

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

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Caracterización molecular de los productos del gen *DMD*; Dp71a,
Dp71c y Dp40 en células PC12”**

TESIS

Que presenta

ALEJANDRO MARTÍNEZ HERRERA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de la Tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

México, D. F.

AGOSTO, 2015

AGRADECIMIENTOS.

El alumno que sustenta la presente tesis agradece al CONACYT por haber sido apoyado con la beca No. 173195, sin la cual no habría sido posible la obtención del grado. Así mismo al apoyo de los proyectos CONACyT CB-2009-127600 y SEP-CONACYT-ECOS-ANUIES M11-S02 B000/064/12.

A la Dra. Cecilia Montañez, por haber confiado en mí persona para formar parte de su grupo de trabajo.

Con especial mención a los auxiliares de Investigación; Dr. Francisco Depardón† y Víctor Ceja, por haberme brindado su amistad y por haber influido de manera positiva en mi formación.

Al grupo de trabajo de la Dra. Cecilia Montañez por haber colaborado durante mi estancia en el laboratorio y que culminó en la presentación de esta tesis.

Mi más sincero agradecimiento a los distinguidos Doctores asesores de este trabajo por sus atinadas y oportunas observaciones.

A mi familia, por su paciencia y apoyo demostrado.

Al Sr. Adalberto Herrera, Gabriela Mora, Guadalupe Aguilar e Iván Galván Mendoza por el apoyo técnico recibido durante el desarrollo del presente trabajo y por su valiosa amistad brindada.

DEDICATORIA.

El presente trabajo está dedicado a la memoria de mi padre el Sr. Fernando Catalino Martínez Méndez, 30 de abril de 1937-12 de mayo del 2015†.

INDICE.

SECCIÓN	PÁGINA
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES DIRECTOS	22
JUSTIFICACIÓN	25
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y METODOS	25
RESULTADOS	33
DISCUSION	67
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFIA	80

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1.- Localización subcelular de las isoformas Dp71a, Dp71c y Dp40n en células PC12.....	34
Figura 2.- Detección de las proteínas recombinantes Xpress-Dp71a, Xpress-Dp71c, Xpress-Dp40n y Xpress- Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12 transfectadas de manera estable.....	35
Figura 3.- Reacciones de PCR del DNA genómico de cada una de las clonas estables obtenidas transfectadas con los vectores 4hisMaxTopo-TA-Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y Dp40n.....	36
Figura 4.- Reacciones de RT-PCR a partir del RNA total de las clonas estables.	36
Figura 5.- Inmunodetección en fase solida de las proteínas recombinantes Xpress-Dp71a, Xpress-Dp71c y Xpress-Dp40.....	37
Figura 6.- Expresión del mRNA de Dp40 en células PC12.....	39
Figura 7.- Secuenciación de los cDNAs de Dp40 obtenidos a partir de células PC12.	41
Figura 8.- Secuencia de aminoácidos de los cDNAs de Dp40 aislados a partir de las células PC12.....	42
Figura 9.- Distribución subcelular de las proteínas Xpres-Dp40n y Xpress-Dp40c en células PC12 sin diferenciar.....	45
Figura 10.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp40n-1 y Xpress-Dp40c-1 en células PC12 sin diferenciar.....	46
Figura 11.- Localización subcelular de las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c en células HeLa.....	47
Figura 12.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c en células PC12 diferenciadas por 72 Hrs con NGF.....	48
Figura 13.- Alineamiento de las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c.....	50
Figura 14.- Distribución subcelular de las proteína mutantes Xpress-Dp40cL93/170P en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas con NGF por 72 Hrs.....	51
Figura 15.- Distribución subcelular de las proteína mutantes Xpress-Dp40cL93P y Xpress-Dp40cL170P en células PC12 sin diferenciar.....	52
Figura 16.- Ensayos de co-localización entre las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c con β -Distroglicano en células PC12 no diferenciadas.....	53
Figura 17.- Ensayos de co-localización entre las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c con β -Distroglicano en células PC12 diferenciadas con NGF.....	54

Figura 18.- Ensayos de co-localización entre la proteína Xpress-Dp40n y lamina A/C en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas con NGF.....	55
Figura 19.- Efecto de diferentes concentraciones de ActD sobre la proteína nuclear hrnpA1 en células PC12.....	57
Figura 20.- Efecto de ActD sobre la co-localización de las proteínas Xpress-Dp40n y Myc-Dp40n con el DNAg en células PC12 sin diferenciar.....	58
Figura 21.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71a4 en células PC12 sin diferenciar.....	63
Figura 22.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71a4 en células PC12 diferenciadas con NGF por 72 Hrs.....	64
Figura 23.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71c y Xpress-Dp71c-5 en células PC12 sin diferenciar.....	65
Figura 24.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71c y Xpress-Dp71c-5 en células PC12 diferenciadas con NGF por 72 Hrs.....	66
Figura 25.- Análisis de alineamiento entre las proteínas Dp40 encontradas en las células PC12 y la proteína Dp40 humana.....	72
Figura 26.- Modelaje tridimensional de las proteínas Dp40c, Dp40c-1, Dp40n y Dp40n-1 de Dp40 aisladas a partir de células PC12.....	73
Figura 27.- Modelo del dominio DGB de distrofina.....	74
Tabla 1. Relación de cambios en el cDNA de Dp71a encontrados en células PC12.	60
Tabla 2. Análisis <i>in silico</i> de los cambios de un nucleótido encontrados para Dp71a en células PC12.....	60
Tabla 3. Relación de los cambios de cDNA de Dp71c encontrados en células PC12.	61
Tabla 4. Análisis <i>in silico</i> de los cambios de un nucleótido encontrados para Dp71c.	61

RESUMEN.

El gen *DMD* se encuentra localizado en el cromosoma X y codifica para una familia de proteínas llamadas distrofinas. El déficit de la proteína más grande; Dp427 es responsable de la patología conocida como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), la cual se caracteriza por una degeneración muscular progresiva. La prevalencia de DMD se estima es de 1 por cada 3500 varones. En el 45% de pacientes con DMD se han identificado problemas cognitivos. Existen varios reportes acerca de que las isoformas más cortas del gen; Dp71 y Dp40 pueden desempeñar un papel importante en los problemas neurológicos mediante la organización y localización de proteínas especializadas en señalización, útiles en la función neuronal. El presente trabajo tiene por objetivo caracterizar la expresión y localización de las isoformas de Dp71; Dp71a, Dp71c y Dp40 en el modelo celular PC12, este modelo es útil para estudiar procesos de diferenciación neuronal *in vitro*, ya que las células responden de manera reversible al factor de crecimiento neuronal (NGF), generando células tipo neuronas. Con el fin de cumplir esto, se aislaron los mensajeros específicos para estas proteínas mediante ensayos de RT-PCR, para ser clonados y analizados por secuenciación. Esta estrategia permitió el aislamiento y caracterización de los cDNAs que codifican para las distrofinas Dp71a, Dp71c y Dp40. Adicionalmente se aislaron cDNAs con modificaciones en la secuencia nucleotídica, los cuales presentaron alteraciones en algunos residuos de aminoácidos de la proteína para la cual codifican. Los cDNAs aislados fueron clonados en vectores de expresión para transfectar células PC12 y determinar la localización de las proteínas recombinantes mediante ensayos de transfección transitoria e inmunofluorescencia indirecta. Los resultados demostraron la presencia de cDNAs para Dp40 que codifican para dos tipos de proteínas, un tipo corresponde a proteínas localizadas en la periferia celular y otro tipo corresponde a proteínas con localización nuclear. Un análisis detallado de las diferencias a nivel de proteínas generado por estos cDNAs, indicaron que los dominios EF-Hand 1 y EF-Hand 2, juegan un papel trascendental en la localización de la Dp40. Esta misma estrategia permitió el estudio de Dp71a y Dp71c, las cuales se localizaron en el citoplasma/núcleo y en la periferia celular respectivamente, tanto en células sin diferenciar así como diferenciadas con NGF. La presente tesis también describe procedimientos experimentales para obtener células transfectadas de manera estable en las células PC12. Las variaciones encontradas en los productos del gen *DMD* estudiados pudieron deberse a mutaciones, no obstante se discute la importancia de tales cambios así como su

contribución al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la localización subcelular de las distrofinas.

ABSTRACT.

The *DMD* gene is located on the X chromosome and encodes for a family of proteins called dystrophins. The deficit of the largest protein; Dp427 is responsible for the pathology known as Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), which is characterized by progressive muscle degeneration. The estimated prevalence of DMD is 1 for 3,500 males. Cognitive problems have been identified in 45% of patients with DMD. There are several reports related to the shorter isoforms of this gene; Dp71 and Dp40, play an important role in neurological problems through the organization and location of specialized signaling proteins. This work aims to characterize the expression and localization of Dp71 isoforms; Dp71a, Dp71c and Dp40 in PC12 cells, a model useful for studying neuronal differentiation *in vitro*, these cells respond reversibly to nerve growth factor (NGF), generating neuron like cells. To accomplish this, specific mRNAs were isolated by RT-PCR, to be cloned and analyzed by sequencing. This strategy allowed the isolation and characterization of Dp71a, Dp71c and Dp40 cDNAs, additionally cDNAs with several single nucleotide changes, altering amino acid residues in the protein for which it encoded. The isolated cDNAs were cloned into the expression vectors to transfect PC12 cells and to determine the location of the recombinant proteins by using transient transfection assays and indirect immunofluorescence. The results showed the presence of Dp40 cDNAs encoding for two types of proteins; one type corresponding to proteins located in the cell periphery and other for proteins with nuclear localization. A detailed analysis of the differences at the protein level generated by these cDNAs indicated that, the EF-1 and EF-2 Hand domains play a major role in the location of Dp40. The same strategy allowed the study of Dp71a and Dp71c, which were located in the cytoplasm/nucleus and in the cell periphery respectively, this was observed in un-differentiated as well in differentiated cells exposed to NGF. This thesis describes experimental procedures for obtaining stably transfected PC12 cells. The sequence variations found in *DMD* gene products studied here, could be due to mutations events. These contributions expand our knowledge about the molecular mechanisms related with the dystrophin cellular localization.

INTRODUCCIÓN

Las distrofias musculares son un grupo grande y heterogéneo de desórdenes hereditarios que comparten características patológicas tales como; debilidad músculo-esquelética progresiva y defectos en la conducción cardíaca. Estas enfermedades se clasifican por su modo de herencia, la edad de comienzo del padecimiento así como el grupo de músculos que se afectan primero. A nivel celular, se pierde la integridad de la célula muscular como resultado del rompimiento de la estructura del sarcolema ¹. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, que se caracteriza por una degeneración progresiva de los músculos y muerte en la segunda o tercera década de la vida. La DMD es una de las enfermedades genéticas más comunes en humanos afectando aproximadamente a 1 de cada 3500 niños ². Además de la degeneración muscular este padecimiento presenta manifestaciones no musculares como es el caso del retraso mental ³, anomalías en la retina ⁴, enfermedades del corazón ⁵, y posibles defectos auditivos ⁶. Un estudio de 50 pacientes con DMD revela que el 45% posee un coeficiente intelectual que puede ser considerado por debajo de lo normal ⁷.

El gen *DMD*

El gen *DMD* se localiza en el brazo corto del cromosoma X y abarca > 2.2 Mb. En el humano, este gen es el más largo dentro de los que se han caracterizado, comprendiendo cerca del 0.1 % del genoma ⁸. En el músculo, el mRNA de longitud completa tiene un tamaño de 14 Kb y codifica para una proteína de 427 kDa llamada Distrofina, la cual está formada por 3685 aa y constituye aproximadamente el 0.002 % de la proteína muscular total. El gen de la distrofina tiene al menos 79 exones. La ausencia de la distrofina en el músculo es el primer defecto bioquímico en pacientes con esta enfermedad.

La distribución de las mutaciones que provocan los rearrreglos de la distrofina en la DMD no es azarosa, se conoce la existencia de dos sitios “hot-spots” que presentan una alta frecuencia de mutación, uno de ellos está ubicado en el extremo 5´ y comprende los exones 2 al 20, con muchos puntos de ruptura en los intrones 1 y 7. El segundo sitio se localiza a dos tercios del gen hacia el extremo 3´ y comprende los exones 45 a 53, con varios puntos de ruptura en los intrones 44, 45, 47 y 50 ^{9,10}. Las eliminaciones en los sitios “hot-spots” hacia el extremo 3´ son resultado de una recombinación meiótica que se produce en el exón 44, esta recombinación ocurre a una frecuencia 12 veces mayor que en otros sitios ¹¹.

La Distrofina.

El producto del gen *DMD* es la distrofina, esta proteína presenta cuatro dominios; el dominio N terminal con 240 aa, el cual es homólogo al dominio de la α -actinina que une actina (residuos 1-220 de la distrofina humana). Los 220 aminoácidos presentes en el amino terminal de la Distrofina y Utrofina, incluidas las Distrofinas de invertebrados, muestran homología con regiones de unión a actina de las familias espectrina y α actinina, y ambas proteínas comprenden dos dominios con homología a calponina en tándem. Se ha demostrado que este dominio se une a filamentos de actina con una marcada preferencia para formas no musculares de actina. El dominio central o similar a espectrina está formado por 24 segmentos triple hélice de 109 aa cada uno (residuos 338-3,055). Más del 70% de la longitud de la distrofina corresponde al dominio repetido, semejante a una versión del repetido de espectrina¹². Estos repetidos de aproximadamente 110 aminoácidos, son semejantes a sus contrapartes de espectrina, y forman un haz de tres hélices anti paralelas. Estudios de microscopía electrónica confirman que como las espectrinas, la región repetida de la Distrofina es responsable de conferir a esta proteína una forma semejante a un bastón de aproximadamente 110-170 nm de longitud¹³. El tercer dominio es el dominio rico en cisteína y está formado por 150 aa siendo similar al dominio C terminal de la α -actinina de *Dictiostelum* (residuos 3,056-3,354). Al final del dominio central existe una región altamente conservada que corresponde a una característica clave de la familia de proteínas Distrofina/Distrobrevina. La región está formada por los siguientes sub dominios; un dominio WW pequeño (cerca de 40 aa), compuesto por láminas β y situado después de dos residuos conservados de triptófano, éste usualmente une “*motifs*” ricos en prolina. Un *motif* “hands-EF”, el cual comprende horquillas de α hélice, que es dependiente de calcio¹³. Finalmente un dominio ZZ, el cual se ha encontrado en un gran número de proteínas. Su estructura es reforzada por la coordinación del Zn^{+2} por las cisteínas, en las Distrofinas de vertebrados se encuentran cuatro mientras que en las de invertebrados y Distrobrevinas se presentan seis¹³. Estudios funcionales muestran que el dominio rico en cisteínas media la interacción entre la Distrofina y el extremo intracelular del β Distroglicano, un componente transmembranal de las DAPs (proteínas asociadas a distrofinas). Este es probablemente el sitio crítico de anclaje a la membrana para las distrofinas y la pérdida de esta interacción resulta en un fenotipo nulo¹³. El cuarto dominio corresponde al C terminal el cual está formado por 420 aa y presenta gran similitud con el dominio correspondiente a Utrofina (residuos 3355-3685). La región carboxilo terminal contiene dominios de unión a proteínas del tipo

“coiled-coil”, en esta región se localizan los sitios de unión a la familia de proteínas; Sintrofinas y Distrobrevinas. Estas proteínas son encargadas de reclutar diversas proteínas de señalización tales como la óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS), Grb2, así como canales iónicos, tales como los canales de Na^+ estimulados por voltaje y una serin/treonin cinasa asociada a microtúbulos ¹⁴⁻¹⁶. El segmento de unión a Sintrofina (exones 73 al 75), está sujeto a un patrón complejo de procesamiento alternativo tanto en las Distrofinas como en las Distrobrevinas. La estequiometría del complejo entre Distrofina y Sintrofina está regulada. Este segmento es seguido por dos grupos de motifs con 7 leucinas helicoidales, los cuales son responsables de la interacción homotípica entre Distrofinas y Distrobrevinas ¹⁷.

La Distrofina se encuentra en todos los tipos de células musculares y se localiza en la cara citoplasmática del sarcolema. En el músculo esquelético, la Distrofina se une al citoesqueleto a través de su interacción con F-actina, mientras que su dominio C terminal se encuentra unido a un complejo oligomérico de proteínas, las cuales se conocen colectivamente como proteínas asociadas a distrofina o DAPs. Este complejo incluye a los subcomplejos; Distroglicano, Sarcoglicano, Sintrofinas, Distrobrevinas y una proteína de 25 kDa conocida como Sarcospan. Debido a su localización, se ha propuesto que las DAPs junto con la Distrofina sirven como un puente de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular estabilizando el sarcolema durante ciclos repetidos de contracción y relajación y transmitiendo la fuerza generada en los sarcómeros musculares a la matriz extracelular ¹⁸. Existen evidencias de que las DAPs están involucradas en procesos de señalización celular a través de sus interacciones con calmodulina, Grb2 y nNOS ¹⁹.

A partir de la identificación de la Distrofina y su localización cercana a la superficie interna de la membrana plasmática, se ha investigado su papel fisiológico en la membrana celular. Estos estudios se han enfocado principalmente a la patofisiología muscular que se presenta en DMD y en modelos animales, donde la proteína está ausente o presente en una forma no funcional. Estos trabajos han dado lugar a proponer diferentes mecanismos que explican los cambios patológicos en el músculo con deficiencia en los niveles de Distrofina. Algunas de las teorías más aceptadas establecen que la Distrofina se requiere para mantener la estabilidad mecánica del músculo, para agrupar canales iónicos y que está involucrada en la homeostasis del Ca^{+2} ^{20,21}.

La carencia de Distrofina resulta en la pérdida secundaria de componentes de las DAP's que se localizan en la membrana, causando en conjunto un síndrome letal de miopatía cardíaca y esquelética (involucrando rupturas en la membrana, muerte celular, falla en la regeneración y fibrosis), ceguera nocturna, retraso mental, defectos en la circulación cardíaca, así como defectos en el músculo liso ¹³. Se han observado alteraciones en los niveles de expresión de una multitud de metaloproteinasas (MMPs), que comprenden a una familia de endopeptidasas extracelulares de pendientes de Zn^{2+} , en particular de la MMP-2 y MMP9, también conocidas como gelatinasas. Estas enzimas actúan sobre el ectodominio del β -Distroglicano llevando a su degradación y alterando la unión del complejo DAPs con la matriz extracelular, teniendo importantes repercusiones sobre el sistema nervioso central y periférico. De lo anterior, se desprende la importancia del implemento de estrategias terapéuticas encaminadas a la regulación de estas enzimas con la finalidad de aliviar las complicaciones observadas en las distrofias musculares ²².

Se han descrito al menos ocho promotores diferentes que regulan la transcripción de *DMD* y que dan lugar a distrofinas de diferente longitud de una manera tejida específica; cuatro de estos están localizados en el extremo 5' del gen y regulan la expresión de las Distrofinas de longitud completa como son la distrofina de tipo muscular, cerebral, de Purkinje y la denominada L-distrofina. Dos promotores más están localizados a nivel del dominio similar a espectrina y regulan la expresión de Dp260 la cual se presenta en retina y Dp140, que está presente en el sistema nervioso central. Finalmente otros dos promotores adicionales regulan la expresión de Dp116 que se expresa en nervios periféricos y Dp71 que es la más ubicua y se expresa principalmente en tejidos no musculares siendo la distrofina que se expresa en niveles más elevados en el cerebro ²³.

Todos los miembros de la familia de las Distrofinas, parecen estar asociados a la membrana, la Distrofina en vertebrados está localizada en la membrana plasmática de células del músculo liso, cardíaco y esquelético ²⁴ y un grupo de sinapsis en el sistema nervioso central. Las tres isoformas de Distrofina; Dp260, Dp140 y Dp116 carecen del dominio de unión a actina, pero contienen una porción del dominio "rod" y retienen los dominios ricos en cisteína y C-terminal ²⁵⁻²⁷. La isoforma Dp71 tiene únicamente siete residuos en el N-terminal, fusionados a los dominios ricos en cisteína y C-terminal ^{28,29}.

La Utrofina

Un homólogo autosómico de la Distrofina, la Utrofina, está codificada por el cromosoma 6 y se ha demostrado que también interactúa con las DAPs³⁰. La utrofina tiene organización intron-exon casi idéntica a la distrofina, la diferencia entre ambas proteínas radica en que la utrofina presenta 22 repetidos de espectrina, mientras que la distrofina posee 24¹³. La utrofina está localizada en la unión neuromuscular³¹, en donde las interacciones de esta proteína con las DAPs, rapsina y agrina permiten el agrupamiento de receptores de acetilcolina nicotínicos en los pliegues de unión de la membrana post sináptica³², formando un complejo de proteínas asociado a utrofina (UAPs). Los complejos DAPs y UAPs mantienen la estabilidad de la membrana plasmática durante los procesos de contracción y juegan un papel importante en la señalización transmembranal. Recientemente fue descrito un estudio donde se demuestra la existencia de un complejo UAPs en dominios de balsas lipídicas en células del músculo liso de arteria umbilical humana, el cual está constituido por; utrofina, β -dístroglicano, ϵ -sarcoglicano, actina de músculo liso tipo alfa, Cav 1, sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y cavin-1. Este complejo participa en la regulación de eNOS y en la función vascular.³³

Miembros del complejo DAPs

Como se mencionó anteriormente, las distrofinas forman parte de un complejo que incluye proteínas integrales de membrana (Dístroglicanos y Sarcoglicanos) así como proteínas periféricas (Dístrobrevinas y Sintrofinas).

El complejo Dístroglicano. El sostén del complejo DAPs, es la unión transmembranal generada por la presencia de α y β Dístroglicanos. Estas proteínas actúan para formar un eslabón integral en el sarcolema, localizando a la Distrofina en la región subsarcolemal. Una región rica en prolina en el extremo C-terminal del β -Dístroglicano, media su interacción con Distrofina y sus isoformas. Así como en el complejo del músculo, la unión es mediada por el dominio WW de la Distrofina estabilizada por la región adyacente “hand-EF”.

El gen que codifica para los Dístroglicanos está compuesto de 2 exones y estos se expresan como una sola proteína o pro péptido de 160 kDa, el cual sufre un procesamiento post-traduccional en el que la proteína se divide en dos para formar el α -Dístroglicano, una glicoproteína extracelular de membrana de 140 kDa y el β -Dístroglicano, proteína

transmembranal de 43 kDa^{34,35}. El α -Distroglicano se une a la matriz extracelular a través de los dos últimos dominios G de la cadena $\alpha 2$, de la proteína laminina-1 y se presume que la unión ocurre mediante residuos de carbohidratos del α -Distroglicano. Ubicado en esta región, se cree que el α -Distroglicano se asocia directamente con el β -Distroglicano a través de interacciones covalentes múltiples. El β -Distroglicano atraviesa la membrana y se une directamente a la Distrofina, mediante los últimos 15 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal del β -Distroglicano, con el dominio WW (Trp-Trp Exones 62 y 63) y los sitios de unión a Ca^{+2} de la Distrofina³⁶.

El carboxilo terminal del β -Distroglicano se une también a la proteína adaptadora Grb2. Esta interacción es mediada por el dominio SH3 de Grb2 que se une a secuencias ricas en prolina en el extremo citoplásmico del β -Distroglicano. Esta interacción genera la posibilidad de que el β -Distroglicano pueda participar en la transducción de señales extracelulares al citoesqueleto del músculo.

Caveolina-3. Se ha descrito recientemente que la caveolina 3 se une al β -Distroglicano³⁷. Las caveolas son invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática que se encuentran en muchos tipos celulares. La proteína formadora de la caveola en el músculo esquelético es la caveolina-3, y aunque tradicionalmente es considerada distinta al complejo DAPs, varios estudios sugieren una relación importante con éste. La caveolina-3 interacciona directamente con el C-terminal del β -distroglicano, co-purifica con Distrofina y α -Sarcoglicano y presenta una expresión elevada en pacientes con DMD. Ratones transgénicos que sobre-expresan caveolina-3, presentan una patología semejante a la DMD, sugiriendo que puede ocurrir una subregulación de Distrofina en el sarcolema. Mutaciones en caveolina-3 están asociadas con la Distrofia Muscular Limb-Girdle³⁸.

El complejo Sarcoglicano-Sarcospan. En el músculo esquelético y cardiaco, el complejo de Sarcoglicano está compuesto por cuatro glicoproteínas transmembranales α -, β -, γ -, y δ -Sarcoglicano y un miembro de la familia tetraspan de proteínas llamado Sarcospan. La estructura primaria de los Sarcoglicanos indica que el α (50 kDa) y ϵ (45 kDa) sarcoglicanos son proteínas transmembranales tipo 1, mientras que el β ³⁵, γ (35 kDa) y δ (35 kDa) sarcoglicanos son proteínas transmembranales tipo 2. Todas estas proteínas tienen una topología similar, poseen un dominio extracelular grande y un dominio

intracelular pequeño separado por un dominio transmembranal. Este grupo de proteínas posee sitios potenciales de N-glicosilación en el dominio extracelular, además α , β , γ y ε -sarcoglicanos poseen sitios potenciales de fosforilación en el dominio citoplásmico y β , γ y δ -Sarcoglicanos poseen un grupo de residuos de cisteínas en la región C-terminal³⁹.

En ratones se ha observado el desarrollo de un tipo de Distrofia Muscular que se caracteriza por déficit en: α , β o γ -sarcoglicanos⁴⁰. En estos ratones los niveles de Distrofina y Distroglicano presentes en el sarcolema parecen ser normales, sugiriendo que la deficiencia de Sarcoglicano contribuye directamente a la patogénesis de la enfermedad y no involucra la alteración de otras proteínas del complejo. En humanos, las mutaciones en cada uno de los genes que codifican para los Sarcoglicanos causan diferentes formas de Distrofia Muscular de tipo “Limb-girdle” (LGMD). Interesantemente individuos con LGMDs relacionados a Distrofinas, no parecen tener retraso mental. Esta observación es importante debido a que apoya la idea de que la deficiencia primaria de Distrofinas, es la causa de las anomalías en el sistema nervioso central en la DMD y es consistente con el papel que se ha adjudicado actualmente al complejo de Sarcoglicanos, que está restringido al músculo². No obstante, el grupo de Fort *et al*⁴⁰ demostró la expresión a nivel de mRNA de β -, δ -, γ -, y ε -sarcoglicanos junto con sarcospan en la retina de ratón. Estas proteínas se localizan en las membranas limitantes internas y externas, en las células de Müller así como en los axones de las células ganglionares donde no se ha reportado la expresión de Distrofinas. Los ensayos en el modelo de ratón *mdx*^{3cv} indican que la expresión y localización del complejo Sarcoglicano-sarcospan es independiente de las distrofinas en la retina.

Sarcospan. El sarcospan es una proteína membranal de 25 kDa con un papel importante como regulador de la adherencia, fuerza y regeneración de la célula muscular. Las investigaciones que utilizan varios modelos de ratones transgénicos demuestran que la sobreexpresión de esta proteína en el modelo de ratón *mdx*, restaura la unión de las células del músculo a la laminina, aminorando la patología. El Sarcospan mejora la expresión de los complejos DAPs y UAPS en la superficie celular, así como también la $\alpha 7\beta 1$ integrina, los cuales son los tres principales complejos de unión a laminina en el músculo. La utrofina y la integrina $\alpha 7\beta 1$ compensan la pérdida de la distrofina y el hallazgo de que el sarcospan incrementa su expresión en el sarcolema, fortalece la idea del uso de sarcospan como blanco terapéutico. Estudios hechos en ratones deficientes en sarcospan demuestran una

reducción de la fuerza y un incremento en la caída del vigor en el musculo del diafragma, así como un decremento en los niveles de expresión de utrofina y distrofina, revelando así el papel de sarcospan en la determinación de la abundancia de estos complejos. El proceso de regeneración muscular es dependiente de la señalización por Akt y el Sarcospan es el principal regulador de esta vía. De manera interesante, Sarcospan regula la glicosilación de una subpoblación específica de α -dystroglicano, que es el receptor de unión a laminina asociado con la Distrofina y Utofina en la unión neuromuscular ^{41,42}.

Sintrofinas. La familia de las Sintrofinas está compuesta por 5 miembros, α -, β 1-, β 2, γ 1-, y γ 2-sintrofina. Las Sintrofinas se asocian con la Distrofina, Utofina y la Distrobrevina. Estas proteínas tienen un papel estructural y se supone que también de señalización ⁴³⁻⁴⁶. Las Sintrofinas se han dividido en dos clases en base a su punto isoeléctrico; la Sintrofina acídica α 1 (PI \approx 6.7) y las Sintrofinas básicas β 1 y β 2 (PI \approx 9.0). Cada una de estas proteínas es codificada por un gen distinto ⁴⁷. Estas proteínas funcionan como proteínas adaptadoras, dado que cada isoforma de Sintrofina, consiste casi completamente de los dominios PH (dominio de homología con plectrina), un dominio PDZ y una secuencia altamente conservada de 56 aminoácidos en el extremo C-terminal específico de Sintrofina ^{48,49}. La asociación mejor caracterizada de Sintrofinas se presenta entre su dominio PDZ y el de los canales de sodio dependientes de voltaje del músculo SKM1 y SKM2 ¹⁵, así como la nNOS ^{14,50}. Las tres Sintrofinas muestran patrones de expresión diferentes siendo la expresión de α Sintrofina alta en el músculo estriado, bajo en el cerebro y apenas detectable en otros tejidos, mientras que la β 1 Sintrofina se expresa en diferentes tejidos, con una expresión baja en el cerebro. Finalmente, la β 2 Sintrofina está presente en varios tejidos en concentraciones altas en el cerebro, mientras que en el músculo esquelético, está restringida a las uniones neuromusculares ^{46,51}.

Un reporte de Piluso *et al* ⁵² identificó dos isoformas de Sintrofina adicionales, γ 1 y γ 2. Mediante análisis por “Northern blot”, se detectó que la γ 1-sintrofina se expresa únicamente en el cerebro, mientras que la γ 2-sintrofina tiene una distribución más amplia. Estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos, han mostrado que la γ 1-sintrofina se expresa exclusivamente en neuronas y aunque la γ 1-sintrofina se une al carboxilo terminal de miembros de la familia de distrofinas, esta no interactúa con la nNOS a través de sus dominios PDZ.

En ensayos bioquímicos, se encontró que el carboxilo terminal de la diacilglicerol cinasa- ζ ⁵³, la cual contiene un motivo de unión tipo PDZ, se une a la γ 1-sintrofina. Cuando son co-expresadas la DGK- ζ y γ 1-sintrofina en células Hela, forman un complejo estable que se localiza entre el citoplasma y el núcleo. DGK- ζ se relocaliza del citoplasma al núcleo por un proceso regulado negativamente por la proteína cinasa C. La DGK- ζ , recluta a la Sintrofina en el núcleo vía sus dominios PDZ, el rompimiento de esta unión altera la localización intracelular de ambas proteínas; la DGK- ζ se acumula en el núcleo, mientras que la γ 1-sintrofina permanece en el citoplasma. Además, experimentos de co-inmunoprecipitación sugieren que DGK- ζ , γ 1-sintrofina, y Dp71 forman un complejo ternario⁵³.

Distrobrevinas. La Distrobrevina fue inicialmente identificada como una proteína de 87 kDa que co-purifica con el receptor de acetilcolina del órgano eléctrico de *Torpedo californica*. La clonación de esta proteína mostró que la Distrobrevina era una proteína relacionada a Distrofina ya que presenta una homología a nivel de proteína en el carboxilo terminal de la Distrofina⁵⁴. La familia de Distrobrevinas se une directamente a la familia de Distrofinas en el músculo, cerebro y otros tejidos, la interacción ocurre vía uno de los dos grupos de 7 leucinas helicoidales de la región “coiled coil”¹³. La familia de Distrobrevinas incluyen a una proteína en invertebrados y dos proteínas relacionadas (α y β Distrobrevinas) en vertebrados¹³. La especificidad de la Distrobrevina α ó β , es dependiente de la isoforma de Distrofina presente en la región del tejido. La isoforma principal de β -Distrobrevina se ha encontrado en neuronas y en la formación del hipocampo, más asociada probablemente con la Distrofina de longitud completa⁵⁵. Estudios de co-inmunoprecipitación han identificado α -Distrobrevina, en particular la α Distrobrevina 1, como el compañero de unión a la Dp71 en células gliales de Bergman⁵⁶. Se piensa que se asocia con Utrofina en astrocitos perivasculares. Experimentos de co-inmunoprecipitación han revelado que Dp140 se asocia a la β -Distrobrevina, aunque esta proteína no se encuentra en el tejido micro vascular. Se ha demostrado también una asociación de β -Distrobrevina con Utrofina. En el cerebelo la β -Distrobrevina tiene una localización nuclear, probablemente asociada con la Dp71d³².

Sincoilina. La sincoilina fue identificada a través de su interacción con α -dystrobrevina en el músculo⁵⁷. El Análisis de su secuencia reveló la presencia de un dominio único N-terminal y un dominio tipo coiled-coil, que es típico de aquellos

encontrados en proteínas de filamentos intermedios. La sincoilina se expresa en altos niveles en músculo esquelético, cardíaco y músculo liso en el sarcolema, líneas Z y uniones neuromusculares. Se piensa que la Sincoilina a través de su interacción con Desmina, provee un enlace entre las DAPs en el sarcolema y la red de filamentos intermedios⁵⁸. Su sobre regulación en un grupo de Distrofias Musculares, puede ser un mecanismo compensatorio en contra del daño muscular.

Proteínas que interaccionan con las DAPs.

nNOS. La producción de óxido nítrico por la nNOS es importante para el incremento local del flujo sanguíneo, para contrarrestar el incremento en la carga metabólica de los músculos en contracción que se presenta durante el ejercicio. La presencia de nNOS en el sarcolema es mediada por su interacción PDZ con Sintrofina y esta interacción se pierde en un gran número de Distrofias Musculares incluyendo la DMD. Además, pacientes con DMD muestran constricción anormal de vasos sanguíneos presumiblemente debido a la pérdida de nNOS en el sarcolema⁵⁹. Esta es la única proteína conocida que se correlaciona tan cercanamente con un grupo de Distrofias específicas. Esta observación concuerda con el supuesto papel del complejo DAPs en la señalización y la contribución del estrés isquémico en la degeneración muscular. Sin embargo, la abolición de la expresión de nNOS en ratones no causa Distrofia^{60,61}

Laminina 2. La laminina 2 está compuesta de las cadenas $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\gamma 1$ que unen a α -dístroglicano y al complejo $\alpha 7\beta 1$ integrina. Se piensa que las lamininas forman parte estructural de las membranas basales junto con la colágena tipo IV, nidogen y perlecano. Mutaciones del gen de laminina $\alpha 2$ generan Distrofia Muscular congénita severa, pero no parecen causar daño al sarcolema⁶².

La proteína Dp71

La proteína Dp71 se identificó por primera vez en la línea celular HepG2. Es la isoforma de distrofina más ubicua y la que se expresa en mayor nivel en el sistema nervioso central. Dp71 es el producto principal del gen *DMD* que se detecta durante el desarrollo esto es, se expresa en células pluripotenciales embrionarias además, durante el desarrollo temprano muestra una distribución confinada al sistema nervioso, así como en tejidos no musculares incluyendo el cerebro y la capa limitante interna de la retina.

La proteína Dp71 carece de los dominios N-terminal y similar a espectrina, presenta únicamente el dominio rico en cisteína y C terminal de las Distrofinas y como ya se mencionó, este dominio es de suma importancia debido a que une al complejo de las DAP's. La Dp71 presenta un primer exón único que codifica para siete nuevos aa hacia su extremo N terminal. Algunos estudios señalan que Dp71 se encuentra glicosilada y que está asociada con la membrana de las células HepG2, Hela y astrocitos ⁶³.

La expresión de Dp71 está regulada por un promotor de tipo “house Keeping” localizado en el intrón 62 del gen *DMD* el cual no contiene caja TATA y presenta un alto contenido en GC así como varios sitios potenciales de unión a Sp1, lo cual resulta en la expresión en una amplia variedad de tejidos. Dp71 está presente en el cerebro, retina, pulmón, hígado, riñón, testículos y músculo liso ⁶⁴.

El mRNA de Dp71 consta de 4.5 Kb y en varios tejidos se presenta un procesamiento alternativo de los exones 71, 71 al 74 y 78, presentes en la región codificante 3' del transcrito. El procesamiento alternativo modifica el extremo C-terminal de la Dp71 y se ha demostrado que el procesamiento del exón 78 provoca un cambio en el marco de lectura que resulta en la sustitución de los últimos 13 aminoácidos hidrofílicos, por una secuencia hidrofóbica específica de 31 aminoácidos llamada secuencia “founder”, así la isoforma Dp71 que carece del exón 78 se ha denominado Dp71f; mientras que la isoforma que presenta este exón se ha denominado Dp71d.

Una isoforma adicional de la Dp71 se reportó en un estudio realizado por Ceccarini *et al* ⁶⁵, en donde se demostró la existencia de dos transcritos de la Dp71 procesados alternativamente: uno de 2.1 y el otro de 1.8 Kb, a partir de diferentes áreas de tejido neuronal humano. Ambos transcritos carecían de los exones 71 y 78, el transcrito más corto carecía adicionalmente de los exones 72 al 74, una región que corresponde al sitio de unión a Sintrofina. Adicionalmente se ha reportado por estudios de PCR en humano y ratón a un transcrito con una eliminación de 330 pb comprendiendo las bases 10432-10761 de la secuencia de distrofina, región que corresponde a los exones 72 al 74 ⁶⁶. Austin *et al* ⁶⁷ clonó y caracterizó una subpoblación de transcritos truncados de la Dp71 que se expresan en el cerebro adulto humano, los cuales no contenían los exones 71-74, resultando en una eliminación de 330 pb. Estos transcritos presentaban un procesamiento alternativo para el exón 78. Un análisis por “inmunoblot” usando anticuerpos específicos

para la región C terminal de la Distrofina, identifico a la Distrofina de longitud completa⁶⁸, Dp140, y Dp71. También fue identificada una banda menor de aproximadamente 58 kDa, denominada Dp71 Δ ₁₁₀. La observación de que un anticuerpo monoclonal, dirigido contra los epítopes de los exones 73-74, no detecto la proteína de 58 kDa, indico que la Dp71 Δ ₁₁₀, es derivada de un transcrito de la Dp71 que carece del dominio de unión a Sintrofina. El grupo de Dp71e incluye a las isoformas Dp71e y Dp71ec, las cuales retienen 34 pb del intron 77 generando un nuevo C-Terminal⁶⁹.

Los niveles de expresión y la proporción de las isoformas procesadas alternativamente varían considerablemente entre los tejidos de humanos adultos⁷⁰. Durante el desarrollo neuronal, la regulación del promotor sigue una actividad estado y tipo celular específico. La expresión de Dp71 se ha detectado en mioblastos, no obstante esta declina durante la miogénesis para evitar interferir con la función de la Distrofina que es el producto dominante del gen *DMD* en fibras musculares diferenciadas. Bermúdez de León *et al.*,⁷¹ investigaron los mecanismos regulatorios transcripcionales que operan sobre la expresión de Dp71, analizando los niveles de proteína y actividad del promotor durante la miogénesis de las células C2C12. Este grupo encontró que tanto la proteína como el transcrito sufrían un decremento en miotubos, como una consecuencia de la regulación negativa, que el proceso de diferenciación tiene sobre el promotor de Dp71.

Diversos reportes han demostrado la asociación de Dp71 con proteínas que forman parte de las DAPs, tales como el β Distroglicano⁶⁵, Distrobrevina⁷² y Sintrofina⁴³, además, la Dp71 tiene en su región amino terminal un sitio que puede unirse con actina³², no obstante la Dp71 no puede sustituir funcionalmente a la distrofina de longitud completa. Aunque la expresión de Dp71 en músculo de ratones transgénicos *mdx*, restaura los niveles de las DAPs, esto no es suficiente para aliviar los síntomas de la degeneración muscular. Estos resultados indican que la Dp71 es capaz de interactuar con las DAPs en una manera similar a la Distrofina, pero su unión a la membrana “*per se*” no es suficiente para desempeñar todos los papeles funcionales de la Distrofina⁷³. Lo anterior sugiere que esta proteína es importante para entender la fisiopatología presente en DMD. Dp71 está involucrada en dos principales fenotipos no musculares presentes en DMD que son: retraso mental y alteraciones de la retina. Diversos datos experimentales provenientes de modelos murino y celulares han generado evidencia de la participación de Dp71 en varios procesos

celulares incluyendo; homeóstasis iónica, señalización celular, adhesión celular, división celular así como mantenimiento de la estructura nuclear⁶³

Se ha sugerido que la ausencia o la estructura alterada de Dp71, es responsable de las alteraciones mentales observadas en cerca del 30% de pacientes con DMD⁷⁴. La localización de las isoformas de la Dp71 se ha analizado en diferentes sistemas. Alemán *et al.*⁷⁵ demostró la localización subcelular de las isoformas Dp71d y f en neuronas del hipocampo y astrocitos en cultivo. Sus resultados demuestran que aunque en baja concentración, Dp71f se expresa en neuronas del hipocampo y astrocitos pero Dp71d está presente en concentración moderada en astrocitos y en alta concentración en neuronas. Mediante inmunohistoquímica este grupo localizó a Dp71f y Dp71d en el Complejo de Golgi y el núcleo neuronal. Únicamente la Dp71d fue encontrada en neurofilamentos citoplásmicos, sugiriendo así que las isoformas de Dp71 pueden tener diferentes funciones en la misma célula u organelo o entre dos diferentes tipos celulares.

Un estudio de García-Tovar⁷⁶ demostró que la Dp71f es una proteína citoplasmática de 70 kDa que se localiza en todas las regiones del encéfalo de las ratas estudiadas. Estudios de doble marcaje con varios marcadores específicos para varios tipos celulares, confirmó la distribución de la Dp71f en el citoplasma de todos los tipos estudiados. El marcaje fue más conspicuo cerca del núcleo y disminuyó hacia la periferia de las células. En extractos citoplasmáticos la Dp71d co-purificó con actina, mientras que Dp71f no. Sin embargo en células U-373 MG que expresan Dp71f, esta proteína co-localiza con actina, β Distroglicano, β 1 integrinas, α actininas y vinculina en complejos de lamelipodios y focales⁷⁷, por otro lado la isoforma Dp71d se encontró estar relacionada con fibras de estrés⁷⁸.

El grupo del Doctor Rendón se ha encargado de analizar la participación de distrofinas y componentes de las DAPs en las células de la glía de Müller, en la retina de rata. Sus estudios han encontrado que estas células expresan únicamente a Dp71 así como a diferentes miembros del complejo DAPs⁷⁹. Acuaporina 4 (AQP4) es el principal canal de H₂O expresado en procesos astrocíticos perivasculares en el cerebro⁸⁰. La presencia de Dp71 en el cerebro parece jugar un papel clave en el anclaje correcto y estabilidad de AQP4 en el fondo de la glía perivascular. Diversos experimentos sugieren que la Dp71 tiene un papel crítico en la localización correcta de AQP4 y la ausencia de Dp71 en el

modelo murino *mdx*^{3cv}, resulta en la inestabilidad de la membrana de moléculas AQP4, generando su ausencia o deslocalización parcial. La reducción de AQP4 asociada con procesos de inflamación de la glía, encontrados en el ratón *mdx*^{3cv}, indica que la homeostasis de H₂O esta alterada severamente. La reducción de AQP4 está involucrada en la modificación cerebral que ocurre en pacientes con DMD, en los cuales mutaciones en la Distrofina involucra a la isoforma Dp71⁸⁰.

Hernández –González *et al*⁸¹, mostraron que el espermatozoide de ratón contiene exclusivamente Dp71. Para elucidar el papel de Dp71, los investigadores estudiaron los espermatozoides del modelo *mdx*^{3cv} y encontraron que la ausencia de Dp71 generaba: 1) un incremento en la morfología flagelar anormal, 2) un incremento en los niveles y redistribución de Up71, α Sintrofina, canales de Na⁺ (micro1), K⁺ (Kv 1.1) y nNOS, y 3) una reducción en los niveles de β -Distroglicano. Los autores mencionan que la sobre regulación de la utrofina Up71, pudiera estar compensado la ausencia de Dp71, formando un complejo Up71-DAPs.

La proteína Dp40.

Tinsley *et al*⁸², describieron la clonación y secuenciación de un transcrito de 2.2 Kb, a partir de una biblioteca de rata y demostraron que la expresión en los tejidos es similar al transcrito de la Dp71, pero a diferencia de otros productos del gen *DMD*, este transcrito se expresa en etapas fetales y en músculo adulto en humanos. Los autores llamaron a este transcrito apo-distrofina 3 (Dp40). Este transcrito se origina a partir de un sitio alternativo de poli A que se encuentra dentro del intrón 70 del gen *DMD*. La traducción de esta región genera un codón de paro en el sitio donador de procesamiento alternativo en el intron 70. La comparación en la secuencia de DNA de la apo-distrofina 3 revelo una conservación alta con la secuencia de Distrofina, codificando el final del repetido No.24, el dominio rico en cisteínas y los primeros 48 aa del carboxilo terminal. El análisis de la secuencia del extremo 5' de 13 aa muestra que es idéntica a la región 5' no traducida y los primeros 7 aa del transcrito de Dp71, lo que sugiere que apo-distrofina 3 puede ser transcrita a partir del promotor de Dp71, ubicado entre los exones 62 y 63 del gen *DMD*. La secuencia del extremo 3' de la apo-distrofina 3, de 13 aa presenta un codón de paro traduccional. El marco de lectura de Dp40 abarca a los exones 63 al 70, carece de la región carboxilo terminal de la proteína completa y codifica para los dominios WW, EF1, EF2 y ZZ, predice una proteína de 341 aa con un peso molecular estimado de 40 kDa.

Por los dominios presentes en Dp40, esta proteína puede interactuar con β -Distroglicano. Existe un reporte de la expresión de Dp40 en cerebro de ratón y su interacción con un grupo de proteínas pre sinápticas involucrando a Dp40 en procesos de exocitosis, las cuales incluyen Sintaxina 1A y SNAP25 proteínas implicadas en la exocitosis de vesículas sinápticas en neuronas⁸³. Un trabajo de Fujimoto *et al*⁸⁴, demostró, usando cerebros de ratón embrionario y en etapa postnatal, que la Dp40 es detectada a nivel de proteína desde tempranos estados neonatales hasta la edad adulta, mientras que Dp71 fue detectada en cerebros provenientes de ratones pre y post natales. Cuando se analizó la localización subcelular de una proteína recombinante de Dp40 sobre neuronas disociadas en cultivo, esta reveló que Dp40 se localiza en el soma y sus dendritas pero no se observó señal en los axones. La proteína Dp40 se localizó a lo largo de la región cercana a la membrana plasmática de los ejes dendríticos así como también en sitios post-sinápticos excitatorios, lo anterior llevo a denominar a Dp40 como una distrofina de tipo neurona involucrada en funciones dendríticas y sinápticas⁸⁴.

Las células PC12.

El modelo celular adoptado por nuestro grupo de trabajo, para el estudio de Dp71 y D40 en el sistema nervioso, es la línea celular PC12. Esta línea proviene de un feocromocitoma de rata, sintetiza una gran cantidad de catecolaminas (dopamina y norepinefrina) y ha sido ampliamente utilizada para investigar los mecanismos celulares y moleculares que conducen a la diferenciación neuronal. Estas células adquieren un fenotipo tipo neuronal simpático, cuando se tratan con el factor de crecimiento neuronal (NGF) producen vesículas sinápticas que contienen dopamina y norepinefrina y sintetizan y secretan acetilcolina. Los cambios provocados por el NGF son rápidos y reversibles ya que después de 24 horas de eliminar éste, la mayoría de las células pierden sus procesos neuríticos^{85,86}.

ANTECEDENTES DIRECTOS.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que las células PC12 expresan a la Dp71 y Dp40 y no otras formas de distrofina^{87,88}. Adicionalmente se ha descubierto que existe un incremento tanto en la expresión del mRNA, como de la proteína durante la diferenciación celular de la línea PC12 tratadas con NGF⁸⁷.

Márquez *et al*⁸⁸, demostraron que en células PC12 se expresan al menos dos isoformas de Dp71, y estas muestran a lo largo de la diferenciación neuronal, una regulación y distribución subcelular diferente. Se demostró que durante el proceso de diferenciación se presenta un incremento de nueve veces en la cantidad de proteína de Dp71f en extractos totales mientras que la Dp71d se incrementó hasta siete veces en extractos nucleares. Este incremento en los niveles de proteína es similar al que presentan otras proteínas asociadas con la diferenciación, como es el caso de las MAP 2, por lo que se puede sugerir que Dp71 tiene una función importante durante la diferenciación en la línea celular PC12.

En estudios de inmunofluorescencia, se observó que Dp71f se encuentra en citoplasma de células no diferenciadas, en tanto en células diferenciadas se encuentra en citoplasma y procesos neuríticos, principalmente en las varicosidades y conos de crecimiento. En células no diferenciadas, Dp71d se encuentra en el citoplasma y en el núcleo a excepción del nucléolo, mientras que a nueve días de diferenciación la mayoría de las células muestran una fuerte inmunoreactividad en el núcleo, aunque también se encuentra una señal presente en el citoplasma y los procesos neuríticos. Dp71f co-localiza con β Distroglicano, sugiriendo una interacción específica entre estas proteínas en células PC12 no diferenciadas⁸⁹.

Se ha observado una co-localización entre Dp71f y sinaptofisina, sugiriendo que Dp71f es una proteína vesicular. Dp71d muestra una fuerte co-localización con β -Distroglicano en el núcleo de células PC12 diferenciadas, además en las regiones de contacto célula-célula, existe una alta concentración de Dp71d mientras que Dp71f se encuentra ausente en esta región⁸⁸.

Para determinar el papel de la Dp71 en células neuronales. Acosta *et al*⁸⁹, reportaron la generación de líneas celulares PC12, en los cuales los niveles de Dp71 fueron controlados mediante la transfección estable con construcciones sentido y anti sentido. Las células Dp71 anti sentido contenían cantidades reducidas de dos grupos de isoformas endógenas de Dp71; Dp71d y Dp71f, así como una supresión en el crecimiento de neuritas bajo la inducción con NGF o dibutilil AMP cíclico. Por otro lado, la expresión de Distrobrevinas en las clonas anti sentido se vio alterada, mientras que el homólogo de la Distrofina, la Utrofina presentaba altos niveles de expresión en comparación con el

plásmido control. Los autores concluyen que la expresión normal de la Dp71 es esencial para el crecimiento de neuritas en células PC12 y su trabajo constituye la primera evidencia directa que implica a la Dp71 en una función neuronal ⁸⁹.

Estudios posteriores han demostrado que las células PC12 producen cinco isoformas de Dp71; la que carece del exón 71 y cuenta con el exón 78 (Dp71d) denominada Dp71a, la que por procesamiento alternativo pierde además del exón 71, el exón 78 Dp71ab (Dp71f), existe una tercer isoforma de Dp71 que se ha denominado Dp71c, isoforma que presenta el exón 78 pero carece de los exones 71 al 74. Existe una cuarta isoforma que carece del exón 71 y 78, presentando un procesamiento alternativo en su región carboxilo-terminal que genera una nueva secuencia de aa no encontrada antes en células PC12, denominada Dp71e y una variante de esta última, Dp71ec ⁶⁹. El presente trabajo describe por primera vez el cDNA del miembro más pequeño de la familia de distrofinas que genera una proteína de 40 kDa, también conocida como Dp40 en este modelo celular. Las secuencias de las isoformas de Dp71, han sido publicadas en el Gen Bank con los números de acceso: Dp71a AY326947, Dp71ab AY326948, Dp71c AY326949, Dp71e JF510048.2 así como Dp71ec KP798809 reportadas por nuestro grupo.

En estudios preliminares llevados a cabo durante el trabajo de maestría ⁹⁰ fue analizada la localización subcelular de las isoformas Dp71a y Dp71c, así como Dp40. Además se construyeron vectores de expresión para Dp71ab y para una isoforma mutante: Dp71 Δ_{78-79} , la cual carece de los exones 78 y 79 ⁹¹. Estos plásmidos expresan a las variantes de la Dp71 y Dp40 fusionadas a una bandera o etiqueta en su región amino terminal, además de que incluyen el gen de resistencia a Zeocina útil para la selección de células transfectadas de manera estable. Se construyeron además vectores que añadían en su región amino terminal los epítopes C-Myc y HA ⁹⁰. Por inmunofluorescencia indirecta se mostró la señal de la Dp71a recombinante en la región central de la célula, tratándose muy probablemente del núcleo. La Dp71c mostró una distribución punteada en todo el citoplasma, con una ligera señal en el núcleo. Los resultados sugirieron, que la diferencia en localización subcelular entre las isoformas Dp71a y Dp71c, les puede conferir la capacidad de interactuar con diferentes proteínas y por tanto tener diferentes funciones celulares.

JUSTIFICACIÓN.

Debido a que las células PC12 expresan dos isoformas “d” de Dp71 (Dp71a y Dp71c), además de Dp40 y no se cuenta con anticuerpos capaces de distinguir a cada una de ellas, para poder estudiarlas es necesario clonarlas en vectores de expresión. Este estudio propone analizar la localización subcelular de las isoformas Dp71a, Dp71c y Dp40, en la línea celular de feocromocitoma de rata PC12, transfectadas en forma transitoria y en forma estable con vectores recombinantes que expresen dichas proteínas. Esto con el fin de que se pueda indagar a cerca de la posible función de estos miembros de la familia de Distrofinas en este modelo celular.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la localización y posible función de las isoformas Dp71a, Dp71c y Dp40 en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Estudiar la localización de las isoformas recombinantes Xpress-Dp71a, Xpress-Dp71c y Xpress-Dp40, en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas, en células transfectadas de manera transitoria
2. Obtener y caracterizar células transfectadas de manera estable con las isoformas Xpress-Dp71a, Xpress-Dp71c y Xpress-Dp40.
3. Estudiar la localización de las isoformas recombinantes en las células transfectadas de manera estable durante el proceso de diferenciación inducido por NGF.
4. Investigar si existe co-localización de la Dp71a, γ 1 sintrofina y DGK ζ en células PC12.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo celular

Las células PC12 fueron mantenidas en frascos de 75 cm² en medio RPMI 1640, complementado con suero de caballo al 10%, suero fetal bovino 5%, penicilina (100 μ g/ml), estreptomycin (1 mg/ml) y anfotericina B (0.25 μ g/ml), todo comercializado por Gibco. Las células HELA fueron mantenidas en placas P100 en medio DMEM, complementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina (100 μ g/ml), estreptomycin (1 mg/ml) y anfotericina B (0.25 μ g/m). Las células se mantuvieron en una incubadora con

una atmosfera saturada con agua, CO₂ al 5% a 37°C. Para obtener RNA total (descrito más adelante), las células PC12 fueron crecidas en placas P100 hasta que alcanzaron 80 % de confluencia. Para la obtención de células transfectadas de manera estable, las células fueron sembradas en placas P100 pre-cubiertas con colágena de rata.

Generación y caracterización de las clonas estables que expresan las isoformas Dp71 y Dp40.

Una caja P-100 pre tratada con colágena fue sembrada el día anterior a la transfección con células PC12 al 80%. En dos tubos falcón de 15 ml se colocaron 500 µl de medio Optimem por isoforma (Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp71Δ₇₈₋₇₉ y Dp40), a un tubo se le agregaron 50 µl de lipofectamina 2000 (Invitrogen) y al otro se le agregaron 10 µg de DNA plasmídico. Se homogenizaron los tubos y se incubaron por 5 min. El DNA fue mezclado con la lipofectamina homogeneizándose suavemente por pipeteo, la mezcla se incubó por 45 min, una vez formados los complejos se añadieron 5 ml de medio Optimem. Las cajas fueron lavadas 2 veces con 3 ml de medio Optimem y el contenido de cada tubo fue añadido a cada caja para posteriormente colocarlo en la incubadora por 5 horas. Transcurrido el tiempo se añadieron a cada caja 6 ml de medio de crecimiento, las células se regresaron a la incubadora y se incubaron por 48 hrs. Se llevó a cabo un cambio de medio fresco adicionado con 400µg/ml de zeocina y se realizaron 2 cambios a la semana, las células se mantuvieron hasta que el control (sin DNA), habían presentado muerte celular completa. Las clonas de cada isoforma resistentes a zeocina fueron sub cultivadas hasta que se generaron una cantidad de células que permitieran llevar a cabo su caracterización por inmunodetección en fase sólida, RT-PCR, así como PCR de DNA genómico (DNAg).

Extracción de DNA a partir de células transfectadas de manera estable.

Una caja P-100 al 90 % fue cosechada y lavada con PBS. El pellet fue resuspendido en 500 µl de buffer de lisis (Tris pH 8 500 mM, EDTA pH 8 100 mM, Sarcocyl 0.5%). Se añadieron 5 µl de RNAsa A (20 mg/ml), se incubó la muestra a 37° C/60 min y se adicionaron 5 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), incubándose a 65°C/60 min. Se añadió un volumen de Fenol saturado con Tris pH 8, se mezcló por inversión y se incubó a TA por 5 min., con agitación ocasional. Se añadió 1/2 volumen de cloroformo mezclando suavemente por inversión durante 5 min. La muestra fue centrifugada a 11000 rpm/5 min y se recuperó la fase acuosa y se lavó con 1 vol. de cloroformo. Se centrifugó la muestra a 11 000 rpm/5

min, se recuperó la fase acuosa y se precipitó con $1/2$ volumen de acetato de amonio (7.5 M) y 2 vol. de etanol absoluto. Se dejó precipitar el DNA a $-20^{\circ}\text{C}/2$ hrs. La muestra fue centrifugada a 11 000 rpm /15 min a 4°C . La pastilla fue lavada con etanol al 70% y el tubo fue colocado invertido sobre un papel absorbente hasta que se secase la pastilla. El material fue resuspendido en 200 μl de H_2O . El DNAg fue cuantificado en espectro y se guardó a -20°C . Se llevó a cabo una reacción de PCR para detectar la incorporación del plásmido.

Extracción de RNA.

Una caja P-100 al 90% de confluencia fue cosechada en un tubo de 1.5 ml y la pastilla celular fue sometida a la extracción de RNA total por la técnica de TRIzol (Invitrogen), como se describe a continuación; la pastilla fue tratada con 1 ml de TRIzol por pipeteo suave. El lisado fue centrifugado a 10 500 rpm/10 min 4°C . El sobrenadante fue incubado 5 min a TA. Se añadieron 200 μl de cloroformo y se agitaron los tubos vigorosamente para incubarlo por 3 min a TA. Los tubos fueron centrifugados a 10 500 rpm/15 min 4°C . La fase acuosa superior fue transferida a un tubo nuevo. Se añadieron 500 μl de alcohol isopropílico a cada tubo y se incubó 10 min a TA. Los tubos fueron centrifugados a 10 500 rpm/10 min 4°C . El sobrenadante fue removido por decantación y el pellet fue lavado con 1 ml de etanol 70%. Se mezclaron las muestras por vortex y se centrifugaron a 8000 rpm/5 min 4°C . Se decanta el sobrenadante y se invierte el tubo sobre un papel absorbente para secar brevemente. El pellet es re-suspendido en 100 μl en H_2O -DEPC. El RNA total fue cuantificado por espectro, analizado en un gel Agarosa 1.2 % teñido con Bromuro de Etidio, y fue almacenado a -70°C hasta el día que se llevó a cabo la reacción de RT-PCR.

RT-PCR.

A partir del RNA total proveniente de células PC12 así como de cada una de las líneas celulares transfectadas de manera estable se tomaron 2 μg de RNA para la síntesis de cDNA como sigue: RNA total 1-5 μl , primer específico 1 μl (200 ng), dNTPs 1 μl , H_2O -DEPC para alcanzar un volumen de 10 μl . La mezcla se colocó en un tubo para PCR y se incubó a $65^{\circ}\text{C}/5$ min, la reacción se colocó en hielo/1 min. En otro tubo de PCR se mezcló: Buffer 10X RT 2 μl , MgCl_2 25 mM 4 μl , DTT 0.1 M 2 μl , RNase out (40U/ml) 1 μl , Superscript III RT (Invitrogen) 1 μl . La mezcla RNA-primer fue añadida a la mezcla de síntesis de cDNA, se mezcló gentilmente y se colectaron las muestras por una leve centrifugación en el fondo del tubo. La síntesis del cDNA se llevó a cabo incubando la

reacción a 55°C/60 min, seguido de una incubación a 85°C/5 min y terminando la reacción a 4°C. Se colectaron las muestras por centrifugación. Se añadió 1 µl de RNase H (2U/µl) a cada tubo y se incubó a 37°C/20 min y el cDNA fue sometido a una reacción de PCR.

Para la obtención del cDNA de las isoformas de Dp71 y Dp40 expresadas en células PC12 se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

CDNAF: 5'-GAATATTATAAAAACCATGCG-3' para amplificar la región codificante de todas las isoformas Dp71.

CDNA-Apo3: 5'- GATATAGCAAATGAAAGTTTAAAG-3' para amplificar la región codificante de la proteína Dp40.

Para la detección de los mensajeros correspondientes a las proteínas recombinantes en las células PC12 transfectadas de manera estable, la secuencia de los oligonucleótidos 3' se describen en la sección de PCR.

Para llevar a cabo la detección del mensajero de actina se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: Actin 1: 5'TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3' y Actin 2 5'-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3'. Las condiciones de amplificación para este producto fueron: 94°C/3 min, 94°C/30 seg, 60°C/1 min, 72°C/1 min por 30 ciclos.

PCR.

A partir del cDNA de las células PC12, células PC12 transfectadas de manera estable, y el DNA genómico (DNAg) se llevó a cabo una reacción de PCR como sigue: Buffer PCR 10 X 5 µl, dNTPs mix 10 mM 1 µl, MgCl₂ 25 mM 3 µl, primer 5' y 3' específico 1 µl c/u (200 ng), Taq DNA polymerase 0.3 µl (5 U/ µl). Para la obtención del cDNA de las isoformas de Dp71 y Dp40 la Taq fue reemplazada por: *pfu* DNA polymerase high fidelity (Invitrogen) colocando una unidad de enzima por reacción. DNAg 2 µg o cDNA 5 µl y H₂O para alcanzar un volumen final de 50 µl. La mezcla se colocó en un termociclador Perkin Helmer 2720 con el siguiente programa: 94°C 1 min, 94°C 30 s 68 °C 3 min por 30 ciclos, 70 °C 10 min y 4°C. La detección de los productos esperados se llevó a cabo en geles de agarosa al 1.2 % teñidos con Bromuro de Etidio.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR fue:

5'TOPO: 5'-ATGAGGGAACACTCAAAGGCCACG-3', la secuencia de este oligonucleotido inicia en el codón de inicio de la traducción de todas las isoformas de Dp71 y Dp40.

TopoF: 5'-TATGGCTAGCATGACTGGT-3', localizado 100 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción sobre la secuencia del vector Topo.

Los oligonucleótidos 3' específicos fueron:

Dp71dnot3: 5'- GATCTAGCGGCCGCTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGC -3', para las isoformas Dp71a y Dp71c

apnot3 5'-GATCTAGCGGCCGCTCACGTTTCCATGTTGTCCCCCTCTAAC-3' para detectar Dp40

Dp71fnot3: 5'- GATCTAGCGGCCGCTTATTCTGCTCCTTCTTCATCTATC-3', para detectar Dp71ab

3Δ78: 5'-TACCTATCCTCTTGAAGTGGGAAGG-3' para la clona Dp71Δ₇₈₋₇₉ recombinante.

Clonación de las isoformas Dp71 y Dp40.

Los cDNAs de las isoformas de Dp71 y Dp40 fueron clonados en el vector de tránsito pGEM-T easy (Promega) como se describe a continuación; los PCRs fueron purificados utilizando las columnas PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) acorde a las instrucciones del fabricante. A los productos purificados se les añadió las A's en los extremos 5' y 3', adicionando a 20 µl de PCR purificado lo siguiente: 1 µl de Taq DNA Pol. Buffer de PCR a 1X, 1 µl de dNTPs mix. La mezcla anterior fue incubada en un termociclador a 70°C durante 30 min y se colocó en hielo. La clonación fue llevada a cabo en un tubo de PCR añadiendo 1 µl del producto de PCR, 5 µl de Buffer 2X, 1 µl de pGEM Vector, 1 µl de T4 DNA ligasa y 2 µl de H₂O, la mezcla fue incubada por 30 min a TA para después ser almacenada a -20°C por 12 hrs. Se utilizaron 2 µl de la reacción de clonación para transformar células competentes y posteriormente éstas se sembraron en placas LB-Amp para seleccionar a las clonas resistentes. A partir de las clonas obtenidas se extrajo DNA plasmídico para ser analizado por PCR y secuenciación automática. Una vez seleccionada la clona de interés esta fue re-clonada en el vector de expresión 4hisMaxTopo-TA, (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las colonias resultantes fueron caracterizadas por PCR y secuenciación.

Secuenciación automática.

Los cDNAs clonados en los vectores de tránsito (pGEM-T easy) así como de expresión (4hisMaxTopo-TA), fueron sometidos a reacciones de secuenciación como sigue: Plásmido 2 µl (500 ng), Oligonucleótido 2 µl (200 ng), Big Dye Terminator V 3.1 reacción mix 8 µl (Applied Biosystems), H₂O 8 µl. La mezcla anterior fue incubada en un termociclador Perkin Helmer 2720 con el siguiente programa: 94°C 5 min, 35 ciclos: 94°C

30 seg. 55°C 20 seg. 60°C 4 min con una extensión final de 60°C 5 min y 4°C. La reacción de secuenciación fue purificada utilizando las columnas Centri-Sep Spin Columns (Princeton Separations). Los oligonucleótidos utilizados fueron los correspondientes ubicados en los extremos 5' y 3' para cada isoforma de Dp71 y Dp40 descritos en las reacciones de PCR. Adicionalmente se utilizaron oligonucleótidos internos para secuenciar en su totalidad la región codificante de las isoformas Dp71a y Dp71c. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados fue:

562u 5'-CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG-3'

1366 5'-CTGTCCCCACTGCCGTCTCCT-3'

Para verificar la presencia de los codones de inicio y terminación de la traducción de los cDNAs clonados en el vector de expresión 4hisMaxTopo-TA, se utilizaron los juegos de oligonucleótidos: TopoF: 5'-TATGGCTAGCATGACTGGT-3' y

TopoR: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

Inmunoprecipitación.

Las células confluentes mantenidas en cajas P-100 fueron empastilladas mediante centrifugación a 3000 rpm/10 min. El paquete celular se lavó una vez con PBS, y a la pastilla se le añadieron 700 µl de Buffer de extracción 2 (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tritón X-100 1%), adicionado con 50 µl de inhibidor de proteasas Complete 25X (Roche). La muestra se incubó en hielo por 15 min agitando cada 5 min mediante pipeteo suave. La muestra fue dividida en dos tubos: 1) Control, 2) Experimental. Al tubo control se le añadieron 400 µl de Buffer de extracción 2, al experimental se le añadió el mismo volumen de buffer suplementado con 1 µg de Ab y a ambos tubos se le añadieron 15 µl de Complete 25X. Los tubos fueron incubados bajo agitación continua en agitador horizontal durante 2 Hrs a 4°C. Los tubos fueron centrifugados a 12 rpm/ 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo tipo eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 20 µl de proteína G acoplada a sefarosa (Sigma) a cada tubo, incubándose en agitación constante por 1 H a 4°C. Los tubos fueron centrifugados a 12 rpm/15 min, el sobrenadante fue retirado cuidadosamente sin tocar la pastilla y se guardó a -20°C para correrse en el ensayo de inmunodetección en fase sólida. A las pastillas se les añadieron 500 µl de Buffer de extracción 2 complementado con complete 1X. Los tubos fueron mezclados por inversión para posteriormente ser centrifugados a 12 000 rpm/15 min 4°C. Se retiró nuevamente el sobrenadante sin tocar la pastilla y está fue lavada y centrifugada como en el paso anterior. La pastilla fue resuspendida en 15 µl de buffer de muestra 2Xtubos fueron sometidos a

ebullición por 5 min. Los extractos se guardaron a -20°C, en espera de la inmunodetección en fase sólida.

Inmunodetección en fase sólida.

Los extractos proteicos en buffer de muestra 1X se separaron por electroforesis SDS PAGE en un gel de acrilamida al 10%. Los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Hibond C Amersham) a 300 mA por 45 min en una cámara de transferencia húmeda (Biorad). Las membranas fueron lavadas en TBS-T (Tris 10 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1% v/v) por 5 min y los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados mediante una incubación de la membrana en TBS-T adicionada con leche descremada al 5% por 1 h. Después del bloqueo, la membrana fue incubada en presencia de distintos anticuerpos toda la noche a 4°C, las membranas fueron lavadas en TBS-T por 10 min a TA en tres ocasiones. La detección de la señal correspondiente a cada anticuerpo primario se llevó a cabo utilizando el anticuerpo secundario respectivo, incubando durante una hora en TBS-T-leche. Las bandas fueron reveladas utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia (ECL Amersham) por auto radiografía.

Anticuerpos.

Para la detección de las proteínas recombinantes Xpres-Dp71a, Xpres-Dp71c y Xpres-Dp40, se utilizó el anticuerpo Anti-Xpress (Invitrogen), la señal de Dp71 endógena en células PC12 se llevó a cabo utilizando el anticuerpo H4, el anticuerpo LG5 fue utilizado para la detección de β -Distroglicano. Los anticuerpos para la detección de las proteínas lamina A/C, (Lamin A/C (H-110): sc-20681), DGK- ζ (DGK- ζ (N-19): sc-8721) y γ 1-Sintrofina (γ 1-Syntrophin (N-15): sc-13767), fueron adquiridos comercialmente de Santa Cruz Biotechnology. Para la detección de hrnpA1 se empleó el anticuerpo monoclonal sc:32301, Santa Cruz Biotechnology, proporcionado gentilmente por la Dra. Cancio del Departamento de Patología Experimental. Para la detección de la señal de las proteínas por inmunofluorescencia se adquirieron los anticuerpos: Alexa fluor 488 Donkey anti-mouse y Alexa fluor 594 Donkey anti-rabbit de Molecular Probes (Invitrogen).

Transfección transitoria de células PC12.

El día anterior a la transfección fueron sembradas 8×10^5 células PC12 sobre cubreobjetos pre-tratados con Poli-L-lisine en cajas de 6 pozos. Por cada pozo se colocaron 2 tubos tipo eppendorf de 1.5 ml a los cuales se les añadieron 100 μ l de medio Optimem (Invitrogen),

un tubo fue suplementado con 20 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), al otro tubo se le añadieron 1.5 μ g de DNA plasmídico purificado por columnas (Qiagen) mezclando suavemente. El tubo con el DNA fue transferido al tubo con lipofectamina, mezclado gentilmente e incubado por 45min. Se añadieron 800 μ l de medio Optimem a la mezcla de transfección. La caja de 6 pozos fue retirada de la incubadora y fue lavada con 3 ml de medio Optimem en dos ocasiones. La mezcla de transfección fue añadida a cada pozo y la caja se incubó por 5 h, transcurrido el tiempo se añadió 1 ml de medio de crecimiento. Las células fueron incubadas por 24 para los ensayos con células no diferenciadas. Para la detección de las proteínas recombinantes en células diferenciadas, después de las 5 horas de transfección el medio fue sustituido por 2 ml de medio al 1% de suero, suplementado con 50 ng/ml de NGF e incubado por 72 hrs. La señal de las proteínas recombinantes fue detectada por la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Inmunofluorescencia indirecta.

Después de la transfección los cubreobjetos fueron fijados durante 5 min en una solución de Paraformaldehído (PFA) al 4% y Tritón X-100 al 0.4% en una solución amortiguadora de citoesqueleto (CB) (MES 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, y Glucosa 5 mM). Las preparaciones fueron lavadas tres veces con CB durante 5 min y se incubaron en una solución de PFA al 4% en CB durante 20 minutos. Las preparaciones fueron lavadas de nuevo con PBS tres veces y se bloquearon con gelatina al 0.5% en PBS por 40 min. Posteriormente las preparaciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-Xpress (1:200) durante toda la noche a 4°C, se lavaron tres veces en PBS durante 5 min y la señal de las proteínas recombinantes se detectó incubando las preparaciones durante 1 h con el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-mouse (1:300). Después se lavaron tres veces en PBS seguidos de agua y se montaron en Vectashield (Vector laboratorios, Inc.). Las preparaciones en las que se llevó a cabo una doble tinción fueron incubadas después del anticuerpo secundario con los anticuerpos anti-lamina A/C, o LG5 por toda la noche a 4°C. Las preparaciones fueron lavadas nuevamente en PBS e incubadas con el anticuerpo secundario Alexa 594 anti-rabbit (1:200), a continuación se lavaron tres veces en PBS y agua y se montaron en Vectashield. Los núcleos fueron contra teñidos con DAPI. Las preparaciones fueron almacenadas a 4°C hasta ser analizadas en el microscopio de epifluorescencia Zeiss (Axioimager A1) y en el Microscopio Confocal Leica (Leica TCS SPE, Objetivo 63X inmersión y AN 1.3). En el microscopio confocal fueron analizadas

secciones cada 0.3 μm con los filtros correspondientes. El análisis de co-localización fue llevado a cabo con ayuda del software de Leica.

Mutagénesis *in vitro*.

El plásmido TopoDp40-X fue sometido a mutagénesis dirigida en los codones que corresponden a las leucinas 93 y 170, para ser sustituidas por residuos de prolinas. Los oligonucleótidos utilizados se muestran a continuación:

Para leu 93: Dp40 TXC1-F 5'-CTA CTA TTT ATG ACC GTC CGG AGC AAG AGC ACA ACA ATT TGG-3' y Dp40 TxC1-R 5'-CCA AAT TGT TGT GCT CTT GCT CCG GAC GGT CAT AAA TAG TAG-3'. Para leu 170: Dp40 TxC2-F 5'-CGT AGA CTG GGT CTT CTT CCG CAT GAT TCT ATT CAA ATC C-3' and Dp40 TxC2-R 5'-G GAT TTG AAT AGA ATC ATG CGG AAG AAG ACC CAG TCT ACG-3'.

La reacción se llevó a cabo con QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene), acorde a las recomendaciones del fabricante. Brevemente, la reacción de síntesis se llevó a cabo de la siguiente manera: TopoDp40c vector 50 ng, Buffer de reacción 10X 5 μl , oligonucleótido 125 ng c/u, DNTPs mix 1 μl , enzima *pfu* turbo DNA polimerasa 1 μl y H_2O para obtener un volumen final de 50 μl . Lo anterior fue mezclado en un tubo de PCR y sometido a las siguientes condiciones: 95°C 30 seg, 95°C 30 seg, 55°C 1 min, 68°C 8 min por 18 ciclos y finalmente la reacción fue terminada a 4 °C. A la reacción se le añadió 1 μl de la enzima de restricción Dpn1 e incubada a 37°C por 1 h. La reacción fue usada para transformar células súper competentes Blue-XL1, para posteriormente ser sembradas en placas de LB amp. Las mutaciones incorporadas fueron verificadas por secuenciación automática.

RESULTADOS.

Localización diferencial de los productos del gen *DMD*: Dp71a, Dp71c y Dp40 en células PC12.

Con el fin de investigar cual es la localización subcelular de las isoformas Dp71a, Dp71c y Dp40 en el trabajo previamente desarrollado en la tesis de maestría⁹⁰, se obtuvieron las construcciones 4hisMaxTopo-TA-Dp71a, 4hisMaxTopo-TA-Dp71c y 4hisMaxTopo-TA-Dp40, estas construcciones fueron caracterizadas por PCR y secuenciación. A partir de ensayos con células transfectadas de manera transitoria se llevó a cabo el análisis de la distribución celular de estas proteínas recombinantes en células PC12 sin diferenciar utilizando la técnica de inmunofluorescencia. Los resultados

obtenidos se muestran en la figura 1 e indicaron claramente una localización diferencial de las proteínas recombinantes; Xpress-Dp71a mostró una localización citoplasmica y nuclear, Xpress-Dp71c mostro una localización en la periferia celular, mientras que Xpress-Dp40n mostro una localización nuclear (figura 1).

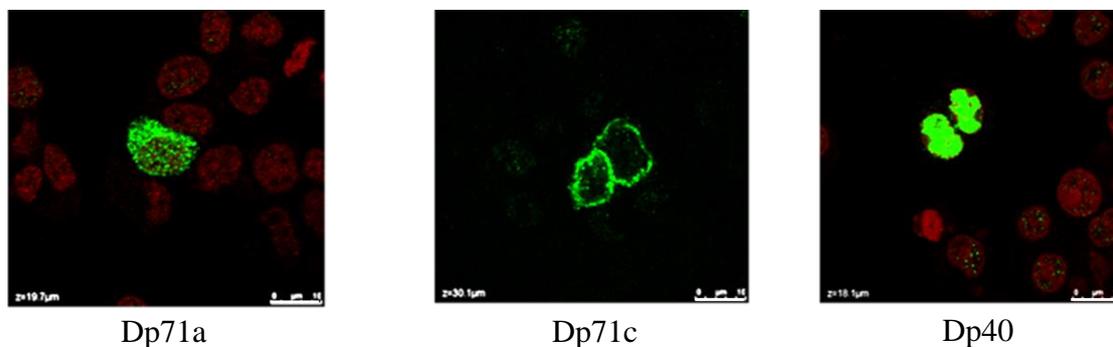


Figura 1.- Localización subcelular de las isoformas Dp71a, Dp71c y Dp40n en células PC12.

Después de transfectar de manera transitoria a las células PC12 con los vectores que expresan a las proteínas recombinantes, como se detalló en materiales y métodos, la señal de la bandera Xpress, fue detectada mediante el uso del anticuerpo anti-Xpress. Las células fueron analizadas por microscopia confocal, observándose una localización diferencial de las proteínas recombinantes; Dp71a en el núcleo y citoplasma, Dp71c en la periferia celular y Dp40 en el núcleo de la célula transfectada. La señal de la proteína se observa en verde, el núcleo se encuentra teñido con Ioduro de propidio (rojo) y cada imagen tiene indicada la proteína analizada. En cada imagen se indica la escala (10 μ M) y la posición en el eje z (partes inferiores de cada imagen).

Obtención de células PC12 transfectadas de manera estable.

Los vectores 4hisMaxTopo-TA-Dp71a, 4hisMaxTopo-TA-Dp71c, 4hisMaxTopo-TA-Dp71ab, 4hisMaxTopo-TA-Dp71 Δ_{78-79} y 4hisMaxTopo-TA-Dp40n, fueron utilizados para transfectar a las células PC12 sembradas en cajas p100 y estas se sometieron a una selección con zeocina para obtener células transfectadas de manera estable como se describió en materiales y métodos. Después de 3 meses de subcultivo en el medio de crecimiento con zeocina, las células transfectadas fueron cosechadas y procesadas para obtener extractos proteicos. Cien microgramos de proteína total fueron analizados por SDS-PAGE al 10% con el anticuerpo anti-Xpress para llevar a cabo la detección de las proteínas recombinantes por inmunodetección en fase sólida. De todas las líneas generadas solo las células transfectadas con el vector que codifica para la proteína mutante Dp71 Δ_{78-79} , mostraron una banda de reactividad al anticuerpo anti-Xpress (figura 2) un estudio de la caracterización a fondo de esta línea celular ha sido objeto de una publicación⁹¹. Es conveniente mencionar que se realizaron tres intentos para obtener líneas celulares que

expresaran a cada una de las isoformas de Dp71 y Dp40. Para corroborar la incorporación del vector de expresión en el DNAg, este fue aislado a partir de cada una de las clonas generadas y se llevó cabo un PCR utilizando oligonucleótidos dirigidos en contra del vector en la región 5' y específicos para cada proteína recombinante en el 3'. Los resultados son mostrados en la figura 3 y se observó amplificación de los vectores recombinantes a partir del DNAg aislado para cada línea celular. Por otro lado se corroboró la presencia del mensajero en las células transfectadas de manera estable con el fin de descartar que el plásmido no fuese el adecuado para llevar a cabo la expresión de las isoformas de distrofina clonadas. Los resultados mostrados en la figura 4, indican que las líneas celulares expresan los transcritos correspondientes a las proteínas recombinante. Los oligonucleótidos utilizados están dirigidos a la región 5' del vector (topo F) y a la región 3' de cada isoforma recombinante, se utilizó también un oligonucleótido interno para llevar a cabo la detección, como control de la reacción se emplearon oligonucleótidos para la detección del mRNA de Actina.

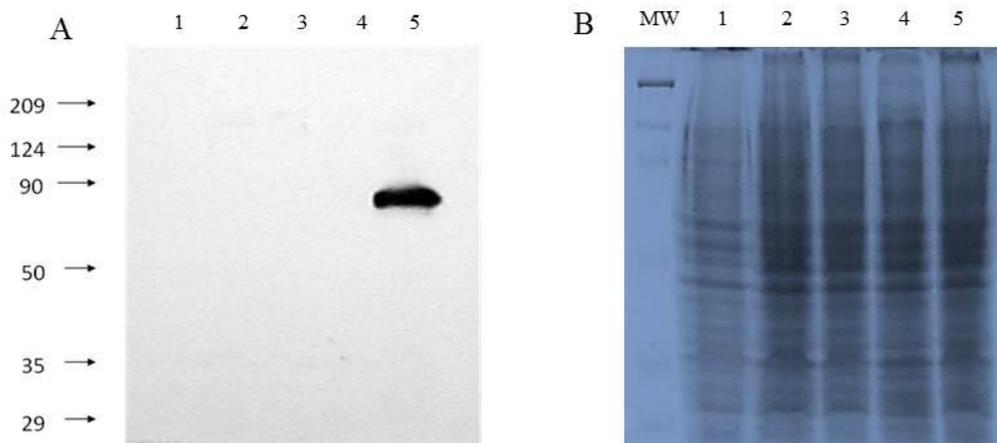


Figura 2.- Detección de las proteínas recombinantes Xpress-Dp71a, Xpress-Dp71c, Xpress-Dp40n y Xpress- Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12 transfectadas de manera estable. Una vez obtenidas las líneas celulares transfectadas con los diferentes vectores de expresión que codifican para cada proteína recombinante y mantenidas en medio selectivo, se obtuvo el extracto total de proteína. Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 10% y se llevó a cabo la detección de las proteínas recombinantes mediante inmunodetección en fase sólida (A), como se detalla en materiales y métodos utilizando el Ab anti-Xpress. En las células que fueron transfectadas con la construcción que codifica para Xpress-Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, se detectó a la proteína recombinante, mientras que en las demás líneas celulares no se detectó la expresión de las proteínas. En B, se observa un gel con tinción por coomasie de los extractos empleados. El peso molecular en kDa está indicado a

la izquierda de la imagen A y corresponden a las bandas del marcador en B (MW). Carriles: 1) WT= células PC12 sin transfectar, 2) Células tranfectadas con Xpress-Dp71a, 3) Xpress-Dp71c, 4) Xpress-Dp40 y 5) Xpress-Dp71 Δ_{78-79}

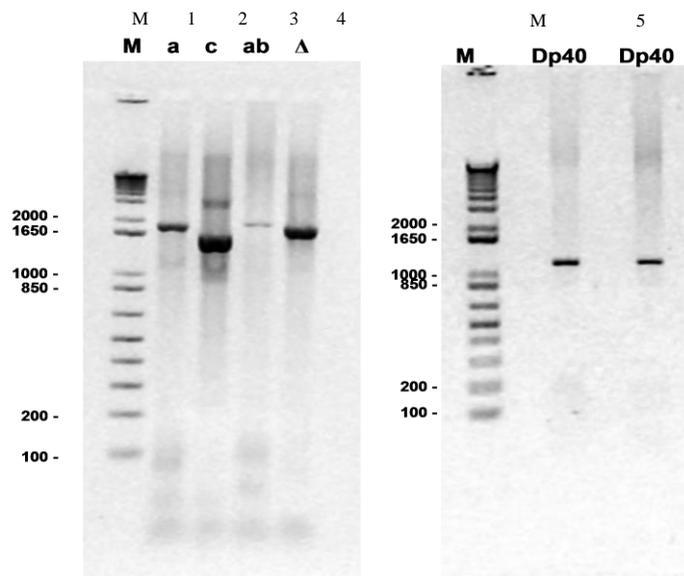


Figura 3.- Reacciones de PCR del DNA genómico de cada una de las clonas estables obtenidas transfectadas con los vectores 4hisMaxTopo-TA-Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp71 Δ_{78-79} y Dp40n. Después de llevarse a cabo la transfección de células PC12 con cada vector, estas fueron seleccionadas con zeocina. Se extrajo DNAg para corroborar por PCR la presencia del vector insertado. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio e indican la presencia de los vectores transfectados en el genoma celular. Los productos para cada vector analizado fueron: 1) Dp71a, 2) Dp71c, 3) Dp71ab, 4) Dp71 Δ_{78-79} y 5) Dp40, indicados en la parte superior de los gels. M.-Marcador de 1 Kb plus. A la izquierda de cada gel se encuentran indicados los pesos en pb.

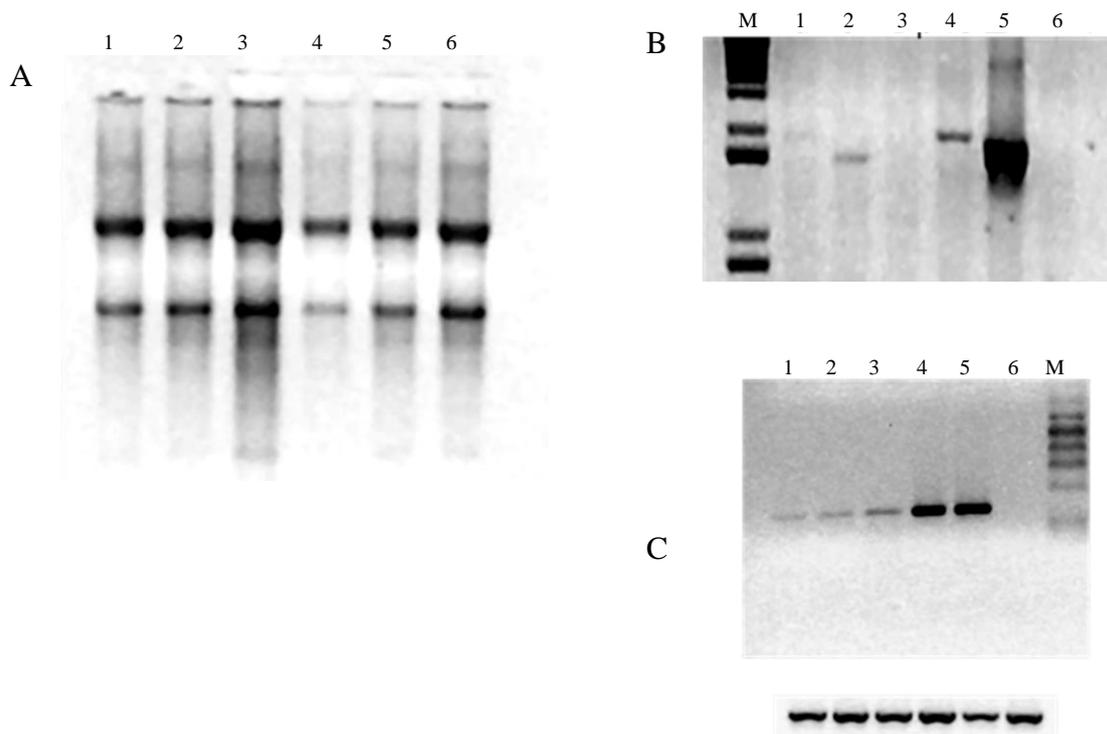


Figura 4.- Reacciones de RT-PCR a partir del RNA total de las clonas estables. Las células PC12 transfectadas con los vectores que codifican para Xpress-Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp40n y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ fueron analizadas. En A se muestra el corrimiento electroforético de 1 μ g de RNA total de las diferentes líneas celulares. En B se muestran las bandas correspondientes a los cDNAs de cada uno de los vectores transfectados utilizando un primer específico del vector (5' tope f) y un primer 3' específico para cada isoforma transfectada. En C se observan las reacciones de RT-PCR empleando el mismo oligonucleótido utilizado en B y un oligonucleótido 3' interno que reconoce todos los productos del gen Distrofina (oligo 247), se amplificó el mensajero de Actina como control. Carriles: M) Marcador de DNA 1Kb plus 1) Dp71a, 2) Dp71c, 3) Dp71ab, 4) Dp40 5) Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y 6) WT. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

Expresión de Proteínas recombinantes Xpress-Dp71a, Xpress-Dp71c y Xpress-Dp40 en el modelo celular HeLa.

A fin de confirmar la expresión de las proteínas recombinantes a partir de los vectores utilizados en la obtención de células PC12 transfectadas de manera estable, se empleó el modelo celular HeLa, debido a que este modelo presenta una mayor eficiencia de transfección que las células PC12. Para ello se transfectaron cajas p100 con células en estado de confluencia por 24 hrs como indican los materiales y métodos. A partir de extractos proteicos totales se llevó a cabo una inmunodetección en fase sólida empleando

el anticuerpo anti-Xpress y H4. Como muestra la figura 5A empleando el anticuerpo H4 dirigido en contra del C-Terminal de las distrofinas, los plásmidos construidos expresan a las proteínas recombinantes con el tamaño teórico esperado (Dp71a=71kDa y Dp71c=58kDa). El empleo del anticuerpo H4 permitió la detección de las isoformas de Dp71.

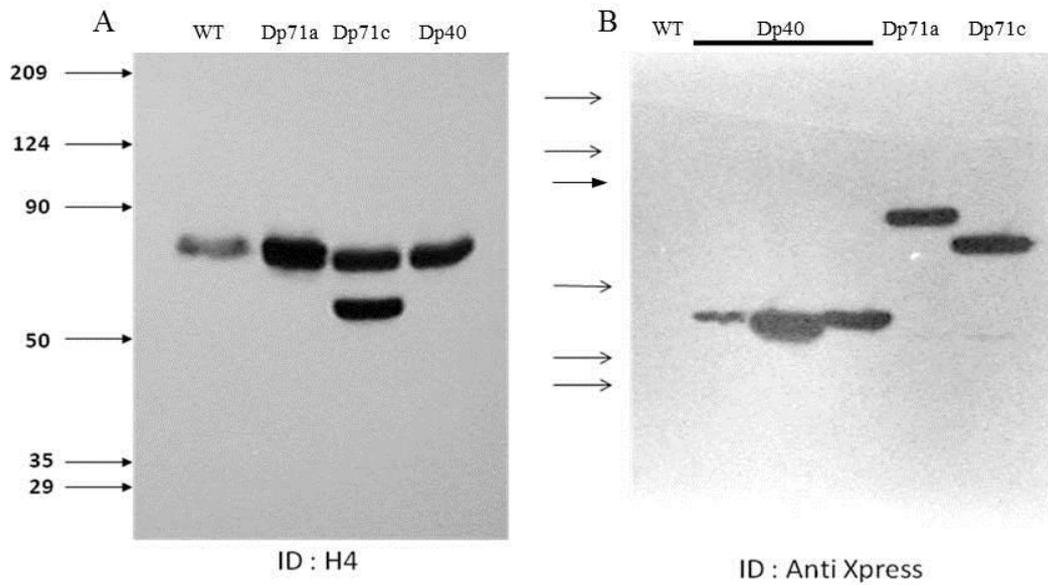


Figura 5. Inmunodetección en fase solida de las proteínas recombinantes Xpress-Dp71a,

Xpress-Dp71c y Xpress-Dp40. Cajas confluentes de células HeLa fueron transfectadas con los vectores que codifican para cada proteína como indican los materiales y métodos. Los extractos proteicos totales fueron obtenidos, separados en geles SDS-PAGE y sometidos a inmunodetección empleando los anticuerpos H4 (A) y anti-Xpress (B). Las bandas detectadas con los pesos moleculares esperados confirman la expresión de las proteínas recombinantes a partir de los vectores generados. Los marcadores de peso en kDa están indicados en la izquierda de cada panel y sus valores son mostrados en A. Los extractos utilizados se indican para cada carril y los anticuerpos empleados están indicados en la parte inferior de cada gel. WT: Extracto de HeLa sin transfectar.

Expresión y caracterización de la distrofina Dp40 en células PC12.

La isoforma de Distrofina Dp40 fue identificada por Tinsley *et al*⁸² a nivel de cDNA, con el objeto de determinar si las células PC12 expresan esta isoforma en el presente trabajo se empleó un oligonucleótido específico para Dp40 (CDNA-Apo3) y se llevó a cabo una reacción de RT-PCR con el fin de identificar el transcrito de esta proteína a partir de RNA total de células PC12, como se detalló en materiales y métodos. En la figura 6 se muestra el transcrito específico para Dp40 expresado en células PC12, durante la diferenciación inducida por NGF. El producto de 1100 pb se observa a los 0, 4, 9 y 12

días de diferenciación. Este cDNA fue clonado en el vector transitorio pGEM-T-Easy y la reacción de clonación fue usada para transformar células competentes. Las clonas obtenidas fueron analizadas con oligonucleótidos dirigidos en contra del inicio y el final de la traducción de Dp40. Se seleccionaron clonas al azar mediante secuenciación automática como se describe en materiales y métodos. Se obtuvo la secuencia completa de 4 transcritos en este modelo celular provenientes de 3 experimentos independientes, es importante resaltar que fueron secuenciadas ambas cadenas de DNA. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con aquella reportada para la secuencia de rata reportada en el Gen Bank (X69767.1). La clona denominada Dp40c no presentó cambios a nivel de cDNA. La secuencia de esta clona fue reportada en el GenBank con el número KF154977.1.

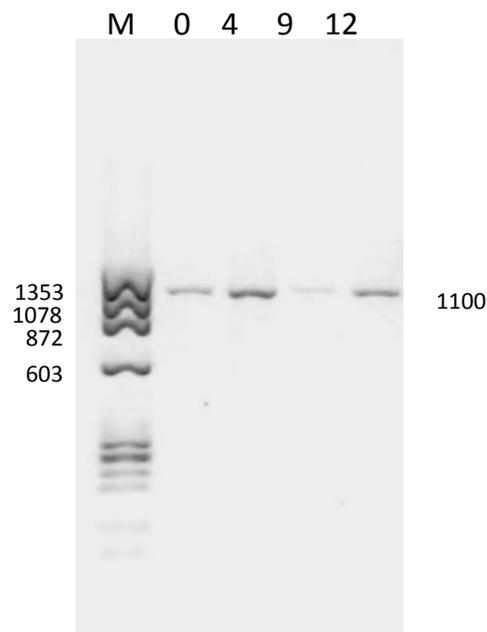


Figura 6. Expresión del mRNA de Dp40 en células PC12. A partir de RNA total proveniente de células PC12 se llevó a cabo una reacción de RT-PCR con oligonucleótidos específicos para detectar el mensajero correspondiente al transcrito de Dp40 (TopoF y Aponot-3). Como se observa en la figura la banda correspondiente a Dp40 (1100 pb), es detectada en todos los días analizados: 0, 4, 9 y 12 días de diferenciación con NGF, indicados en la parte superior del gel. Los PCRs fueron separados en gels de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio. M=Marcador de pb.

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Dp40      ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAATG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      ACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACT
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
          C
*****

Dp40      GCCATGAAGCTCAGAAGACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCT
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      GCATGTGACGCCTTGACCAGCACAACTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      CAGATAATTAAGTGTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTTG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
                               C
*****

Dp40      GTCAATGTCCCTCTCTGTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
          G
*****

Dp40      GGACGAACAGGGAGGATCCGTGTCTTTTAAACTGGCATCATTCTCTGTGTAAA
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
          A
*****

Dp40      GCACACTTGAAGACAAGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTCAACCGGCTTT
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
          G
*****

Dp40      TGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTCTGCATGATTCTATTCAAATCCCAAGACAGTTG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
          G
          C
*****

Dp40      GGTGAAGTTGCCTCCTTTGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTTCCAG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
          C
*****

```

```

Dp40      TTTGCCAATAATAAACCTGAGATTGAAGCCGCTCTCTCTCCTTGACTGGATGCGTCTGGAA
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1      C      A
Dp40n-1
*****

Dp40      CCCCAGTCTATGGTGTGGCTGCCGGTCTTGCACAGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAAG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      CATCAGGCCAAGTGTAAACATCTGTAAGGAGTGTCCAATCATTTGGATTTCAGGTACAGAAGC
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      CTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGCTGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1      A
*****

Dp40      GGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGAT
Dp40n      C
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      GTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTTGAAACCAAAGGTATTTGCGAAG
Dp40n      G
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAACG
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
*****

Dp40      TGA
Dp40n
Dp40c
Dp40c-1
Dp40n-1
***

```

Figura 7. Secuenciación de los cDNAs de Dp40 obtenidos a partir de células PC12. Los cDNAs de Dp40 obtenidos de las células PC12 fueron clonados en el vector de transito p-GEM-t-easy y se transformaron las bacterias como se indica en materiales y métodos. Se seleccionaron 4 clonas al azar a partir de 3 experimentos independientes, los cuales fueron sometidos a secuenciación automática. Las clonas fueron denominadas Dp40c, Dp40c-1, Dp40n y Dp40n-1. En la figura se muestra el análisis de alineamiento en el programa Clustal X entre las clonas y la secuencia de rata (X69767.1). Las células PC12 expresan distintos cDNAs con cambios de un solo nucleótido. El asterisco indica sin cambio en la secuencia. Cada clona está indicada.

La comparación de los demás cDNAs aislados con la secuencia de rata para Dp40 (X69767.1) se observa en la figura 7 y se observó que la clona denominada Dp40c-1 presento 3 cambios en las posiciones 553, 618 y 628 pb. La clona Dp40n presentó 5 cambios en las posiciones 278, 432, 509, 863 y 908 pb y la clona Dp40n-1 presenta 5 cambios en las posiciones 70, 304, 370, 488 y 835 pb. Con el fin de determinar si los cambios de un solo nucleótido en los cDNAS obtenidos podrían modificar la secuencia de aminoácidos a nivel de la proteína, las secuencias fueron traducidas en el programa DNA club. Las secuencias de aminoácidos fueron comparadas por alineamiento en el programa Clustal X con la secuencia reportada para rata en el Gen Bank (X69767.1). Como se observa en la figura 8, de los 13 cambios reportados, 11 fueron no sinónimos es decir mutaciones con cambio de sentido y 2 fueron mutaciones silenciosas, sinónimas (sin cambio). Es importante resaltar que ningún cambio encontrado generó una mutación sin sentido que interrumpiera el marco de lectura de la proteína esperada (figura 8).

```

|CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

Dp40c      MREHLKGHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSA YRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
Dp40c-1
Dp40n
Dp40n-1
                H
*****;*****

Dp40c      ACDALDQHNLKQNDQPM DILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLINVYDT
Dp40c-1
Dp40n                P
Dp40n-1                D
*****;*****

Dp40c      GRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYL F KQVASSTGFCDQRR LGLLHDSIQIPRQL
Dp40c-1
Dp40n                R                P
Dp40n-1                R                P
*** *****;*****

Dp40c      GEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAAETAK
Dp40c-1                P                T
Dp40n
Dp40n-1
****_*****;*****

Dp40c      HQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGKMHYPMVEYCTPTTSGED
Dp40c-1
Dp40n                T                T
Dp40n-1                T                T
*****;*****

Dp40c      VRDFAKVLK NKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
Dp40c-1
Dp40n                G
Dp40n-1
**_*****

```

Figura 8.- Secuencia de aminoácidos de los cDNAs de Dp40 aislados a partir de las células PC12. Algunos de los cambios a nivel de cDNA modifican los residuos de aminoácidos en las proteínas traducidas con el programa DNA club. El asterisco denota sin cambio, los cambios en la secuencia de aminoácidos están indicados con el residuo correspondiente.

Expresión de los cDNAs de Dp40 en células HeLa.

Los 4 cDNAs de Dp40 encontrados y caracterizados en las PC12 fueron clonados en el vector de expresión para células de mamífero 4hisMaxTopo-TA, este vector añade el epítipo Xpress en la región amino terminal de la proteína generando una proteína recombinante con esta etiqueta. Después de caracterizar las 4 construcciones de Dp40 en el vector de expresión mediante PCR y secuenciación como se detalla en materiales y métodos, las construcciones 4HisMaxTopo-Dp40n, 4hisMaxTopo-Dp40c-1 y 4hismaxTopo-Dp40c, fueron empleadas para transfectar de manera transitoria células HeLa con el fin de corroborar la expresión de las proteínas esperadas. En la figura 5 se muestra la detección de las tres proteínas clonadas en el vector de expresión por inmunodetección en fase sólida, las bandas observadas concuerdan con el peso teórico de Dp40. Este resultado indicó que los vectores construidos expresan las proteínas de Dp40 clonadas. Se construyeron también los vectores de expresión pcDNA3.1/V5-His-TOPO-TA/Dp40n y Dp40c-1, este vector añade en la región C-terminal el epítipo V5, con el fin de descartar que la localización subcelular observada se debiera al epítipo Xpress. Las construcciones fueron caracterizadas por secuenciación y sometidas a ensayos de Inmunodetección en fase sólida en células HeLa así como en ensayos de localización subcelular en células PC12 y Hela, analizadas por microscopia confocal.

Localización subcelular de las proteínas Dp40 en células PC12 y Hela.

Una vez corroborada la funcionalidad de los vectores de expresión que contenían a las diferentes secuencias de Dp40 (Dp40c, Dp40c-1, Dp40n), estos vectores fueron utilizados para transfectar de manera transitoria células PC12 y HeLa, con el fin de determinar la localización subcelular de las diferentes proteínas recombinantes. Después de la transfección, las células fueron permeabilizadas y fijadas para llevar a cabo ensayos de inmunofluorescencia indirecta que permitieran detectar a las proteínas recombinantes utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se detalla en materiales y métodos. Empleando microscopia confocal se determinó que la proteína Xpress-Dp40n se localiza en el núcleo de las células PC12 a las 24 h post-transfección (figura 9). Por otro lado la proteína

Xpress-Dp40c se localiza en la periferia de la célula muy cerca de la membrana celular (figura 9). La proteína Xpress-Dp40c-1 y Xpress-Dp40n-1 mostraron la misma distribución subcelular diferencial es decir en la periferia y el núcleo de la célula transfectada respectivamente (figura 10). Es por esto que en el presente escrito se denominaron a las secuencias de Dp40 con localización nuclear como “n” y a las citoplasmicas como “c” por mostrar localización citoplasmicas Todos los resultados de localización subcelular de las proteínas recombinantes presentadas en el presente trabajo, fueron reproducidos en tres experimentos independientes.

Con el objeto de analizar si la localización diferencial de las proteínas de Dp40 era dependiente de la línea celular, los vectores que codifican para las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c fueron transfectados en células HeLa, ya que este modelo celular resulto adecuado para detectar a las diferentes proteínas de Dp40 mediante ensayos de inmunodetección en fase sólida. Para ello, las células fueron sembradas en cubre objetos y transfectadas de la misma manera que las células PC12, para posteriormente ser analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta, como se describe en materiales y métodos. Los resultados se muestran en la figura 11, las proteínas de Dp40 mostraron una localización similar a la observada en células PC12, Xpress-Dp40n se observó en el núcleo de la célula transfectada, mientras que Xpress-Dp40c se observó en la periferia celular (figura 11), indicando que los mecanismos que determinan la localización de las proteínas Dp40 se conservan en eucariotas.

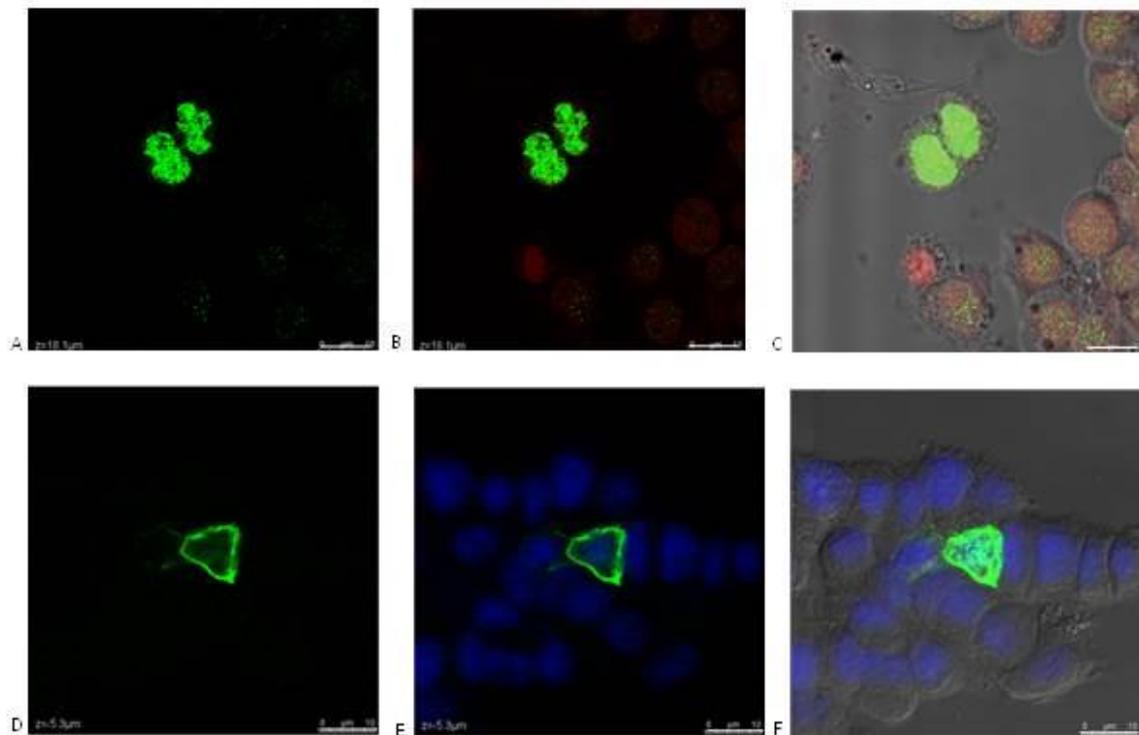


Figura 9.- Distribución subcelular de las proteínas Xpres-Dp40n y Xpress-Dp40c en células PC12 sin diferenciar. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopía confocal, se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. A-C se muestra los cortes por confocal de la proteína Xpress-Dp40n, esta proteína se localiza únicamente en el núcleo de las células transfectadas. D-F, muestran la señal de Xpress-Dp40c, esta proteína se localiza en la periferia celular. La señal en verde indica la localización de la proteína recombinante, en rojo y azul se aprecian los núcleos teñidos con Ioduro de propidio o DAPI, en las imágenes de la derecha se muestra la proyección máxima así como el nomarski. En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μ m) así como la posición en el plano Z. Los cortes (A, B, D y E) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

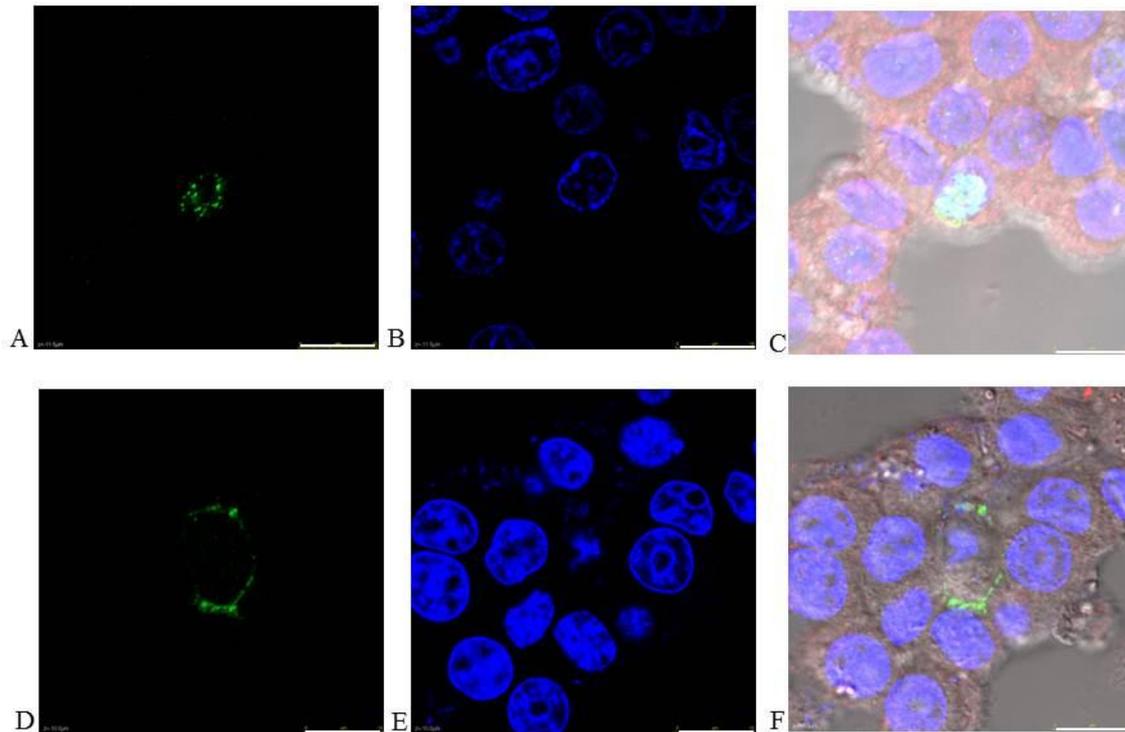


Figura 10.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp40n-1 y Xpress-Dp40c-1 en células PC12 sin diferenciar. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal, se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. A-C muestran los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp40n-1, esta proteína se localiza únicamente en el núcleo de las células transfectadas. D-F, se muestra la señal de Xpress-Dp40c-1, esta proteína se localiza en la periferia celular. La señal en verde indica la localización de la proteína recombinante, en rojo y azul se aprecian los núcleos teñidos con Ioduro de propicio o DAPI. En las imágenes de la derecha se muestra la proyección máxima así como el nomarski. En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μm) así como la posición en el plano Z. Los cortes (A, B, D y E) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos de tres experimentos independientes.

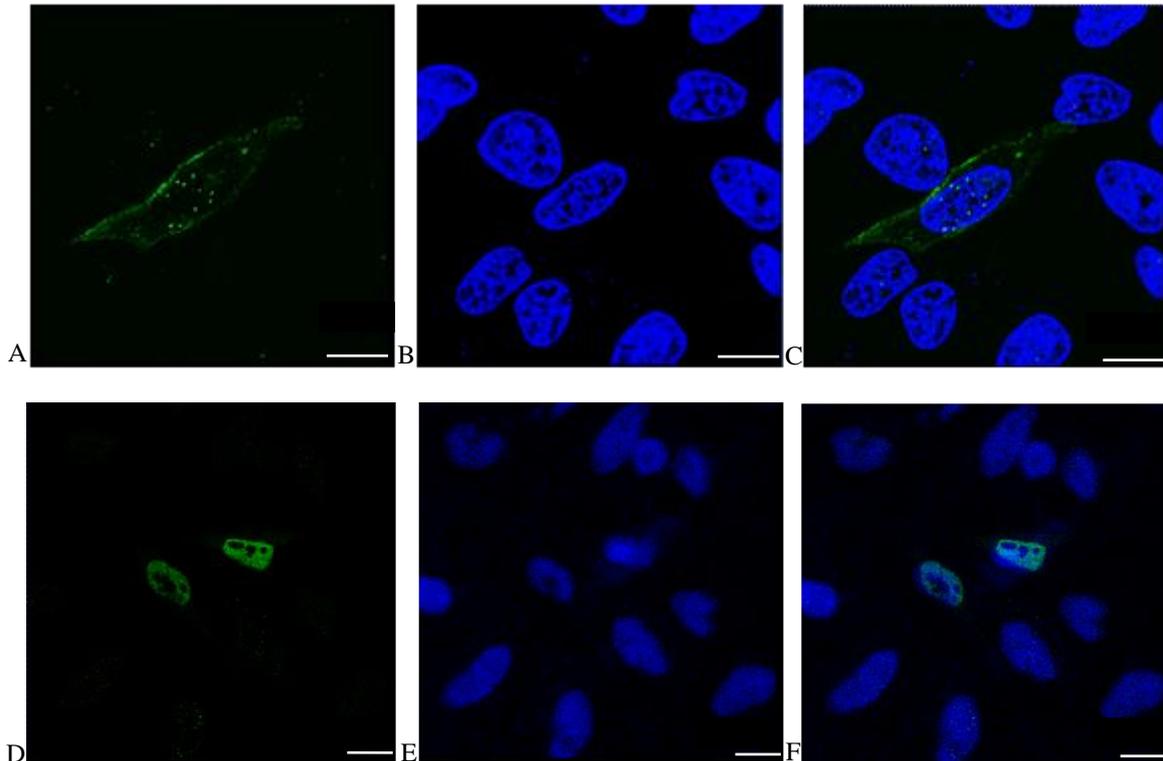


Figura 11. Localización subcelular de las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c en células HeLa. Después de la transfección las células fueron teñidas por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-Xpress como se indica en materiales y métodos. Xpress-Dp40c se localizó principalmente en la periferia celular (A y C), Xpress-Dp40n se localizó en el núcleo de la célula transfectada (D y F). En verde se presenta la señal de la proteína recombinante, el núcleo se encuentra teñido en azul (DAPI) y la sobreposición se muestra a la derecha de cada conjunto de imágenes. La escala (10 μ m) está señalada por la barra en cada imagen. Los cortes (A, B, D y E) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

Para descartar que la bandera presente en el amino terminal de las proteínas recombinantes pudiera influir en su localización, se realizaron los mismos ensayos de localización en células PC12 con las diferentes proteínas Dp40 fusionadas en su extremo carboxilo terminal al epítopo V5 (Dp40n-V5 y Dp40c-V5). Las proteínas con la bandera en el C-terminal mostraron la misma localización observada en aquellas con la bandera en el N-terminal.

Como siguiente paso se determinó la distribución de las proteínas recombinantes en células PC12 diferenciadas por 72 hrs con NGF, transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la detección de las proteínas mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta. Se determinó que la proteína Xpress-Dp40n se localiza principalmente en el núcleo de la

célula transfectada expuesta al NGF (figura 12). Por otro lado, la proteína recombinante Xpress-Dp40c se localiza en el citoplasma cercano a la periferia celular (figura 12). Estos resultados indican que se los cDNAs específicos de Dp40 que se aislaron provenientes de células PC12 codifican para 2 tipos de proteínas. Un tipo corresponde a proteínas nucleares (Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40n-1) mientras que el otro tipo corresponde para una proteína que se encuentra localizada en el citoplasma cercano a la periferia celular (Xpress-Dp40c y Xpress-Dp40c-1), tanto en células sin diferenciar así como diferenciadas con NGF.

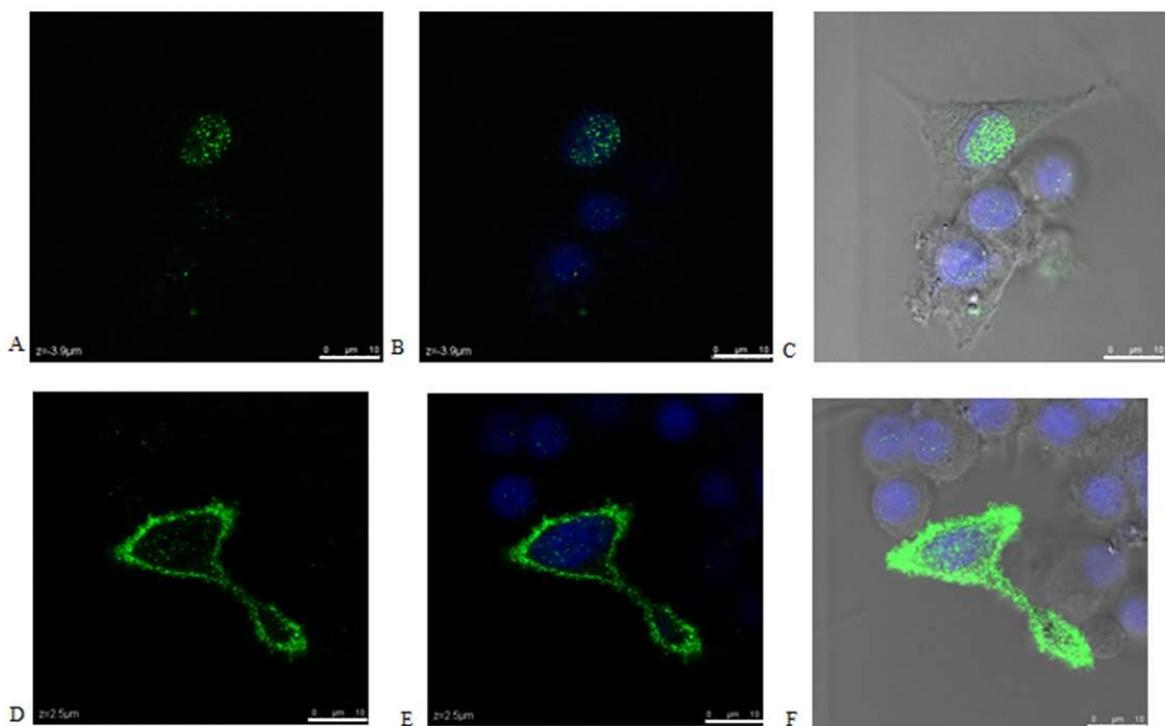


Figura 12.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c en células PC12 diferenciadas por 72 Hrs con NGF. Las células PC12 fueron transfectadas, diferenciadas y teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress, como se indica en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. La señal de la proteína Xpress-Dp40n se observó en el núcleo de la célula (A-C). La señal de la proteína Xpress-Dp40c fue observada en el citoplasma cercano a la periferia celular (D- F) y se observó una ligera tinción nuclear. En verde se muestra la señal de las proteínas recombinantes, el núcleo se encuentra teñido con DAPI (azul). Las imágenes de la derecha representan la proyección máxima de los cortes, así como el nomarski. Los cortes (A, B, D y E) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos. En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μ m) así como el plano en el eje Z.

Dos residuos de prolinas participan en la distribución diferencial de las proteínas Dp40 en las células PC12.

Con el fin de analizar la distribución diferencial de las diferentes cDNAs de Dp40 aisladas a partir de las células PC12, la secuencia de aminoácidos fue analizada en el programa bioinformático PSORT⁹². Este programa lleva a cabo una predicción de la localización subcelular de una proteína, así como una búsqueda de señales de localización nuclear. Las proteínas Xpress-Dp40n, Xpress-Dp40c-1 y Xpress-Dp40c fueron sometidas al análisis en este programa. De manera interesante el programa arrojó que las proteínas Dp40c-1 y Dp40c podrían estar localizadas en el citoplasma celular con una probabilidad del 55%, mientras que la proteína Xpress-Dp40n se localizaría en el núcleo de la célula con la misma probabilidad. Los resultados experimentales obtenidos en esta trabajo soportan la predicción generada por el programa bioinformático (figuras 9-12). Para el caso de la proteína nuclear (Xpres-Dp40n) el programa no encontró ninguna señal de localización nuclear. Se procedió a llevar a cabo una comparación a nivel de proteína entre ambas variantes de Dp40 (Dp40n y Dp40c) mediante análisis de alineamiento en el programa Clustal X. El alineamiento arrojó 4 diferencias (figura 13). Cuando los residuos de leucina en las posiciones 93 y 170 en la proteína Dp40c-1 (figura 13, recuadros rojos), son sustituidos por prolinas, residuos presentes en Dp40n, la predicción del programa PSORT para esta proteína indica que se localiza en el núcleo. Con el fin de corroborar lo anterior se llevó a cabo una mutagénesis dirigida en el vector que codifica para la proteína Xpress-Dp40c para sustituir los residuos de leucina por prolina en ambos sitios (93 y 170). Después de realizar la mutagénesis como se detalla en materiales y métodos y corroborado el cambio por secuenciación automática, se obtuvo la mutante Xpress-Dp40c-L93/170P, y también se obtuvieron las clonas individuales Xpress-Dp40c-L93P y Xpress-Dp40c-L170P. Estas proteínas mutantes fueron analizadas para determinar la importancia de estos residuos sobre la localización subcelular de Dp40 mediante inmunofluorescencia indirecta.

```

|CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

Dp40c      MREHLKGHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
Dp40n      MREHLKGHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
*****

Dp40c      ACDALDQHNLKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRLEQEHN NLVNVPLCVDMCLN WLLNVYDT
Dp40n      ACDALDQHNLKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRPEQEHN NLVNVPLCVDMCLN WLLNVYDT
*****

Dp40c      GRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYL FFKQVASSTGFCDQRR LGLLPHDSIQIPRQL
Dp40n      GRTGRIRVLSFKTGIISLCKAHLEDKYRYL FFKQVASSTGFCDQRR LGLLPHDSIQIPRQL
*****

Dp40c      GEVASF GGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAAETAK
Dp40n      GEVASF GGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAAETAK
*****

Dp40c      HQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHMHPMVEYCTPTTSGED
Dp40n      HQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHMHPMVEYCTPTTSGED
*****

Dp40c      VRDFAKVLKKNKFRTRKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
Dp40n      VRGFAKVLKKNKFRTRKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET
*****

```

Figura 13.-Alineamiento de las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c. La secuencia de ambas proteínas fue alineada en el programa Clustal X. En cuadros rojos se indican los dos residuos identificados en el programa PSORT como probables responsables de la localización diferencial de las proteínas. Los asteriscos indican 100% de homología. Los símbolos con 1 punto y dos puntos señalan el grado de homología a nivel de los grupos R de los aminoácidos.

Se llevó a cabo la transfección de células empleando los vectores con las mutaciones que codifican para las proteínas; Xpress-Dp40c-L93P, Xpress-Dp40c-L170P y Xpress-Dp40-L93/170P en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas por 72 Hrs con NGF. Una vez llevada a cabo la tinción por inmunofluorescencia indirecta y análisis por microscopia confocal se encontró que la doble mutante: Xpress-Dp40c1 93/170LXP se relocalizó en el núcleo de la célula transfectada (figura 14). Lo anterior indica que los residuos de prolinas presentes en la variante Xpress-Dp40n juegan un papel importante en la determinación de la localización subcelular de la Distrofina Dp40. Se analizó la influencia de cada residuo involucrado (93 y170) en vectores que codifican para cada proteína mutada. Los resultados se pueden observar en la figura 15. En esta figura se observa que tan solo una modificación de un residuo en las posiciones 93 ó 170, cambia la localización de la proteína recombinante, localizándola hacia el núcleo de las células PC12 transfectadas sin diferenciar. Estos resultados apuntan a que estos residuos se encuentran en dominios de Dp40 que son importantes para su localización. De manera interesante estos cambios se encuentran localizados en los dominios EF1 y EF2 respectivamente.

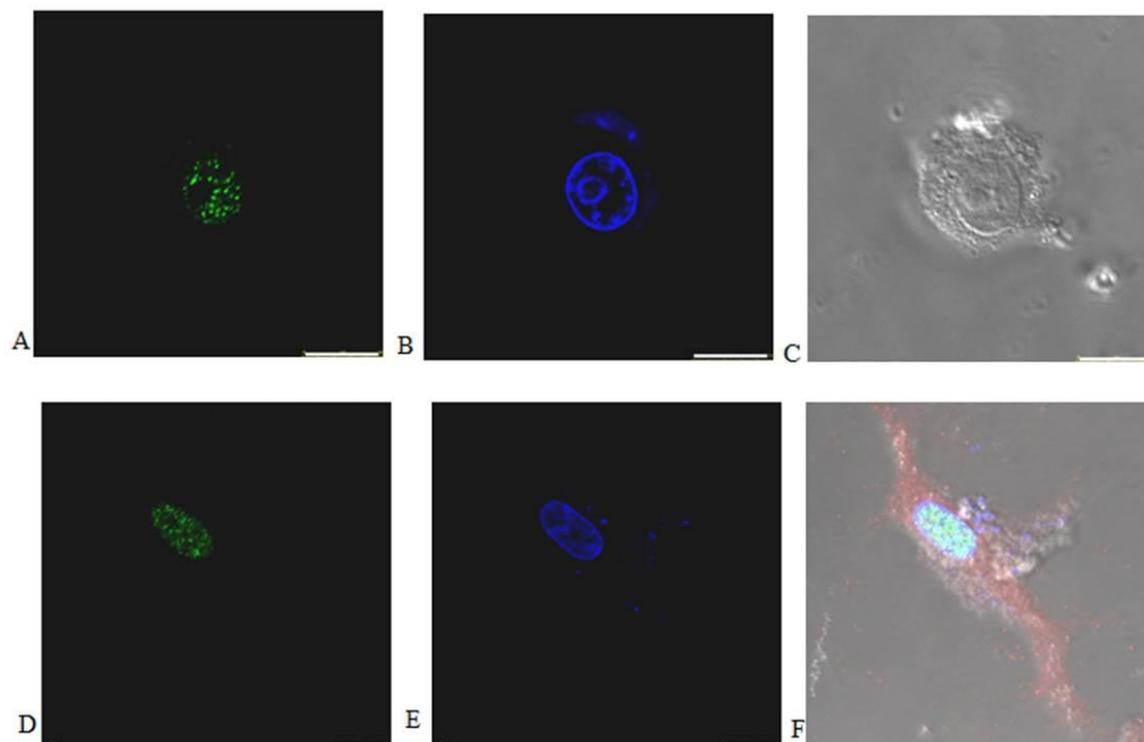


Figura 14.- Distribución subcelular de las proteína mutantes Xpress-Dp40cL93/170P en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas con NGF por 72 Hrs. Después de la transfección, las células fueron teñidos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress, como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal se detectó la distribución de la proteína recombinante. A-C muestran los cortes por confocal de las células PC12 sin diferenciar que expresan la proteína Xpress-Dp40cL93/170P, esta proteína se observó en el núcleo de la célula transfectada. D-F muestra los cortes por microscopia confocal de las células diferenciadas con NGF por 72 Hrs, la señal de la proteína se observa en el núcleo de la célula transfectada. La señal de la proteína recombinante se observa en verde y el núcleo celular en azul teñido con DAPI. En el lado derecho de las imágenes se encuentra la proyección máxima y nomarski. En la parte inferior de cada imagen se encuentra la escala (10 μ m) y la posición en el eje Z. Los corte A, B, D y E y corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

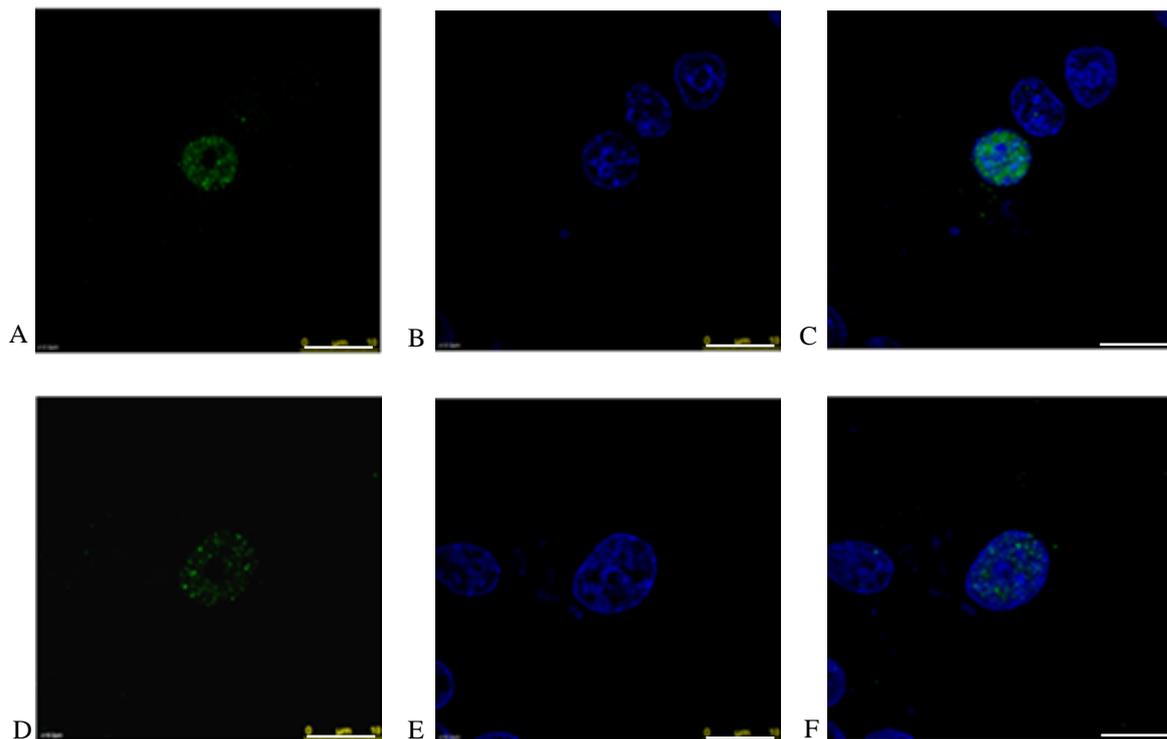


Figura 15.- Distribución subcelular de las proteína mutantes Xpress-Dp40cL93P y Xpress-Dp40cL170P en células PC12 sin diferenciar. Después de la transfección, las células fueron teñidos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal se detectó la distribución de la proteína recombinante. A-C se muestra los cortes por confocal de las células PC12 sin diferenciar que expresan la proteína Xpress-Dp40cL93P. D-F muestran los cortes para Xpress-Dp40cL170P, ambas proteínas se observan en el núcleo de la célula transfectada. La señal de la proteína recombinante se observa en verde y el núcleo celular en azul teñido con DAPI. En el lado derecho de las imágenes se encuentra la sobreposición de ambos canales. En la parte inferior de cada imagen se encuentra la escala (10 μm) y la posición en el eje Z. Los corte A, B, D y E y corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

Interacción de las proteínas Xpress-Dp40c y Xpress-Dp40n con β -Distroglicano.

La proteína Dp40 esta codificada por los exones 63-70 del gen de la distrofina y estos exones contiene el dominio rico en cisteína y los primeros 48 aminoácidos de la región carboxilo terminal de las distrofinas (81), en esta región se encuentra el sitio de unión para el β -Distroglicano, y ya se ha descrito la interacción de Dp71 con esta proteína. Lo anterior sugiere que Dp40 podría interaccionar con β -Distroglicano y formar un complejo en células PC12. Esta posibilidad fue explorada mediante la transfección transitoria de células sin diferenciar y diferenciadas por 72 Hrs con NGF con ambas proteínas. Los resultados se muestran en la figura 16 y 17, la proteína Xpress-Dp40n

presenta un porcentaje de co-localización de 5% en células tratadas y sin tratar con NGF. Es importante señalar que todos los porcentajes de co-localización reportados en este trabajo fueron obtenidos a partir de la proyección máxima de los cortes en el microscopio confocal entre las señales que se analizan. De esta manera en células PC12, la proteína Xpress-Dp40c presento un porcentaje de co-localización del 40% en las células tratadas y sin tratar con NGF. Estos resultados sugieren que las proteínas con localización citoplasmica (Xpress- Dp40c-1 y Dp40c), esta interaccionando con β -Distroglicano en las células PC12 sin tratar (figura 16) y tratadas con NGF (figura 17) y es probable que esta interacción sea la responsable de la localización subcelular de Dp40.

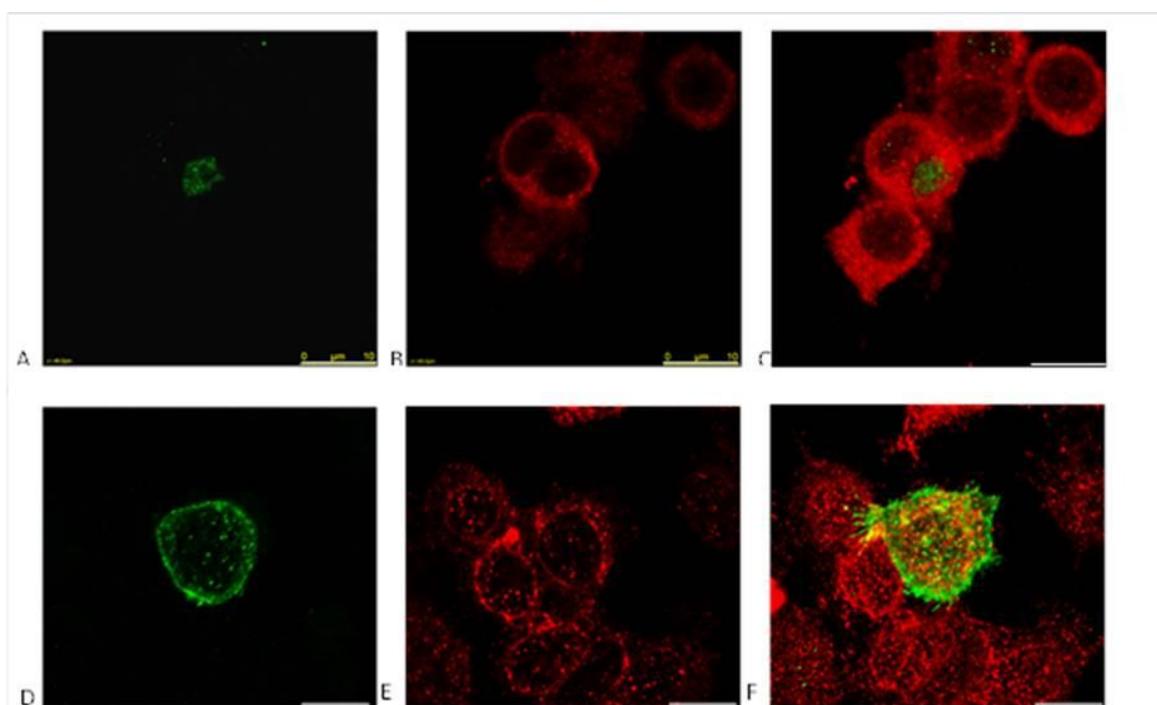


Figura 16. Ensayos de co-localización entre las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c con β -Distroglicano en células PC12 no diferenciadas. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress, como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal, se analizó la co-localización de las señales de la proteína recombinantes (verde) y la proteína endógena β -Distroglicano (rojo). El porcentaje de co-localización fue calculado a partir de la sobreposición de ambos canales a partir de la proyección máxima, mostrados a la derecha de cada conjunto de imágenes. A-C muestran los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp40n. D-F muestran los cortes por confocal de las células que expresan Xpress-Dp40c. En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μ m), así como la posición en el eje Z. los cortes A, B, D y E corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

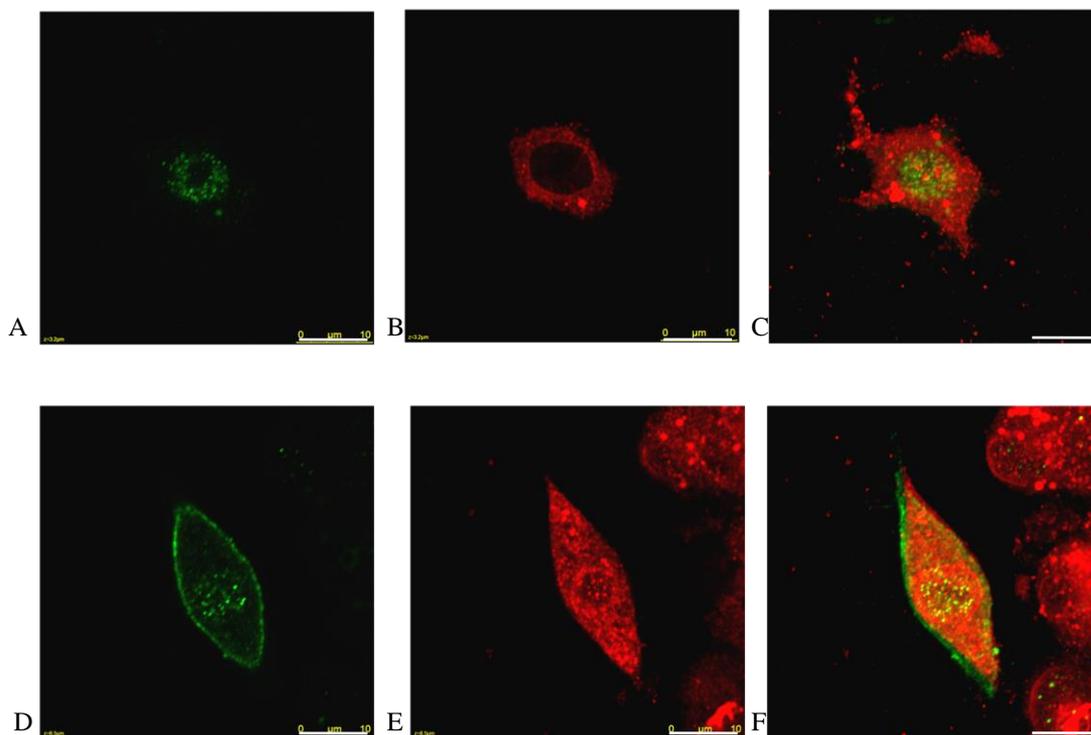


Figura 17. Ensayos de co-localización entre las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40c con β -Distroglicano en células PC12 diferenciadas con NGF. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress, como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal, se analizó la co-localización entre las señales de la proteína recombinantes (verde) y la proteína endógena β -Distroglicano (rojo). El porcentaje de co-localización fue calculado a partir de la sobreposición de ambos canales a partir de la proyección máxima, mostrados a la derecha de cada conjunto de imágenes. A-C se muestra los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp40n en células diferenciadas con NGF. D-F muestran los cortes por confocal de las células que expresan Xpress-Dp40c diferenciadas con NGF. En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μ m) así como la posición en el eje Z. los cortes A, B, D y E corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

Evaluación de la interacción de la proteína Dp40n con componentes nucleares.

Los resultados anteriores indican una distribución diferencial en las proteínas Dp40. Las variantes Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40n1 se localizan en el núcleo de las células analizadas. Para contribuir al estudio de la función de esta proteína, se procedió a analizar la co-localización de estas con lámina A/C un componente estructural de la matriz nuclear. Así, células transfectadas con el vector que expresa a Xpress-Dp40n y sometidas a análisis por inmunofluorescencia indirecta para detectar a la proteína recombinante con el

anticuerpo anti-Xpress y un anticuerpo anti lamina A/C como se describe en materiales y métodos fueron sometidas a análisis de co-localización. Como se muestra en la figura 18, el porcentaje de co-localización entre ambas proteínas fue del 5%, tanto en células sin diferenciar como diferenciadas con NGF por 72 hrs. Esto indica que Xpress-Dp40n no se encuentra interaccionando con este componente de la matriz nuclear. Las mutantes de Dp40c (Xpress-Dp40cL93/170P, Xpress-Dp40cL93P y Xpress-Dp40cL170P), mostraron porcentajes de co-localización similares con lamina A/C.

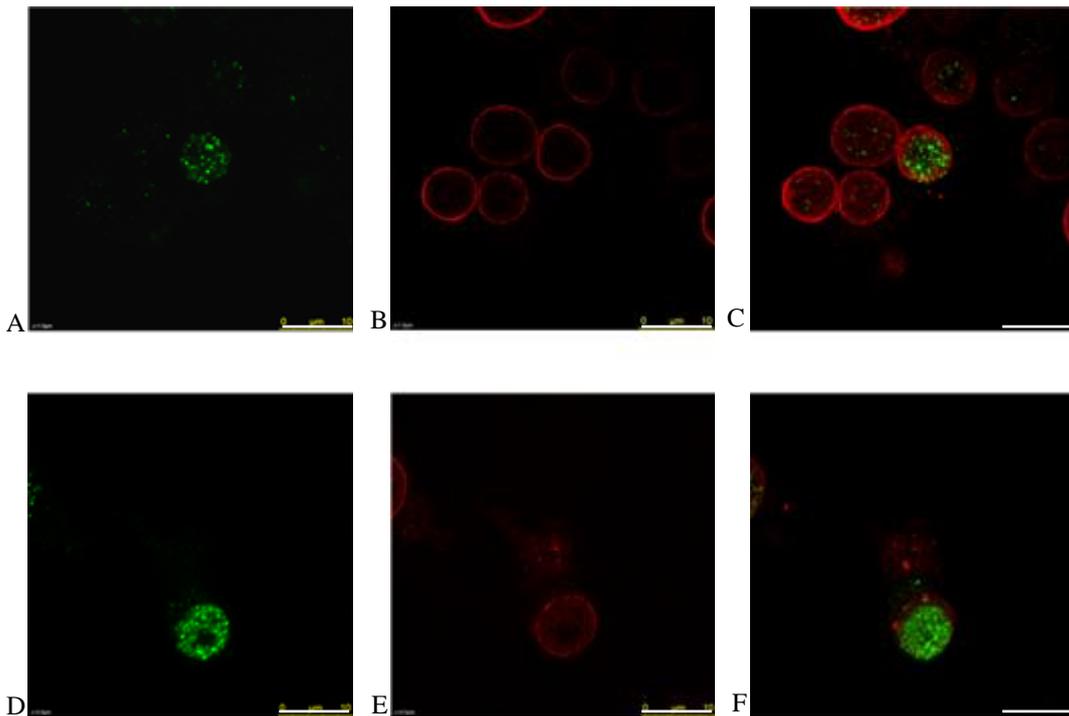


Figura 18. Ensayos de co-localización entre la proteína Xpress-Dp40n y lamina A/C en células PC12 sin diferenciar y diferenciadas con NGF. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress y anti Lamina A/C, como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal, se detectó la co-localización entre las señales de la proteína Xpress-Dp40n (verde) y la proteína endógena Lamina A/C (rojo). El porcentaje de co-localización fue calculado a partir de la sobreposición de ambos canales en la proyección máxima y este fue del 5%, se observa la sobreposición de ambos canales en las imágenes de la derecha. A-C muestra los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp40n en células no diferenciadas. D-F muestran los cortes por confocal de las células diferenciadas con NGF. En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μ m) así como la posición en el eje Z. los cortes A, B, D y E corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos.

Para responder a la interrogante de si la proteína Xpress-Dp40n podría estar asociada con el DNAg, se utilizó al agente intercalante del DNA; Actinomicina D. Se ha propuesto que alteraciones estructurales de la cromatina generadas por la unión de Actinomicina D, resultan en un estado de cromatina transcripcionalmente inactivo ⁹³. Además se ha reportado la deslocalización de proteínas nucleares que interactúan con DNA en células expuestas a este fármaco ⁹⁴. Con estos antecedentes se procedió a analizar el efecto de diferentes concentraciones de ActD sobre la distribución de las proteínas, empleando el anticuerpo primario monoclonal anti-hrnpA1. Para esto, células PC12 sembradas 24 horas antes del tratamiento, se les retiró el medio de crecimiento para ser complementado con 3 dosis de ActD (5, 10 y 15 µg/ml) por dos horas. Seguido de esto, las células fueron teñidas por inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo monoclonal anti-hrnpA1. Las células fueron observadas en un microscopio Axioscop 1000 de Epifluorescencia (figura 19), y se observó que las concentraciones de 10 y 15 µg/ml provocaron la salida de la proteína hrnpA1 del núcleo celular no así la de 5 µg/ml. La concentración de 10 µg/ml fue seleccionada para el resto de los experimentos por ser una concentración intermedia entre las concentraciones analizadas. Las células PC12 una vez transfectadas fueron expuestas a Actinomicina D por 2 horas (10 µg/ml) y sometidas a inmunofluorescencia indirecta como se indica en materiales y métodos para posteriormente ser analizadas mediante microscopía confocal. Los análisis de co-localización entre Xpress-Dp40n y el DNAg (marcaje blanco en la figura) disminuyeron de un 20.04% a un 4.42 % en aquellas células expuestas a Actinomicina D (figura 20). Lo anterior sugiere que la proteína nuclear Dp40n pudiera estar asociada a la heterocromatina. Empleando un vector construido durante el desarrollo de la Tesis de maestría del que sustenta la presente ⁹⁰, que codifica para la proteína Myc-Dp40n los resultados fueron similares (figura 22-C). El vector generado expresa a la proteína Dp40n con la bandera c-Myc fusionado en el amino terminal.

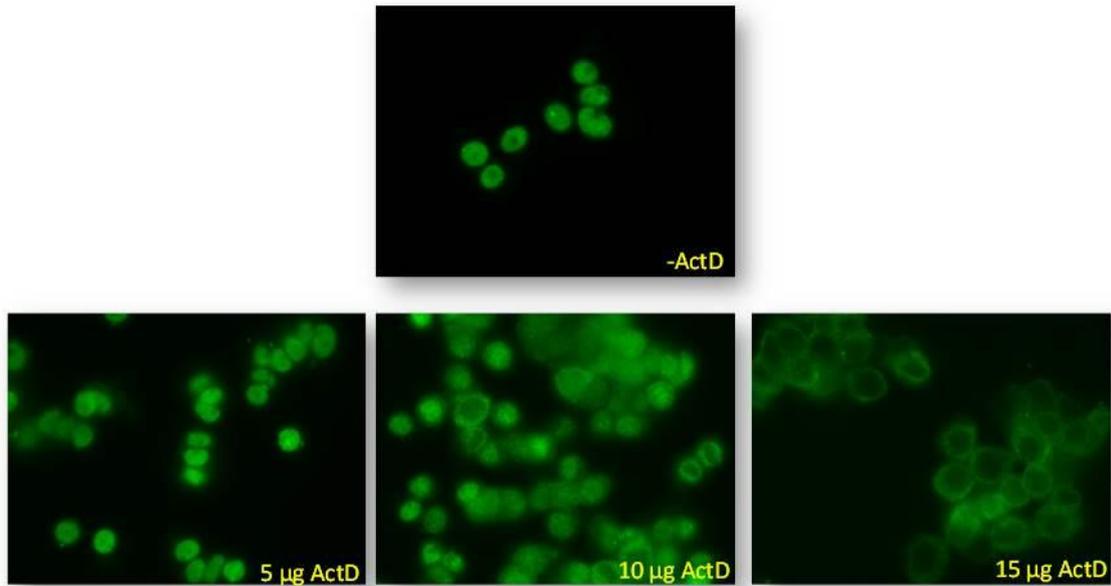


Figura 19.- Efecto de diferentes concentraciones de ActD sobre la proteína nuclear hrnpA1 en células PC12. Las células PC12 fueron expuestas a 3 distintas concentraciones de ActD (5, 10 y 15 µg/ml) por 2 horas para posteriormente ser analizadas por inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-hrnpA1 como se indica en materiales y métodos. Las células fueron analizadas con un microscopio de epifluorescencia para detectar la señal de la proteína. Se observa que las concentraciones de 10 y 15 µg/ml provocan la salida de hrnpA1 del núcleo. La señal de hrnpA1 se observa en verde. La concentración de ActD está indicada en cada imagen.

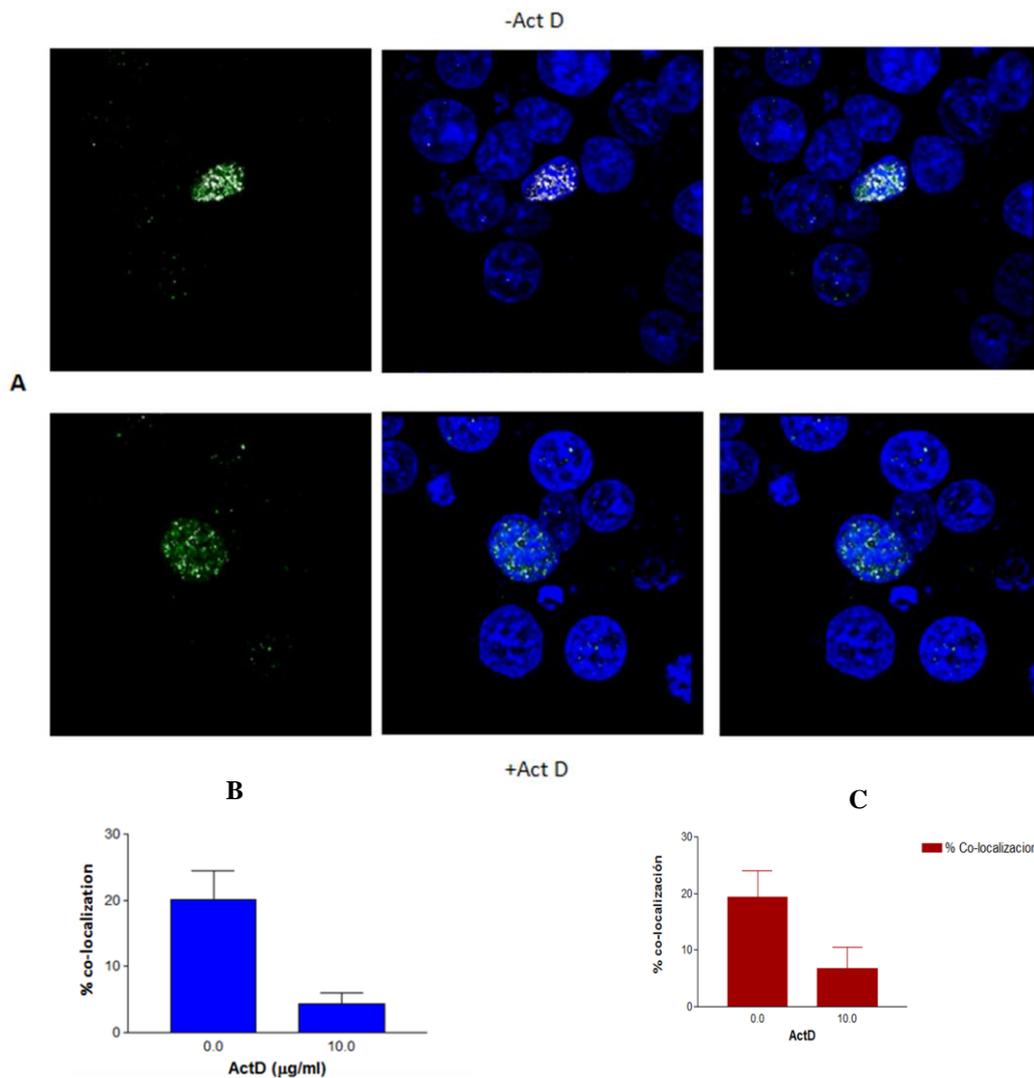


Figura 20. Efecto de ActD sobre la co-localización de las proteínas Xpress-Dp40n y Myc-Dp40n con el DNAg en células PC12 sin diferenciar. Después de la transfección, las células fueron pre-tratadas con 10 µg/ml de ActD por 2 hrs seguido de la detección de las proteínas recombinantes por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, empleando los anticuerpos anti-Xpress y anti-Cmyc como se describe en materiales y métodos. Mediante el uso de microscopia confocal, en A se muestra la señal de la proteína Xpress-Dp40n (verde) sin exponer y expuestas a ActD como se indica y en azul los núcleos teñidos con DAPI. El porcentaje de co-localización entre la proteína y el DNAg fue cuantificado en la sobreposición de ambos canales y con la proyección máxima. En B se observa la gráfica a partir de 30 determinaciones de co-localización para las células transfectadas con Xpres-Dp40n, y en C para Myc-Dp40n con el DNAg. El porcentaje de co-localización entre las proteínas recombinantes y el DNAg disminuyo con el tratamiento de ActD. Los cortes por confocal mostrados en A son representativos.

Caracterización de cDNAs de Dp71 obtenidos de células PC12.

Dentro de los productos del gen *DMD* analizados en el presente trabajo, se encuentran las isoformas Dp71a y Dp71c las cuales se expresan en las células PC12, con el fin de determinar su localización subcelular. Previo a estos ensayos se generaron líneas celulares transfectadas de manera estable con vectores que expresaban a Dp71a y Dp71c como se describió en las figuras 2, 3 y 4. Debido a la variabilidad observada para Dp40 existía la posibilidad de aislar cDNAs de Dp71 que presentaran cambios con respecto a la secuencia reportada para rata, como lo detectado para Dp40 y que afectaran su localización subcelular, por lo que se procedió a llevar a cabo la estrategia descrita para Dp40. Se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR para detectar las isoformas de Dp71 expresadas en células PC12 sin diferenciar, empleando oligonucleótidos específicos como se describe en materiales y métodos. Los cDNAs fueron clonados en un vector de tránsito pGEM-Teasy y fueron sometidos a reacciones de secuenciación automática. Análisis posteriores de alineamientos entre las secuencias obtenidas con la secuencia de rata reportada en el Gen Bank (NM_012698.2) demostraron la presencia de cambios de un solo nucleótido encontrado en los cDNAs aislados.

Los cDNAs aislados se presentan en la tabla 1 y se encontraron cambios de nucleótidos en su secuencia. El cDNA de la isoforma denominada Dp71a fue la que más cambios de un solo nucleótido presento detectándose también la presencia de un cambio de codón (**cag** sustituye a **aga**), cabe aclarar que esta isoforma fue la empleada para la obtención de células transfectadas de manera estable obteniéndose los resultados anteriormente descritos, los números en el nombre de cada clona sirve para su identificación, la clona Dp71a-4 no presentó cambios con respecto a la secuencia de rata. La repercusión de estas modificaciones fue analizada mediante traducción *in silico* para determinar si estas cambiaban la secuencia de aminoácidos o interrumpían el marco de lectura. Como se indica en la tabla 2, ninguno de los cambios de un solo nucleótido interrumpió el marco de lectura, pero si modificó algunos aminoácidos. Se encontraron 16 cambios de los cuales 9 fueron sinónimos y 7 no sinónimos. Es importante señalar que ambas cadenas de DNA fueron secuenciadas.

Tabla1 Relación de cambios en el cDNA de Dp71a encontrados en células PC12.

Clona	Cambio	Exón
Dp71a-8	c→t	67
	a→g	68
	t→c	76
Dp71a-11	g→a	66
	g→a	72
	g→a	75
Dp71a-13	c→t	66
Dp71a	c→t	67
	t→c	67
	g→a	67
	a→g	67
	c→a	68
	g→c	68
	cag→aga	74-75
Dp71a-4	Sin cambios	

Tabla 2. Análisis *in silico* de los cambios de un nucleótido encontrados para Dp71a en células PC12.

Clona	Modificación	Exón
Dp71a-8	A→V	67
	M→V	68
Dp71a-11	R→K	66
	R→H	72
Dp71a-13	T→I	66
Dp71a	N→K	68
	Q→R	75

Los cDNAs específicos para la isoforma Dp71c aislados a partir de las células PC12, fueron analizados mediante alineamientos contra la secuencia de rata reportada en el Gen Bank (NM_001005246.1), este análisis se muestra en la tabla 3. En este caso también fueron detectados cambios de un solo nucleótido para la isoforma Dp71c. La clona denominada Dp71c fue la que más cambios presentó (6 cambios), es de llamar la atención

esta clona ya que fue la secuencia empleada en el intento de obtener células transfectadas de manera estable con los resultados descritos anteriormente, la secuencia de la clona Dp71c-5 no presento cambios. Se llevó a cabo la traducción *in silico* de los cDNAs encontrados para determinar si los cambios encontrados interrumpirían el marco de lectura de la proteína, los resultados de este análisis se muestran en la tabla 4, se encontraron 10 cambios de los cuales 6 fueron sinónimos y 4 no sinónimos. Es de llamar la atención de que los cDNAs de Dp71a y Dp71c comparten variaciones y la sustitución a nivel del aminoácido N→K en el exón 68, este es común para ambas isoformas. Estos resultados sugieren que los cDNAs tuvieron un origen común.

Tabla 3. Relación de los cambios de cDNA de Dp71c encontrados en células PC12.

Clona	SNV	Exón
Dp71c-1	g→a	69
Dp71c-12	a→g	65
	a→g	75
	t→c	75
Dp71c	c→t	67
	t→c	67
	g→a	67
	a→g	67
	c→a	68
	g→a	75
Dp71c-5	Sin cambios	

Tabla 4. Análisis *in silico* de los cambios de un nucleótido encontrados para Dp71c

Clona	Modificación	Exón
Dp71c-1	E→k	69
Dp71c-12	T→A	65
	F→L	75
Dp71c	N→K	68

Localización subcelular de las proteínas de Dp71 en células PC12.

El estudio de los cambios encontrados en los cDNAs de Dp40 mostró que estos influyen en la localización subcelular de las proteínas para los que codifican, de hecho los vectores generados durante el trabajo previo para expresar las proteínas Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71c, las secuencias clonadas presentaban modificaciones a nivel de cDNA (tabla 1), es por ello que se decidió aislar, caracterizar y clonar diferentes cDNAs de Dp71 en el mismo vector de expresión (4hisMaxTopo-TA). Las secuencias clonadas fueron Dp71a-4 y Dp71c-5, estas fueron seleccionadas debido a que no presentaron ningún cambio con respecto a la secuencia de rata (tablas 1 y 3). Se obtuvieron los vectores recombinantes que codifican para estas proteínas los cuales fueron caracterizados por PCR y secuenciación. Los vectores se emplearon para realizar ensayos de transfección transitoria y detección de las proteínas recombinantes por inmunofluorescencia indirecta, como se describe en materiales y métodos, en células PC12 sin diferenciar y diferenciados por 72 hrs con NGF. Como se muestra en la figura 21 y 22, las proteínas de Dp71a; Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71a-4 muestran una localización citoplasmática y nuclear. La proteína recombinante Xpress-Dp71a mostro una localización citoplasmática en la mayoría de las células analizadas y en algunas células se observó tinción nuclear tanto en células sin diferenciar y diferenciadas con NGF. Por otro lado la variante Xpress-Dp71a-4 mostro una localización citoplasmática solo que más cercano a la periferia celular, tanto en células no diferenciadas y diferenciadas con NGF por 72 hrs (figuras 23 y 24). La proteína Xpress-Dp71a-4 no mostró tinción nuclear en ninguno de los experimentos realizados. En las tablas 1 y 2 se muestra que entre ambas proteínas de Dp71a, la proteína Xpress-Dp71a presenta dos cambios con respecto a Xpress-Dp71a-4, estos cambios son: N205K y Q437R, localizados en los exones 68 y 75 respectivamente. Estos cambios residen en dominios que influyen en la localización de la distrofina Dp71a.

Xpress-Dp71a

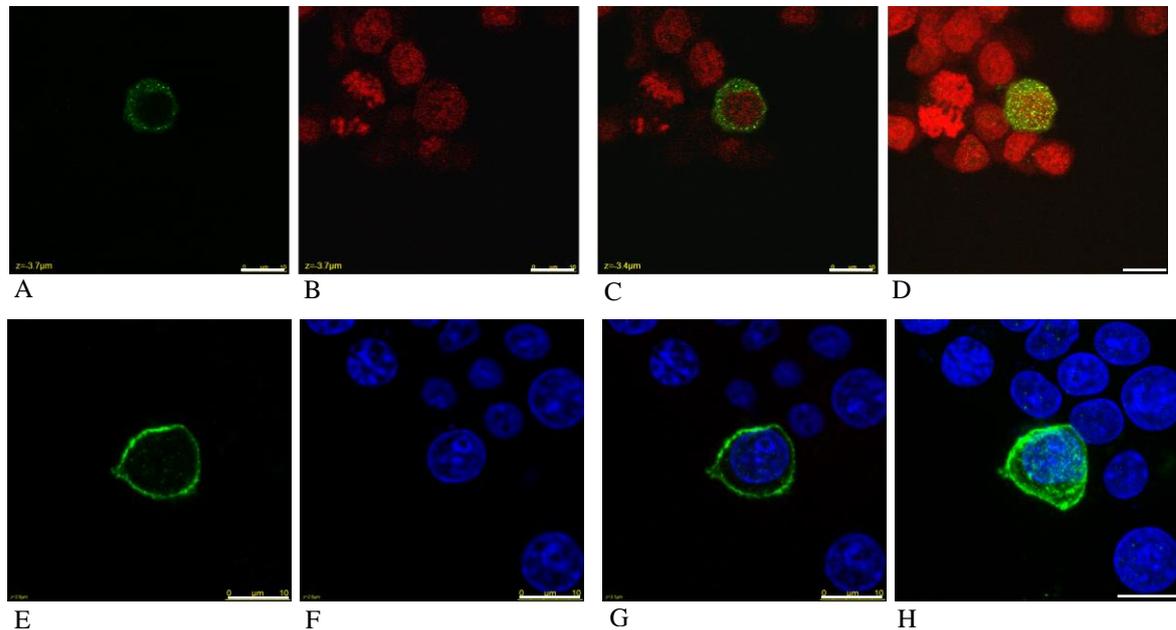


Figura 21.- Distribución subcelular Xpress-Dp71a-4 Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71a4 en células PC12 sin diferenciar. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. A-D muestran los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71a. Esta proteína se localiza en el citoplasma y núcleo de las células transfectadas. E-H, muestra los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71a-4, esta proteína se localiza en la periferia celular. La señal en verde indica la localización de la proteína recombinante mientras que en rojo y azul se aprecian los núcleos teñidos con Ioduro de propidio o DAPI, en las imágenes de la derecha se muestra la sobreposición de los canales (C, G) y la proyección máxima (D-H). En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μm) así como la posición en el plano Z. Los cortes (A, B, E y F) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos de tres experimentos independientes.

Xpress-Dp71a

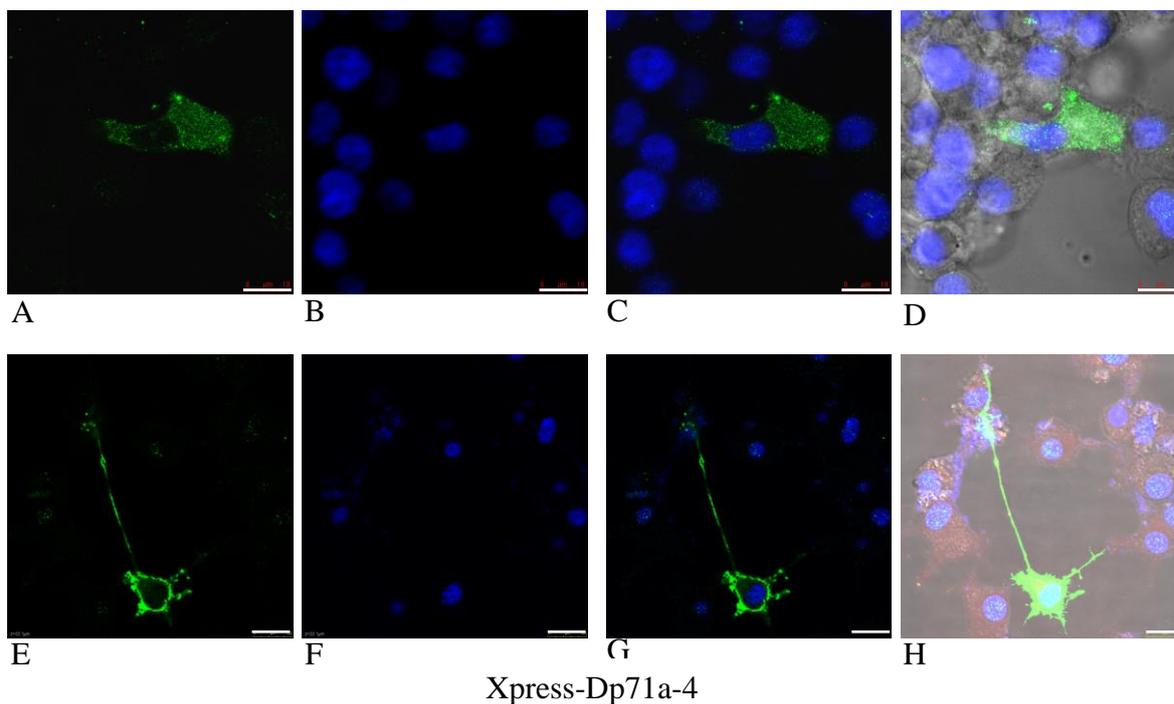


Figura 22.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71a4 en células PC12 diferenciadas con NGF por 72 Hrs. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. A-D muestran los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71a, esta proteína se localiza en el citoplasma de las células transfectadas. E-H, muestra los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71a-4, esta proteína se localiza en el citoplasma incluyendo axones y neuritas. La señal en verde indica la localización de la proteína recombinante, en rojo y azul se aprecian los núcleos teñidos con Ioduro de propidio y DAPI, en las imágenes de la derecha se muestra la sobreposición de los canales (C, G), la proyección máxima y nomarski (D y H). En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10 μ m) así como la posición en el plano Z. Los cortes (A, B, E y F) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos de tres experimentos independientes.

Los ensayos con las proteínas de Dp71c aisladas de en PC12 se muestran en las figuras 23 y 24. La señal de ambas proteínas recombinantes; Xpress-Dp71c y Xpress-Dp71c-5 mostró una señal de marcaje en la periferia de célula transfectada, tanto en células sin diferenciar (figura 25) y diferenciadas con NGF por 72 hrs (figura 26). Las imágenes mostradas son representativas de 3 experimentos independientes. En las células diferenciadas se observó algo interesante, aquellas células transfectadas y sobre

expresando a las proteínas recombinantes, se observaron intento de procesos de desarrollo de neuritas u estructuras semejantes a filopodios u prolongaciones emergiendo del soma celular (flechas rojas en figura 24), dando indicios de que la sobreexpresión de la isoforma Dp71c pudiera obstaculizar el proceso de diferenciación en células PC12. Lo anterior sugeriría que los cambios encontrados a nivel de cDNA no alteran la localización de las proteínas Dp71c. Estos cambios se encuentran en los exones 67 y 68 y codifican para el dominio rico en cisteínas entre EF2 y ZZ, así como el exón 75 que codifica para el dominio de unión a Distrobrevina en la distrofinas¹⁷.

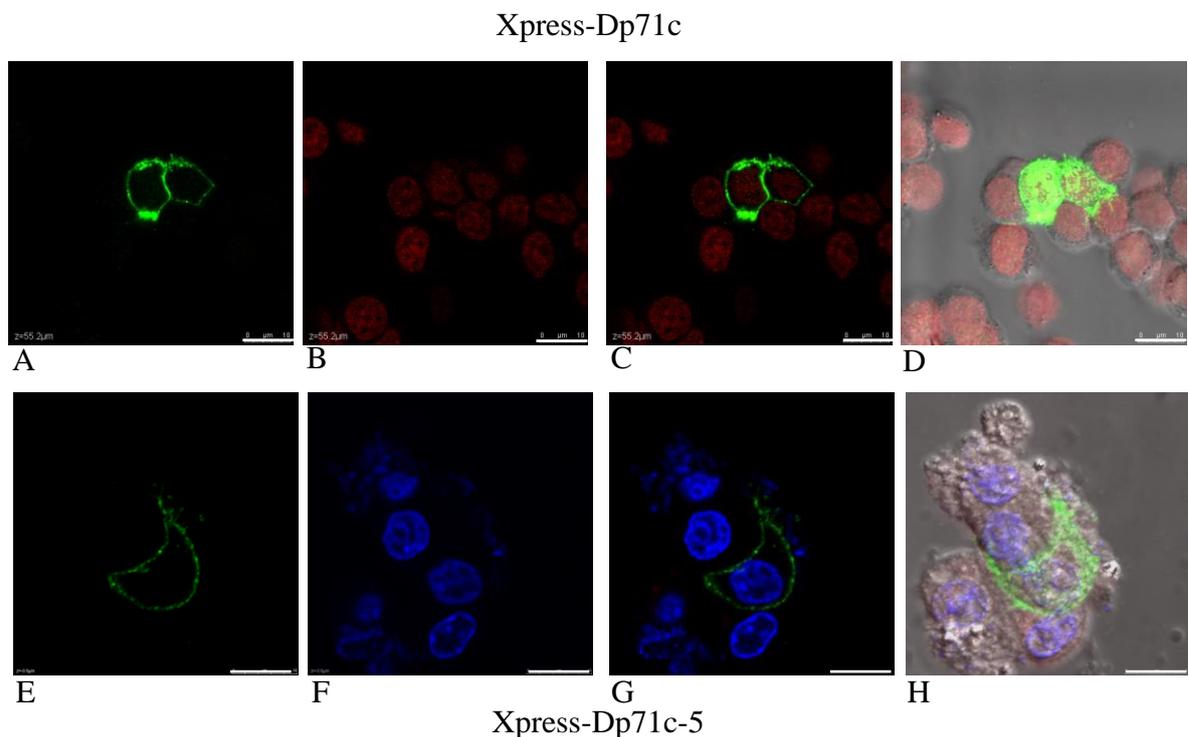


Figura 23.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71c y Xpress-Dp71c-5 en células PC12 sin diferenciar. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopia confocal se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. A-D muestran los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71c, esta proteína se localiza en la periferia celular. E-H, muestra los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71c-5, esta proteína se localiza en la periferia celular. La señal en verde indica la localización de la proteína recombinante, en rojo y azul se aprecian los núcleos teñidos con Ioduro de propidio y DAPI, en las imágenes de la derecha se muestra la sobreposición de los canales (C, G) la proyección máxima y nomarski (D, H). En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (10μm) así como la posición en el plano Z. Los cortes (A, B, E y F) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos de tres experimentos independientes.

Xpress-Dp71c

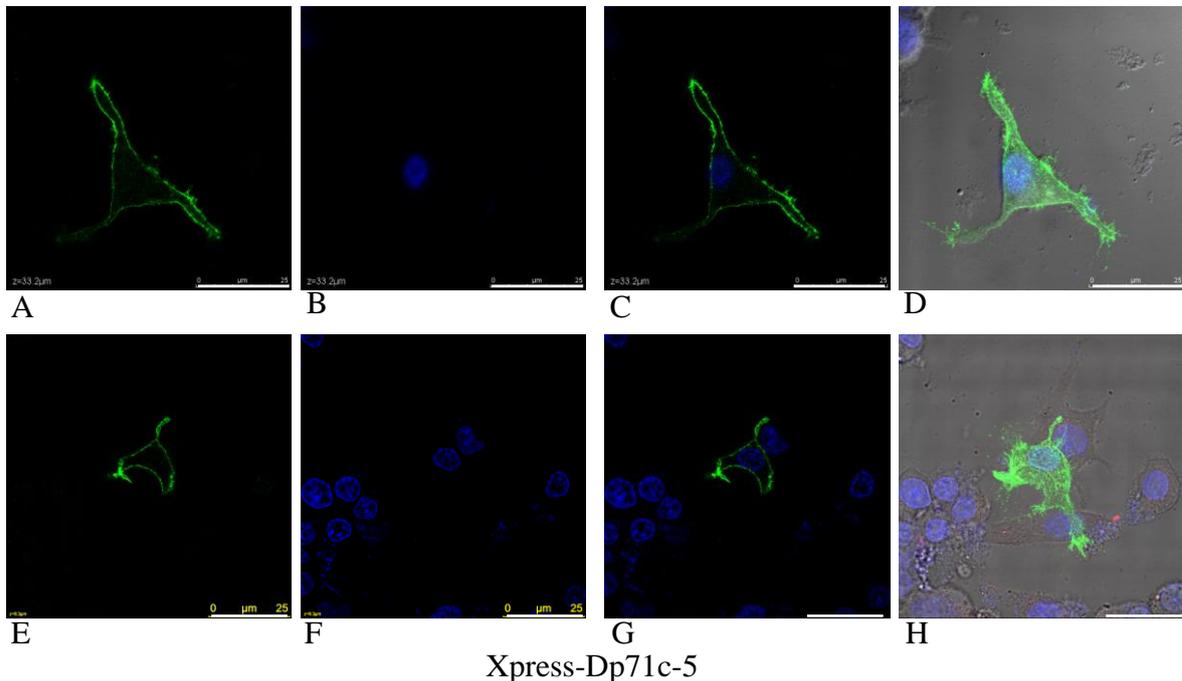


Figura 24.- Distribución subcelular de las proteínas Xpress-Dp71c y Xpress-Dp71c-5 en células PC12 diferenciadas con NGF por 72 Hrs. Después de la transfección, las células fueron teñidas por la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo anti-Xpress como se describe en materiales y métodos. Mediante microscopía confocal se detectó la distribución de las proteínas recombinantes. A-D muestran los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71c, esta proteína se localiza en la periferia celular. E-H muestra los cortes por confocal de las células que expresan la proteína Xpress-Dp71c-5, esta proteína se localiza en la periferia celular. La señal en verde indica la localización de la proteína recombinante, en azul se aprecian los núcleos teñidos con DAPI, en las imágenes de la derecha se muestra la sobreposición de los canales (C, G) la proyección máxima y nomarski (D, H). Nótese las extensiones membranales en la periferia de la célula transfectada (flechas rojas). En la parte inferior de cada imagen se aprecia la escala (25 μ m) así como la posición en el eje Z. Los cortes (A, B, E y F) corresponden al plano ecuatorial de la célula y son representativos de tres experimentos independientes.

Análisis de la probable interacción de Dp71 con DGK ζ .

Con el objetivo de analizar si la interacción de Dp71 con DGK ζ a través de γ 1 sintrofina⁵³, pudiera ser responsable del transporte de Dp71 al núcleo en células PC12, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación, para ello primero se llevó a cabo la detección de las proteínas DGK ζ y γ 1 sintrofina en células PC12 por ensayos de

inmunodetección en fase sólida. Posteriormente se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación los cuales consistieron en inmunoprecipitar a la Dp71 endógena con un anticuerpo específico (H4) que reconoce a las isoformas Dp71a y Dp71c y posteriormente inmunodetectar a DGK ζ o γ 1-sintrofina. Al realizar estos experimentos, no se detectó la interacción de Dp71 con estas proteínas en células PC12 sin diferenciar (datos no mostrados), esto sugiere que estas proteínas no están interaccionando con la isoforma Dp71a endógena. Para corroborar lo anterior, se llevó a cabo la inmunoprecipitación inversa, es decir se inmunoprecipitó a la DGK ζ o γ 1-sintrofina y se detectó a la Dp71a con el anticuerpo H4. Los resultados indicaron que la señal de la Dp71a endógena solo se observó en los carriles donde se cargaron los sobrenadantes de cada experimento y no se observa señal en el carril donde se cargaron los inmunoprecipitados (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que no existe una interacción de las proteínas DGK ζ y γ 1 sintrofina con la isoforma Dp71a endógena en células PC12 sin diferenciar.

DISCUSIÓN.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la localización subcelular de las isoformas Dp71a, Dp71c y Dp40 en el modelo celular PC12. Debido a que las isoformas Dp71a y Dp71c, están codificadas por los exones 63-78, con presencia/ausencia de los exones 72-74 respectivamente, estas no pueden diferenciarse una de otra empleando los anticuerpos dirigidos en contra de la región C-terminal de las distrofinas, por otro lado, la proteína Dp40 al contar con los exones 63 al 70, un anticuerpo dirigido en contra de su N-terminal, también podría reconocer a las isoformas de Dp71, por lo que la estrategia empleada en el presente trabajo ofrece una nueva alternativa para su estudio y para el caso de Dp71c el presente trabajo es el primero que analiza su localización.

Por lo anterior se aislaron los cDNAs correspondientes a las proteínas Dp71a, Dp71c y Dp40 y al llevar a cabo su caracterización, se encontraron diferencias a nivel de cDNA de un solo cambio de nucleótido para los productos del gen *DMD* aislados, esta misma estrategia permitió el aislamiento de cDNAs con una secuencia idéntica a la reportada en rata. Estos cDNAs fueron clonados para sobre-expresar a las proteínas recombinantes fusionadas con el epítopo Xpress en su región amino terminal y su detección se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, los resultados indicaron que los cambios encontrados modifican la localización subcelular de la proteína Dp40; las proteínas Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40n-1 mostraron una

localización nuclear, mientras que las proteínas Xpress-Dp40c y Xpress-Dp40c-1 mostraron una localización citoplasmática cercana a la periferia celular. Por otro lado Xpress-Dp71a y Xpress-Dp71a-4 mostraron una localización subcelular en el citoplasma/núcleo y en la periferia de la célula transfectada. Los cDNAs Dp71c y Dp71c-5, codificaron para proteínas cuya localización se observó en la periferia celular tanto en células sin diferenciar y diferenciadas con NGF por 72 Hrs.

Un problema que se detectó desde los primeros ensayos con las células PC12, es que este modelo no presenta una alta tasa de eficiencia de transfección (< 10 %), es por ello que otro objetivo de este trabajo fue el generar células transfectadas de manera estable, aprovechando que el vector en que fueron clonadas (4HisMax-TOPO TA) presenta un gen de resistencia a zeocina, útil para la selección de clonas que expresan constantemente al DNA transfectado. Además de las proteínas reportadas en esta Tesis, por conveniencia los experimentos incluyeron a la Dp71ab y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Los ensayos que perseguían este objetivo solo generaron células transfectadas de manera estable y que expresaran a la proteína blanco, en aquellas transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína mutante Xpress-Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (figura 2), ya que cuando se llevó a cabo la detección de las proteínas recombinantes por ensayos de inmunodetección en fase sólida, solo en estas se detectó a la proteína recombinante, recordando que esta proteína carece de los exones 78-79. Estos experimentos se realizaron por triplicado y se obtuvieron los mismos resultados. Una posibilidad que pudo haber generado estos resultados, era de que los plásmidos transfectados no fueran incorporados al genoma celular o que no estuvieran expresando a la proteína recombinante, esto se descartó ya que el PCR a partir de DNAg con oligonucleótidos dirigidos en contra del vector mostraron productos de amplificación para cada línea transfectada (figura 3) y también se detectaron los mensajeros correspondientes a cada plásmido transfectado (figura 4), aunque en relación con el producto de actina, se observa niveles bajos de los mensajeros, con excepción de Dp40n y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. La presencia de estos niveles bajos a nivel de transcrito podría sugerir algún tipo de regulación a nivel transcripcional en el gen distrofina. El grupo de Voloventa ⁹⁵ identificó en el gen *DMD*, una nueva variedad de RNAs largos no codificantes (lncRNAs) de origen en los intrones, de orientación sentido y anti sentido específicamente localizados en el núcleo y expresados contextualmente con isoformas de distrofina en humano y ratón. La expresión ectópica forzada de estos lncRNAs causa una regulación negativa específica de isoformas de longitud completa. Análisis de secuencia identificaron un ncRNA de 1872 pb en una

dirección anti sentido de la región 3'UTR del gen *DMD* y este transcrito traslapa aproximadamente 2 Kb de la región 3'UTR de todas las isoformas de distrofina; las de longitud completa y las del extremo 3' (Dp71 y Dp40). Sin embargo la sobreexpresión de este ncRNA no regula negativamente la expresión de Dp71, sugiriendo que el efecto de estos ncRNAs tiene un efecto específico. Por lo anterior, se descarta la posibilidad de que este nc3UTRas haya regulado negativamente a las isoformas clonadas en el vector de expresión empleado en este trabajo, ya que fueron clonadas solo las regiones codificantes de cada gen excluyendo las regiones 5' y 3'UTR. Otra posibilidad es que el sitio donde se incorporó el plásmido se encontrara dentro de una región transcripcionalmente reprimida, sin embargo los ensayos de RT-PCR mostraron niveles comparables entre Dp71 Δ_{78-79} y Dp40n y solo en la primera fue posible la detección de la proteína. Lo anterior apunta a que entonces la célula ejerce una regulación a nivel post-traducciona que regula los niveles de estas proteínas endógenas y que escapa a tal regulación la proteína mutante (Dp71 Δ_{78-79}), sugiriendo que los aminoácidos codificados por estos exones deberían de ser importantes para la regulación a nivel de las Dp71, por lo que estas proteínas son de suma importancia para la fisiología de las células PC12 y que la sobreexpresión constante de las mismas resulten incompatibles con su fisiología, estos resultados sugieren hacer uso de sistemas de expresión inducibles.

Los resultados de este trabajo demostraron que las células PC12 expresan el mRNA de Dp40 durante el proceso de diferenciación (figura 6) y al llevar a cabo su caracterización se detectó la presencia de cambios de un solo nucleótido en las secuencias de cDNAs analizados mediante secuenciación (figura 7) algunos de las cuales, modifican la secuencia de aminoácidos (figura 8). Las variaciones encontradas demostraron que influyen en la localización subcelular de la proteína Dp40 y respaldado mediante un programa bioinformático (PSORT). Se encontraron 2 grupos de cDNA, un grupo que codifica para una proteína que se localiza en la periferia (Dp40c y Dp40c1) y otro grupo con localización nuclear (Dp40n y Dp40n1). La proteína Dp40 codifica para la región rica en cisteínas (CR) ubicada entre los exones 63-69 de la distrofina por lo que como se describió previamente, cuenta con la capacidad de interactuar con el β -Distroglicano. Los ensayos de co-localización por microscopia confocal sugieren esta interacción entre las proteínas Dp40c y Dp40c1 con el β -Distroglicano en las células PC12 (figuras 16 y 17). No obstante y dada la limitante de que este modelo no presenta un alto índice de transfección, esta interacción no pudo ser confirmada por ensayos bioquímicos.

Como se observa en la figura 7 los cDNAs aislados a partir de las células PC12 presentaron diferencias de un solo nucleótido en la CR y estas diferencias modificaron algunos residuos (figura 25) aunque ninguna de las modificaciones halladas genera una mutación sin sentido. Se llevó a cabo un análisis comparativo entre las secuencias encontradas en este estudio y la proteína Dp40 humana (NP_004010.1) mostrado en la figura 25. Este dominio es particularmente importante para las distrofinas ya que este incluye tres dominios distintos: El dominio WW (nombrado así por sus 2 dominios conservados de triptófano), el dominio EF hand y el dominio ZZ. La región WW es conocida por unir un motif consenso P-P-X-Y y es el sitio primario de unión entre distrofina y un epítipo rico en prolinas en la región C-terminal del β -Distroglicano. Sin embargo la interacción es posible únicamente en presencia del dominio EF1, el cual permite al dominio WW adoptar la conformación adecuada para la interacción con β -Distroglicano⁹⁶. El dominio ZZ se caracteriza por tener 4 residuos conservados de cisteína en distintos motifs C-X-X-C. Esta región fue llamada así debido a su capacidad de coordinar motifs de dedos de zinc con histidinas adicionales y otros residuos de ligando potencial. El dominio ZZ está involucrado en la interacción estable entre distrofina y el β -Distroglicano y un estudio sugirió que el péptido YRSLKHF del dominio ZZ (figura 25), forman una parte crucial de la región de contacto entre las dos proteínas⁹⁷. Esto sugiere que existen al menos dos sitios de unión en el dominio CR de la distrofina que es importante para la unión con β -Distroglicano, uno en el dominio WW y otro en el dominio ZZ.

La importancia de la región CR sobre la función de la distrofina es demostrada por la distribución de mutaciones con cambio de sentido detectadas en las distrofinopatías. Este tipo de mutaciones son raras en DMD, ya que solo son observadas en 1.4% de todas las mutaciones en distrofinopatías. Entre las 11 mutaciones identificadas en el dominio ZZ (www.dmd.nl) nueve de los pacientes presentan un fenotipo DMD severo. Una de estas mutaciones; p.Cys3340Tyr (figura 25), fue encontrada en un paciente con DMD con expresión reducida de ambas proteínas; Distrofina y β -Distroglicano. Otra mutación p.Cys3313Phe (figura 25) está asociada con características clínicas e histopatológicas característicos de DMD, mostrando una reducción en la tinción de distrofina en biopsias de musculo. Una tercera mutación, p.Asp3335His (figura 25) fue el primer caso en mostrar un fenotipo DMD relativamente severo a pesar de la expresión cercana a lo normal de

distrofina y β -Distroglicano, con aparente localización en el sarcolema de ambas proteínas (94). Existe un reporte en el que fue identificada una mutación con pérdida de 3 pares de bases en el gen DMD, c.9711_9713del, p.(Leu3238del) en una familia con discapacidad intelectual no específica ligada al cromosoma X. Esta pérdida de un solo aminoácido, no impide la expresión de las isoformas de distrofina. El modelaje molecular de esta mutación predice que se desestabiliza el dominio C-terminal de la Distrofina y se reduce la capacidad de interacción con el β -Distroglicano. De manera interesante la determinación de los niveles de Cinasa de creatinina en suero del paciente índice, indicó una moderada elevación de esta enzima en suero. Los autores concluyen que esta mutación es la primera mutación en el gen *DMD* que genera discapacidad intelectual sin distrofia muscular⁹⁸. Este residuo de Leucina corresponde al residuo 170 de Dp40 (figura 13 recuadro rojo) y se encuentra en el dominio EF-Hand 2 (figura 25).

Cuando llevamos a cabo un análisis de las proteínas Dp40n y Dp40c en el programa bioinformático PSORT, encontramos que Dp40n se podría localizar en el núcleo celular, mientras que Dp40c se localizaría en el citoplasma, predicciones que fueron corroboradas experimentalmente en este trabajo (figuras 9 y 10), al hacer un análisis comparativo entre estas proteínas (figura 25), encontramos que dentro de las diferencias presentadas dos residuos de prolina localizados en las posiciones 93 y 170, fueron señalados por el programa como responsables de esta localización diferencial. Al llevar a cabo mutagénesis dirigida en Dp40c, sustituyendo los residuos de lisina por prolina en estas posiciones, las nuevas proteínas se localizaban en el núcleo. De esta manera las mutantes: Xpress-Dp40c-L93/170P así como Xpress-Dp40c-L93P y Xpress-Dp40c-L170P se localizaron en el núcleo de las células transfectadas (figuras 14 y 15). Como se observa en la figura 26, estos residuos de prolina (remarcados en púrpura), se encuentran en la región EF-Hand 1 y 2 respectivamente. El grupo de Ishikawa-Sakurai⁹⁷, propone que la región entera desde el dominio WW hasta el dominio ZZ forma una unidad funcional y esta es requerida para la unión *in vivo* de las distrofinas con el β -Distroglicano, los autores la nombran el dominio DGB (dystroglycan-binding domain). La figura 27 ilustra la conformación propuesta para este dominio en que la región desde el dominio WW hasta el dominio EF2 forma una estructura terciaria pero el resto del dominio EF2 y algunos péptidos antes del dominio ZZ (FZ) genera un giro que hace que el dominio ZZ se una con el EF1 y que el cambio conformacional inducido por la interacción entre los dominios EF1 y ZZ son necesarios para adquirir la actividad de unión completa. Esto sugiere que las diferencias de un

residuo en Dp40n podrían modificar la conformación del dominio DGB y este cambio afectaría la interacción con el β -Distroglicano en las células PC12. Para analizar si estas prolinas pudieran repercutir en la conformación estructural de las diferentes proteínas de Dp40 y a su vez estas modificaciones pudieran explicar su localización diferencial, se obtuvieron modelos tridimensionales para Dp40c, Dp40c-1, Dp40n y Dp40n-1 a partir del modelaje descrito para la unión de distrofina con β -Distroglicano (PDB IEG4), los modelados se realizaron en el programa Swiss model ⁹⁹ e I-TASSER ¹⁰⁰. En la figura 26 se muestran una comparación de los modelos tridimensionales para las diferentes cDNAs de Dp40 en PC12 y los ensayos de co-localización indicaron que Dp40c y Dp40c-1 interaccionan con β -Distroglicano, no así las proteínas Dp40n y Dp40n-1, por lo tanto los modelos tridimensionales de Dp40c y Dp40c-1 podrían corresponder al dominio DGB (figura 26 y 27).

```

Dp40c      MREHLKGHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
Dp40h      MRQLKGHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
Dp40n      MREHLKGHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
Dp40c-1    MREHLKGHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
Dp40n-1    MREHLKGHETQTTCDWHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSA
*****

Dp40c      ACDALDQHNLRKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LCVDMCLNWL LNVYDT
Dp40h      ACDALDQHNLRKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LCVDMCLNWL LNVYDT
Dp40n      ACDALDQHNLRKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LCVDMCLNWL LNVYDT
Dp40c-1    ACDALDQHNLRKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LCVDMCLNWL LNVYDT
Dp40n-1    ACDALDQHNLRKQNDQPM DILQI INCLTTIYDRLEQEHNNLVNVP LCVDMCLNWL LNVYDT
*****

Dp40c      GRTGRIRVLSFRTGIIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSTGFCDQRR LGLLHDSIQIPRQL
Dp40h      GRTGRIRVLSFRTGIIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSTGFCDQRR LGLLHDSIQIPRQL
Dp40n      GRTGRIRVLSFRTGIIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSTGFCDQRR LGLLHDSIQIPRQL
Dp40c-1    GRTGRIRVLSFRTGIIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSTGFCDQRR LGLLHDSIQIPRQL
Dp40n-1    GRTGRIRVLSFRTGIIISLCKAHLEDKRYRFLFKQVASSTGFCDQRR LGLLHDSIQIPRQL
*****

Dp40c      GEVAFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAEETAK
Dp40h      GEVAFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAEETAK
Dp40n      GEVAFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAEETAK
Dp40c-1    GEVAFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAEETAK
Dp40n-1    GEVAFGGSNIEPSVRS CFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPV LHRVAAEETAK
*****

Dp40c      HQAKCNICKECP IIGFRYRSLKHFNYD ICQSCFFSGRVAKGHKMHPMVEYCTPTTSGED
Dp40h      HQAKCNICKECP IIGFRYRSLKHFNYD ICQSCFFSGRVAKGHKMHPMVEYCTPTTSGED
Dp40n      HQAKCNICKECP IIGFRYRSLKHFNYD ICQSCFFSGRVAKGHKMHPMVEYCTPTTSGED
Dp40c-1    HQAKCNICKECP IIGFRYRSLKHFNYD ICQSCFFSGRVAKGHKMHPMVEYCTPTTSGED
Dp40n-1    HQAKCNICKECP IIGFRYRSLKHFNYD ICQSCFFSGRVAKGHKMHPMVEYCTPTTSGED
*****

Dp40c      VRDFAKVLKKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQT VLEGDNMET
Dp40h      VRDFAKVLKKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQT VLEGDNMET
Dp40n      VRDFAKVLKKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQT VLEGDNMET
Dp40c-1    VRDFAKVLKKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQT VLEGDNMET
Dp40n-1    VRDFAKVLKKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPVQT VLEGDNMET
*****

```

Figura 25. Análisis de alineamiento entre las proteínas Dp40 encontradas en las células PC12 y la proteína Dp40 humana. Los cDNAs de Dp40 fueron traducidas *in silico* y comparadas por alineamiento con la proteína Dp40 humana (Dp40h, NP_004010.1). Las regiones marcadas en rojo indican los dominios EF-Hand 1 y 2 separados por los residuos KAH. La región en amarillo,

corresponde al dominio ZZ, dentro de la cual los residuos marcados en rojo, corresponden a mutaciones en pacientes con DMD severo, además de la región YRSLKHF, que se ha demostrado es importante para la unión con β -Distroglicano (véase texto). El dominio WW se encuentra subrayado en la región amino terminal. Las variaciones a nivel de residuos de las proteínas encontradas en las células PC12 se encuentran marcadas en amarillo y púrpura.

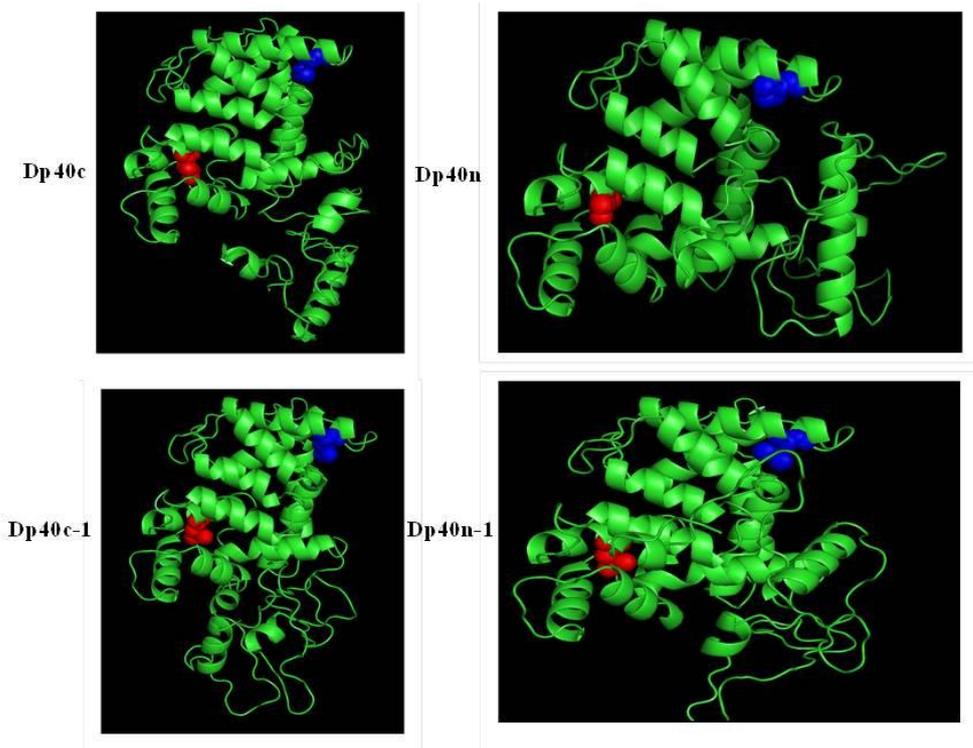


Figura 26. Modelaje tridimensional de las proteínas Dp40c, Dp40c-1, Dp40n y Dp40n-1 de Dp40 aisladas a partir de células PC12. La secuencia de aminoácidos de las diferentes proteínas de Dp40 fue modelada con ayudas de los programas Swiss model e I-Tasser basándose en la estructura IEG4 para la interacción de distrofina con β -Distroglicano. En esferas azules se encuentra marcada la prolina 93 y en amarillo la prolina 170 (Dp40n). Con fines comparativos estas mismas posiciones están marcadas en los demás modelos. El modelo Dp40c representaría a la Dp40 silvestre.

Como se observa en la figura 26, las proteínas nucleares (Dp40n y Dp40n-1) muestran una conformación o plegamiento más compacto, mientras que las variantes citoplasmáticas con localización cercana a la periferia (Dp40c y Dp40c-1) despliegan una estructura más relajada. Lo anterior favorece la hipótesis de que estas últimas poseen una

estructura que permite la interacción estable entre Dp40 y β -Distroglicano, y que toda la conformación del dominio CR es trascendental para que esta interacción se lleve a cabo.

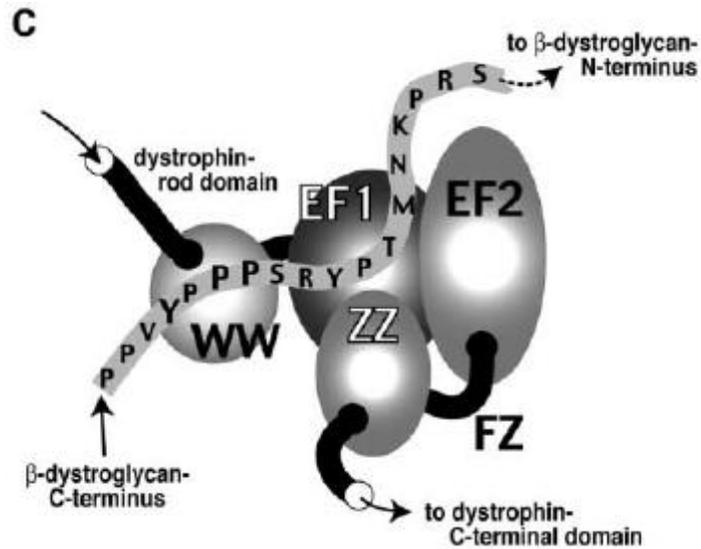


Figura 27. Modelo del dominio DGB de distrofina. El dominio se compone de los dominios WW, EF1, EF2 y ZZ. La secuencia entre EF2 y ZZ se llama FZ, tomado de Ishikawa-Sakurai.

La idea de que la conformación tridimensional de Dp40c y Dp40c-1 corresponde al dominio DGB, se fortalece a partir de los estudios descritos por Draviam¹⁰¹. Este grupo realizó mutaciones puntuales en los residuos de cisteínas en el dominio ZZ en construcciones de mini distrofinas fusionadas con EGFP y demostraron que todas las mutaciones analizadas resultaron en una pérdida de la unión con β -Distroglicano, acompañada de una deslocalización de una mini distrofina y su translocación al núcleo. Este grupo argumenta que el dominio ZZ no únicamente juega un papel crítico en la interacción Distrofina/ β -Distroglicano, sino que cuando es afectado por mutaciones puntuales, estas últimas provocan una deposición nuclear quizás generando una NLS o realizando un cambio conformacional en la distrofina y de esta manera afecta sus patrones de unión que controlan la localización nuclear. Las variantes Dp40n y Dp40n-1, poseen una localización nuclear (figuras 14 y 15), no co-localizan con β -Distroglicano y su arreglo tridimensional es diferente al de las proteínas citoplasmicas que si co-localizan con β -Distroglicano. Por otro lado, se ha descrito que una mutación en el dominio EF-hand de la proteína GCAP1 participa en su localización, membranal, citoplasmica y nuclear¹⁰², mientras que el dominio EF-hand es requerido para la localización de Ras GRP1 hacia la membrana plasmática¹⁰³. Por otro lado, una mutación en el gen DMD p.Leu3238del, fue

descrita en pacientes con discapacidad intelectual, sin presentar Distrofia muscular y el efecto de esta pérdida puede generar la desestabilización de la unión entre las distrofinas con el β -dístroglicano⁹⁸. Este residuo corresponde a la Leucina 170 de Dp40 descrita en este trabajo. Todo lo anterior señala a que los dominios EF-Hand 1 y 2 son importantes para la localización diferencial de la proteína Dp40 en las células PC12 y esta interacción es importante para las funciones de señalización de las Distrofinas.

En un estudio de Tozawa⁸³, se reportó la generación de un anticuerpo específico en contra de la región amino terminal de Dp71 y Dp40 para investigar los patrones de expresión en el cerebro de ratón. Los resultados obtenidos por este grupo, revelaron que Dp40 fue detectada en vesículas sinápticas e interacciona con un grupo de proteínas pre sinápticas, incluyendo Sintaxina 1A y SNAP25, las cuales están involucradas en los procesos de exocitosis de vesículas sinápticas en neuronas. Sus ensayos de co-inmunoprecipitación sugieren que Dp40 puede jugar un papel funcional en la terminal pre sináptica, incluyendo acoplamiento de vesículas exocíticas o fusión con la membrana plasmática. Es importante señalar que los autores no proponen un mecanismo por el cual Dp40 podría estar formando esta interacción. En este estudio se analizó la interacción entre Dp40 y β -Dístroglicano y se encontró que solo las proteínas Dp40c y Dp40c-1 podrían formar una interacción en células PC12, aunque no se descarta la posibilidad de que Dp40 participe en la formación de vesículas en este modelo celular. En el 2013, González B.¹⁰⁴ determinó la participación de Dp40 durante la diferenciación de células PC12 Tet-On y su relación con proteínas asociadas con microvesículas sinápticas (SMLV), resultando en que la sobreexpresión de esta proteína estimula la diferenciación inducida por NGF, además de que Dp40 co-localizó con sinaptobrevina, GLUT3, dineína y Kinesina, proteínas importantes en funciones sinápticas.

Los resultados obtenidos indican la presencia de cDNAs con diferencias de un solo nucleótido y que estas diferencias repercuten en la localización diferencial observada en Dp40 en las células PC12. Estos cambios pudieran deberse a eventos generados ya sea por una alta tasa de mutación o un artificio. Sin embargo hay que tener en consideración lo siguiente. 1) Dp40 fue identificada mediante secuenciación de una clona de cDNA aislada a partir de una librería de Schwannoma de rata (81) y en el presente estudio se identificó diferentes cDNAs de Dp40 caracterizadas de la misma manera. 2) Las variantes de Dp40 fueron aisladas a partir de experimentos independientes obtenidos por personas y en

tiempos distintos. 3) Durante la reacción de RT-PCR, se utilizó una Taq Polimerasa 3 veces más eficiente que una taq convencional en cuanto a la capacidad de incorporar una base equivocada. 4) Ninguna de las variaciones de un solo nucleótido genera una mutación sin sentido y solo se encontraron alteraciones con cambio de sentido. 5) Un análisis bioinformático en el programa PSORT ⁹² encontró dos residuos en la variante Dp40n como los responsables de la localización nuclear de la proteína, los cuales al ser incorporados en las variantes citoplasmicas, estas últimas sufrieron una re-localización hacia el núcleo de la célula. 6) Los modelos tridimensionales de las variantes de Dp40, indican que las variantes membranales (Dp40c y Dp40c-1) comparten estructura que podrían definir el DGB, mientras que las variantes nucleares comparten otro arreglo estructural. 7) El análisis de la probable interacción de Dp40n con el material genético, empleando el fármaco ActD, sugieren que esta interacción podría ser real y por lo tanto persigue un propósito, las imágenes por confocal indican que cuando se bloquea la transcripción a diferencia de hrnpA1, Dp40 permanece en el núcleo, esto indica que esta proteína pudiera participar en el mantenimiento de la estructura nuclear. Por otra parte, la localización nuclear observada genera la necesidad de la mediación de un transporte dependiente de energía para acumular a una proteína en contra de un gradiente de concentración. Para apoyar lo anterior Suarez-Sánchez ¹⁰⁵, propone que la entrada y salida del núcleo de la distrofina Dp71d en las células C2C12 se lleva a cabo mediante la acción del complejo $\alpha 2$ y $\beta 1$ importina y que la salida del núcleo es mediado por Crm1 respectivamente. Se sabe que ambos procesos de transporte son dependientes de energía a través del complejo del poro nuclear. 8) En el estudio de Tozawa ⁸³ y Fujimoto ⁸⁴, se reportó una tinción nuclear y membranal en neuronas de hipocampo de ratón, empleando un anticuerpo dirigido en contra de la región amino terminal de Dp71 y Dp40, y así como se ha reportado una localización nuclear y función nuclear para Dp71, los autores sugieren que Dp40 también podría tener una localización y función nuclear putativa.

En este punto considero necesario dedicar unas líneas a argumentar cual sería el origen de tales variaciones a nivel de cDNA en las células PC12. El hecho es que se trabajó con un modelo celular, lo cual no descarta que las condiciones del cultivo pudiesen ejercer influencia en la expresión genética por el simple hecho de mantener cultivos *in vitro*. Por otro lado, estas variaciones se pueden deber al origen de la misma de la línea celular, que proviene de un feocromocitoma de medula adrenal de rata, la cual tiene un origen embrionario proveniente de la cresta neural, generado a partir de una mezcla de células

neuroblásticas y células eosinofílicas⁸⁵. Los hechos indican que se encontró variación a nivel de un solo nucleótido en los cDNAs del gen distrofina, específicamente Dp71 y Dp40, y que dichas variaciones influyen en la localización subcelular de ambas proteínas, aun cuando se encontraron aquellos cuyas secuencias son idénticas a las reportadas en el GenBank, también se encontraron otros cDNAs con variaciones, incluido un cDNA que presentaba el exón 71 para Dp71 (dato no mostrado). Es comprensible que la presencia de tales variaciones genere incertidumbre sobre su origen, no obstante algo que no se puede negar desde el punto de vista biológico es que el motor evolutivo es justamente ese; las mutaciones.

La evolución ya desde antes del antecesor común a todos los seres vivos, se ha producido gracias a muchísimos cambios aleatorios en la secuencia de bases del DNA que llamamos mutaciones. Esto se origina por errores de la información genética contenida en las células generados por factores químicos o físicos y también su posterior propagación por replicación, siendo trascendentes para la evolución aquellas que luego se van a transmitir a la descendencia: las células somáticas si la reproducción es asexual y los gametos si es sexual. Por este motivo, decimos que las mutaciones son la fuente primaria de variabilidad génica, imprescindible para que exista evolución. Entonces, sin mutaciones no se presentaría la variabilidad genética que necesita la selección natural además, dicha diversidad es importante para que la población se adapte con éxito a los continuos cambios ambientales. Otro efecto a destacar consiste en que la mayoría de las mutaciones son deletéreas (suponen un perjuicio a sus portadores y son rápidamente eliminadas), por la sencilla razón que la mayoría de los genes que existen en una población han sobrevivido de entre otros muchos debido a que han adaptado mejor a sus portadores. Por lo anterior los diferentes cDNAs encontrados para los productos más pequeños del gen *DMD* se pueden deber a eventos de mutación y lo importante es que estos eventos se registran y pueden ser útiles para ayudar a entender otros eventos mutacionales como los observados en humanos. Por todo lo anterior, Dp40 resulta ser un producto de distrofina útil para estudiar su función en diferentes compartimentos celulares en el modelo celular PC12.

La localización subcelular de los cDNAs analizados para Dp71, también demostraron que las diferencias a nivel de un nucleótido afectan su localización subcelular, la proteína Xpress-Dp71a se localiza en el citoplasma y núcleo en células sin diferenciar y diferenciadas con NGF (figuras 21-22), y Xpress-Dp71a-4, que no presentó ninguna

variación con respecto a la secuencia de rata reportada previamente, se localizó solo en la periferia de las células transfectadas y pareciera que favorece la diferenciación de la célula expuesta al NGF, mientras que las proteínas de Dp71c se localizaron en la periferia celular tanto en células sin diferenciar y diferenciadas con NGF. Por otro lado en las células expuestas a NGF, la sobreexpresión de esta isoforma parecería ser un obstáculo para la generación de neuritas (figura 24), generando la idea de que la expresión de esta proteína debería de ser regulada durante el proceso de diferenciación, esto se podría deber a que la sobreexpresión de esta proteína y su localización en la periferia actué sobre la membrana, confiriéndole mayor rigidez o restándole movilidad, por supuesto que un análisis más extenso de las isoformas Dp71a y Dp71c en este modelo celular tendría que ser abordado en futuros estudios. La localización diferencial observada en estas proteínas podría deberse a la interacción con β -Distroglicano de una manera similar a la descrita para Dp40. La Dp71a, a diferencia de Dp40 si codifica para la región C-terminal de las distrofinas y dentro de esta zona, la región comprendida por los exones 72-74 codifica para el sitio de unión a sintrofinas, por lo que Dp71a además de poder interactuar con β -Distroglicano, también lo puede hacer con las sintrofinas aunque Dp71c no puede interactuar con las sintrofinas al carecer de los exones que codifican para la interacción con dichas proteínas. Por lo observado con Dp40c, Dp71c podría interactuar con β -Distroglicano, dado que contiene los mismos dominios que Dp40. Desafortunadamente el análisis de dicha interacción no pudo ser completada durante el desarrollo de este trabajo. Los resultados preliminares sugieren que existe esta interacción (datos no mostrados), Dp71a no interactúa con α -sintrofina en células sin diferenciar, pero si lo hace en células diferenciadas por 3 días con NGF (datos no mostrados). Un estudio de asociación diferencial con sintrofinas durante el proceso de diferenciación con NGF fue descrito en células PC12 para Dp71ab¹⁰⁶.

Otro objetivo abordado durante este trabajo fue analizar si existía una asociación entre la proteína DGK- ζ , la cual posee una señal de localización nuclear y Dp71d vía γ 1-sintrofina y como resultado de esta asociación Dp71d se podría localizar en el núcleo, por lo que la hipótesis era que este complejo ternario enviaba a Dp71d al núcleo de las células PC12 diferenciadas, evento reportado por Márquez⁸⁸. Mediante ensayos bioquímicos Hogan⁵³, demostró que el carboxilo terminal de DGK- ζ , el cual contiene un motif/dominio consenso de unión PDZ, es necesario y suficiente para la asociación con γ 1-sintrofina. Cuando es co-expresado en células Hela, DGK- ζ y γ 1-sintrofina formaron un complejo

estable que se localizó entre el núcleo y el citoplasma y que DGK- ζ recluta a γ 1-sintrofina dentro del núcleo indicando que el dominio PDZ es requerido. Ensayos de inmunoprecipitación realizados en células Hela, co-transfectadas con plásmidos que sobre-expresan a Dp71 y γ 1-sintrofina demostraron que ambas proteínas fueron co-inmunoprecipitadas. Los ensayos de inmunoprecipitación indicaron que la Dp71d endógena no está interaccionando con γ 1-sintrofina ni con DGK- ζ en células PC12 sin diferenciar aunque Hogan reportó que solo algo de DGK- ζ forma un complejo con Dp71 en extractos de cerebro de ratón, por lo que tal vez en las células PC12 no exista tal interacción o se requiera partir de mayor cantidad de extracto proteico para demostrar tal interacción. Cabe la posibilidad de que si esta interacción existe, sea solo momentánea, de manera tal que bajo las condiciones experimentales utilizadas, no fuese posible llevar a cabo su detección en células PC12. No esta demás proponer que se lleve a cabo este análisis en células diferenciadas. Recientemente Suarez-Sánchez ¹⁰⁵, analizó el transporte núcleo/citoplasma de Dp71d en células C2C12 en cultivo y determinó de que cuando las células son expuestas al agente nocodazol, un reactivo que despolimeriza a los microtúbulos o el inhibidor de dineina EHNA, la localización nuclear de Dp71d fue disminuida, no así cuando se alteró la estructura de actina, lo anterior sugiere que la asociación de Dp71 al aparato microtubular la transporta al núcleo de la célula. Aun cuando este grupo no aclara cual es el modo en que las distrofinas pudieran interactuar con estas proteínas, su resultado podría indicar de qué manera las distrofinas llegan al núcleo.

CONCLUSIONES.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se pueden generar las siguientes conclusiones; se aislaron y caracterizaron los transcritos específicos para algunos de los productos más pequeños del gen *DMD* como son; Dp71a, Dp71c y Dp40 a partir del modelo celular PC12. Los cDNAs aislados demostraron la presencia de cambios de un solo nucleótido los cuales generaron mutaciones no sinónimas y sinónimas, ninguno de los cambios encontrados generó una mutación sin sentido. Para el caso de Dp40, estos cambios demostraron ser determinantes para su localización subcelular. Mediante ensayos de inmunofluorescencia se encontraron dos grupos de cDNAs para Dp40, un grupo codifica para proteínas con localización en la periferia celular (Xpress-Dp40c y Xpress-Dp40c-1), mientras que otro grupo codifica para productos con localización nuclear (Xpress-Dp40n y Xpress-Dp40n-1). Se determinó que los residuos en las posiciones 93 y 170, presentes en los dominios EF-Hand 1 y 2 respectivamente, son importantes para su

localización subcelular ya que pueden mediar su asociación con β -Distroglicano. Las proteínas de Dp71a se localizaron en el citoplasma/núcleo de las células transfectadas, mientras que las proteínas de Dp71c fueron localizadas en la periferia celular. Los ensayos para obtener células transfectadas de manera estable no fueron exitosos probablemente debido a que el nivel de estos productos del gen *DMD* es importante para la fisiología de la célula, ya que solo se logró generar una línea que constitutivamente expresara a la proteína mutante Xpress-Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. En células PC12 no diferenciadas no fue posible detectar la formación de un complejo ternario entre Dp71a, γ 1-sintrofina y DGK- ζ .

BIBLIOGRAFÍA.

1. Maidment SL, Ellis JA: Muscular dystrophies, dilated cardiomyopathy, lipodystrophy and neuropathy: the nuclear connection. *Expert Rev Mol Med* 2002; **4**: 1-21.
2. Blake DJ, Kröger S: The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 2000; **23**: 92-99.
3. Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandão L, Love D, Vainzof M, Zatz M: Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 1991; **39**: 437-441.
4. Pillers DA, Bulman DE, Weleber RG *et al*: Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 1993; **4**: 82-86.
5. Emery AEH: *Duchenne Muscular Dystrophy*, Second Edition edn., 1993.
6. Allen NR: Hearing acuity in patients with muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 1973; **15**: 500-505.
7. Bresolin N, Castelli E, Comi GP *et al*: Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1994; **4**: 359-369.
8. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987; **50**: 509-517.
9. Abbs S, Roberts RG, Mathew CG, Bentley DR, Bobrow M: Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics* 1990; **7**: 602-606.
10. Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow M: A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with

- cDNA hybridisation shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 1991; **28**: 304-311.
11. Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL: Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet* 1992; **1**: 599-603.
 12. Winder SJ, Gibson TJ, Kendrick-Jones J: Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett* 1995; **369**: 27-33.
 13. Roberts RG: Dystrophins and dystrobrevins. *Genome Biol* 2001; **2**: REVIEWS3006.
 14. Brenman JE, Chao DS, Gee SH *et al*: Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 1996; **84**: 757-767.
 15. Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC: Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* 1998; **18**: 128-137.
 16. Lumeng C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K, Chamberlain JS: Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* 1999; **2**: 611-617.
 17. Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM: Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; **94**: 12413-12418.
 18. Ehmsen J, Poon E, Davies K: The dystrophin-associated protein complex. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2801-2803.
 19. Rando TA: The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001; **24**: 1575-1594.
 20. Gillis JM: Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. *Acta Physiol Scand* 1996; **156**: 397-406.
 21. Carlson CG: The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol Dis* 1998; **5**: 3-15.
 22. Bozzi M, Sciandra F, Brancaccio A: Role of gelatinases in pathological and physiological processes involving the dystrophin-glycoprotein complex. *Matrix Biol* 2015; **44-46C**: 130-137.
 23. Greenberg DS, Schatz Y, Levy Z, Pizzo P, Yaffe D, Nudel U: Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1299-1303.

24. Zubrzycka-Gaarn EE, Bulman DE, Karpati G *et al*: The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 1988; **333**: 466-469.
25. Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM: An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 1993; **4**: 77-81.
26. Lidov HG, Selig S, Kunkel LM: Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 329-335.
27. D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN: A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 837-842.
28. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U: A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 1990; **272**: 557-560.
29. Hugnot JP, Gilgenkrantz H, Vincent N *et al*: Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 7506-7510.
30. Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J: Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 1995; **20**: 133-135.
31. Culligan KG, Mackey AJ, Finn DM, Maguire PB, Ohlendieck K: Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy (review). *Int J Mol Med* 1998; **2**: 639-648.
32. Culligan K, Ohlendieck K: Diversity of the Brain Dystrophin-Glycoprotein Complex. *J Biomed Biotechnol* 2002; **2**: 31-36.
33. Palma-Flores C, Ramírez-Sánchez I, Rosas-Vargas H, Canto P, Coral-Vázquez RM: Description of a utrophin associated protein complex in lipid raft domains of human artery smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1838**: 1047-1054.
34. Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP: Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 1992; **355**: 696-702.
35. Holt KH, Crosbie RH, Venzke DP, Campbell KP: Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS Lett* 2000; **468**: 79-83.
36. Constantin B: Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1838**: 635-642.
37. Sotgia F, Lee JK, Das K *et al*: Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 2000; **275**: 38048-38058.

38. Galbiati F, Razani B, Lisanti MP: Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol Med* 2001; **7**: 435-441.
39. Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T: Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; **45**: 751-762.
40. Fort P, Estrada FJ, Bordais A *et al*: The sarcoglycan-sarcospan complex localization in mouse retina is independent from dystrophins. *Neurosci Res* 2005; **53**: 25-33.
41. Marshall JL, Kwok Y, McMorran BJ, Baum LG, Crosbie-Watson RH: The potential of sarcospan in adhesion complex replacement therapeutics for the treatment of muscular dystrophy. *FEBS J* 2013; **280**: 4210-4229.
42. Marshall JL, Crosbie-Watson RH: Sarcospan: a small protein with large potential for Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 2013; **3**: 1.
43. Kramarcy NR, Vidal A, Froehner SC, Sealock R: Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem* 1994; **269**: 2870-2876.
44. Froehner SC, Adams ME, Peters MF, Gee SH: Syntrophins: modular adapter proteins at the neuromuscular junction and the sarcolemma. *Soc Gen Physiol Ser* 1997; **52**: 197-207.
45. Ahn AH, Kunkel LM: Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 1995; **128**: 363-371.
46. Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM: The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 1996; **271**: 2724-2730.
47. Górecki DC, Abdulrazzak H, Lukasiuk K, Barnard EA: Differential expression of syntrophins and analysis of alternatively spliced dystrophin transcripts in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 1997; **9**: 965-976.
48. Gibson TJ, Hyvönen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E: PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 1994; **19**: 349-353.
49. Adams ME, Dwyer TM, Dowler LL, White RA, Froehner SC: Mouse alpha 1- and beta 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a discs large domain. *J Biol Chem* 1995; **270**: 25859-25865.
50. Tochio H, Zhang Q, Mandal P, Li M, Zhang M: Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat Struct Biol* 1999; **6**: 417-421.

51. Peters MF, Kramarcy NR, Sealock R, Froehner SC: beta 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreport* 1994; **5**: 1577-1580.
52. Piluso G, Mirabella M, Ricci E *et al*: Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* 2000; **275**: 15851-15860.
53. Hogan A, Shepherd L, Chabot J *et al*: Interaction of gamma 1-syntrophin with diacylglycerol kinase-zeta. Regulation of nuclear localization by PDZ interactions. *J Biol Chem* 2001; **276**: 26526-26533.
54. Nakamori M, Takahashi MP: The role of α -dystrobrevin in striated muscle. *Int J Mol Sci* 2011; **12**: 1660-1671.
55. Peters MF, O'Brien KF, Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM, Adams ME, Froehner SC: beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J Biol Chem* 1997; **272**: 31561-31569.
56. Ueda H, Baba T, Terada N *et al*: Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum. *Neurosci Lett* 2000; **283**: 121-124.
57. Newey SE, Howman EV, Ponting CP *et al*: Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle. *J Biol Chem* 2001; **276**: 6645-6655.
58. Poon E, Howman EV, Newey SE, Davies KE: Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *J Biol Chem* 2002; **277**: 3433-3439.
59. Nichols B, Takeda S, Yokota T: Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains. *Brain Sci* 2015; **5**: 275-298.
60. Crosbie RH, Straub V, Yun HY *et al*: mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation. *Hum Mol Genet* 1998; **7**: 823-829.
61. Chao DS, Silvagno F, Bredt DS: Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 1998; **71**: 784-789.
62. Patton BL: Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech* 2000; **51**: 247-261.
63. Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B: Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol* 2012; **45**: 43-60.
64. Lederfein D, Yaffe D, Nudel U: A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 1883-1888.

65. Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC: A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; **103**: 77-82.
66. Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS: Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 1992; **20**: 1725-1731.
67. Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN: Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord* 2000; **10**: 187-193.
68. Howard PL, Dally GY, Ditta SD *et al*: Dystrophin isoforms DP71 and DP427 have distinct roles in myogenic cells. *Muscle Nerve* 1999; **22**: 16-27.
69. Saint Martín A, Aragón J, Depardon-Benítez F *et al*: Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J* 2012; **279**: 66-77.
70. Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN: Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet* 1995; **4**: 1475-1483.
71. de León MB, Montañez C, Gómez P *et al*: Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *J Biol Chem* 2005; **280**: 5290-5299.
72. Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW: Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 1999; **147**: 645-658.
73. González E, Montañez C, Ray PN *et al*: Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett* 2000; **482**: 209-214.
74. Moizard MP, Toutain A, Fournier D *et al*: Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet* 2000; **8**: 552-556.
75. Aleman V, Osorio B, Chavez O, Rendon A, Mornet D, Martinez D: Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol* 2001; **115**: 243-254.
76. Garcia-Tovar CG, Perez A, Luna J *et al*: Biochemical and histochemical analysis of 71 kDa dystrophin isoform (Dp71f) in rat brain. *Acta Histochem* 2001; **103**: 209-224.
77. García-Tovar CG, Luna J, Mena R *et al*: Dystrophin isoform Dp71 is present in lamellipodia and focal complexes in human astrocytoma cells U-373 MG. *Acta Histochem* 2002; **104**: 245-254.
78. Howard PL, Klamut HJ, Ray PN: Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Lett* 1998; **441**: 337-341.

79. Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T *et al*: Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; **41**: 294-304.
80. Nicchia GP, Nico B, Camassa LM *et al*: The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models. *Neuroscience* 2004; **129**: 935-945.
81. Hernández-González EO, Mornet D, Rendon A, Martínez-Rojas D: Absence of Dp71 in mdx3cv mouse spermatozoa alters flagellar morphology and the distribution of ion channels and nNOS. *J Cell Sci* 2005; **118**: 137-145.
82. Tinsley JM, Blake DJ, Davies KE: Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 521-524.
83. Tozawa T, Itoh K, Yaoi T *et al*: The Shortest Isoform of Dystrophin (Dp40) Interacts with a Group of Presynaptic Proteins to Form a Presumptive Novel Complex in the Mouse Brain. *Molecular Neurobiology* 2012; **45**: 287-297.
84. Fujimoto T, Itoh K, Yaoi T, Fushiki S: Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **452**: 79-84.
85. Greene LA, Tischler AS: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; **73**: 2424-2428.
86. Grifman M, Soreq H: Differentiation intensifies the susceptibility of pheochromocytoma cells to antisense oligodeoxynucleotide-dependent suppression of acetylcholinesterase activity. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997; **7**: 351-359.
87. Cisneros B, Rendon A, Genty V *et al*: Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci Lett* 1996; **213**: 107-110.
88. Marquez FG, Cisneros B, Garcia F *et al*: Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 2003; **118**: 957-966.
89. Acosta R, Montañez C, Fuentes-Mera L *et al*: Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res* 2004; **296**: 265-275.
90. Herrera AM: Localización celular de las isoformas rDp71a y rDp71c en células PC12. M en C. thesis, CINVESTAV, Zacatenco, 2004.
91. Aragon J, Romo-Yanez J, Martinez-Herrera A, Ceja V, Rendon A, Montanez C: Characterization of Dp71 Delta(78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of Neurochemistry* 2011; **119**: 697-707.

92. Nakai K, Horton P: PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* 1999; **24**: 34-35.
93. Pliss A, Malyavantham K, Bhattacharya S, Zeitz M, Berezney R: Chromatin dynamics is correlated with replication timing. *Chromosoma* 2009; **118**: 459-470.
94. Dreyfuss G, Matunis MJ, Piñol-Roma S, Burd CG: hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 1993; **62**: 289-321.
95. Bovolenta M, Erriquez D, Valli E *et al*: The DMD locus harbours multiple long non-coding RNAs which orchestrate and control transcription of muscle dystrophin mRNA isoforms. *PLoS One* 2012; **7**: e45328.
96. Vulin A, Wein N, Strandjord DM *et al*: The ZZ domain of dystrophin in DMD: making sense of missense mutations. *Hum Mutat* 2014; **35**: 257-264.
97. Ishikawa-Sakurai M, Yoshida M, Imamura M, Davies KE, Ozawa E: ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Human Molecular Genetics* 2004; **13**: 693-702.
98. de Brouwer AP, Nabuurs SB, Verhaart IE *et al*: A 3-base pair deletion, c.9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* 2014; **22**: 480-485.
99. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T: The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 2006; **22**: 195-201.
100. Roy A, Kucukural A, Zhang Y: I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 2010; **5**: 725-738.
101. Draviam RA, Wang B, Li J, Xiao X, Watkins SC: Mini-dystrophin efficiently incorporates into the dystrophin protein complex in living cells. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27**: 53-67.
102. Peshenko IV, Olshevskaya EV, Dizhoor AM: Binding of guanylyl cyclase activating protein 1 (GCAP1) to retinal guanylyl cyclase (RetGC1). The role of individual EF-hands. *J Biol Chem* 2008; **283**: 21747-21757.
103. Tazmini G, Beaulieu N, Woo A, Zahedi B, Goulding RE, Kay RJ: Membrane localization of RasGRP1 is controlled by an EF-hand, and by the GEF domain. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 447-461.
104. B. GA: Sobre-expresión de Dp40 y su relación con componentes y transportadores de microvesículas tipo sinápticas. M en C. thesis, CINVESTAV, Zacatenco, 2013.
105. Suárez-Sánchez R, Aguilar A, Wagstaff KM *et al*: Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1843**: 985-1001.

106. Romo-Yanez J, Ceja V, Ilarraza-Lomeli R *et al*: Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; **102**: 82-97.

Los miembros del comité tutorial del M en C. Alejandro Martínez Herrera, hacen constar que han revisado y aprobado esta tesis, con el fin de otorgarle el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Genética y Biología Molecular en el programa de este departamento.

Dra. Cecilia Montañez Ojeda
Investigadora Cinvestav 3D.
Tutora.

Dr. Rosa Ma. Bermúdez Cruz.
Investigador Cinvestav 3B.
Asesor.

Dr. Luis Kameyama Kawabe.
Investigador Cinvestav 3B
Asesor.

Dr. Patricio Gariglio Vidal.
Investigador Cinvestav 3E
Asesor.

Dr. José Tapia Ramírez.
Investigador Cinvestav 3C.
Asesor.

Dr. Francisco Javier Estrada Mena.
Jefe de Academia.
Universidad Panamericana.
Asesor externo.

México D. F a 31 de agosto del 2015.