

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

*“Participación de la región carboxilo terminal de las distrofinas en la localización de Dp40”*

Tesis que presenta

ING. BIOQ. INGRID MARICEL SALDAÑA GUERRERO

para obtener el Grado de

**Maestra 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

### **Agradecimiento a CONACYT**

Este trabajo fue apoyado por el consejo nacional de ciencia y tecnología CONACYT con los proyectos CONACYT CB-2009-127600 y SEP-CONACYT-ECOS-ANUIES M11-S02 B000/064/12, fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda y con la asesoría de la Dr. Rosa Ma. Del Refugio Bermúdez Cruz y del Dr. Javier Hernández Sánchez, además durante el desarrollo del trabajo la alumno fue becaria del CONACYT.

Agradezco principalmente a **la Dra. Cecilia Montañez** por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por sus consejos y su paciencia, por creer en mí y sobre todo, por ayudarme en esta etapa de transición y aprendizaje, que para mí, ha sido la más importante de mi vida académica. Nunca olvidaré este gran regalo.

A mis asesores, Dra. Rosa Ma. Bermúdez y Dr. Javier Hernández, porque desde los inicios de este camino creyeron en mí y me dieron la oportunidad de probarme a mí misma, por su apoyo y sus consejos. Por todo el tiempo dedicado a mi formación.

Al Dr. Jorge Aragón, por su inagotable fuente de paciencia, por los consejos, por su preocupación sincera, por la amistad que me brindó.

A Alejandra Sánchez, gracias por todas las facilidades brindadas, por hacerme sentir bienvenida al laboratorio desde el primer momento en que llegué, por las bromas, por siempre mantenernos unidos. A Víctor Ceja, porque me brindó no sólo su apoyo sino también su amistad, siempre dispuesto a escucharme y a aconsejarme.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, por apoyarme en mis primeros pasos en el laboratorio, darme sus sinceros consejos, por todas las reuniones y las risas. Por los tiempos de trabajo y de celebración.

A Coztli Azotla, porque esta tesis no hubiera podido ser concluida sin su apoyo incondicional. Por todo el cariño brindado, por el tiempo invertido, por los consejos y las palabras de aliento, porque siempre en la tempestad me hizo volver a creer en mí.

A mi mamá, **Dora Luz Guerrero**, porque me mostró el mundo tomada de su mano, me dio alas para volar y me mostró infinitos cielos, porque me ha infundido valor y me impulsó a seguir mis sueños.

*“La vida de cada hombre es un camino hacia sí mismo,  
el intento de un camino, el esbozo de un sendero”.*

Hermann Hesse

## Contents

RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
Generalidades .....	8
DISTROFINA: GEN Y PROTEÍNA .....	9
PROMOTORES DE LA DISTROFINA .....	10
MUTACIONES EN EL GEN DE LA DMD .....	11
LA PROTEÍNA DISTROFINA .....	12
COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A DISTROFINA .....	14
COMPLEJO SARCOGLICANO .....	15
SINTROFINAS .....	15
DP71 .....	16
EXPRESIÓN DE DP71 .....	19
LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE DP71 Y LOS COMPONENTES DE DAPC .....	19
DP40 .....	21
CÉLULAS PC12 .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	26
OBJETIVOS .....	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
Construcción de los vectores de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO-TA/Dp40 y Dp40-L93-170 con los extremos carboxilo d, f y e y con la NES (p.352-363) .....	30
Purificación general del los diferentes productos de PCR por electroelución .....	33
Adenilación .....	33
Vector de expresión .....	34
Secuenciación automática .....	36
Cultivo y transfección de células PC12 .....	37
Extracción de proteínas .....	37
Ensayos de Western Blot .....	38
Ensayos de inmunofluorescencia .....	38
Análisis estadístico .....	39

RESULTADOS .....	40
Predicción <i>in silico</i> de la localización subcelular probable de las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHe, XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363). ....	40
Construcción de los vectores de expresión pcDNA4 HisMax/TOPO-TA/Dp40 y pcDNA HisMax TOPO-TA/Dp40-L93-170P con los extremos carboxilo d, f y e y la secuencia (NES p.352-363).....	43
Expresión de las proteínas recombinantes: XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363). ....	50
Distribución celular de las proteínas XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363) recombinantes. ....	51
Análisis estadístico de la distribución celular de las proteínas XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363) recombinantes. ....	55
DISCUSIÓN .....	60
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

## RESUMEN

El gen DMD contiene varios promotores, uno de ellos permite la expresión de la distrofina Dp71. Esta distrofina tiene diferentes isoformas las cuales se han clasificado en los siguientes grupos: Dp71d, Dp71f, D71e y Dp40. Dichos grupos se diferencian, entre otras cosas, por su extremo carboxilo terminal, del cual no se conoce su función. Considerando lo anterior, en este trabajo se planteó determinar el papel que juega el extremo carboxilo terminal de los diferentes grupos de las isoformas de la distrofina Dp71, en su localización celular. Para alcanzar dicho objetivo se realizaron diversas construcciones con las secuencias de la Dp40 y los extremos carboxilo terminal de éstas proteínas en un vector de expresión que se utilizó para transfectar a células PC12. Estas construcciones permitirían analizar la participación de los diferentes extremos carboxilo terminal en la localización subcelular de la Dp71. En este estudio se utilizó a la distrofina Dp40, que es la isoforma más pequeña que expresa el promotor de la Dp71 y la cual tiene una localización citoplásmica predominante, así como una Dp40 con dos mutaciones (Dp40L93-170P), que presenta una localización nuclear. A dichas proteínas se les añadieron los diferentes extremos carboxilo terminal para averiguar si estos dominios participan en la localización subcelular bajo diferentes condiciones. En este trabajo se encontró que el extremo carboxilo del grupo d confirió una localización nuclear a la proteína Dp40. Adicionalmente se demostró que el extremo carboxilo del grupo f le confiere una localización citoplasmática a la proteína Dp40L93-170P, no así una señal de exporte nuclear putativa (MADDLGRAMESL) que se encuentra en el extremo carboxilo terminal del grupo f, la cual, por si sola, no es capaz de modificar la localización subcelular de la doble mutante. Por otro lado Juntos, estos resultados nos sugieren la participación de varios factores en la distribución celular de las isoformas de Dp71.

## ABSTRACT

The DMD gene contains several promoters, one of them expresses the dystrophin Dp71. Different isoforms are expressed from this promotor by alternative splicing which have been classified into the following groups: Dp71d, Dp71f, D71e and Dp40. These groups differ by its carboxy terminus, which function is unknown, therefore the aim of this work was to determine the role of the carboxy terminal end groups of the different Dp71 dystrophin isoforms in their cellular localization. To achieve this objective various constructs with Dp40 sequences and the different carboxy terminal ends were cloned in an expression vector used to transfect PC12 cells. The recombinant vectors will allow to analyze the participation of different carboxy terminal ends on the subcellular localization of Dp71. For this study we used the DP40 dystrophin, which is the smallest isoform expressed in PC12 cells and it has a predominant cytoplasmic localization, as well as a Dp40 variants with two mutations (Dp40L93-170P), which have a nuclear localization. The carboxy terminal ends were added to the proteins to analyze its role in the subcellular localization under different conditions. The results obtained show that the carboxy terminal end “d” conferred nuclear localization to the protein DP40. Additionally the carboxy terminal end “f” confers a cytoplasmic localization to Dp40L93-170P protein, it was not observed the same phenomena with a putative nuclear export signal (MADDLGRAMESL) located at the carboxyl terminal end of the group f, which, by itself, is unable to change the subcellular localization of the double mutant. Together, these results suggest the involvement of various factors on the cellular distribution of Dp71 isoforms.

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X; esta enfermedad se caracteriza por un desgaste muscular progresivo y afecta alrededor de ~1 en 3,500 hombres nacidos (Emery, 1993). Este desorden genético no presenta ninguna manifestación clínica al nacer, aunque los niveles de suero de la isoforma muscular de la creatin-cinasa están elevados, no es sino hasta la edad de 2 a 5 años, cuando la debilidad de los músculos proximales se comienza a observar (Jennekens et al., 1991). El retraso para empezar a caminar, mantenerse de pie y la dificultad para correr sugieren distrofia muscular de Duchenne. Eventualmente, cuando la disminución de la fuerza en las extremidades comienza, los pacientes tienen la necesidad de usar una silla de ruedas, antes de los 12 años (Emery, 1993) y mueren en la adolescencia o a inicios de los 20 años, usualmente debido a una falla respiratoria. Existe una enfermedad más leve, la distrofia muscular de Becker (BMD)(Becker and Kiener, 1955), que tiene un inicio más tardío y una sobrevivencia mucho más larga. Ambos desórdenes son causados por mutaciones en el gen DMD que codifica una proteína del citoesqueleto de 427-kDa llamada distrofina. La gran mayoría de las mutaciones del gen DMD dan lugar a la ausencia completa de la distrofina, mientras que la presencia de bajos niveles de una proteína truncada se presenta en pacientes con BMD.

El músculo esquelético normal consiste en fibras musculares que están espaciadas uniformemente, angulares y de un tamaño relativamente uniforme. El músculo, siendo un sincitio está multinucleado con los núcleos localizados en la periferia de la fibra. El músculo fetal con DMD es histológicamente normal excepto por algunas fibras eosinofílicas hipercontracturadas (Emery, 1977). En todas las biopsias postnatales de individuos con DMD se observan fibras musculares necróticas o en degeneración aun antes de que la debilidad muscular se observe clínicamente. Las

fibras en degeneración se observan normalmente en grupos; además, hay estudios que muestran que este proceso está confinado de manera recurrente a segmentos de la fibra muscular (Schmalbruch, 1984). Otro signo secundario de las fibras musculares en necrosis es la regeneración activa del músculo para reemplazar o reparar la pérdida o daño de las fibras (Schmalbruch, 1984). Eventualmente, la capacidad regenerativa de los músculos se va perdiendo y las fibras musculares son reemplazadas de manera gradual por tejido adiposo y conectivo fibroso, dando lugar a la pseudohipertrofia, seguida por atrofia (Emery, 1993)

El músculo deficiente en distrofina se caracteriza por una permeabilidad incrementada a macromoléculas que fluyen dentro y fuera de la célula y que es agravada con el estrés mecánico (McNeil and Khakee, 1992). Probablemente hay déficits estructurales y funcionales en el esqueleto sarcolemal que podrían dejar a la membrana vulnerable al daño mecánico.

La homeostasis de calcio es crítica en muchos aspectos de la función muscular (Berchtold et al., 2000), por tanto se hipotetizó que la concentración de calcio intracelular está elevada en los músculos deficientes en distrofina y que esto es una causa importante del proceso patofisiológico que da lugar a la muerte celular (Duncan, 1978). Además, hay información que indica que las proteasas y en particular las calpains pueden tener un papel importante en la patofisiología de la deficiencia de distrofina. Una hipótesis alterna estableció que las rupturas transitorias de la membrana permiten un influjo de calcio. Esto entonces, causa una activación local de las proteasas las cuales modifican los canales de calcio para dar lugar a más influjo de calcio (Alderton and Steinhardt, 2000)

#### **DISTROFINA: GEN Y PROTEÍNA**

El gen DMD fue localizado en el brazo corto del cromosoma X en la banda Xp21 (Kunkel et al., 1986) por estudios de ligamiento y análisis de clonación posicional en pacientes femeninos con DMD (Boyd and Buckle, 1986). El gen de DMD es el más

largo descrito hasta la fecha, abarca alrededor de 2.5 Mb de la secuencia genómica y corresponde el 1.5% del cromosoma X y 0.1% de todo el genoma humano (Tadayoni et al., 2012). Este gen está compuesto de 79 exones que codifican para una proteína del citoesqueleto de 427-kDa con 3685 residuos (Koenig et al., 1987). El mRNA tiene una longitud de 14-Kb y se expresa principalmente en el músculo esquelético y cardíaco con niveles bajos en el cerebro (Koenig et al., 1987).

### PROMOTORES DE LA DISTROFINA

El gen de la distrofina codifica para 7 proteínas diferentes. La expresión del transcrito de longitud completa está controlada por tres promotores regulados de manera independiente que se encuentran en la región 5' del gen. Cada mensajero codifica para una proteína de 427-kDa que sólo difieren en sus secuencias amino terminal (Blake et al., 2002). Los promotores del cerebro (B), músculo (M) y Purkinje (P) contienen un primer exón único con un sitio de corte y empalme común (Boyce et al., 1991; Chelly et al., 1990; Gorecki et al., 1992; Klamut et al., 1990). El promotor B dirige la expresión en las neuronas corticales e hipocámpales del cerebro (Chelly et al., 1990), mientras que el promotor P es expresado en las células de Purkinje cerebelares además del músculo esquelético (Holder et al., 1996). El promotor M da lugar a la expresión en el músculo esquelético y los cardiomiocitos además de encontrarse en bajos niveles en algunas células gliales en el cerebro (Figura 1 (Chelly et al., 1990)).

Promotores internos dentro del gen DMD así como el procesamiento alternativo del RNA mensajero dan lugar a múltiples isoformas de la distrofina truncadas en su N-terminal y así como a variaciones en la región carboxilo terminal (Jin et al., 2007). Estos promotores son el retinal (R), el de "brain-3" (B3) (Dp140), el de las células de Schwann (S) y el general (G) que se expresa de manera ubicua (a excepción del músculo esquelético). Cada uno de estos promotores utiliza un primer exón único que se une en los exones 30, 44, 56 y 63 respectivamente, para generar productos proteicos de 260 kDa (promotor retinal- R) (Dp260) (Disatnik et al., 1998), 140 kDa

(Dp140) (promotor “brain-3”) (Lidov et al., 1995), 116 kDa (Dp 116) (promotor células Shwann-S) (Byers et al., 1993) y de 71 kDa (Dp71) (promotor General- G) (Blake et al., 1992). A partir del promotor de Dp71 se transcribe otra distrofina, la proteína Dp40, la cual carece de los exones 71 al 79 (Tinsley et al., 1993). Dp71 se expresa en la mayoría de los tejidos no musculares, los cuales incluyen cerebro, hígado, riñón y pulmón (Blake et al., 1992; Howard et al., 1998; Sarig et al., 1999), mientras que las proteínas restantes se expresan en el sistema nervioso central y periférico (Byers et al., 1993). Estas proteínas, a excepción de la isoforma Dp40 contienen en su C- terminal los sitios de unión necesarios para algunas de las proteínas asociadas a distrofina.

#### MUTACIONES EN EL GEN DE LA DMD

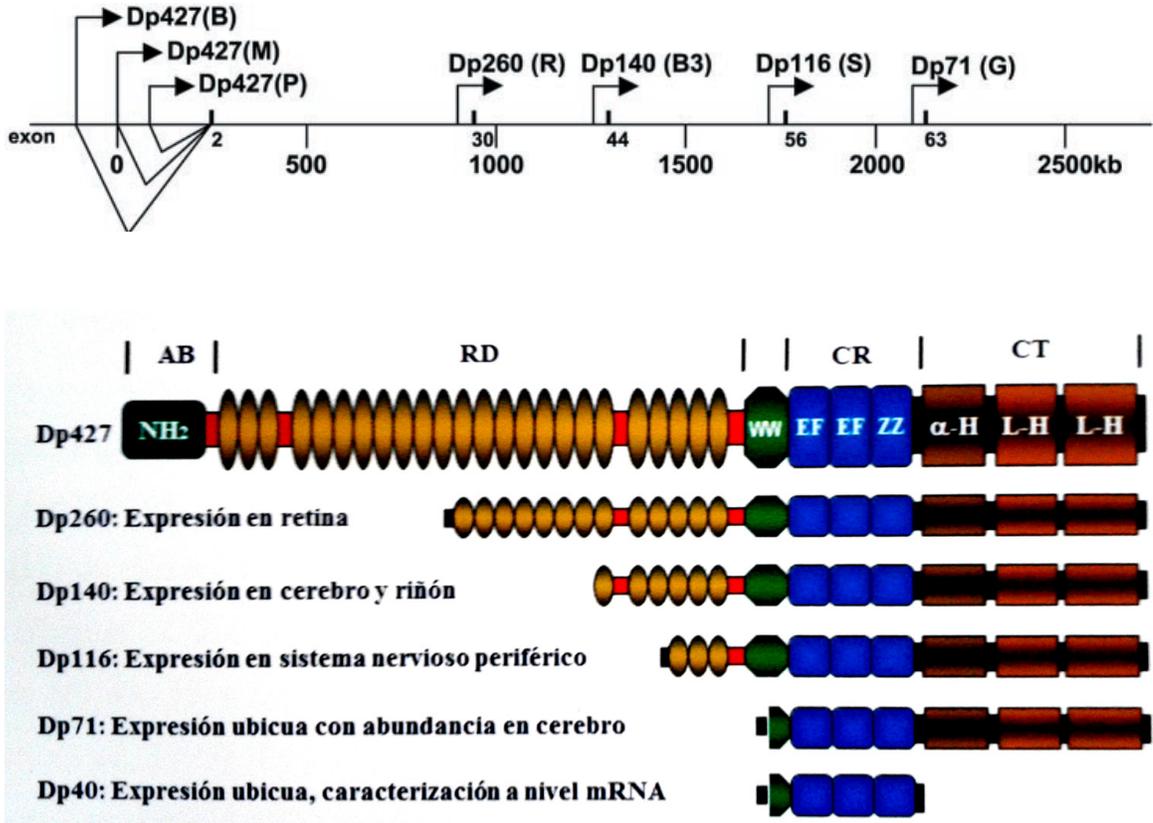
Las mutaciones que causan la DMD generalmente dan lugar a la ausencia o a niveles muy reducidos de la distrofina mientras que los pacientes que padecen BMD generalmente producen una proteína parcialmente funcional (Amalfitano et al; 1997). Aproximadamente el 65% de los pacientes con DMD y BMD tienen grandes “deleciones” del gen DMD (Koenig et al., 1989), la gran mayoría de estas deleciones se localizan alrededor de dos regiones “hot spots” (Koenig et al., 1989). Es posible, sin embargo, que la estructura de la cromatina en Xp21 influya en la generación de las deleciones o recombinación en estos “hot-spots”. La región I en la que ocurren las deleciones abarca los exones 45-53 (Beggs et al., 1990) y elimina parte del dominio varilla, mientras que la región de deleción II abarca los exones 2-20 y remueve algunos o todos los sitios de unión a actina y parte del dominio varilla (Liechti-Gallati et al., 1989). Un tercio de los casos de DMD son causados por una muy pequeña cantidad de deleciones y mutaciones puntuales, la mayoría de las cuales introducen codones de paro prematuros (Roberts et al., 1994). Algunas mutaciones tales como la sustitución de un residuo conservado con una tirosina en la posición 3340 dan lugar a niveles reducidos, pero aún detectables, de distrofina. De manera interesante, el dominio rico en cisteína nunca se elimina en pacientes

con BMD, lo que sugiere que este dominio es crítico para la función de la distrofina (Rafael et al., 1996).

### LA PROTEÍNA DISTROFINA

La distrofina es una proteína del citoesqueleto de 427-kDa, es un miembro de la familia de proteínas  $\beta$ -spectrina/ $\alpha$ -actinina (Koenig et al., 1988). La distrofina se organiza en cuatro regiones de acuerdo a las homologías de secuencia y a las capacidades de unión a otras proteínas (**figura 1**); el dominio de unión a actina localizado en el extremo NH2 terminal, el dominio varilla central, el dominio rico en cisteína y el dominio C- terminal (Rybakova et al., 1996). El dominio amino terminal contiene un par de módulos de unión a filamentos de actina los cuales poseen homología con calponina, dichos módulos son dos plegamientos globulares alfa-hélice (Norwood et al., 2000). El dominio varilla está compuesto de 24 unidades de repetidos que son similares a los repetidos de triple hélice de la espectrina (Koenig and Kunkel, 1990), al final de los 24 repetidos se encuentra la cuarta región de bisagra, seguida por el dominio WW el cual se une a sustratos ricos en prolina (Macias et al., 1996). El dominio WW separa el dominio varilla del dominio rico en cisteína y del C- terminal. Aunque no ha sido descrito un ligando en específico para el dominio WW de la distrofina, esta región media la interacción entre el  $\beta$ -dystroglicano y la distrofina ya que el dominio citoplasmático del  $\beta$ -dystroglicano es rico en prolina (Rosa et al., 1996). El dominio rico en cisteína contiene dos motifs EF-hand (Koenig et al., 1988), el dominio ZZ y un número de residuos de cisteína conservados que forman los sitios de coordinación para los metales divalentes tales como  $Zn^{2+}$  (Ponting et al., 1996). El dominio ZZ de la distrofina se une a calmodulina en una manera dependiente de  $Ca^{2+}$  (Anderson et al., 1996). La región C- terminal de la distrofina contiene dos polipéptidos estrechos que pueden formar un “coiled coils” hélice alfa similar a aquellos del dominio varilla (Blake et al., 1995). Este dominio se denomina el dominio CC (Coiled coil). La región CC de la distrofina forma

el sitio de unión para la distrobrevina y puede modular la interacción entre la sintrofina y otras proteínas asociadas a distrofina (Blake et al., 1995)



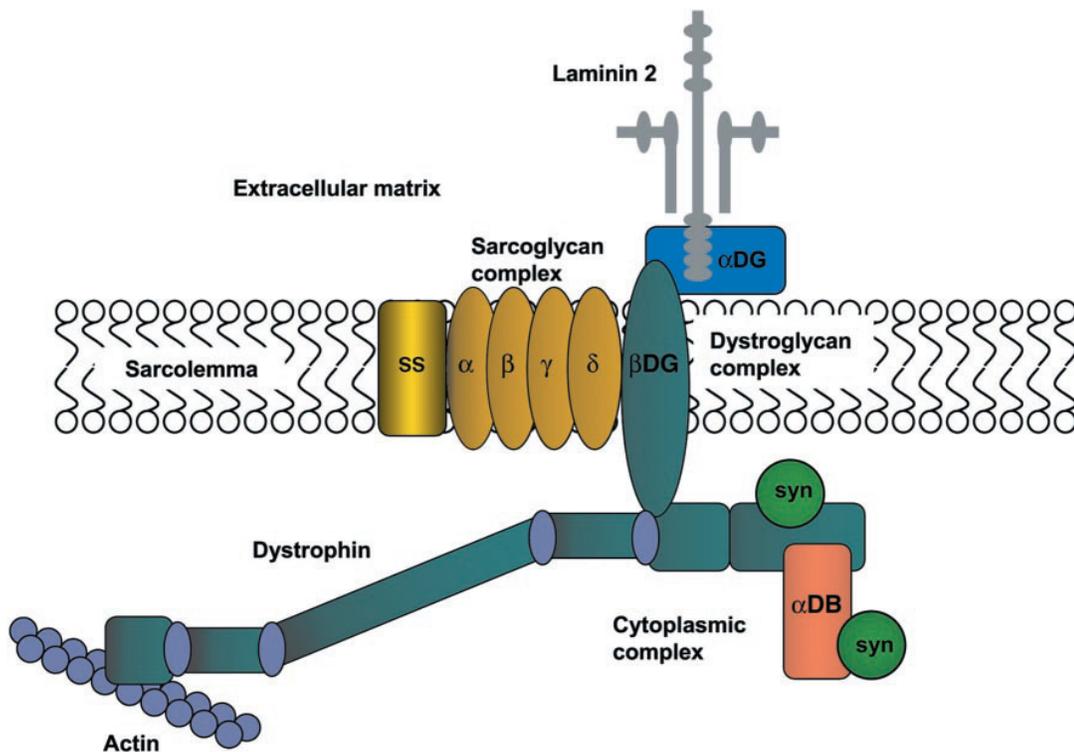
**Figura 1 Esquema que muestra la organización del gen DMD y su relación con otras proteínas.** El gen de la distrofina tiene un tamaño de 2500 kb. La proteína de tamaño completo es transcrita a partir de 3 promotores localizados en la región 5' del gen. A su vez posee otros 4 promotores internos que codifican para versiones de la proteína trucadas en su región N-terminal, con respecto a la de tamaño completo. Los tres productos de tamaño completo son designados como Dp427 (B), Dp427 (M) y Dp427 (P) para representar en qué tejido se expresan: B es cerebro, M músculo y P en células cerebelares de Purkinje. Las isoformas más pequeñas se localizan en promotores que se expresan en Retina (R), cerebro (B3), células de Schwann (S) o de manera ubicua (G). Los dominios que se aprecian son el dominio de unión a actina, dominio varilla, dominio rico en cisteína que abarca las regiones EF y ZZ, por último, el dominio C-terminal (Derek J. Blake et al. 2012)

## COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A DISTROFINA

La distrofina está ligada al sarcolema del músculo normal por un complejo proteico compuesto por al menos 10 proteínas diferentes. La distrofina en contraste con la espectrina, es monomérica (Rybakova and Ervasti, 1997). Este complejo abarca la membrana y liga el citoesqueleto de actina a la lámina basal muscular, entonces, el complejo de proteínas asociado a distrofina (DPC) se puede considerar como un andamio que conecta el interior de una fibra muscular con la exterior.

Yoshida y col. (Yoshida et al., 1994) mostraron que el DPC puede ser disociado en tres complejos distintos:

- 1) El complejo distroglicano
- 2) El complejo sarcoglicano-sarcospan
- 3) El complejo citoplasmático que contiene a la distrofina.



**Fig 2. Complejo proteico asociado a distrofina (DAPC) en músculo esquelético.** La distrofina se une al citoesqueleto de actina en su región N-terminal. En la región C-terminal la distrofina se asocia con diferentes proteínas de membrana que pueden clasificarse en el subcomplejo distroglicano, el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan y el subcomplejo citoplasmático (Derek J. Blake. 2002)

### COMPLEJO DISTROGLICANO

El gen del distroglicano produce una proteína precursora que es procesada por una proteasa para dar lugar a  $\alpha$  y  $\beta$  distroglicanos. En el músculo, el  $\alpha$  distroglicano tiene una masa molecular de 156 kDa mientras que el  $\beta$ -distroglicano es de 43 kDa (Smalheiser and Kim, 1995). El  $\beta$ -distroglicano tiene un solo dominio transmembranal y está insertado dentro de la membrana plasmática del músculo con el C- terminal en el lado citoplasmático, este extremo C- terminal contiene algunos residuos de prolina que son requeridos para la unión del distroglicano a la distrofina (Jung et al., 1995). Los últimos 15 aminoácidos del  $\beta$ -distroglicano parecen unirse directamente a la región rica en cisteína de la distrofina. Esta región del  $\beta$ -distroglicano es rica en prolina y contiene un sitio para la fosforilación de tirosina (James et al., 2000). La estructura de la distrofina que se une a distroglicano muestra que el distroglicano forma contactos con los dominios WW y EF hands de la distrofina.

### COMPLEJO SARCOGLICANO

En el músculo esquelético y cardiaco, el complejo sarcoglicano está compuesto por 4 glicoproteínas transmembranales;  $\alpha$ ,  $\beta$ , gama y delta sarcoglicano, y un miembro de la familia tetraspan de proteínas llamada sarcospan (Crosbie et al., 1997). La distribución de  $\alpha$ -sarcoglicano parece estar restringida al músculo esquelético y cardiaco, mientras que  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  sarcoglicano son expresadas sobre todo en el músculo liso (Barresi et al., 2000; Roberds et al., 1993; Straub et al., 1999). Muchos estudios sobre la función del sarcoglicano sugieren que pueden tener un papel en la transducción de señales intracelulares.

### SINTROFINAS

La familia de sintrofinas está compuesta por cinco miembros:  $\alpha$ -sintrofina,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2-sintrofina y  $\gamma$ 1 y  $\gamma$ 2-sintrofina (Adams et al., 1993; Ahn et al., 1996; Ahn et al., 1994; Piluso et al., 2000). Las sintrofinas se distribuyen de manera diferencial en el

músculo, se unen directamente a la distrofina y a la distrobrevina en el “coiled coil” de ambas proteínas (Blake et al., 2002). Se sugiere que las sintrofinas están involucradas en un gran número de funciones celulares y pueden ser consideradas proteínas adaptadoras que unen a las proteína asociadas a membrana a los complejos DPC o a los complejos parecidos DPC en tejido no muscular (Blake et al., 2002). Recientemente, se ha mostrado que hay dos sitios de unión a sintrofina en el extremo C- de la distrofina y adicionalmente dos sitios en alfa-distrobrevina (Newey et al., 2000). Por tanto, cuatro moléculas de sintrofina pueden ser ancladas al DPC en el músculo.

### DP71

La proteína Dp71 se expresa en una amplia variedad de tejidos no-musculares siendo el producto del gen de la DMD que se expresa en niveles más altos en el sistema nervioso (Blake et al., 1992; Hugnot et al., 1992). Dp71 se expresa en las células embrionarias pluriportentes, siendo el primer producto del gen detectable durante el desarrollo (Rapaport et al., 1992). La falta de esta proteína ha sido involucrada con al menos dos padecimientos clínicos de la DMD; retraso mental y mal funcionamiento de la retina (Daloz et al., 2003; Moizard et al., 1998).

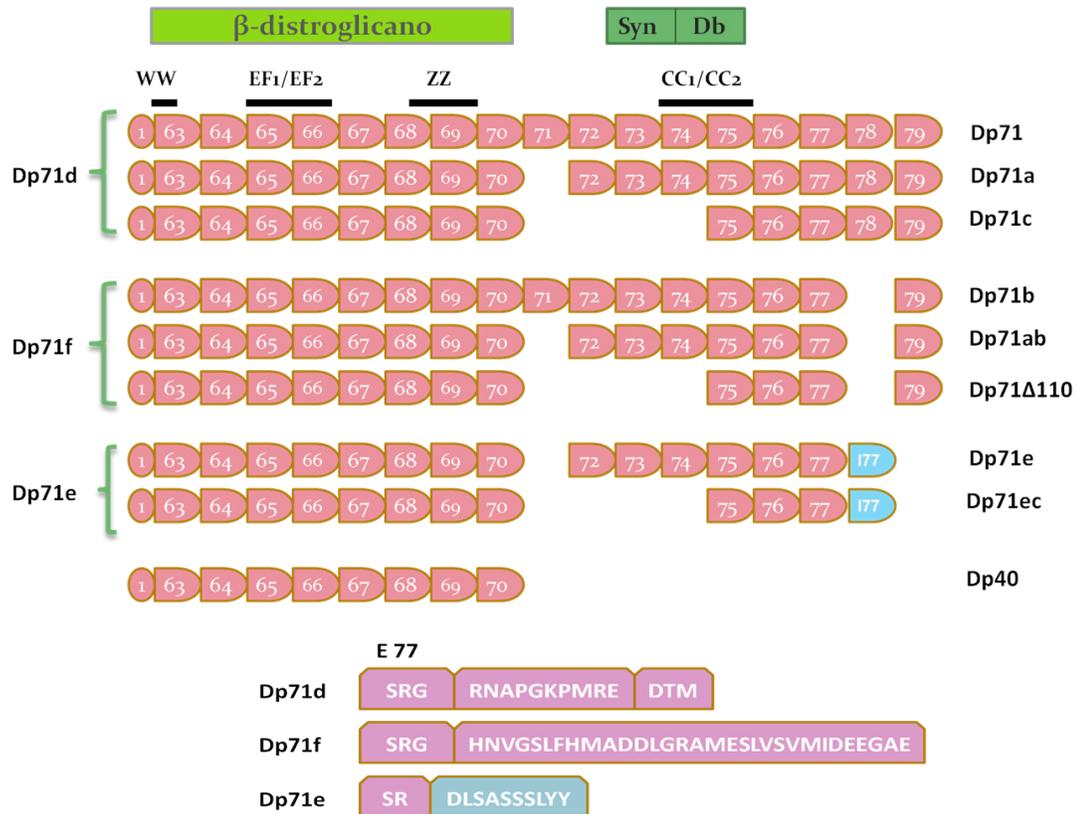
La proteína Dp71 carece del dominio N terminal de unión a actina y de la región de los repetidos parecidos a espectrina encontradas en la distrofina de longitud completa, sin embargo contiene los dominios C- terminal y el dominio rico en cisteína que es común para todas las proteínas codificadas por el gen de la DMD, flanqueada por una región N terminal única de siete aminoácidos y por secuencias C-terminal. El N terminal único posee un “motif” de unión a actina compuesto de seis aminoácidos (Howard et al., 1998) (**figura 1**).

Feener y colaboradores (Feener et al., 1989) describieron por primera vez que el transcrito de distrofina puede sufrir diferentes procesamientos alternativos en su extremo 3' para crear numerosas isoformas proteicas que difieren una de la otra en sus dominios carboxilos. Además, encontraron que el patrón de transcritos con

procesamientos alternativos es característico tanto del tejido como de la etapa del desarrollo (Bies et al., 1992).

Kramarcy y colaboradores (Kramarcy et al., 1994) revelaron la existencia de dos subpoblaciones de Dp71 que contienen tanto el C terminal hidrofílico de 17 aminoácidos o el hidrofóbico de 31 aa. Además, se reveló la existencia de variantes generadas por procesamiento alternativo con la presencia o ausencia de los exones 71 y/o exón 78 en el transcrito (Austin et al., 2000).

Las isoformas de Dp71 se pueden clasificar en 3 subgrupos dependiendo de qué procesamiento alternativo hayan sufrido. El primer subgrupo es el de las Dp71d, el cual contiene a Dp71 que comparte el extremo carboxilo con la distrofina de tamaño completo, Dp71a (que carece del exón 71) y a Dp71c (carece los exones 71 al 74). El segundo subgrupo corresponde a Dp71f, el cual contiene a las variantes Dp71b (sólo carece del exón 78), Dp71ab (carece del exón 71 y 78), y Dp71 $\Delta$ 110 (carece exones 71-74 y 78). El último subgrupo es el de las Dp71e que incluye a Dp71e (carece del exón 71) y Dp71ec (carece del exón 71-74) las cuales se generan mediante un evento de procesamiento alternativo en el cual se incorporan 34 pares de bases del intrón 77, generando un nuevo C-terminal con 10 aminoácidos de carácter hidrofílico (**Figura 3**)



**Figura 3. Proteína Dp71 y las isoformas que se generan por procesamiento alternativo.** La primera parte de la imagen corresponde a una representación esquemática de la proteína Dp71 y sus diferentes variantes generadas por procesamiento alternativo, las cuales se clasifican en diferentes grupos dependiendo de su extremo carboxilo terminal: el grupo Dp71d conserva el exón 78, lo cual no conlleva un cambio en el marco de lectura, por tanto, posee un C-terminal de 13 aminoácidos de carácter hidrofílico; el grupo Dp71f carece del exón 78 y a diferencia de la variante anterior, ésta sí provoca un cambio en el marco de lectura, dando lugar a 31 aminoácidos nuevos de carácter hidrofóbico y Dp71e retiene 10 aminoácidos en el intrón 77 lo cual genera un extremo carboxilo terminal de carácter hidrofílico. Por último, se encuentra la proteína Dp40, la cual se considera isoforma ya que comparte el mismo promotor con Dp71, abarca de los exones 63 al 70 y carece de extremo carboxilo. En la segunda parte de la imagen se presentan los aminoácidos que conforman los diferentes extremos carboxilo terminal de cada grupo.

## EXPRESIÓN DE DP71

La expresión de Dp71 es ubicua con la excepción del músculo esquelético. Sus niveles no sólo varían entre los diferentes tejidos y tipos celulares sino también durante la diferenciación. Los niveles de mRNA y proteína incrementan durante la diferenciación inducida por cAMP de astrocitos de cerebro de rata (Imamura and Ozawa, 1998) y la diferenciación de las células PC12 inducida por NGF (nerve growth factor) (Marquez et al., 2003).

El promotor de Dp71 se localiza en el intrón que se encuentra entre los exones 62 y 63 del gen de la DMD (Lederfein et al., 1992), el cual se expresa en una amplia variedad de tejidos; la proteína está presente en cerebro, retina, pulmón, hígado, testículos, riñones y músculo liso y en bajos niveles en el músculo esquelético fetal y cardíaco (Lederfein et al., 1992). Además, Blake y colaboradores (Blake et al., 1999) demostraron por primera vez que la Dp71 es capaz de formar complejos parecidos a DAPC en cerebro. Reportes recientes han mostrado la asociación de Dp71 con proteínas del DAPC tales como  $\beta$ -dístroglicano (Rosa et al., 1996), distrobrevina (Blake et al., 1999) y sintrofina (Kramarcy et al., 1994), sin embargo, Dp71 no puede sustituir de manera funcional a la distrofina de tamaño completo.

Los complejos tipo DAPC que contienen a la proteína Dp71 han sido identificados en diferentes líneas celulares, incluyendo las PC12 y las células C2C12 (Gonzalez-Ramirez et al., 2008). En las células PC12, Dp71 interactúa con  $\beta$ -dístroglicano,  $\beta$ 1-sintrofina,  $\beta$ -distrobrevina, y  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -sarcoglicano (Romo-Yanez et al., 2007)

## LA LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE DP71 Y LOS COMPONENTES DE DAPC

Alemán y colaboradores (Aleman et al., 2001) encontraron que Dp71d y Dp71f están presentes en extractos nucleares obtenidos de neuronas hipocámpales. También se demostró que el procesamiento alternativo determina la localización subcelular de las isoformas de Dp71 (Gonzalez et al., 2000). La isoforma de la Dp71 que carece de los aminoácidos codificados por los exones 71 y 78 se localiza exclusivamente en el citoplasma, mientras que las variantes de la Dp71 que contienen los aminoácidos

codificados por el exón 71 y/o 78 exhiben una localización predominantemente nuclear (Gonzalez et al., 2000). Ensayos en células PC12 demostraron que Dp71d exhibe localización nuclear, mientras que la Dp71f se localiza de manera exclusiva en el citoplasma (Marquez et al., 2003).

Dp71 coincide en el núcleo con los sarcoglicanos,  $\beta$ -dístroglicano, sintrofinas, y distrobrevinas, y todos estos están ensamblados dentro de un DAPC nuclear en las líneas celulares de HeLa, C2C12 y PC12 (Villarreal-Silva et al., 2010).

Es posible que Dp71 entre al núcleo a través de su asociación con otras proteínas que facilitan su acceso a la maquinaria de transporte soluble, tal como se ha reportado para un gran número de proteínas nucleares (Kaffman and O'Shea, 1999). Aunque la proteína Dp71 carece de una señal de localización nuclear canónica (NLS), su fosforilación por la cinasa II dependiente de calmodulina  $Ca^{2+}$  parece facilitar su transporte nuclear (Calderilla-Barbosa et al., 2006)

El importe de proteínas al núcleo tiene diferentes niveles de regulación, uno de los cuales es la fosforilación de proteínas. La fosforilación puede inducir la translocación nuclear por la liberación de la carga de su ancla citoplasmática o promoviendo la asociación con el receptor importina (Kaffman and O'Shea, 1999). La fosforilación protéica puede además inhibir el importe nuclear induciendo un cambio intramolecular que enmascara la secuencia NLS o disminuyendo la afinidad de la carga por su receptor de importina (Kaffman and O'Shea, 1999).

En este respecto, se ha mostrado que la distrofina es fosforilada en los residuos de serina y treonina por cinasas endógenas (Milner et al., 1993; Walsh et al., 1995) aunque los sitios exactos no se han localizado aun. El análisis de la secuencia de la Dp71 reveló dos sitios de fosforilación potenciales en la región C-terminal, el primero localizado en el exón 78 y el segundo en el exón 79 (Milner et al., 1993; Walsh et al., 1995)

Recientemente, una NLS funcional en la cola citoplasmática del  $\beta$ -dístroglicano fue identificado (Lara-Chacon et al., 2010), lo cual hace posible proponer que la Dp71

gana acceso al núcleo a través de su asociación con el  $\beta$ -dístroglicano (Tadayoni et al., 2012). Sin embargo, se ha determinado que el dominio ZZ que comprende dos motivos de dedos de zinc media el importe nuclear de Dp71d y que éste es dependiente de las importinas IMP $\alpha$ 2/ $\beta$ 1, también que el exporte nuclear depende de la exportina CRM1 (Suarez-Sanchez et al., 2014)

#### DP40

Aunque el cerebro es el órgano que muestra mayor abundancia en la expresión de distrofina, después del músculo (Lederfein et al., 1992), las funciones que juega la distrofina en el cerebro permanecen sin elucidar. Tinsley y colaboradores (Tinsley et al., 1993) aislaron una clona de cDNA cuyas secuencias 5' y 3' eran únicas en comparación con el gen de la distrofina, a esta isoforma le dieron el nombre de Apo-dystrophin-3 (Dp40), la cual codificaba para una proteína de 340 aminoácidos y posee un peso molecular de 40 kDa. Este producto génico pequeño es codificado por un mensajero de 2.2 kb transcrito a partir del promotor de la proteína Dp71, localizado en el intrón 62. La región 5'-UTR y la secuencia de los primeros siete aminoácidos son idénticos a aquellos codificados por la Dp71, pero la región 3'-UTR se deriva de la secuencia del intrón 70. Entonces el mensajero de la proteína Dp40 está formado por los exones 63 al 70 del gen de DMD y éste codifica para una proteína de 340 aminoácidos con un peso molecular correspondiente de 40kDa (Tinsley et al., 1993). La proteína Dp40 carece del extremo C-terminal normal de la Dp427 (aminoácidos 3409-3685), por tanto, la proteína Dp40 es la isoforma más pequeña de la distrofina (Tinsley et al., 1993). La región 3' terminal presente en el mensajero de esta la distrofina no corresponde al exón 79 como en la distrofina de tamaño completo sino que posee un sitio alternativo de poliA en el intrón 70 del gen que codifica para la distrofina, la traducción de esta región genera un codón de paro y da lugar a la proteína Apo distrofina 3 o Dp40.

Tozawa *et al* (2012) obtuvieron un anticuerpo policlonal contra la secuencia N terminal común para las isoformas cortas de la distrofina, incluyendo Dp40, e

investigaron el patrón de expresión de Dp40 en el cerebro de ratón. Los autores encontraron que Dp40 se expresa de manera abundante en las vesículas sinápticas e interactúa con un grupo de proteínas presinápticas, incluyendo a la syntaxin 1<sup>a</sup> y SNAP25 (Tozawa et al., 2012). Debido a que Dp40 posee el mismo promotor que la Dp71, la expresión de la Dp40 podría estar afectada en pacientes con DMD con mutaciones localizadas en el gen Dp71. Se ha reportado que la mayoría de los pacientes con DMD con retraso mental severo tienen mutaciones en el exón 63-69 el cual influencia la expresión tanto de Dp71 como de Dp40 (Daoud et al., 2009).

La proteína Dp40 es una isoforma particular de la distrofina Dp71 la cual carece del extremo carboxilo, es decir, los aminoácidos 3409 al 3685 en comparación con la distrofina de tamaño completo (Dp427). Los siete aminoácidos del N-terminal están fusionados a los dominios ricos en cisteína y a los primeros 48 aminoácidos del dominio carboxilo terminal de la distrofina, lo que significa que la proteína Dp40 contiene el dominio para la interacción de  $\beta$ -dístroglicano. Aunque la distribución de la proteína Dp40 en tejidos es similar a la de Dp71, Dp40 se expresa durante el desarrollo temprano; su expresión fue detectada en todos los tejidos fetales de humano y ratón (ej. músculo, pulmón, hígado, cerebro) en línea celular de Schwannoma de rata, en músculo de adulto y en células troncales de ratón (Tinsley et al., 1993). Además, se ha estudiado la expresión y distribución celular de la Dp40 en células PC12 y se ha encontrado que el mRNA se expresa en células no diferenciadas y diferenciadas en presencia de NGF (Aragon et al., 2015). Adicionalmente se ha visto que la sobreexpresión de la proteína Dp40 silvestre en las células PC12 estimula la diferenciación inducida con NGF y ésta proteína se localiza principalmente en la periferia/citoplasma de las células PC12 diferenciadas y sin diferenciar con NGF. Además se encontró que Dp40 colocaliza con proteínas que componen y transportan vesículas tipo sinápticas tales como sinaptobrevina, GLUT3, dineína y kinesina, lo cual sugiere que pudiera ser importante para algunas funciones sinápticas (Brenda Gonzáles, 2013). Por otra parte existen mutantes de Dp40 que presentan cambios puntuales en los exones 65 y 67, que corresponden a

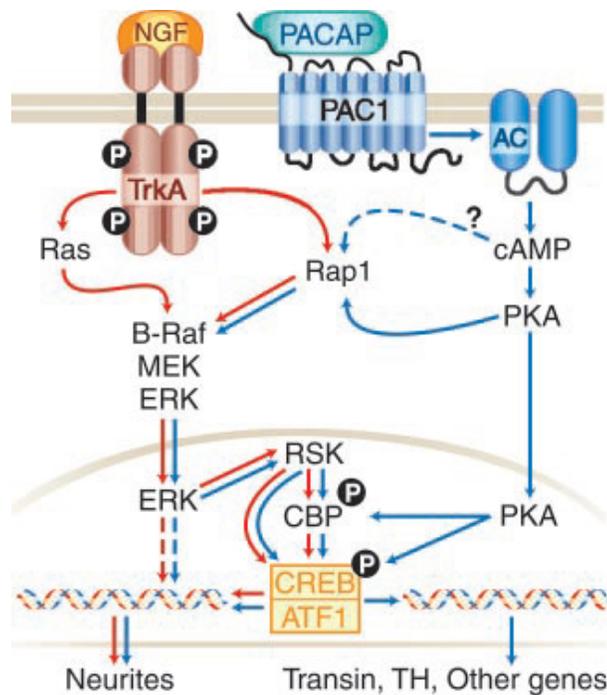
los motivos EF hand 1 y 2 respectivamente, los cuales hacen que las proteínas tengan una localización nuclear. En este trabajo se determinó que la localización nuclear de las proteínas Dp40L93P y Dp40L170P se encuentra condicionada por los residuos de prolina ubicados en la posición 93 y 170 (Aragón et al; 2014 enviado a publicación)

### CÉLULAS PC12

Ya que Dp71 ha sido relacionada con la disfunción cognitiva presente en una fracción de los pacientes con DMD, las células PC12 fueron escogidas como un modelo *in vitro* para el estudio de la función neuronal potencial de Dp71.

Las células PC12 corresponden a una línea celular originada a partir de un feocromocitoma adrenal de rata. Una de las características principales de esta línea es que, a la primera semana de ser expuesta a NGF (Nerve growth factor), las células detienen su proliferación y comienza a observarse un proceso de generación de neuritas comparable con aquél observado en neuronas simpáticas en cultivo celular primario (Greene and Tischler, 1976).

La duración de la señalización a través de ERK pudiera ser la razón del porqué las células PC12 responden de manera diferencial al estímulo con NGF (diferenciación) y EGF (proliferación). EGF induce a la fosforilación rápida y transitoria de ERK dependiente de Rap1 y Ras, mientras que el estímulo con NGF es rápido y sostenido. Además, la activación del receptor acoplado a proteínas G a través de PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) también puede estimular algunos aspectos de la diferenciación, sin embargo, la señalización a través de PACAP es independiente de Ras, **Figura 4.** (Gerdin and Eiden, 2007)



**Figura 4. Rutas de señalización dependientes de PKA en la diferenciación de células PC12 bajo condiciones de exposición a NGF y PACAP.** Diferencias en la intensidad, duración y sinergia de la señal pudieran ser la razón de las diferencias cualitativas entre el estímulo con PACAP y NGF. Imagen obtenida de (Vaudry et al., 2002).

Además, se ha demostrado que estas células son un buen modelo para estudiar la función de las distrofinas cortas ya que presentan la ventaja de que solamente expresan a la Dp71 y Dp40 como productos del gen de la distrofina. Se ha demostrado que las células PC12 expresan las isoformas de Dp71d, Dp71f (Marquez et al., 2003) y Dp71e (Saint Martin et al., 2012). Sin embargo, de manera reciente, se ha aislado y secuenciado el mRNA de las distintas isoformas de Dp71 y Dp40 demostrándose la expresión de Dp71a, Dp71c, Dp71ab, Dp71e, Dp71ec y Dp40 en estas células (Aragón et al., en preparación) La diferenciación neuronal inducida con NGF de las células PC12 da lugar a una regulación diferencial de la expresión y de la localización subcelular de las isoformas de Dp71: Dp71a, Dp71 ab y Dp71e se localizan y colocalizan con  $\beta$ -distroglicano y  $\alpha$ -sintrofina en el citoplasma y periferia en células diferenciadas y sin diferenciar con NGF, mientras que Dp71c y Dp71ec se

localizan principalmente en la periferia celular y no colocalizan con  $\beta$ -dístroglicano ni con  $\alpha$ -sintrofina. En cambio, la localización de Dp71a, Dp71e y Dp71ec incrementa en el núcleo una vez que las células se han sometido a diferenciación. Adicionalmente, las isoformas de Dp71 se han localizado en las extensiones neuríticas y en el cono de crecimiento. Estos resultados sugieren que ya que diversas isoformas se asocian con diferentes complejos subcelulares pueden tener diferentes funciones en las células PC12 (Aragón et al., en preparación).

## JUSTIFICACIÓN

Dp71 es el producto del gen de la distrofina que se expresa en mayores niveles en el sistema nervioso, su carencia se ha relacionado con al menos dos padecimientos clínicos de la distrofia muscular de Duchenne que son retraso mental y alteraciones de la retina. Por tanto, es de gran importancia conocer la función que tiene esta proteína.

Se conoce parcialmente el papel que juega el extremo carboxilo de las distrofinas en la distribución de estas proteínas. Considerando que las células PC12 expresan isoformas de los grupos Dp71d, Dp71f y Dp71e, las cuales difieren en la región carboxilo terminal, así como la Dp40 que carece de esta región, en este trabajo se planteó la construcción de proteínas recombinantes que permitieran estudiar el papel de la región carboxilo terminal de estas isoformas.

## OBJETIVOS

### ❑ **Objetivo general**

Determinar el papel de la región carboxilo terminal de las isoformas Dp71d, Dp71f y Dp71e en la localización de Dp40 y Dp40-L93-170.

### ❑ **Objetivos específicos:**

- Construir los vectores pcDNA4/HisMax-TOPO-TA/Dp40 y Dp40-L93-170 con los extremos carboxilos de Dp71d, Dp71f y Dp71e.
- Determinar la expresión de las proteínas Dp40 recombinantes en las células PC12.
- Determinar la localización subcelular de las proteínas Dp40 recombinantes en células PC12 en ausencia y presencia de NGF.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo de este proyecto es contribuir al conocimiento de la función que tiene el extremo carboxilo de las diferentes isoformas de Dp71, para esto se comenzó con la construcción de los vectores en los que las proteínas Dp40 y Dp40-L93-170 se fusionarán con el extremo carboxilo de isoformas representantes de cada uno de los grupos de Dp71 (a, ab y e) (**Tabla 1**). La fusión se realizó mediante la amplificación por PCR con oligos que contuvieran la secuencia de cada región carboxilo terminal de Dp71, utilizando como molde las secuencias que codifican para Dp40 y Dp40-L93-170 ya que la proteína en su forma silvestre se localiza en la periferia celular, citoplasma y en menor grado en núcleo; y la mutante Dp40-L93-170 tiene una localización principalmente nuclear, mimetizando por tanto, la localización que tienen las diferentes isoformas de Dp71 en las células PC12, además de que Dp40 es la isoforma más corta.

**Tabla 1. Extremos carboxilo de cada uno de los grupos de Dp71**

Carboxilos	Nucleotidos	Aminoácidos
<b>Dp71d</b>	agaaatgccctggaaagccaatgagagaggacac aatg	RNAPGKPMREDTM
<b>Dp71f</b>	cacaatgtaggaagcctttccacatggcagatgatt gggcagagcgatggagtccttagtttcagtcagata gatgaagaaggagcagaa	HNVGSLFHMADDLGRA MESLVSVMIDEEGAE
<b>Dp71e</b>	gatctatctgccttctctctctattat	DLSASSSLYY

Adicionalmente, y por medio de análisis *in silico*, se determinó la localización subcelular que pudieran tener las diferentes isoformas. Además, por medio del programa NetNes 1.1 se buscó una secuencia probable de exporte nuclear en el extremo carboxilo de la isoforma Dp71f.

Por tanto, se realizaron construcciones adicionales de Dp40 y Dp40L93-170 con la secuencia probable de exporte nuclear (NES por sus siglas en inglés (nuclear export signal)).

Una vez concluidas las construcciones, se llevó a cabo la purificación del producto de PCR por electroelución y el producto purificado se ligó al vector de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO-TA. Con el producto de ligación se transformaron células DH5 $\alpha$  competentes y después, estas células fueron sembradas en placas LB con ampicilina. Las células transformadas con los plásmidos recombinantes que contienen las fusiones XpressDp40-COOHa, XpressDp40- COOHab, XpressDp40-L93-170-COOHa, XpressDp40-L93-170-COOHab, XpressDp40-L93-170-COOHe y XpressDp40-L93-170P/NES(p.352-363) fueron analizadas por PCR utilizando oligonucleótidos específicos amplificando la secuencia esperada. Una vez que se concluyó este paso, se procedió a la reacción de secuenciación para comprobar la fidelidad de las construcciones. Finalmente, se transfectó a la línea celular PC12 para proceder a determinar la expresión de las diferentes proteínas recombinantes con un ensayo de Western Blot, ayudándose de la bandera Xpress. De esta manera se comprobó que realmente se estaban transfectando las células con el plásmido de interés.

Posteriormente se determinó la localización subcelular de las proteínas Dp40 recombinantes mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Esto se realizó en ausencia de NGF y en exposición a NGF durante 3 días.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción de los vectores de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO-TA/Dp40 y Dp40-L93-170 con los extremos carboxilo d, f y e y con la NES (p.352-363)

Para llevar a cabo la fusión del cDNA de Dp40 y Dp40L170P con el extremo carboxilo de las diferentes isoformas de Dp71 (COOHd, COOHf y COOHe) y con la NES(p.352-363), se realizó una reacción de PCR utilizando tanto el cDNA de Dp40 como el de Dp40-L93-170 contenido en el vector pcDNA4/HisMax-TOPO-TA/Dp40 y Dp40-L93-170 respectivamente, compartiendo los oligonucleótidos del extremo 5' (forward) y con diferentes oligonucleótidos del extremo 3' (reverse). El oligonucleótido del extremo 3' fue elegido de acuerdo al extremo que se deseó añadir, todos siguiendo las condiciones de PCR siguientes: 0.3 µl dNTP, 1 unidad de Pfx DNA polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen), 5µl de buffer 10X, en un volumen final de 50µl, en las condiciones siguientes: 94°C por 2 minutos y 35 ciclos de 94°C por 30 segundos y 68°C por 3 minutos con una extensión final a 70°C por 10 minutos.

#### *Procedimiento para añadir el extremo COOHd a Dp40 y Dp40-L93-170*

Para agregar el extremo carboxilo de Dp71d se partió de los “vectores molde” pcDNA4/HisMax-TOPO-TA/Dp40 y Dp40-L93-170, utilizando los cebadores “forward” 5'-ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCAC-3' (exón 1) y el “reverse” 5'-CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGCTTTCCAGGGGCATTTCTCGTTTCCATGTTGTCCCCCTC-3' (COOHd) para amplificar y añadir el extremo carboxilo de manera simultánea en una reacción de PCR.

#### *Procedimiento para añadir el extremo COOHe a Dp40 y Dp40-L93-170*

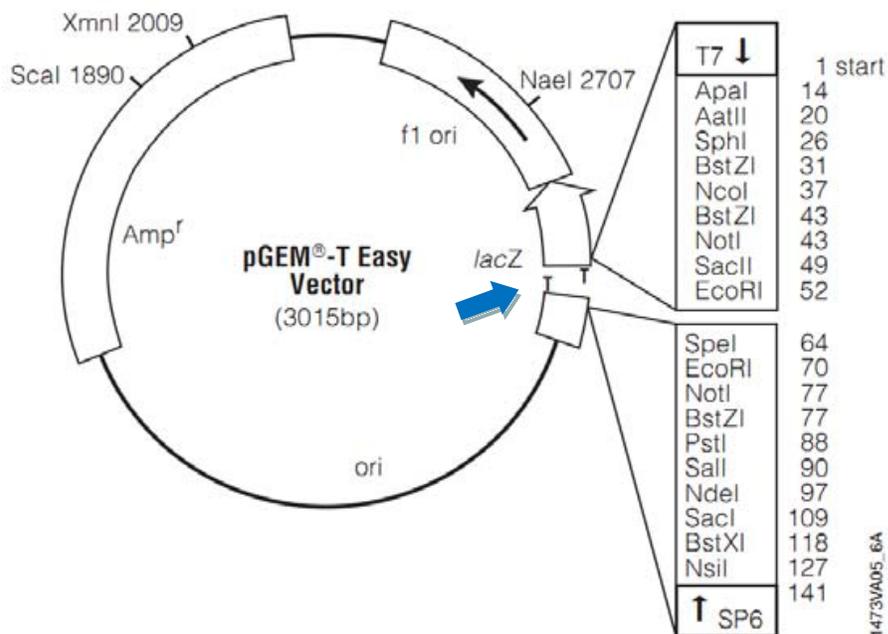
Del mismo modo, para añadir el extremo carboxilo de la isoforma Dp71e se repitió el procedimiento descrito previamente con los cebadores específicos para dicha reacción: “forward” 5'-ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCAC-3' (exón 1) y “reverse” 5'-GATCTATCTGCCTCTTCTCTCTATTATCGTTTCCATGTTGTCCCCCTC-3'.

*Procedimiento para añadir la NES a Dp40 y Dp40-L93-170*

Al igual que con las construcciones anteriores, el procedimiento a seguir para añadir la señal de exporte nuclear fue el mismo utilizándose los cebadores específicos para la reacción: “forward” 5'-ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCAC-3' (exón 1) y “reverse” 5'TAAGGACTCCATCGCTCTGCCCAAATCATCTGCCATCGTTTCCATGTTGTCCCCCTC 3'

*Procedimiento para añadir el extremo COOHab a Dp40 y Dp40-L93-170*

Debido a que el extremo carboxilo del grupo de las isoformas Dp71f tiene un tamaño de 93 pares de bases, su incorporación a Dp40 se llevó a cabo en dos pasos; se realizó una reacción de PCR utilizando cDNA de Dp40 y Dp40-L93-170, y los oligonucleótidos “forward” 5'-ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCAC-3' (exón 1) y “reverse” 5'- CGCTCTGCCCAAATCATCTGCCATGTGGAAAAGGCTTCCTACATTGTGCGT TTCCATGTTGTCCCCCTC -3' (ab5). Esta secuencia contiene la última parte de Dp40 y la primera mitad de la parte carboxilo de Dp71f. Una vez obtenido el fragmento de PCR de interés, se integró al vector de tránsito pGEM-T Easy (**figura 5**), dando como lugar los vectores transitorios: pGEM-T-Easy/Dp40/COOHab5' o pGEM-T-Easy/Dp40L93-170P/COOHab5'



**Figura 5. Vector de tránsito pGEM-T Easy.** Se representa el vector de tránsito que se usó para la clonación de Dp40. Este vector se encuentra en una conformación lineal, y se cierra cuando se integra la secuencia de interés, misma que debe contar con una adenina 3' libre en cada extremo para que se pueda llevar a cabo la ligación con las timinas (T) 5' libres en los extremos del vector (la flecha azul indica el sitio de ligación). Está indicado el gen de resistencia a ampicilina ( $Amp^r$ ) y los sitios de restricción con los que cuenta el plásmido. La ligación de las diferentes construcciones al vector pGEM-T Easy se llevaron a cabo utilizando la DNA ligasa T4 de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Promega).

Para añadir la segunda mitad del extremo COOHab se repitió el procedimiento antes descrito utilizando como molde a los vectores pGEM-T-Easy/Dp40/COOHab5' o pGEM-T-Easy/Dp40L93-170P/COOHab5' utilizando los oligonucleótidos "forward" 5'-ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCAC-3' (exón 1) y el "reverse" 5'CTATTCTGCTCCTTCTTCATCTATCATGACTGAACTAAGGACTCCATCGCTCTGCCAAATCATCTGC -3'(ab3).

Posteriormente se transformaron células competentes de la cepa *E. coli* DH5- $\alpha$  y se seleccionaron en placas de cultivo con ampicilina varias colonias, las cuales se analizaron posteriormente mediante PCR de colonia utilizando el cebador "5' Exón 1" para todas las construcciones y los cebadores "COOHd" para Dp40/COOHd y

Dp40/L93-170P/COOHd; “ab3” para Dp40/COOHf y Dp40/L93-170P/COOHf; “COOHe” para Dp40/L93-170P/COOHe; y “NES (p.352-363)” para Dp40/L93-170P/NES (p. 352-363).

Las concentraciones e integridad de los plásmidos se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. La banda correspondiente al fragmento amplificado se cortó y se purificó posteriormente por electroelución.

#### Purificación general del los diferentes productos de PCR por electroelución

50 µl del producto de PCR fueron mezclados con azul de bromofenol, xilen cianol y glicerol. La muestra se corrió en un gel de agarosa al 1.2% (TBE 0.5X) y se sometió a electroforesis por 1 hora a 100 volts, 300 miliAmp. Se observó y se cortó la banda de DNA en el transiluminador de luz UV de longitud de onda larga. En la cámara de electroelución se colocaron las bandas cortadas y se añadieron 150 µl de acetato de amonio, el cual se utiliza para capturar al DNA; se dejó correr a 100 volts durante 1 hora y 30 minutos, se tomaron a continuación 400 µl de acetato de amonio en un tubo de 1.5 ml., se agregaron 2.5 volúmenes de etanol (1000 µl) y se dejaron por 15 min en el REVCO o toda la noche a 4°C. Se centrifugó la muestra durante 15 min a 4°C a 12000 rpm., se decantó la muestra y se agregó 1ml de alcohol al 75%, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se decantó y se dejó secar 5 min., se le añadieron 20 µl de agua miliQ. La muestra se corrió en un gel al 1.2% (TBE 0.5X) para comprobar la presencia de la banda esperada.

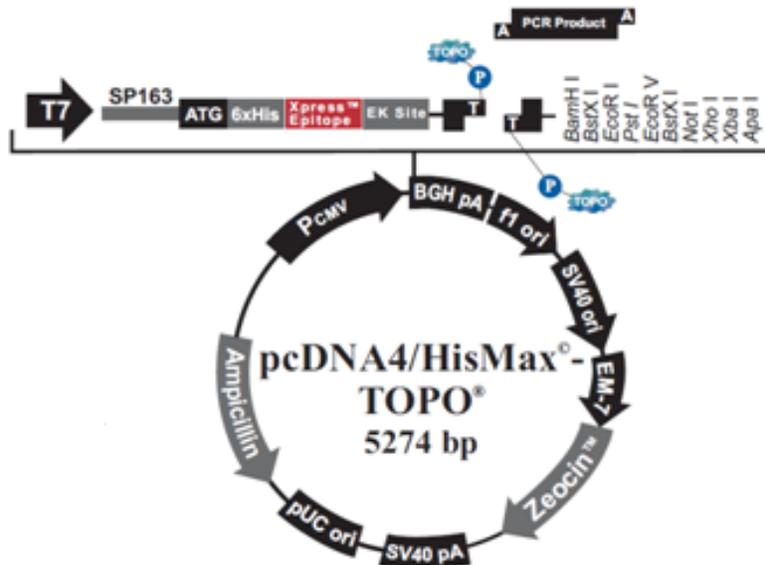
#### Adenilación

Para realizar la ligación del fragmento de DNA de interés con el vector de expresión pcDNA4/HisMax TOPO-TA (el cual se encuentra de manera lineal y posee timinas en los extremos), se utilizó una taq DNA polimerase (recombinant) de baja fidelidad marca Thermo Scientific, ya que ésta se caracteriza por adenilar los extremos de la secuencia, que son necesarias para la ligación de la secuencia de interés, en el

vector de tránsito o de expresión. En la reacción de ligación se utilizaron 5 µl de Buffer 10x, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dinucleótidos y 0.3 µl de la taq polimerasa, a una temperatura de 72°C por 20 minutos.

### Vector de expresión

Los fragmentos adenilados en el paso anterior se purificaron y posteriormente se ligaron al vector de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO-TA (**figura 6**). El vector en cuestión se utilizó para fusionar el epítipo “Xpress” a la región N-terminal de las diferentes proteínas recombinantes de interés en este trabajo.



**Figura 6. Vector de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO.** Se representa el vector de expresión que se utilizó para la expresión de las proteínas recombinantes de Dp40 y Dp40-93/170P conteniendo las regiones carboxilo terminal de interés. Este vector se encuentra en una conformación lineal, y se cierra cuando se integra la secuencia de interés, misma que debe contar con una adenina 3' libre en cada extremo para que se pueda llevar a cabo la ligación gracias a las timinas (T) 5' libres en los extremos del vector. Está indicado el gen de resistencia a ampicilina y los sitios de restricción con los que cuenta.

Este vector no requiere ligasa para llevar a cabo la ligación, tiene una topoisomerasa unida covalentemente al vector, la cual se une al DNA dúplex en sitios específicos y

corta el enlace fosfodiéster después del 5'-CCCTT. La energía de esta ruptura es conservada por la formación de un enlace covalente entre el 3' fosfato de la cadena que ha quedado libre y el residuo Tyr-274. El enlace fosfotirosil entre el DNA y la enzima puede ser atacado posteriormente por el 5' hidroxil de la cadena rota original, o en este caso del fragmento de PCR que se desea ligar, revirtiendo la reacción y liberando a la topoisomerasa. La mezcla de esta ligación se utilizó para transformar a la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$ , las colonias que se obtuvieron se analizaron por PCR con los oligonucleótidos utilizados anteriormente (**tabla 2**). Uno de estos plásmidos (o varios) fue secuenciado como se indica posteriormente, las concentraciones e integridad de los plásmidos se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Finalmente se procedió a la reacción de secuenciación.

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para incorporar los extremos carboxilo correspondientes a cada isoforma.**

Extremo carboxilo a insertar	Cebador "forward"	Cebador "reverse"
<b>Dp71d</b>	<b>Exón 1:</b> 5'ATGAGGGAACACCTCAA AGGCCAC-3'	<b>COOHd:</b> 5'CTACATTGTGTCCTCTCTCATTGGCTTTCCAGGG GCATTTCTCGTTTCCATGTTGTCCCCCTC-3'
<b>Dp71f (primera parte)</b>	<b>Exón 1:</b> 5'ATGAGGGAACACCTCAA AGGCCAC-3'	<b>ab5:</b> 5'CGCTCTGCCCAAATCATCTGCCATGTGGAAAAGG CTTCTACATTGTGCGTTTCCATGTTGTCCCCCTC-3'
<b>Dp71f (segunda parte)</b>	<b>Exón 1:</b> 5'ATGAGGGAACACCTCAA AGGCCAC-3'	<b>ab3:</b> 5'CTATTCTGCTCCTTCTTTCATCTATCATGACTGAAA CTAAGGACTCCATCGCTCTGCCCAAATCATCTGC-3'
<b>Dp71e</b>	<b>Exón 1:</b> 5'ATGAGGGAACACCTCAA AGGCCAC-3'	<b>COOHe</b> 5'GATCTATCTGCCTTCTCTCTCTATTATCGTTTC CATGTTGTCCCCCTC-3'
<b>Señal de Exporte Nuclear (NES)</b>	<b>Exón 1:</b> 5'ATGAGGGAACACCTCAA AGGCCAC-3'	<b>NES (p.352-363)</b> 5'TAAGGACTCCATCGCTCTGCCCAAATCATCTGCC ATCGTTTCCATGTTGTCCCCCTC 3'

### Secuenciación automática

Para llevar a cabo las reacciones de secuenciación se utilizó la técnica de secuenciación automática por electroforesis capilar desarrollada por Applied Biosystems®. Se usaron 500ng de la construcción purificada de pGEM-T Easy/Dp40 o pcDNA4/HisMax-TOPO-TA y cada uno de los siguientes oligonucleótidos:

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la caracterización de los vectores pGEM-T Easy y pcDNA4/HisMax-TOPO-TA**

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Exón 1	5'ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG'3
562U	5'CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG'3
247L	5'TCTGCAGGATATCCATGGGCTGATC'3

Los oligonucleótidos utilizados para la reacción de secuenciación de los fragmentos que codifican para Dp40 en el vector pGEM-T Easy/Dp40 fueron Exón 1, 562U y 247L. Para cada reacción de secuenciación se agregaron a un tubo eppendorf de PCR, 8µl de una mezcla que contiene Amplitaq DNA polimerasa, terminadores modificados etiquetados con dRodamina, cloruro de magnesio, buffer Tris-HCl pH 9.0 y dNTPs, 500ng del vector purificado, 800ng de oligonucleótido y la cantidad necesaria de H<sub>2</sub>O milliQ para tener un volumen final de 20µl. Posteriormente, la reacción se colocó en un termociclador a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos y 60°C por 4 minutos, seguidos de 5 minutos a 60°C. La purificación de los productos de extensión se realizó con isopropanol al 75% y se secó a temperatura ambiente para la posterior secuenciación automática por capilar.

### Cultivo y transfección de células PC12

Las células PC12 se sembraron a diferentes confluencias (60 y 90%), dependiendo de las condiciones a las que se les expondría posteriormente. Se utilizó una confluencia del 90% con medio de sincronización, sobre cubreobjetos previamente tratados con Poli-L-Lisina cuando las células fueron utilizadas para Western Blot y para inmunofluorescencia en ausencia de NGF. Se utilizó una confluencia del 60% para aquellas células destinadas a ensayos de inmunofluorescencias en presencia de NGF. Después de 24 horas de sembradas las células, se llevó a cabo la transfección de la siguiente manera: en un tubo se mezclaron 100  $\mu$ l de Opti-MEM (Gibco) con 2  $\mu$ g del vector de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO/Dp40-COOHa (se repitió el mismo procedimiento con los demás vectores) y en otro tubo 100 $\mu$ l de Opti-MEM con 5  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las preparaciones se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se mezclaron los componentes de ambos tubos y se incubaron a temperatura ambiente durante 40 minutos para la formación de los complejos de transfección. A la mezcla DNA-Lipofectamina 2000 se le agregaron 800  $\mu$ l de Opti-MEM y se volvió a incubar por 10 minutos a temperatura ambiente. Al mismo tiempo, las células se lavaron una vez con Opti-MEM, se les agregó el medio de transfección y se incubaron durante 5 horas a 37°C en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO<sub>2</sub>. Por último, a las células transfectadas se les adicionó 1 ml de medio de crecimiento. Este último paso fue diferente para las células que serían expuestas a NGF durante tres días. En este caso, en lugar de agregar 1 ml de medio de crecimiento, se les colocó 1ml de medio de crecimiento adicionado con NGF (50ng/ml) y se les dejó incubando en las mismas condiciones durante 3 días.

### Extracción de proteínas

Una vez pasado el tiempo de transfección y de crecimiento, se retira el medio con cuidado y se les coloca 1ml de PBS a cada uno de los pozos, lavando de tal manera que se despeguen las células y así poder recolectarlas en tubos eppendorf de 1.5ml.

Se centrifugan posteriormente por 5 min a 6000 rpm para eliminar por decantación el PBS. Posteriormente la pastilla se diluye en 60 µl de Buffer de Extracción II compuesto por Tris-HCl 250mM pH 8 y EDTA 1mM pH 8, adicionado con 80µl/ml de inhibidores de proteasas COMPLETE (Roche, Inc.). Se dejan reposando en hielo por 15 minutos. Posteriormente se les adicionan Buffer de carga 5X (4.8 ml H<sub>2</sub>O; 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 1.2 ml; Glicerol 1 ml; SDS al 10%, 2ml; Azul de bromofenol al 0.1%, 0.5ml), BME (β-Mercaptoethanol). Se guardó a -20°C para su posterior análisis.

### Ensayos de Western Blot

Se realizaron geles de poliacrilamida-SDS al 10%, los cuales fueron cargados con 60-80 µl de la proteína extraída en el paso anterior, para posteriormente ser sometidas a electroforesis. Las proteínas se transfirieron posteriormente a membranas de nitrocelulosa con una intensidad de corriente eléctrica de 20 volts durante 16-18 horas, a una temperatura de 4°C. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas se bloqueó con leche descremada al 5% en buffer TBS-T (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.05%) durante 2 hrs, en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-Xpress marca Invitrogen (1:200) diluido en buffer TBS-T. Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-mouse marca invitrogen (1:10000) que reconocen la bandera Xpress del vector para la detección.

### Ensayos de inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se llevaron a cabo en células PC12 (en ausencia o presencia de NGF de acuerdo a lo antes descrito) transfectadas con el vector de expresión que contiene las proteínas recombinantes de interés: XpressDp40-COOHa, XpressDp40/COOHab, XpressDp40-L93-170P/COOHa, XpressDp40-L93-170P/COOHab, XpressDp40-L93-170P/COOHe y XpressDp40-L93-170P/NES(p.352-363). Las células PC12 se cultivaron sobre cubre objetos pre-tratados con poli-L-lisina. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron con buffer de citoesqueleto y las

células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.4% y paraformaldehído al 4%, en buffer CB (Buffer de citoesqueleto) durante 5 min. Posteriormente las células se lavaron tres veces por 5 min con buffer CB y se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer CB durante 20 min. Después de lavar con PBS, se bloquearon los sitios inespecíficos con 0.5% de gelatina en PBS durante 40 min., posterior a esto los cubreobjetos se lavaron con PBS y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes diluidos en PBS (1:150 de anti-Xpress). Al siguiente día los cubreobjetos se lavaron con PBS para quitar el exceso del anticuerpo y se incubaron durante 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Alexa 488) que reconoce la bandera Xpress contenida en el vector de expresión, seguido por DAPI (3 min a una dilución de 1:1000) para poder observar los núcleos. Por último, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se colocaron sobre portaobjetos con el medio de montar Vectashield (Vecto Labs).

Las preparaciones se analizaron en el microscopio confocal “baby” de la marca Leica modelo Sp2. Los cortes se realizaron en intervalos de aproximadamente 0.34  $\mu\text{m}$ ; las imágenes que se seleccionaron para el análisis fueron aquellas que cortaban de manera ecuatorial a la célula.

### Análisis estadístico

El análisis de intensidad de fluorescencia en las células transfectadas se realizó usando el software Image J, el cual analiza un área determinada y proporciona valores en términos de escala de grises. Las áreas a cuantificar fueron el núcleo, citoplasma y periferia; de cada una de estas secciones se tomó un área entre 300 y 500 píxeles. Dichos valores fueron transformados a porcentajes para ser posteriormente analizados con la prueba Anova de dos vías usando el software GraphPad Prism 6. Se utilizó  $P < 0.05$  como criterio de significancia estadística.

## RESULTADOS

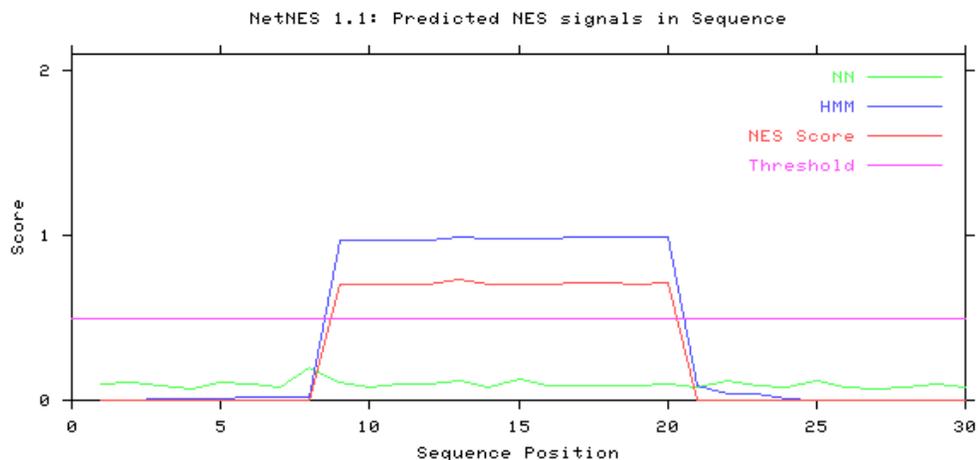
Predicción *in silico* de la localización subcelular probable de las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHe, XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363).

Previo a la construcción de los diferentes vectores de expresión que contuvieran a las diferentes proteínas recombinantes se llevaron a cabo predicciones *in silico* con el fin de averiguar cuál sería la localización subcelular probable de las proteínas recombinantes en estudio. Se utilizó para dicho el programa PSORT II, los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 4**. Debido a que las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHf y XpressDp40L93-170P/COOHf obtuvieron un porcentaje alto de localización en citoplasma, se supuso que esto tal vez se debiera a la presencia de una Señal de Exporte Nuclear (NES) en el extremo carboxilo terminal del grupo f, por tanto, se analizó con el programa bioinformático llamado NetNES la secuencia de las dos proteínas recombinantes que contenían al extremo carboxilo terminal f,, encontrándose tal como se esperaba, en el extremo carboxilo terminal del grupo f (**Figura 7**).

Proteína	Localización en citoplasma	Localización en núcleo
Dp40 wt	<b>69.5%</b>	30.4%
Dp40wt+COOHd	39.1%	<b>60.9%</b>
Dp40wt+COOHf	<b>69.5%</b>	30.4%
Dp40wt+COOHe	39.1%	<b>60.9%</b>
Dp40wt+NES	<b>69.5%</b>	30.4%

Proteína	Localización en el citoplasma	Localización en el núcleo
Dp40L93/170P	39.1%	<b>60.9%</b>
Dp40L93/170P+COOHd	39.1%	<b>60.9%</b>
Dp40L93/170P+COOHf	<b>73.9%</b>	26.1%
Dp40L93/170P+COOHe	39.1%	<b>60.9%</b>
Dp40L93/170P+ NES	<b>39.1%</b>	60.9%

**Tabla 4. Predicción de la localización subcelular de las diferentes construcciones analizadas utilizando PSORT II.** En el cuadro superior se muestran las diferentes predicciones para cada una de las proteínas Dp40 con los diferentes extremos carboxilo terminales (d, f, e, NES p.352-363). En el recuadro inferior se muestran las predicciones para cada una de las proteínas Dp40L93-170P con los diferentes extremos carboxilo terminales (d, f, e, NES p.352-363).



#Seq-Pos-Residue	ANN	HMM	NES	Predicted
Sequence-1-H	0.098	0.000	0.000	-
Sequence-2-N	0.113	0.000	0.000	-
Sequence-3-V	0.094	0.006	0.000	-
Sequence-4-G	0.073	0.006	0.000	-
Sequence-5-S	0.111	0.006	0.000	-
Sequence-6-L	0.103	0.020	0.000	-
Sequence-7-F	0.079	0.022	0.000	-
Sequence-8-H	0.203	0.022	0.000	-
Sequence-9-M	0.110	0.968	0.704	Yes
Sequence-10-A	0.078	0.968	0.705	Yes
Sequence-11-D	0.102	0.968	0.703	Yes
Sequence-12-D	0.102	0.968	0.703	Yes
Sequence-13-L	0.118	0.989	0.732	Yes
Sequence-14-G	0.083	0.984	0.702	Yes
Sequence-15-R	0.126	0.984	0.706	Yes
Sequence-16-A	0.088	0.984	0.708	Yes
Sequence-17-M	0.092	0.995	0.717	Yes
Sequence-18-E	0.094	0.994	0.714	Yes
Sequence-19-S	0.089	0.994	0.708	Yes
Sequence-20-L	0.101	0.994	0.712	Yes
Sequence-21-V	0.080	0.091	0.000	-
Sequence-22-S	0.119	0.042	0.000	-
Sequence-23-V	0.086	0.042	0.000	-
Sequence-24-M	0.083	0.014	0.000	-
Sequence-25-I	0.123	0.000	0.000	-
Sequence-26-D	0.083	0.000	0.000	-
Sequence-27-E	0.072	0.000	0.000	-
Sequence-28-E	0.078	0.000	0.000	-
Sequence-29-G	0.100	0.000	0.000	-
Sequence-30-A	0.084	0.000	0.000	-
Sequence-31-E	0.073	0.000	0.000	-
//				

**Figura 7. Determinación de la secuencia probable de exporte nuclear. Fuente:** NetNes server 1.1. En el primer recuadro se muestra la gráfica en dónde se evaluán las probabilidades de que se encuentre una secuencia de exporte nuclear en las construcciones dadas. El programa utiliza el Modelo Oculto de Markov y las Redes Neuronales Artificiales como método para predecir la existencia de señales de exporte nuclear putativas. Si se supera el valor límite, se considera una señal de exporte nuclear probable. En el recuadro inferior se ha enmarcado en negro la posición y secuencia que el programa detecto como probable de exporte nuclear.

Construcción de los vectores de expresión pcDNA4 HisMax/TOPO-TA/Dp40 y pcDNA HisMax TOPO-TA/Dp40-L93-170P con los extremos carboxilo d, f y e y la secuencia (NES p.352-363).

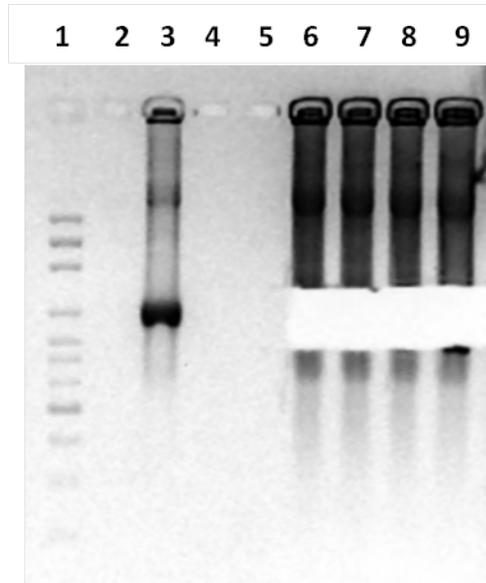
En la primera parte de este trabajo se construyeron los vectores de expresión que contienen las proteínas recombinantes Dp40 y Dp40L93-170 con los diferentes extremos carboxilo de los grupos d, f y e, así como la señal de exporte nuclear (NES p.352-363), de acuerdo a lo ya antes descrito en la sección materiales y métodos. Los vectores construidos como se describe a continuación fueron los siguientes:

- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40
- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHd
- pcDNA4 /HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHf
- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170P
- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170P-COOHd
- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170P-COOHf
- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170P-COOHe
- pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170P/(NES p.352-363).

A partir de los vectores pcDNA4/HisMax-TOPO-TA Dp40 y Dp40-L93-170, los cuales ya se encontraban caracterizados, se amplificaron y se adicionaron mediante PCR los diferentes extremos carboxilo terminal d,f,e y (NES p.352-363), utilizando los oligonucleótidos Exón 1 para la región 5' común para todos, y el oligonucleótido específico para las diferentes regiones 3' contenidos en la tabla de oligonucleótidos de materiales y métodos.

Los productos de PCR Dp40, Dp40/COOHd, Dp40/COOHf, Dp40L93-170, Dp40L93-170-COOHd, Dp40L93-170-COOHf, Dp40L93-170-COOHe y Dp40L93-170-COOH (NES p.352-363) se corrieron en un gel de agarosa para visualizar la calidad y el tamaño de los fragmentos esperados. Una vez corroborado lo anterior, las bandas

correspondientes a cada producto, fueron cortadas para ser purificadas mediante electroelución. **Figura 8.**

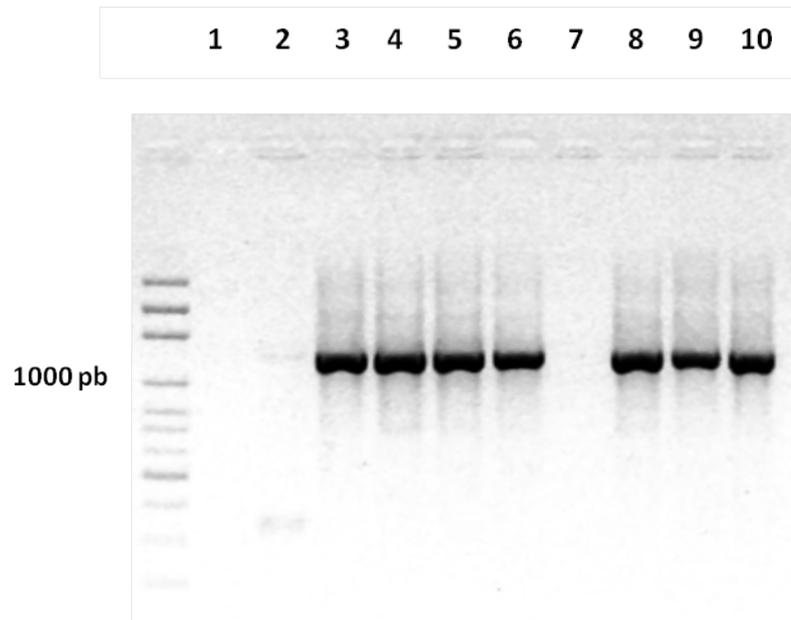


**Figura 8. Obtención de los productos de extensión por PCR**

Ejemplo de la electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de extensión Dp40L93-170P/COOHf (carril 3). Se observa el tamaño esperado de alrededor de 1000 pares de bases. Así mismo, se observa el gel recortado de los carriles 6 al 9, los cuales contienen el mismo producto pero en mayor cantidad, para seguir el proceso de electroelución y posteriormente clonar los fragmentos en el plásmido pcDNA4/HisMax-TOPO-TA. El marcador de peso molecular utilizado es 100bp ladder DNA (100bp-3000bp) de la marca Axygen. El peso molecular en donde se encuentra la proteína de interés es 1000 pares de bases.

Los productos purificados por electroelución se adenilaron y ligaron al vector de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO-TA de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los vectores circularizados pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHd, pcDNA4 /HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHf, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOHd, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOHf, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOHe y pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOH (NES p.352-363) recombinantes se utilizaron para transformar células competentes *E.*

*coli* DH5 $\alpha$ . Las bacterias fueron sembradas en placas con medio LB con ampicilina. Se seleccionaron algunas colonias y éstas fueron analizadas por PCR de colonia para ver si contenían el inserto de interés en fase, tal como se representa en **la figura 9**.



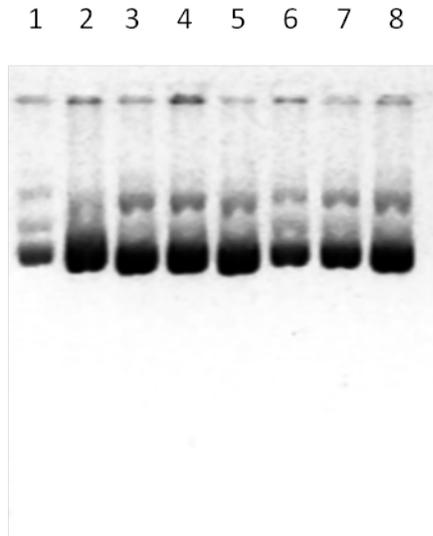
**Figura 9. Productos de PCR a partir de colonias transfectadas**

Electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de PCR de aproximadamente 40 kDa obtenido de colonias *E.coli* transfectadas con el vector Dp40/COOHab utilizando los oligonucleótidos “exón 1” y “BGH (TOPO R)”. Carril 1 control negativo. Carriles 2 al 10 diferentes colonias candidatas. Se indica el tamaño del marcador de peso molecular.

De las colonias analizadas se seleccionaron dos que contuvieran el inserto de interés, se hicieron crecer en medio líquido LB con ampicilina y se purificaron mediante el protocolo de “minipreps”. Posteriormente se cargaron y se corrieron en un gel de agarosa al 1% para comprobar su pureza e integridad., **Figura 10**.

Se obtuvieron por este procedimiento los plásmidos pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHd, pcDNA4 /HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHf, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOHd, pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOHf,

pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOHe y pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40L93-170-COOH (NES p.352-363).



**Figura 10. Producto plasmídico purificado por el método “minipreps”**

Ejemplo de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos candidatos purificados para el proceso de secuenciación. Carriles del 1 al 8 muestran los siguientes plásmidos: carril 1. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/Dp40/COOHd “colonia 7”, carril 2. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40/COOHd “colonia 12”, carril 3. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40L170P /COOHd “colonia 7”, carril 4. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40L170P /COOHd “colonia 12”, carril 5. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40L93-170P /COOHd “colonia 3”, carril 6. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40L93-170P /COOHd “colonia 7”, carril 7. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40/COOHf “colonia 3” y carril 8. pcDNA4/ HisMax TOPO-TA/ Dp40/COOHf “colonia 7”.

Algunos de los vectores purificados se secuenciaron completamente mediante electroforesis capilar. Los electroferogramas de estas secuenciaciones fueron revisados y las secuencias fueron alineadas con las secuencia Dp40 para verificar la adición correcta de los diferentes extremos carboxilo terminal como se muestra en la **Figura 11**. Como se puede observar, las secuenciaciones muestran que las construcciones fueron correctamente clonadas y sin errores, observándose la primera parte del vector de expresión pcDNA4/HisMax-TOPO-TA, la secuencia de la Dp40, o la Dp40L93-170P (según sea el caso), los diferentes extremos carboxilo añadidos (d,f e, NES (p.352-363) y la última parte del mismo vector de expresión.

## Dp40/COOHd

Dp4wta	GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA
WaB	GGGCCATAAAATGCACTACCCCATGGTAGAGTACTGCACTCCGACTACATCTGGAGAAGA *****
Dp4wta	TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTCGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA
WaB	TGTTTCGTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAATTCGAACCAAAGGTATTTTGCAGAA *****
Dp4wta	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC
WaB	GCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAAC *****
Dp4wta	GTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAG-----
WaB	G-----AGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGAGGGCCT * *****
Dp4wta	-----
WaB	GTACCTAGGATCCAGTGTGGTGGAAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGCGCGCCGCTCGA

## Dp40/COOHab

WabB	CG-----CACAATGTAGGAAGCCTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGG
Waboriginal	CGAGAGGACACAATGTAGGAAGCCTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGG ** *****
WabB	AGTCCTTAGTTTCAGTCATGATAGATGAAGAAGGAGCAGAATAGAGGGCCTGTACCTAG
WabOriginal	AGTCCTTAGTTTCAGTCATGATAGATGAAGAAGGAGCAGAATAA----- *****

## Dp40L93-170P/COOHa

Dp40aoriginal	AGCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAA
M3aB	AGCATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAACATGGAAA *****
Dp40aoriginal	CGTCAAGAGGAAGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAG-----
M3aB	CG-----AGAAATGCCCTGGAAAGCCAATGAGAGAGGACACAATGTAGAGGGCC ** *****
Dp40aoriginal	-----
M3aB	TGTACCTAGGATCCAGTGTGGTGGAAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGCGCGCCGCTCG

## Mutación puntual en el sitio 278, aminoácido 93

M3aE	TGCAGATAATTAAGTGTGACTACTATTTATGACCGTCTGGA-----
Dp40wt	TGCAGATAATTAAGTGTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACACAATT *****

## Mutación puntual sitio 509, aminoácido 170

Dp40aoriginal	GGCTTTTGTGACC-AGCGTAGACTGGGTCTTCTTCGCATGATTCATTCAAATCCCAAG
M3abV	GGCTTTTGTGACC-AGCGTAGACTGGGTCTTCTTCGCATGATTCATTCAAATCCCAAG *****

### Dp40L93-170P/COOHab

M3abB	CG-----	CACAATGTAGGAAGCCTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGG
Waboriginal	CGAGAGGACACAATGTAGGAAGCCTTTCCACATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGG	
	**	*****
M3abB		AGTCCTTAGTTTCAGTCATGATAGATGAAGAAGGAGCAGAATAG
WabOriginal	AGTCCTTAGTTTCAGTCATGATAGATGAAGAAGGAGCAGAATAA	AAGGGCCTGTACCTAG
		*****

### Mutación puntual en el sitio 278, aminoácido 93

M3abL	GGATATCCTGCAGATAATTAAGTGTGGACTACTATTTATGACCGTC	GGAGCAAGAGCA
Dp40aoriginal	GGATATCCTGCAGATAATTAAGTGTGGACTACTATTTATGACCGTC	GGAGCAAGAGCA
		*****

### Mutación puntual sitio 509, aminoácido 170

M3abV	GGCTTTTGTGACC-AGCGTAGACTGGGTCTTCTTC	GCATGATTCTATTCAAATCCCAAG
Dp40aoriginal	GGCTTTTGTGACC-AGCGTAGACTGGGTCTTCTTC	GCATGATTCTATTCAAATCCCAAG
		*****

### Dp40L93-170P/COOHe

Dp40e	CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGACAAACATGGAACG	
M3e1B	CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTAGAGGGGGACAAACATGGAACG	
		*****
Dp40e	TCAAGAGATCTATCTGCCTCTTCTCTCTCTATTATTAA	
M3e1B	-----	GATCTATCTGCCTCTTCTCTCTCTATTATTAA
		AAGGGCCTGTACCTAGGATCC
		*****

### Mutación puntual en el sitio 278, aminoácido 93

Dp40e	ATCTCTTGAGCCTGTTCAGCTGCATGTGACGCCTTGACCAGCACAACTCAAGCAAATG	
1L	ATCTCTTGAGCCTGTTCAGCTGCATGTGACGCCTTGACCAGCACAACTCAAGCAAATG	
		*****
Dp40e	ATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAAGTGTGGACTACTATTTATGACCGTCTGG	
1L	ATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAAGTGTGGACTACTATTTATGACCGTCTGG	GG
		*****

### Mutación puntual sitio 509, aminoácido 170

Dp40e	GTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTC	GCATGATTCTATTCAA
1V5	GTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGACTGGGTCTTCTTC	GCATGATTCTATTCAA
		*****
Dp40e	TCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCCTCTTTGGGGCAGTAAACATGAGCCGAGTGTC	
1V5	TCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCCTCTTTGGGGCAGTAAACATGAGCCGAGTGTC	
		*****

**Dp40L93-170P/NES p. 352-363)**

Dp40NES 6B	CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAAACATGGAAACG CATCCCCGAATGGGCTACCTTCCAGTGCAGACTGTGTTAGAGGGGGACAAACATGGAAACG *****
Dp40NES 6B	ATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCTTA----- ATGGCAGATGATTTGGGCAGAGCGATGGAGTCCTTAGAGGGCCGTGACCTAGGATCC *****

**Mutación puntual en el sitio 278, aminoácido 93**

Dp40nes 6L	TGCAGATAATTAAC TGTTTGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAAACAATT TGCAGATAATTAAC TGTTTGACTACTATTTATGACCGTCCGGAGCAAGAGCACAAACAATT *****
---------------	---

**Mutación puntual sitio 509, aminoácido 170**

Dp40nes 6V5	GGGTCTTCTTCTGCATGATTCATTTCAAATCCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTT GGGTCTTCTTCTGCATGATTCATTTCAAATCCCAAGACAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTT *****
Dp40nes 6V5	TGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTCAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAATAAACC TGGGGCAGTAACATTGAGCCGAGTGTCAGGAGCTGTTTCCAGTTTGCCAATAATAAACC *****

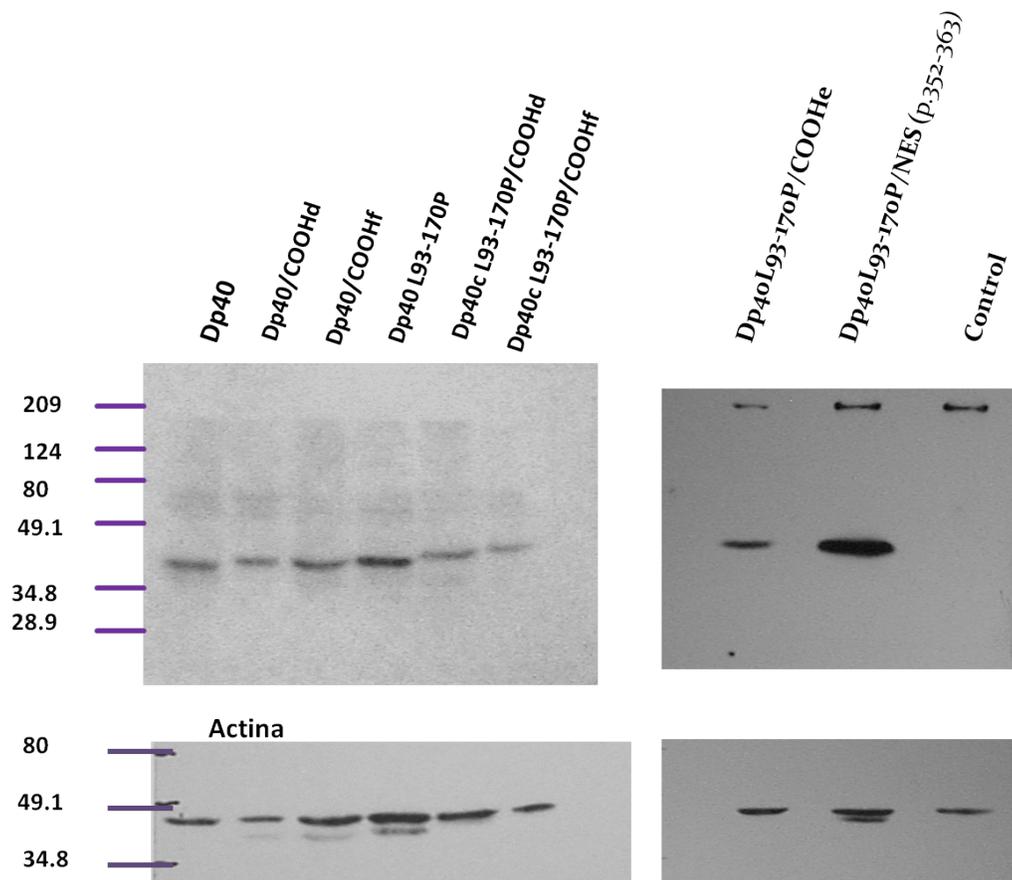
**Figura 11. Alineamiento de las diferentes secuencias**

Secuenciación de las diferentes construcciones. Se muestra el alineamiento de los diferentes fragmentos que corresponden a los diferentes extremos carboxilo añadidos, así como a las mutaciones puntuales añadidas en Dp40L93-170P. En amarillo se muestra el extremo carboxilo terminal añadido, subrayado en verde se encuentran las mutaciones puntuales y encerrado en un rectángulo verde se encuentra el inicio de la secuencia del vector. El símbolo \* indica los lugares donde existe homología entre las pares de bases. El nombre del plásmido analizado se encuentra en la parte superior izquierda y en la parte inferior izquierda se presentan los diferentes oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de las diferentes regiones.

Una vez que se obtuvieron los resultados de las secuenciaciones y se comprobaba que no había ningún error, se procedió con los ensayos de Western Blot e Inmunofluorescencias para determinar la expresión y distribución de las proteínas recombinantes.

Expresión de las proteínas recombinantes: XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363).

Con el objeto de determinar que las proteínas de interés se expresaban a partir de los plásmidos construidos, se llevaron a cabo ensayos de Western Blot con los extractos de las células transfectadas con las diferentes construcciones.



**Figura 12.** Western Blot de las células transfectadas con las construcciones Dp40/COOHd, Dp40/COOHf, Dp40L93-170, Dp40L93-170-COOHd, Dp40L93-170-COOHf, Dp40L93-170-COOHe y Dp40L93-170-COOH (NES p.352-363). Se utilizó anti-Xpress como anticuerpo primario y el anticuerpo anti-mouse como anticuerpo secundario, ambos de la marca invitrogen. El marcador de peso molecular utilizado es el 161-0318 EDU de la marca Bio-Rad. Se observa el tamaño de banda esperado

de las proteínas recombinantes entre 40 y 43 kDa. Actina se muestra en un peso de 42 kDa aproximadamente.

[Distribución celular de las proteínas XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH \(NES p.352-363\) recombinantes.](#)

A continuación se muestran las imágenes de los diferentes ensayos de inmunofluorescencia indirecta, las cuales fueron analizadas y obtenidas como se indica en materiales y métodos, **Figura 13**.

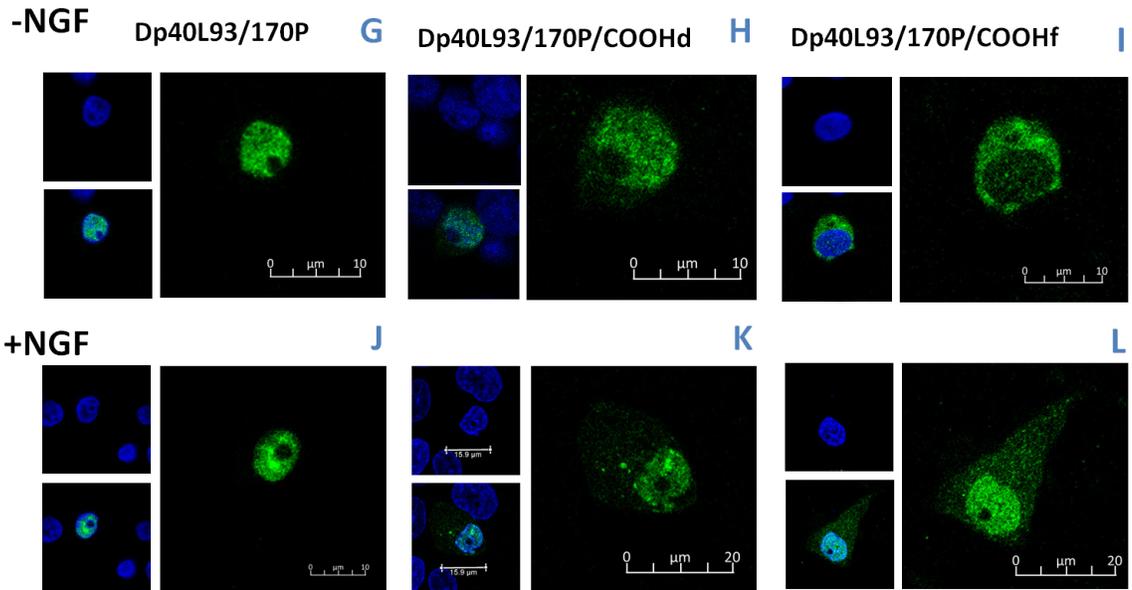
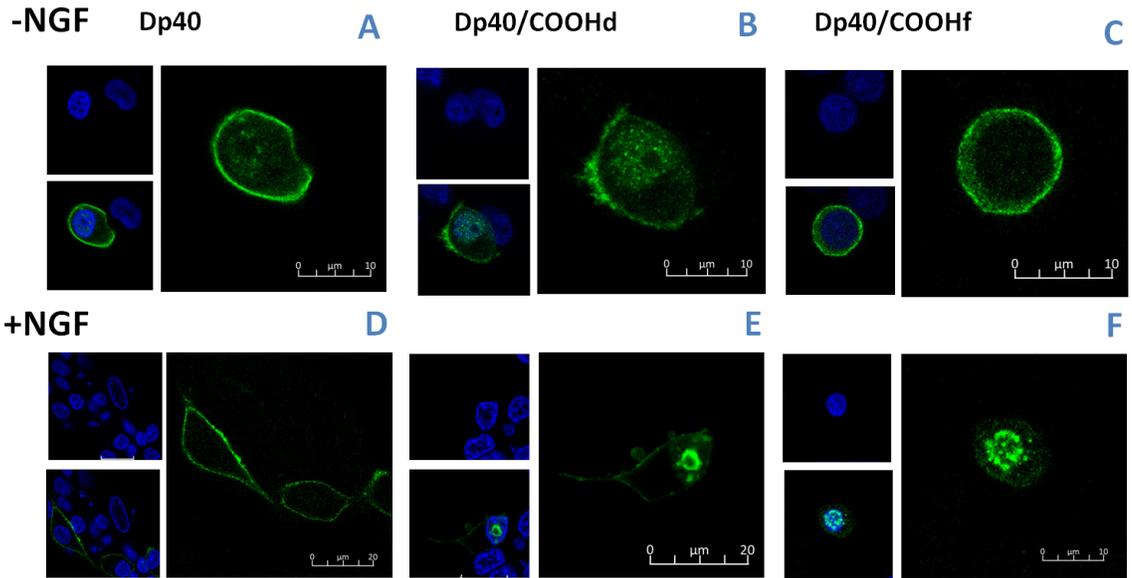
Se observan diferentes comportamientos de las proteínas dependiendo de a) la proteína recombinante que contiene el plásmido, b) si se encuentran o no en presencia de NGF.

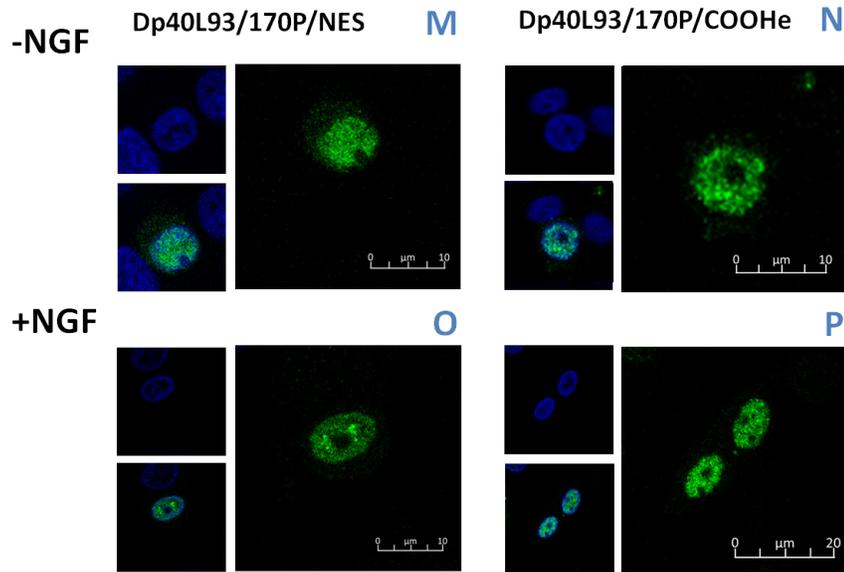
En la **figura 13-A** se encuentra la imagen representativa de la construcción que contiene a la Dp40, la cual en ausencia de NGF presentó una localización principalmente en la periferia celular con una distribución ligera en núcleo. Sin embargo, una vez que se puso en contacto con NGF (**Figura 13-D**) se obtuvieron dos tipos de poblaciones celulares: una población que no desarrolló neuritas cuya proteína se encontró en núcleo de manera predominante y en la periferia celular; la segunda población sí desarrolló neuritas al ponerse en contacto con el NGF, dicha población no presentó en ningún caso la localización de la proteína en el núcleo, siendo su localización predominante en periferia celular.

La siguiente construcción que se observa es Dp40/COOHd (**figura 13-B**) la cual en ausencia de NGF se presentó en la periferia celular de manera predominante, al igual que en núcleo, observándose también un poco en citoplasma, por tanto, observamos una distribución más o menos homogénea en toda la célula. Cuando éstas células se ponen en contacto con NGF, se observó un comportamiento particular ya que nuevamente se observaron dos tipos de poblaciones, la población que no desarrolló neuritas presentó altos niveles de la proteína en núcleo y en menor grado en periferia (al igual que la Dp40), sin embargo, se observó una acumulación en nucléolo, lo cual no se observó con la Dp40 silvestre; la segunda

población, la cual desarrolló neuritas, se encontró en la periferia celular observándose de manera muy escasa en núcleo (**figura 13-E**). La construcción que se analizó a continuación fue Dp40/COOHf, la cual en ausencia de NGF presentó, en todos los casos, localización en citoplasma y periferia celular (**figura 13-C**), sin embargo, al encontrarse en presencia de NGF nuevamente se observaron dos poblaciones, en la primera (en ausencia de neuritas) se presenta una localización principalmente nuclear, en forma de cúmulos en el nucleoplasma (no así en el nucléolo); la segunda población que posee neuritas, se localiza en la periferia casi en su totalidad (**Figura 13-F**). Cabe resaltar que todas las construcciones anteriormente mencionadas presentaron dos poblaciones en presencia de NGF, de las cuales, la población que desarrolló neuritas, en todos los casos, presentó a la proteína recombinante manera casi absoluta en periferia celular.

El siguiente bloque de proteínas recombinantes está compuesto por la XpressDp40L93-170P unida a los diferentes extremos carboxilo. En relación a la localización de XpressDp40L93-170P, ésta presentó una localización predominantemente nuclear en ausencia (**figura 13-G**) como en presencia de NGF (**Figura 13-J**). La siguiente construcción Dp40L93-170P/COOHd (**Figura 13-H**), la cual, al igual que XpressDp40L93-170P, presentó una localización nuclear con NGF y sin NGF (**Figura 13-K**). Sin embargo, la proteína recombinante XpressDp40L93-170P/COOHf presentó dos poblaciones en ausencia de NGF (**Figura 13-I**): un porcentaje menor de la población presenta a la proteína localizada parcialmente en el citoplasma con prevalencia en núcleo, la segunda parte de la población, la cual es más numerosa, presenta prácticamente toda la proteína recombinante en citoplasma; en cambio, en contacto con NGF, la población es principalmente nuclear sin formar cúmulos de ningún tipo (**Figura 13-L**). Las últimas dos construcciones (Dp40L93-170P/COOHe y Dp40L93-170P/(NES p.352-363)), en ausencia y presencia de NGF, mostraron una localización principalmente nuclear (**Figuras 13-M/O y Figuras 13- N/P respectivamente**).





**Figura 13. Distribución celular de las construcciones de Dp40 y Dp40L93-170P en ausencia y presencia de NGF.**

Se muestran los diferentes ensayos de inmunofluorecencia realizados de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Se muestra en los recuadros superiores izquierdos de cada imagen los núcleos teñidos de azul con DAPI. En la parte derecha, en el recuadro más grande, se muestra en verde la localización subcelular de las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363) conteniendo la bandera xpress. Por último se observa la sobreposición de ambas imágenes en el recuadro inferior izquierdo. Se muestra un corte ecuatorial de las células de aproximadamente  $3.7\mu\text{m}$ . La barra corresponde a  $20\mu\text{m}$ . Las células que se observan sólo representan a una muestra representativa de las células observadas en dos experimentos independientes.

Análisis estadístico de la distribución celular de las proteínas XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363) recombinantes.

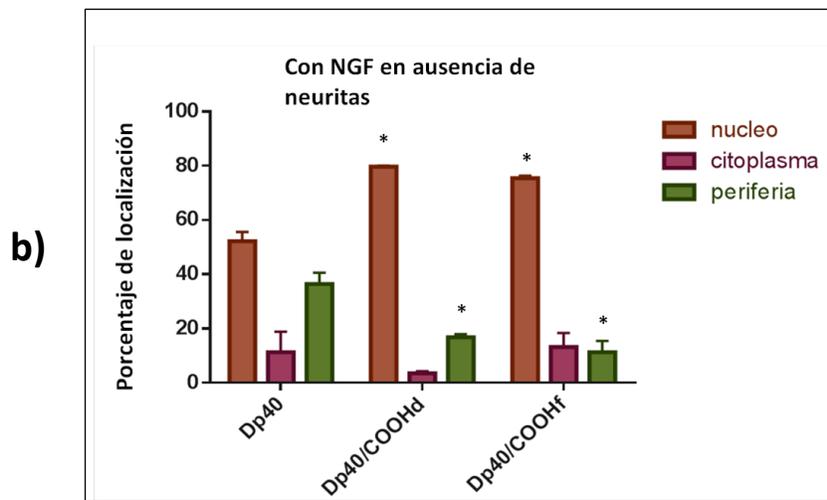
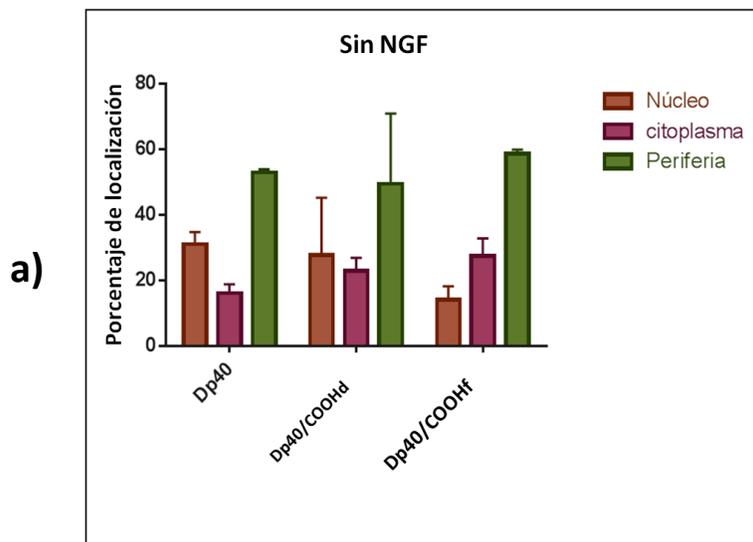
Se presenta a continuación el análisis estadístico de la distribución subcelular de las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf, XpressDp40L93-170, XpressDp40L93-170-COOHd, XpressDp40L93-170-COOHf, XpressDp40L93-170-COOHe y XpressDp40L93-170-COOH (NES p.352-363) que se realizó, utilizando los resultados de los diferentes ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

Para llevar a cabo el análisis de datos, se utilizó la Anova de dos vías, ya que se pretendía evaluar dos condiciones: 1) cómo influían los diferentes extremos carboxilo terminales en la localización de Dp40 y Dp40L93-170P y 2) si la exposición a NGF durante tres días tendría algún efecto.

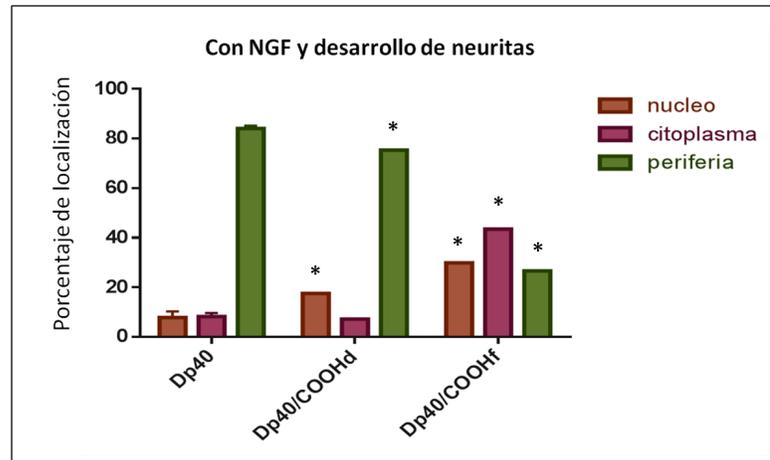
Por tanto, se comparó la localización subcelular de las diferentes proteínas recombinantes, con los controles respectivos en ausencia y presencia de NGF, quedando el análisis de la siguiente manera:

La proteína Dp40 se comparó en ausencia de NGF con las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd y XpressDp40/COOHf (**Figura 14-a**), dando lugar a una localización subcelular similar entre ellas, por tanto, no hubo diferencia significativa en la localización. Así mismo, las células transfectadas que expresaron el mismo grupo de proteínas (Dp40, Dp40/COOHd, Dp40/COOHf), se trataron 3 días con NGF, dando lugar, tal como ya se mencionó antes, a dos tipos de poblaciones, uno sin neuritas y otro con neuritas. A cada una de estas poblaciones se le hizo el mismo análisis estadístico obteniéndose los datos siguientes: En la población que no desarrolló neuritas se encontró que Dp40/COOHd aumenta su localización en núcleo de manera significativa en comparación a su control Dp40, el mismo fenómeno es observado para la isoforma Dp40/COOHf, así mismo, también se observó que la localización subcelular de Dp40/COOHd como de Dp40/COOHf disminuyó de manera significativa en periferia en comparación al control Dp40. (**Figura 14-b**).

En las poblaciones de las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd y XpressDp40/COOHf que sí desarrollaron neuritas, el perfil estadístico mostró que Dp40/COOHd y Dp40/COOHf tuvieron un aumento significativo en su localización nuclear con respecto al control Dp40, así mismo, Dp40/COOHf presentó un aumento en su localización citoplasmática respecto al control, siendo también apreciable una considerable disminución en la localización periférica de las isoformas Dp40/COOHd y Dp/COOHf (Figura 14-c).



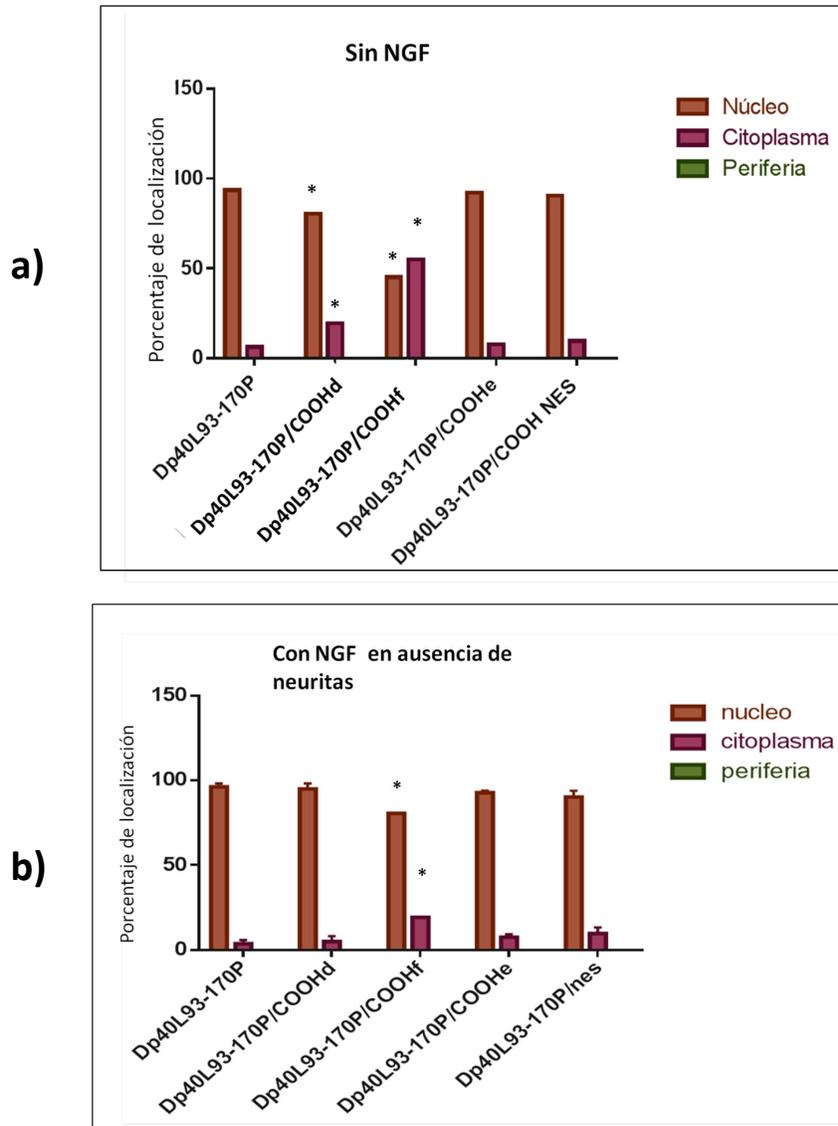
c)



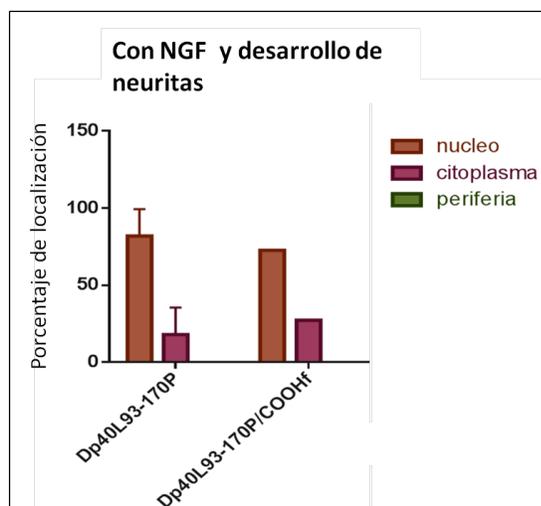
**Figura 14. Análisis estadístico de la distribución de las proteínas recombinantes XpressDp40, XpressDp40/COOHd y XpressDp40/COOHf** Representación del porcentaje de localización que tuvieron las proteínas Dp40, Dp40/COOHd Y Dp40/COOHf: a) en ausencia de NGF. b) en presencia de NGF y sin desarrollo de neuritas y c) en presencia de NGF y con desarrollo neurítico. El \* denota diferencia significativa respecto al control (Dp40) en al menos un valor de  $P < 0.05$ .

El siguiente bloque estuvo compuesto por el control XpressDp40L93-170P y las proteínas recombinantes XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHe y XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363). De igual manera se analizaron en las mismas tres condiciones anteriores: sin NGF, con NGF pero sin el desarrollo de neuritas y con NGF con el respectivo desarrollo neurítico. En la primera condición (**Figura 15-a**) se puede observar que tanto la proteína recombinante XpressDp40L93-170P/COOHd como XpressDp40L93-170P/COOHf modificaron la localización subcelular de la proteína control Dp40L93-170P tanto en núcleo como en citoplasma, siendo mucho más evidente con la isoforma XpressDp40L93-170P/COOHf, ya que se aprecia un aumento significativo de la localización en el citoplasma y una disminución importante en núcleo. En la siguiente condición, que corresponde a la exposición de las diferentes proteínas a NGF pero sin que éste lograra influir en el desarrollo neurítico, se pudo apreciar que solamente la proteína recombinante XpressDp40L93-170P/COOHf pareció tener una influencia en la localización nuclear y citoplasmática del control XpressDp40L93-170P, ya que se observa una ligera disminución en núcleo y un aumento relativo en

citoplasma (**Figura 15-b**). Por último, en la condición final, solamente se lograron encontrar dos grupos de células que desarrollaron neuritas, aquellas que contenían a la proteína XpressDp40L93-170P y a la XpressDp40L93-170P/COOHf, sin embargo, ninguno de estos influyó de manera significativa en la localización de XpressDp40L93-170P (**Figura 15-c**).



c)



**Figura 15. Análisis estadístico de la distribución de las proteínas recombinantes XpressDp40L93-170P, XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHe y XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363).** Porcentaje de localización de las diferentes proteínas recombinantes XpressDp40L93-170P, XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHe y XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363). a) en ausencia de NGF. b) en presencia de NGF y sin desarrollo de neuritas. c) en presencia de NGF y con desarrollo de neuritas, sólo XpressDp40L93-170P/COOHf presentó desarrollo neurítico. El \* denota diferencia significativa respecto al control (Dp40L93-170P) en al menos un valor de  $P < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

La proteína Dp71, como ya se ha mencionado antes, se expresa en una amplia variedad de tejidos no-musculares, corresponde al producto del gen DMD que se expresa con los niveles más altos en el sistema nervioso (Blake et al., 1992). El transcrito de Dp71 puede sufrir diversos procesamientos alternativos que dan lugar a diferentes grupos dependiendo del extremo carboxilo terminal que posean. Los grupos son Dp71d, Dp71f, Dp71e y Dp40. El grupo Dp71d se caracteriza, por conservar el exón 78 que da lugar a un extremo carboxilo terminal de 13 aminoácidos de carácter hidrofílico. En células PC12 la Dp71d se encuentra distribuida en núcleo y citoplasma (Marquez et al., 2003), sin embargo, se acumula en núcleo durante las etapas tardías de la diferenciación con NGF, posiblemente por ser mediador de respuestas nucleares durante la señalización con NGF (Calderilla-Barbosa et al., 2006; Marquez et al., 2003). Se ha propuesto que este cambio de localización inducido por NGF se deba a la fosforilación de la proteína Dp71d, en el exón 79, por la proteína-kinasa II dependiente de  $Ca^{+2}$ /calmodulina (Calderilla-Barbosa et al., 2006). Adicionalmente, se ha sugerido que Dp71d puede moverse entre el núcleo y el citoplasma gracias a los transportadores nucleares convencionales: importina alfa/ $\beta$  y la exportina CRM1, dichos transportadores se guían por una NLS (Señal de localización nuclear) localizada en el dominio ZZ (Suarez-Sanchez et al., 2014).

El grupo Dp71f posee una localización principalmente citoplasmática con una proporción muy baja de proteína nuclear, (Marquez et al., 2003), pero al estimular la diferenciación con NGF, cambia su localización del citoplasma a la periferia celular (procesos neuríticos). Tomando dichos antecedentes, se sugiere que la localización subcelular de las distintas isoformas de Dp71 es modulada por el extremo carboxilo terminal de cada grupo.

Sin embargo, los diferentes extremos carboxilo terminales de cada grupo no son los únicos involucrados en la localización diferencial de las diferentes isoformas de Dp71. Existe otra isoforma de Dp71: la proteína Dp40, la cual abarca los exones 63 al

70 que comparte con Dp71(Aragon et al., 2015). En células PC12 sin diferenciar, la proteína Dp40 posee una localización en periferia/citoplasma, sin embargo, al estimular la diferenciación con NGF, una pequeña cantidad de esta proteína se localiza en núcleo. Existe una mutante de la proteína Dp40, la cual tiene un cambio de Leucina por Prolina en las posiciones 93 y 170, dichas mutaciones se encuentran en los dominios “EF-hands” y le confieren un cambio de localización subcelular, dicha mutante se encuentra localizada principalmente en núcleo. Estos resultados sugieren que los dominios “EF-hands” están involucrados en la distribución diferencial de la distrofina Dp40 (Aragon et al., 2015), y por consecuencia, de Dp71.

En este trabajo se llevó a cabo la construcción de vectores que contuvieran las proteínas recombinantes Xpress/Dp40/COOHd, Xpress/Dp40/COOHf, Xpress/Dp40L93-170P/COOHd, Xpress/Dp40L93-170P/COOHf, Xpress/Dp40L93-170P/COOHe, Xpress/Dp40L93-170P/(NES p.352-363), para así poder evaluar el efecto que tiene el extremo carboxilo terminal en la localización subcelular de Dp40 y Dp40L93-170P en dos condiciones diferentes: en presencia y ausencia de NGF.

En ausencia de NGF se puede apreciar que las células que contienen a las construcciones XpressDp40, XpressDp40/COOHd y XpressDp40/COOHf, es decir, las construcciones que contienen a Dp40 silvestre, se localizaron de manera preferencial en la periferia celular y un poco en citoplasma y núcleo, esto corrobora lo que ya se tenía reportado en la literatura (Aragon et al., 2015; Calderilla-Barbosa et al., 2006; Marquez et al., 2003), dicha localización podría deberse a que Dp40 posee la región de unión a  $\beta$ -dístroglicano (Tadayoni et al., 2012; Tozawa et al., 2012), por tanto, estaría unida a la periferia celular. Por otro lado, su localización en núcleo podría tener las siguientes explicaciones: a) que Dp40 con los diferentes extremos carboxilo migre al núcleo junto con  $\beta$ -dístroglicano bajo ciertas condiciones (Lara-Chacon et al., 2010; Vasquez-Limeta et al., 2014), b) que debido a un cambio conformacional no interaccione con  $\beta$  dístroglicano y/o actina y migre al núcleo utilizando un sitio putativo de importe nuclear (Suarez-Sanchez et al., 2014).

Por otro lado, al estimularse la diferenciación con NGF, se observaron cambios de localización en cada una de estas construcciones, obteniéndose dos tipos de poblaciones: una población con neuritas y otra que no las desarrolló. En las poblaciones que no presentaron neuritas, la XpressDp40 silvestre, XpressDp40/COOHd y XpressDp40/COOHf presentaron una localización excepcionalmente alta en núcleo y periferia, sin embargo, XpressDp40/COOHd presentó un fenómeno adicional, ya que la abundancia relativa de la proteína en núcleo se encontraba además en los nucléolos, situación que no se presentó en ninguna otra construcción. Se ha reportado a Dp71d en el nucléolo y en nucleoplasma (Rodriguez-Munoz et al., 2008), tal vez esta proteína esté involucrada en la estabilidad de dicha estructura en cooperación con  $\beta$  distroglicano, durante el proceso de diferenciación (Martinez-Vieyra et al., 2013). Sin embargo, XpressDp40/COOHf mostró un comportamiento inesperado, ya que la población sin desarrollo neurítico (en presencia de NGF) presentó una localización en forma de cúmulos en el nucleoplasma y lo que parece ser retículo endoplásmico, pero no en nucléolo, una posible explicación podría ser que normalmente la Dp71f viaja al núcleo y ahí interacciona con  $\beta$  distroglicano (Rodriguez-Munoz et al., 2008), pero su estadía en éste podría ser pasajera regresando al citoplasma por medio de señales de exporte nuclear, sin embargo, debe considerarse que en esta construcción se eliminó la señal putativa de exporte nuclear localizada en el exón 75 (Suarez-Sanchez et al., 2014), tal vez el extremo carboxilo terminal de esta isoforma no sea capaz de sacar a la proteína del núcleo bajo el estímulo de NGF. La segunda población, que desarrolló neuritas, presentó a XpressDp40 silvestre, XpressDp40/COOHd y XpressDp40/COOHf en la periferia celular en todos los casos, lo cual tiene sentido, debido a que Dp71d está involucrada en el crecimiento neurítico, su sobre-expresión aumenta la extensión de las neuritas (Rodriguez-Munoz et al., 2008) y Dp71f modula la adhesión de las células PC12 al interactuar con el complejo de proteínas asociado a distrofina.

El segundo grupo analizado está conformado por las proteínas recombinantes XpressDp40L93-170P, XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHf, XpressDp40L93-170P/COOHe y XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363) las cuales también se sometieron a condiciones de ausencia y presencia de NGF. De este grupo, las proteínas XpressDp40L93-170P, XpressDp40L93-170P/COOHd, XpressDp40L93-170P/COOHe y XpressDp40L93-170P/(NES p.352-363) no presentaron cambios en la localización ni en ausencia ni en presencia del estímulo con NGF, posicionándose siempre en el núcleo de la célula. La proteína XpressDp40L93-170P/COOHf presentó dos poblaciones en ausencia de NGF: en la primera población se observa a la proteína parcialmente en citoplasma y en la segunda prácticamente se encontró únicamente en citoplasma. Después del estímulo con NGF su localización cambio a núcleo pero sin formar ningún tipo de cúmulos, (como se presentó con la proteína recombinante XpressDp40/COOHf) esto posiblemente se deba a que la proteína recombinante XpressDp40L93-170P/COOHf posee mutaciones en los sitios "EF-Hands" que pudieran estar impidiendo la correcta unión con  $\beta$  distroglicano (Rentschler et al., 1999) y no le permitan localizarse en la periferia celular, periferia nuclear, nucléolos ni al nucleoplasma, por tanto, no posee una localización específica en núcleo.

## CONCLUSIONES

El extremo carboxilo terminal de los diferentes grupos de isoformas de Dp71 tiene una participación importante en definir la localización subcelular que tienen dichas isoformas en base a las evidencias siguientes:

El extremo carboxilo terminal del grupo d fue suficiente para re localizar a la proteína XpressDp40 silvestre de la periferia celular al núcleo y a los nucléolos bajo el estímulo de NGF.

El extremo carboxilo terminal del grupo f por sí mismo fue capaz de cambiar la localización de la proteína XpressDp40L93-170P (nuclear) al citoplasma en ausencia de NGF. Sin embargo, la señal de exporte nuclear putativa del extremo carboxilo del grupo f (MADDLGRAMESL), no es suficiente para lograr cambiar la localización de XpressDp40L93-170P del núcleo al citoplasma ni en ausencia ni en presencia de NGF. El proceso de diferenciación influye sobre la localización de las proteínas recombinantes XpressDp40/COOHd, XpressDp40/COOHf y XpressDp40L93-170P/COOHf analizadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.E., Butler, M.H., Dwyer, T.M., Peters, M.F., Murnane, A.A., and Froehner, S.C. (1993). Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* *11*, 531-540.
- Ahn, A.H., Freener, C.A., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E., and Kunkel, L.M. (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *The Journal of biological chemistry* *271*, 2724-2730.
- Ahn, A.H., Yoshida, M., Anderson, M.S., Feener, C.A., Selig, S., Hagiwara, Y., Ozawa, E., and Kunkel, L.M. (1994). Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 4446-4450.
- Alderton, J.M., and Steinhardt, R.A. (2000). Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *The Journal of biological chemistry* *275*, 9452-9460.
- Aleman, V., Osorio, B., Chavez, O., Rendon, A., Mornet, D., and Martinez, D. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochemistry and cell biology* *115*, 243-254.
- Anderson, J.T., Rogers, R.P., and Jarrett, H.W. (1996). Ca<sup>2+</sup>-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *The Journal of biological chemistry* *271*, 6605-6610.
- Aragon, J., Martinez-Herrera, A., Bermudez-Cruz, R.M., Bazan, M.L., Soid-Raggi, G., Ceja, V., Coy-Arechavaleta, A.S., Aleman, V., Depardon, F., and Montanez, C. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neuroscience letters* *600*, 115-120.
- Austin, R.C., Morris, G.E., Howard, P.L., Klamut, H.J., and Ray, P.N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscular disorders : NMD* *10*, 187-193.
- Barresi, R., Moore, S.A., Stolle, C.A., Mendell, J.R., and Campbell, K.P. (2000). Expression of gamma -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *The Journal of biological chemistry* *275*, 38554-38560.
- Becker, P.E., and Kiener, F. (1955). [A new x-chromosomal muscular dystrophy]. *Archiv fur Psychiatrie und Nervenkrankheiten, vereinigt mit Zeitschrift fur die gesamte Neurologie und Psychiatrie* *193*, 427-448.
- Beggs, A.H., Koenig, M., Boyce, F.M., and Kunkel, L.M. (1990). Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Human genetics* *86*, 45-48.
- Berchtold, M.W., Brinkmeier, H., and Muntener, M. (2000). Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiological reviews* *80*, 1215-1265.
- Bies, R.D., Phelps, S.F., Cortez, M.D., Roberts, R., Caskey, C.T., and Chamberlain, J.S. (1992). Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic acids research* *20*, 1725-1731.
- Blake, D.J., Hawkes, R., Benson, M.A., and Beesley, P.W. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *The Journal of cell biology* *147*, 645-658.
- Blake, D.J., Love, D.R., Tinsley, J., Morris, G.E., Turley, H., Gatter, K., Dickson, G., Edwards, Y.H., and Davies, K.E. (1992). Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Human molecular genetics* *1*, 103-109.

Blake, D.J., Tinsley, J.M., Davies, K.E., Knight, A.E., Winder, S.J., and Kendrick-Jones, J. (1995). Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends in biochemical sciences* *20*, 133-135.

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews* *82*, 291-329.

Boyce, F.M., Beggs, A.H., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 1276-1280.

Boyd, Y., and Buckle, V.J. (1986). Cytogenetic heterogeneity of translocations associated with Duchenne muscular dystrophy. *Clinical genetics* *29*, 108-115.

Byers, T.J., Lidov, H.G., and Kunkel, L.M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nature genetics* *4*, 77-81.

Calderilla-Barbosa, L., Ortega, A., and Cisneros, B. (2006). Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells. *Journal of neurochemistry* *98*, 713-722.

Crosbie, R.H., Heighway, J., Venzke, D.P., Lee, J.C., and Campbell, K.P. (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *The Journal of biological chemistry* *272*, 31221-31224.

Chelly, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kaplan, J.C., Kahn, A., and Berwald-Netter, Y. (1990). Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature* *344*, 64-65.

Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., Grosche, J., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., *et al.* (2003). Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Human molecular genetics* *12*, 1543-1554.

Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., Cossee, M., Deburgrave, N., Saillour, Y., Tuffery, S., *et al.* (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human molecular genetics* *18*, 3779-3794.

Disatnik, M.H., Dhawan, J., Yu, Y., Beal, M.F., Whirl, M.M., Franco, A.A., and Rando, T.A. (1998). Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *Journal of the neurological sciences* *161*, 77-84.

Duncan, C.J. (1978). Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic condition. *Experientia* *34*, 1531-1535.

Emery, A.E. (1977). Muscle histology and creatine kinase levels in the foetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* *266*, 472-473.

Emery, A.E.H. (1993). *Duchenne muscular dystrophy*, 2nd edn (Oxford ; New York: Oxford University Press).

Feener, C.A., Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* *338*, 509-511.

Gerdin, M.J., and Eiden, L.E. (2007). Regulation of PC12 cell differentiation by cAMP signaling to ERK independent of PKA: do all the connections add up? *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* *2007*, pe15.

Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S.L., Tapia-Ramirez, V., Mornet, D., and Cisneros, B. (2008). Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *Journal of cellular biochemistry* *105*, 735-745.

Gonzalez, E., Montanez, C., Ray, P.N., Howard, P.L., Garcia-Sierra, F., Mornet, D., and Cisneros, B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS letters* *482*, 209-214.

Gorecki, D.C., Monaco, A.P., Derry, J.M., Walker, A.P., Barnard, E.A., and Barnard, P.J. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Human molecular genetics* *1*, 505-510.

Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *73*, 2424-2428.

Holder, E., Maeda, M., and Bies, R.D. (1996). Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Human genetics* *97*, 232-239.

Howard, P.L., Dally, G.Y., Wong, M.H., Ho, A., Weleber, R.G., Pillers, D.A., and Ray, P.N. (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Human molecular genetics* *7*, 1385-1391.

Hugnot, J.P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G.E., Monaco, A.P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J.C., Kahn, A., *et al.* (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *89*, 7506-7510.

Imamura, M., and Ozawa, E. (1998). Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *95*, 6139-6144.

James, M., Nuttall, A., Ilesley, J.L., Ottersbach, K., Tinsley, J.M., Sudol, M., and Winder, S.J. (2000). Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *Journal of cell science* *113 ( Pt 10)*, 1717-1726.

Jin, H., Tan, S., Hermanowski, J., Bohm, S., Pacheco, S., McCauley, J.M., Greener, M.J., Hinitz, Y., Hughes, S.M., Sharpe, P.T., *et al.* (2007). The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. *BMC genomics* *8*, 19.

Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J.S., and Campbell, K.P. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *The Journal of biological chemistry* *270*, 27305-27310.

Kaffman, A., and O'Shea, E.K. (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annual review of cell and developmental biology* *15*, 291-339.

Klamut, H.J., Gangopadhyay, S.B., Worton, R.G., and Ray, P.N. (1990). Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular and cellular biology* *10*, 193-205.

Koenig, M., Beggs, A.H., Moyer, M., Scherpf, S., Heindrich, K., Bettecken, T., Meng, G., Muller, C.R., Lindlof, M., Kaariainen, H., *et al.* (1989). The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *American journal of human genetics* *45*, 498-506.

Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* *50*, 509-517.

Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *The Journal of biological chemistry* *265*, 4560-4566.

Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-228.

Kramarcy, N.R., Vidal, A., Froehner, S.C., and Sealock, R. (1994). Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *The Journal of biological chemistry* 269, 2870-2876.

Kunkel, L.M., Hejtmancik, J.F., Caskey, C.T., Speer, A., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Colletti, C.A., Bertelson, C., Muller, U., Bresnan, M., *et al.* (1986). Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 322, 73-77.

Lara-Chacon, B., de Leon, M.B., Leocadio, D., Gomez, P., Fuentes-Mera, L., Martinez-Vieyra, I., Ortega, A., Jans, D.A., and Cisneros, B. (2010). Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. *Journal of cellular biochemistry* 110, 706-717.

Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 5346-5350.

Lidov, H.G., Selig, S., and Kunkel, L.M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Human molecular genetics* 4, 329-335.

Liechti-Gallati, S., Koenig, M., Kunkel, L.M., Frey, D., Boltshauser, E., Schneider, V., Braga, S., and Moser, H. (1989). Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. *Human genetics* 81, 343-348.

Macias, M.J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., and Oschkinat, H. (1996). Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* 382, 646-649.

Marquez, F.G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velazquez, F., Depardon, F., Cervantes, L., Rendon, A., Mornet, D., Rosas-vargas, H., *et al.* (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 118, 957-966.

Martinez-Vieyra, I.A., Vasquez-Limeta, A., Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S.L., Mondragon, M., Mondragon, R., Ortega, A., Winder, S.J., and Cisneros, B. (2013). A role for beta-dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 698-711.

McNeil, P.L., and Khakee, R. (1992). Disruptions of muscle fiber plasma membranes. Role in exercise-induced damage. *The American journal of pathology* 140, 1097-1109.

Milner, R.E., Busaan, J.L., Holmes, C.F., Wang, J.H., and Michalak, M. (1993). Phosphorylation of dystrophin. The carboxyl-terminal region of dystrophin is a substrate for in vitro phosphorylation by p34cdc2 protein kinase. *The Journal of biological chemistry* 268, 21901-21905.

Moizard, M.P., Billard, C., Toutain, A., Berret, F., Marmin, N., and Moraine, C. (1998). Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *American journal of medical genetics* 80, 32-41.

Newey, S.E., Benson, M.A., Ponting, C.P., Davies, K.E., and Blake, D.J. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Current biology : CB* 10, 1295-1298.

Norwood, F.L., Sutherland-Smith, A.J., Keep, N.H., and Kendrick-Jones, J. (2000). The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure* 8, 481-491.

Piluso, G., Mirabella, M., Ricci, E., Belsito, A., Abbondanza, C., Servidei, S., Puca, A.A., Tonali, P., Puca, G.A., and Nigro, V. (2000). Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *The Journal of biological chemistry* 275, 15851-15860.

Ponting, C.P., Blake, D.J., Davies, K.E., Kendrick-Jones, J., and Winder, S.J. (1996). ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends in biochemical sciences* 21, 11-13.

Rafael, J.A., Cox, G.A., Corrado, K., Jung, D., Campbell, K.P., and Chamberlain, J.S. (1996). Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations. *The Journal of cell biology* 134, 93-102.

Rapaport, D., Fuchs, O., Nudel, U., and Yaffe, D. (1992). Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *The Journal of biological chemistry* 267, 21289-21292.

Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M.T., Espanel, X., and Sudol, M. (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biological chemistry* 380, 431-442.

Roberds, S.L., Ervasti, J.M., Anderson, R.D., Ohlendieck, K., Kahl, S.D., Zoloto, D., and Campbell, K.P. (1993). Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *The Journal of biological chemistry* 268, 11496-11499.

Roberts, R.G., Gardner, R.J., and Bobrow, M. (1994). Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Human mutation* 4, 1-11.

Rodriguez-Munoz, R., Villarreal-Silva, M., Gonzalez-Ramirez, R., Garcia-Sierra, F., Mondragon, M., Mondragon, R., Cerna, J., and Cisneros, B. (2008). Neuronal differentiation modulates the dystrophin Dp71d binding to the nuclear matrix. *Biochemical and biophysical research communications* 375, 303-307.

Romo-Yanez, J., Ceja, V., Ibarra-Lomeli, R., Coral-Vazquez, R., Velazquez, F., Mornet, D., Rendon, A., and Montanez, C. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of cellular biochemistry* 102, 82-97.

Rosa, G., Ceccarini, M., Cavaldesi, M., Zini, M., and Petrucci, T.C. (1996). Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of beta-dystroglycan. *Biochemical and biophysical research communications* 223, 272-277.

Rybakova, I.N., Amann, K.J., and Ervasti, J.M. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *The Journal of cell biology* 135, 661-672.

Rybakova, I.N., and Ervasti, J.M. (1997). Dystrophin-glycoprotein complex is monomeric and stabilizes actin filaments in vitro through a lateral association. *The Journal of biological chemistry* 272, 28771-28778.

Saint Martin, A., Aragon, J., Depardon-Benitez, F., Sanchez-Trujillo, A., Mendoza-Hernandez, G., Ceja, V., and Montanez, C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *The FEBS journal* 279, 66-77.

Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human molecular genetics* 8, 1-10.

Schmalbruch, H. (1984). Regenerated muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy: a serial section study. *Neurology* 34, 60-65.

Smalheiser, N.R., and Kim, E. (1995). Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties. *The Journal of biological chemistry* 270, 15425-15433.

Straub, V., Ettinger, A.J., Durbeej, M., Venzke, D.P., Cutshall, S., Sanes, J.R., and Campbell, K.P. (1999). epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *The Journal of biological chemistry* 274, 27989-27996.

Suarez-Sanchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K.M., Velez, G., Azuara-Medina, P.M., Gomez, P., Vasquez-Limeta, A., Hernandez-Hernandez, O., Lieu, K.G., Jans, D.A., *et al.* (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin alpha/beta and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica et biophysica acta* 1843, 985-1001.

Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L.E., and Cisneros, B. (2012). Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular neurobiology* 45, 43-60.

Tinsley, J.M., Blake, D.J., and Davies, K.E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human molecular genetics* 2, 521-524.

Tozawa, T., Itoh, K., Yaoi, T., Tando, S., Umekage, M., Dai, H., Hosoi, H., and Fushiki, S. (2012). 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* 45, 287-297.

Vasquez-Limeta, A., Wagstaff, K.M., Ortega, A., Crouch, D.H., Jans, D.A., and Cisneros, B. (2014). Nuclear import of beta-dystroglycan is facilitated by ezrin-mediated cytoskeleton reorganization. *PloS one* 9, e90629.

Vaudry, D., Stork, P.J., Lazarovici, P., and Eiden, L.E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296, 1648-1649.

Villarreal-Silva, M., Suarez-Sanchez, R., Rodriguez-Munoz, R., Mornet, D., and Cisneros, B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochemical research* 35, 366-373.

Walsh, M.P., Busaan, J.L., Fraser, E.D., Fu, S.Y., Pato, M.D., and Michalak, M. (1995). Characterization of the recombinant C-terminal domain of dystrophin: phosphorylation by calmodulin-dependent protein kinase II and dephosphorylation by type 2B protein phosphatase. *Biochemistry* 34, 5561-5568.

Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y., and Ozawa, E. (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *European journal of biochemistry / FEBS* 222, 1055-1061.