



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Análisis proteómico de las células
PC12/Xpress-Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (PC12-C11) durante el proceso
de diferenciación neuronal**

T E S I S

Que presenta

M. en C. Candelaria Merino Jiménez

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directora de la Tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Ciudad de México.

Marzo, 2016.

Dedicada a:

Mi familia

Por ser el motor que impulsa mi vida

A Eric

Por ser mi persona especial

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

(Marie Curie; 1867-1934)

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 4 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Zacatenco bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda. Para la realización de esta tesis se contó en el apoyo del CONACYT a través de la beca otorgada a Candelaria Merino Jiménez. No. de Registro 233893 y con el apoyo de los proyectos CONACYT CB-2013-222054 y ECOS-ANUIES-SEP M11-S02 así como del financiamiento del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de este proyecto No. de Registro 233893 y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco por el financiamiento brindado.

AGRADECIMIENTOS

A mis queridos padres: María y Ramiro

Por su amor y apoyo incondicional en cada momento, por ser un gran ejemplo de vida, por todos sus esfuerzos y sacrificios para salir adelante, por todas sus enseñanzas que me formaron en la persona que soy y por ser la motivación que me inspira.

A mi única hermana

Por su cariño, sus cuidados, atenciones, el apoyo que siempre me da, por ser mi hermana mayor y darme unos sobrinos estupendos.

A mis sobrinos Mayte y Cesar

Por venir a ser parte de mi vida, darme su amor incondicional, llenarme de besos, abrazos, alegría y recordarme lo bello que es ser niño.

A mi gran amor Eric

Por su cariño, confianza, paciencia y apoyo incondicional, por estar a mi lado y ser mi compañero de vida, por todos estos años maravillosos que hemos compartido y por motivarme a ser una mejor persona.

A mi Tutora: Dra. Cecilia Montañez

Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la dirección, apoyo y sugerencias en la realización de este proyecto y por contribuir a mi crecimiento profesional.

*A mis asesores: Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Dr. José Tapia Ramírez,
Dra. Febe Elena Cázares Raga y el Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza*

Por su tiempo, disponibilidad, sugerencias sobre la realización de este proyecto y por contribuir a mi crecimiento profesional.

A los auxiliares del laboratorio:

Alejandra Sánchez Trujillo, Víctor Ceja y Jorge Aragón

Por sus observaciones, consejos y asesoría en la realización de este trabajo.

A los técnicos del laboratorio: Clemencia Salas y Víctor Tapia

Por su disponibilidad y el apoyo técnico brindado.

A mis compañeros de laboratorio

Por su agradable compañía a lo largo de todo este tiempo.

A mis amigas y amigos: Coti, Gris, Ale, Cesar, Israel y Víctor

Por su confianza, apoyo, tiempo y grata compañía, por brindarme su amistad y por todos los momentos agradables que compartimos a lo largo de estos años.

A Dios

Por darme la oportunidad de concluir una etapa más en mi vida, por la familia maravillosa en la que crecí, por todas las bendiciones que ha puesto en mi camino y por permitirme conocer a cada una de estas personas que de alguna forma han contribuido para hacer de mí una mejor persona.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
Introducción	1
1. Generalidades	3
1.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	3
1.2 Gen DMD	3
1.2.1 Formas de distrofina	5
1.2.2 Isoformas de Dp71	5
1.3 Función de la distrofina Dp71	8
1.4 Línea celular PC12 como modelo de estudio de la Dp71.....	9
1.4.1 Diferenciación neuronal en células PC12.....	10
1.4.2 Moléculas que participan en el crecimiento neurítico en células PC12	14
2. Proteómica	16
2.1 Herramientas de la proteómica.....	16
2.2.1 2DE.....	16
2.2.2 MS	18
2.2.3 Bioinformática.....	18
2.2 Análisis proteómico en células PC12	19
3. Justificación	21
4. Hipótesis	22

5. Objetivos	23
5.1 Objetivo General.....	23
5.1.1 Objetivos específicos.....	23
6. Materiales y métodos	24
6.1 Cultivo celular y diferenciación	24
6.2 Obtención de extractos totales de proteínas	24
6.3 Análisis proteómico.....	25
6.3.1 2DE.....	25
6.3.3 Análisis de imágenes	25
6.4 Identificación de proteínas.....	26
6.4.1 Digestión enzimática de las proteínas de interés	26
6.4.2 Análisis por espectrometría de masas.....	26
6.4.2.1 MALDI-TOF/TOF	26
6.4.2.2 LC-MS/MS	27
6.5 Western Blot.....	28
6.6 Inmunofluorescencia indirecta	29
6.7 Bloqueo inmunológico	31
6.8 Análisis estadístico	31
7. Resultados	32
7.1 Obtención de proteínas para su análisis por 2D-PAGE y MS.....	32
7.2 Análisis proteómico.....	35
7.2.1 Perfil proteómico	35
7.2.3 Determinación del perfil proteómico de expresión diferencial	45
7.2.5 Clasificación funcional de las proteínas identificadas.....	52
7.3 Validación.....	59
7.3.1 Validación de proteínas expresadas diferencialmente.....	59

7.3.2 Validación funcional de HspB1.....	59
7.4 Localización celular de HspB1 y anexina A5	64
8. Discusión	69
9. Conclusiones	75
10. Perspectivas	76
11. Referencias	77
12. Anexos	91
Anexo I. Artículo aceptado: Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1.....	92
Anexo II. Artículo publicado: Overexpression of mutant dystrophin Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ stimulates cell proliferation.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la distrofina.	4
Figura 2. Representación esquemática de la organización del gen DMD humano	6
Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de Dp71.....	8
Figura 4. Vía MEK/MAPK activada por TrkA en la línea celular PC12, durante la diferenciación celular..	13
Figura 5. Representación esquemática de una electroforesis bidimensional	17
Figura 6. Expresión de la proteína recombinante Xpress-Dp71 Δ 78-79.....	32
Figura 7. Curva de crecimiento de células PC12-C11 y PC12.....	33
Figura 8. Integridad de los extractos de proteínas de las células PC12-C11 y PC12.....	35
Figura 9. Perfiles proteómicos de células PC12-C11 no diferenciadas obtenidos por 2DE	37
Figura 10. Perfiles proteómicos de células PC12 no diferenciadas obtenidos por 2DE	38
Figura 11. Perfiles proteómicos de células PC12-C11 diferenciadas obtenidos por 2DE.....	39
Figura 12. Perfiles proteómicos de células PC12 diferenciadas obtenidos por 2DE.	40
Figura 13. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12-C11 no diferenciadas.....	41
Figura 14. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12 no diferenciadas.....	42
Figura 15. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12-C11 diferenciadas.....	43
Figura 16. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12 diferenciadas.....	44
Figura 17. Expresión diferencial de proteínas de células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas	46
Figura 18. Expresión diferencial de proteínas de células PC12-C11 y PC12 diferenciadas	47
Figura 19. Porcentaje volumen de las manchas expresadas diferencialmente en células PC12-C11 y PC12.	49

Figura 20. Clasificación funcional de las proteínas identificadas en células no diferenciadas.	53
Figura 21. Clasificación funcional de las proteínas identificadas en células diferenciadas	56
Figura 22. Validación de proteínas expresadas diferencialmente durante la diferenciación de celulas PC12-C11 por WB	60
Figura 23. Efecto del anti-HspB1 sobre la diferenciación inducida por NGF en células PC12- C11	62
Figura 24. Expresión de HspB1 durante la diferenciación de células PC12-C11	63
Figura 25. Expresión de HspB1 y pHspB1Ser86 después del tratamiento con el anticuerpo	64
Figura 26. Localización celular de HspB1 y anexina A5 en células PC12-C11 y PC12 diferenciadas.....	66
Figura 27. Localización celular de pHspB1Ser82 en células PC12-C11 diferenciadas.....	67
Figura 28. Participación de HspB1 en el crecimiento neurítico de células PC12-C11.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bases de datos más utilizadas para la identificación de proteínas.....	19
Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios	30
Tabla 3. Concentración de proteína obtenida a partir de diferente número de células.....	33
Tabla 4. Valores de la expresión diferencial obtenidos entre los grupos comparados	46
Tabla 5. Valores del % volumen de las manchas con expresión diferencial.....	48
Tabla 6. Proteínas identificadas por MS.....	49
Tabla 7. Clasificación en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas en células no diferenciadas.....	54
Tabla 8. Clasificación en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas en células diferenciadas.....	57

ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinamínico
2DE	Electroforesis bidimensional
2D-PAGE	Geles de electroforesis bidimensional
DTT	Ditiotreitol
IEF	Isoelectroenfoque
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
kDa	Kilo Dalton
MALDI	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
m/z	Masa/carga
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros
μ M	Micromolar
mA	Mili ampers
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
NGF	Factor de crecimiento neurítico
NF-L	Neurofilamento de cadena ligera
pH	Potencial de iones de hidrógeno

pI	Punto isoeléctrico
PBS	Tampón fosfato salino
pH	Potencial de hidrógeno
ORF	Marco abierto de lectura
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético
TH	Tirosina hidroxilasa
TOF	Tiempo de vuelo

RESUMEN

Las células PC12 adquieren un fenotipo neuronal en respuesta al factor de crecimiento neuronal (NGF). Este fenotipo es más evidente cuando la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ se expresa de manera estable en células PC12-C11. Para investigar el efecto de la expresión de esta mutante en el proteoma de células PC12-C11 se realizó un análisis proteómico por medio de 2DE y MS entre células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas y diferenciadas. En células no diferenciadas, una proteína fue regulada negativamente y 5 presentaron regulación positiva. Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mostró un efecto mayor en células diferenciadas ya que 10 proteínas presentaron una regulación negativa mientras que 7 fueron reguladas positivamente. La proteína con una regulación mayor fue HspB1, presentando un incremento en su expresión de 5.2 veces. Esta proteína está implicada en el crecimiento neurítico a través de la reestructuración del citoesqueleto. Anexina A5 fue la segunda proteína regulada positivamente, exhibiendo un incremento de 2.2 veces más en su expresión. De manera interesante se observó que la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ disminuye la expresión de proteínas importantes en la diferenciación neuronal como: secretogranina-2, neurofilamento de cadena ligera (NF-L), tirosina hidroxilasa (TH) y aldosa reductasa. Los cambios en los niveles de expresión de las proteínas reguladas positivamente (HspB1 y anexina A5) fueron observados y validados por WB e inmunofluorescencia, mientras los cambios en los niveles de expresión de las proteínas reguladas negativamente fueron validados por WB. Mediante el bloqueo inmunológico en contra de la proteína HspB1 se observó que el crecimiento neurítico inducido por NGF en células PC12-C11 fue afectado, reduciéndose drásticamente el porcentaje ($5.38\% \pm 1.36$) de células que presentan neuritas respecto a los controles (NGF $20.71\% \pm 0.97$ y NGF + vehículo $21.70\% \pm 1.36$), además el nivel de HspB1 y HspB1Ser86 disminuyen después del tratamiento, sugiriendo un papel importante para esta proteína en este proceso celular. Los resultados muestran que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ afecta los niveles de expresión de algunas proteínas y que el crecimiento neurítico estimulado por esta mutante ocurre principalmente a través del aumento en la expresión y fosforilación de HspB1.

Palabras clave: Células PC12, Crecimiento neurítico, Diferenciación, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, HspB1, MS.

ABSTRACT

PC12 cells acquire a neuronal phenotype in response to Nerve Growth Factor (NGF). This phenotype is more evident when the dystrophin Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mutant is stably expressed in PC12-C11 cells. To investigate the effect of Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ overexpression on the protein profile of PC12-C11 cells, a comparative 2DE proteomic analysis coupled to MS was performed between undifferentiated and NGF-differentiated PC12-C11 and PC12 cells. In undifferentiated cultures, one protein was downregulated, and five were upregulated. Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ overexpression had a greater effect on differentiated cultures, with ten proteins downregulated and seven upregulated. The highest upregulated protein was HspB1, showing a 5.2-fold increase in expression. Interestingly, this protein is implicated in neurite outgrowth through cytoskeletal restructuring. Annexin-5 was the second highest upregulated protein, exhibiting a 2.2-fold increase in expression. Surprisingly, expression of Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ decreases neuronal differentiation relevant proteins as: secretogranin-2, neurofilament light polypeptide (NF-L), Tyrosine hydroxylase (TH) and aldose reductase. In addition, changes in the upregulated proteins (HspB1 and Annexin-5) expression were observed and validated by WB and immunofluorescence assays, and, changes of the downregulated proteins were validated by WB. Employing an immunologic blockade with a polyclonal antibody against HspB1, it was found that the neurite outgrowth NGF-induced in PC12-C11 cells was affected decreasing the percentage ($5.38\% \pm 1.36$) of cells with neurites compared to controls (NGF $20.71\% \pm 0.97$ and NGF + vehicle $21.70\% \pm 1.36$). Furthermore, the level of HspB1 and HspB1Ser86 decreased, suggesting an important role for this protein in this cellular process. Our results show that Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ affects the expression level of some proteins and that the stimulated neurite outgrowth produced by this mutant takes place mainly through upregulation and phosphorylation of HspB1.

Keywords: Differentiation, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, HspB1, MS, Neurite outgrowth, PC12 cells.

Introducción

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es un desorden ligado al cromosoma X, que se caracteriza por una degeneración muscular progresiva debido a la ausencia de distrofina (Blake *et al.*, 2002). El gen DMD presenta una secuencia de 2.3 Mb compuesta de 79 exones (Coffey *et al.*, 1992 y Monaco *et al.*, 1992), que genera una proteína llamada distrofina con un peso molecular de 427 kDa. A partir de este gen se expresan al menos siete formas diferentes mediante el uso de promotores intragénicos alternativos (Feener *et al.*, 1989). Las diferentes distrofinas se denominan de acuerdo a su peso molecular; las tres distrofinas que presentan una longitud completa se denominan Dp427; las tres isoformas de distrofina de tamaño intermedio se denominan Dp260, Dp140 y Dp116; y las dos isoformas más cortas que las anteriores, una llamada Dp71 y la isoforma más pequeña llamada Dp40 (Tinsley *et al.*, 1993).

La Distrofina Dp71 se expresa en tejidos no musculares, está constituida por tres dominios: el dominio N-terminal compuesto de 7 residuos, una región rica en cisteína y el dominio C-terminal (Hugnot *et al.*, 1992). Esta proteína se transcribe desde un promotor localizado entre los exones 62 y 63 del gen DMD (Lederfein *et al.*, 1993) y es el producto principal de este gen que se expresa en el cerebro (Greenberg *et al.*, 1996).

El mRNA de la Dp71 presenta un procesamiento alternativo de los exones 71, 71 al 74 y 78 que genera una variedad de isoformas de la Dp71, el procesamiento del exón 71 no cambia el ORF mientras que el procesamiento del exón 78 si lo hace reemplazando los últimos 13 amino ácidos (aa) en la región C-terminal por 31 aa diferentes (Austin *et al.*, 1995). Las isoformas más representativas de la Dp71 se diferencian por la ausencia del exon 71 y la presencia o ausencia del exón 78; la Dp71a carece del exon 71 y contiene al exón 78 y está localizada en el núcleo tanto en células PC12 (línea celular derivada de un feocromocitoma de rata) indiferenciadas como diferenciadas y cuya expresión se incrementa durante el proceso de diferenciación; la isoforma denominada Dp71ab carece del exón 71 y 78, en esta misma línea celular presenta una localización citoplasmática más evidente en la periferia celular y también es observada en el cono de crecimiento neural (Marquez *et al.*, 2003).

En trabajos reportados anteriormente se ha observado que Dp71 es necesaria para la estabilización de las proteínas asociadas a distrofina (DAPs) en el cerebro (Greenberg *et al.*, 1996) y que la expresión de esta proteína incrementa a medida que el cerebro se va desarrollando (Jung *et al.*, 1993). Mutaciones en la región C-terminal del gen DMD afectan la expresión de Dp71 y en personas con DMD que presentan retraso mental se han observado bajos niveles de Dp71 (Moizard *et al.*, 2000; Daoud *et al.*, 2009b). Adicionalmente se ha reportado que la isoforma Dp71ab, que carece del exón 71 y 78, puede desempeñar un papel importante en la sinapsis excitatoria (Daoud *et al.*, 2009a).

En otros trabajos se ha reportado que la Dp71 tiene un papel crítico durante la diferenciación neuronal en células PC12 (Márquez *et al.*, 2003) y en células N1E-115 (células de neuroblastoma) (Morales-Lazaro *et al.*, 2010) y que la inhibición de su expresión con un antisentido de Dp71 afecta la diferenciación de células PC12 (Acosta *et al.*, 2004), sugiriendo que la expresión normal de Dp71 es esencial para el proceso de diferenciación neuronal en estas células. Por otra parte, Aragón y colaboradores (2011) generaron una mutante denominada Dp71 Δ_{78-79} , la cual carece de los exones 78 y 79, con la finalidad de estudiar la función de estos dominios, utilizando como modelo a la línea celular PC12. Al caracterizar a esta mutante, se observó que la ausencia de los exones 78 y 79 estimula el proceso de diferenciación neuronal y que la expresión de la Dp71 Δ_{78-79} regula la expresión de las isoformas endógenas de Dp71 (Aragón *et al.*, 2011). Todas estas evidencias sugieren que las isoformas de la Dp71 desempeñan un papel importante en la diferenciación neuronal y que la presencia de los exones 63-77, sin 71 y la ausencia de los dos últimos exones 78 y 79 hacen más eficiente dicho proceso.

En base a lo mencionado anteriormente en este estudio se realizó un análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional (2DE) para investigar el efecto de la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ_{78-79} , en el perfil de expresión de células PC12-C11 no diferenciadas y diferenciadas con el propósito de identificar a las proteínas expresadas diferencialmente.

1. Generalidades

1.1 Distrofia muscular de Duchenne (DMD)

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un desorden ligado al cromosoma X que se presenta en forma temprana en la niñez sólo en varones y se caracteriza por una degeneración muscular progresiva que afecta a 1 de cada 3,300 niños. Este padecimiento es causado por mutaciones en el gen de la distrofina (DMD), que resulta en la carencia o en la expresión de formas mutantes de esta proteína (Blake *et al.*, 2002). Los pacientes usualmente empiezan a manifestar los síntomas a los 12 años de edad y mueren de complicaciones cardiorrespiratorias hasta 10 años después (Yiu y Kornberg, 2008). Las mujeres son portadoras del gen alterado.

1.2 Gen DMD

El gen DMD (Kunkel *et al.*, 1989) es uno de los genes más largos en humanos consta de 2.3 Mb, está compuesto de 79 exones y constituye el 0.1% del total del genoma humano. Este gen está localizado en el brazo corto del cromosoma X (Mandel, 1989) y codifica para una proteína citoplasmática llamada distrofina de 427 kDa (Hoffman *et al.*, 1987; Monaco *et al.*, 1992). La distrofina es miembro de la familia de proteínas β -spectrina/ α -actina y forma parte de un gran complejo glicoproteico, está compuesta de cuatro dominios: un dominio amino-terminal de unión a actina, seguido de un número variable de unidades repetidas conocidos como repetidos de unión a spectrina (dominio de bastón) dentro de los cuales hay cuatro regiones de bisagra; un dominio rico en cisteínas y un dominio carboxilo-terminal (Hoffman *et al.*, 1987; Koenig *et al.*, 1988). El dominio rico en cisteínas junto con el dominio C-terminal presentan varios sitios posibles de interacción con otras proteínas: un dominio WW encontrado en moléculas de señalización y que media la interacción entre el β -dístroglicano y la distrofina; dos sitios EF, que pueden unir calcio; un dominio ZZ, conocido como sitio de unión a calmodulina; un dominio de unión a sintrofinas y una estructura de “coiled-coil”, que participa en la interacción con distrobrevina. Estos sitios son importantes para la interacción de la distrofina con el complejo de proteínas conocidas como DAPs (Blake *et al.*, 2002).

El dominio rico en cisteína se une a laminina-2 por medio del α y β -dístroglicano y actúa como un puente para la unión entre la actina del citoesqueleto y la matriz extracelular (Rando *et al.*, 2001; Rentschler *et al.*, 1999) (Figura 1).



Figura 1. Representación esquemática de la distrofina. El sitio de unión a actina, el dominio central de bastón compuesto por 24 unidades repetidas parecidas a las de espectrina, cuatro regiones ricas en prolina designadas con los números del 1–4 en rojo, el dominio WW, el dominio rico en cisteína (CYS), el cual contiene el sitio EF y el dominio ZZ y la estructura coiled-coil (CC) en la región COOH terminal (CT). Los sitios de unión para β -dístroglicano (DG), sintrofina (SYN), y el sitio de unión a la familia distrofina (DFB) se indican con líneas negras (Modificado de Blake *et al.*, 2002).

La función de las distrofinas consiste en mantener la integridad de la membrana celular a través de su interacción con proteínas de membrana, para ensamblar el complejo integrado por las DAPs el cual es un puente molecular entre las proteínas de la lámina basal y el citoesqueleto de actina (Sciandra *et al.*, 2007).

El mecanismo preciso de cómo la deficiencia de distrofina conduce a la degeneración de las fibras musculares no está claro, sin embargo se plantea que la ausencia de distrofina lleva a la deslocalización de proteínas asociadas a distrofina causando la desestabilización del citoesqueleto lo que resulta en una membrana inestable. Dado que las distrofinas y/o las DAPs se expresan principalmente en tejidos musculares, la ausencia de cualquiera de ellas, en este caso de la distrofina puede desencadenar el desarrollo de miopatías tan severas como la DMD (Petrof *et al.*, 1998; Deconinck *et al.*, 2007).

1.2.1 Formas de distrofina

El gen DMD tiene cuatro promotores internos referidos como (R) de retina, (B) cerebro, (S) células Schwann y (G) general, que codifican para distrofinas cortas de 260 kDa (Dp260), 140 kDa (Dp140), 116 kDa (Dp116) y 71 kDa (Dp71) (Blake *et al.*, 1992; Hugnot *et al.*, 1992; Lenk *et al.*, 1993) (Figura 2). Estas proteínas carecen del dominio de unión a actina pero conservan la región rica en cisteínas y la región C-Terminal. La isoforma más corta de distrofina Dp40 (Tinsley *et al.*, 1993) es la única que carece de la región C-Terminal (aa 3409-3685) y se expresa a partir del mismo promotor que la Dp71; el 5'-UTR y la secuencia de los primeros 7 aa son idénticos al mRNA que codifica para la Dp71, mientras que el 3'-UTR se genera a partir de la secuencia del intrón 70. Aunque la función celular de estas isoformas de distrofina no está bien establecida, se cree que podrían estar regulando la estabilización de la membrana a través de la unión a sus proteínas pares formando complejos que también involucran la asociación con el citoesqueleto de actina (Crawford *et al.*, 2000). El estudio de la expresión de la isoforma Dp40 no ha sido posible debido a que se carece de un anticuerpo específico para esta proteína, sin embargo se cree que interactúa con un grupo de proteínas presinápticas incluyendo la syntaxina 1A y la SNAP25 involucradas en la exocitosis de vesículas sinápticas en neuronas por lo cual la Dp40 puede desempeñar un papel en la función presináptica (Tozawa *et al.*, 2012).

La distrofina tiene una proteína autosomal homóloga, denominada utrofina (Up). Al menos cuatro diferentes productos Up han sido detectados: Up395, Up140, Up110-G-utrofina y Up80. Sin embargo se ha visto que Dp y Up tienen diferentes funciones y que sus interacciones con las DAPs y otras proteínas varían en afinidad y origen.

1.2.2 Isoformas de Dp71

La Distrofina Dp71 es el segundo producto más pequeño del gen DMD de expresión ubicua y es la isoforma principal de las distrofinas que se expresa en el sistema nervioso. Esta isoforma está constituida por tres dominios: el dominio N-terminal compuesto de 7 aa (de unión a actina), una región rica en cisteína y el dominio C-terminal (Hugnot *et al.*, 1992), región crucial para la unión de proteínas asociadas a distrofina (DAPs) (Rapaport *et al.*, 1992).

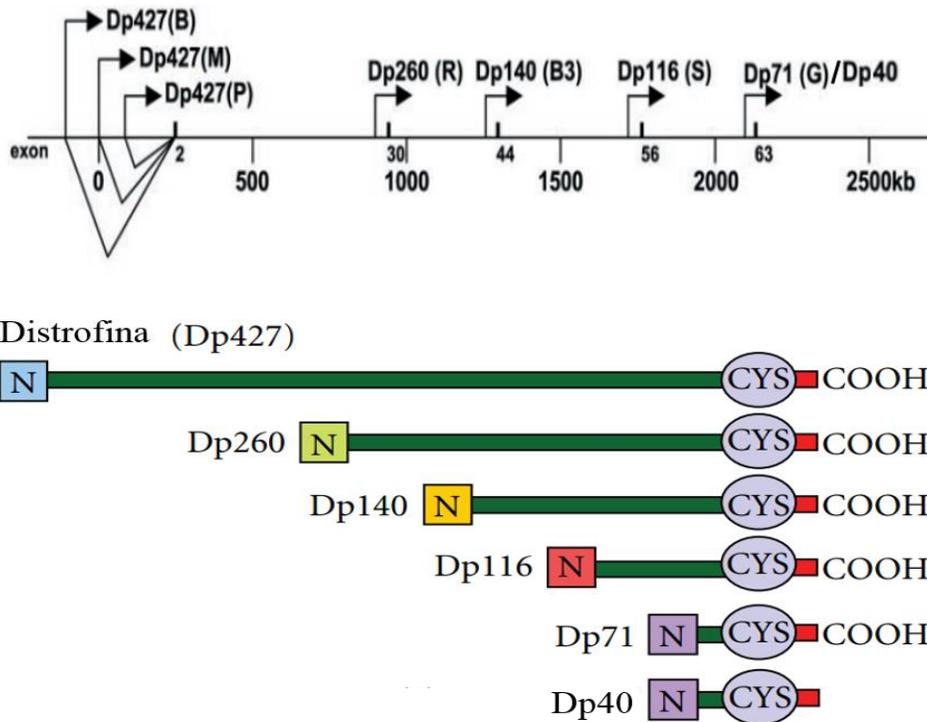


Figura 2. Representación esquemática de la organización del gen DMD humano. Todos los promotores están representados por flechas, los localizados en el extremo 5' del gen transcriben las distrofinas de longitud completa, cada mRNA codifica para una proteína de 427 kDa y éstas solamente difieren en su región N-terminal, los tres productos son de expresión tejido-específica y se designan como Dp427 (B), Dp427 (M) y Dp427 (P), B corresponde a cerebro, M a músculo y P a células de Purkinje. Las isoformas pequeñas se expresan a partir de promotores localizados distalmente dentro del gen y se designan de acuerdo a su peso molecular como: Dp260 expresada en retina, Dp140 en cerebro, Dp116 en células de Schwann, Dp71 de expresión ubicua y la isoforma más corta de distrofina Dp40 que comparte el mismo promotor que la Dp71. Se representa también el dominio amino terminal (N), el dominio central de basto (verde), el dominio rico en cisteínas (CYS) y el carboxilo terminal (COOH). (Modificado de Blake et al., 2001; Perronnet y Vaillend, 2010).

La expresión de Dp71 depende de un mecanismo muy complejo de control postranscripcional ya que el mRNA puede presentar varios sitios de procesamiento alternativo. El procesamiento de los exones 71, 71 al 74 y/ó 78, conduce a la expresión de múltiples isoformas de Dp71 las cuales presentan diferentes interacciones y localizaciones

subcelulares (Lederfein *et al.*, 1992; Rapaport *et al.*, 1992; Kramarcy 1994) (Figura 3). En las células PC12 se han identificado diferentes isoformas entre las que se encuentran: Dp71a y c, las cuales comparten la misma región C-terminal y son conocidas como distrofinas-d y la isoforma Dp71ab que poseen una nueva región C-terminal, en la cual los últimos 13 aa hidrofílicos son reemplazados por 31 aa hidrofóbicos, conocida como distrofina-f (Lederfein *et al.*, 1992).

La localización subcelular de las isoformas d y f es muy diferente en distintos tipos celulares, como en las células PC12 (línea celular de feocromocitoma de rata), HeLa (línea celular de humano), C2C12 (línea celular de mioblasto de ratón) y N1E115 (línea celular de neuroblastoma de ratón) (Lederfin *et al.*, 1992; Márquez *et al.*, 2003). En las células PC12 la Dp71d está concentrada en núcleo y puede encontrarse también en menor cantidad en citoplasma y neuritas, mientras que al Dp71ab está ausente en el núcleo y se ha visto agregarse cerca de neuritas y colocalizar con sinaptofisina, componente de las microvesículas sinápticas (González *et al.*, 2000, Marquez *et al.*, 2003; Ilarraza-Lomeli *et al.*, 2007). Al utilizar tecnología anti-sentido se demostró que la inhibición de la expresión de Dp71 (d y f) conduce a una disminución de la capacidad de las células PC12 a adquirir un fenotipo neuronal acompañado por una disminución en la capacidad de adhesión a laminina (Enríquez-Aragón *et al.*, 2005).

La isoforma Dp71e es generada por un procesamiento alternativo en la región 3'-UTR del transcrito de Dp71, este procesamiento da como resultado una única secuencia que codifica para 10 aa y previene la traducción de los exones 78 y 79, esta isoforma es expresada tanto en células no diferenciadas como diferenciadas y se ve incrementada durante la diferenciación de células PC12 mediada por NGF, así como en diferentes órganos de rata (cerebro, corazón, pulmón, testículos, páncreas, riñón, intestino, hígado y ojos) y en líneas celulares de humano como HeLa (células de carcinoma) y SH-SY5Y (células de neuroblastoma) (Saint *et al.*, 2012).

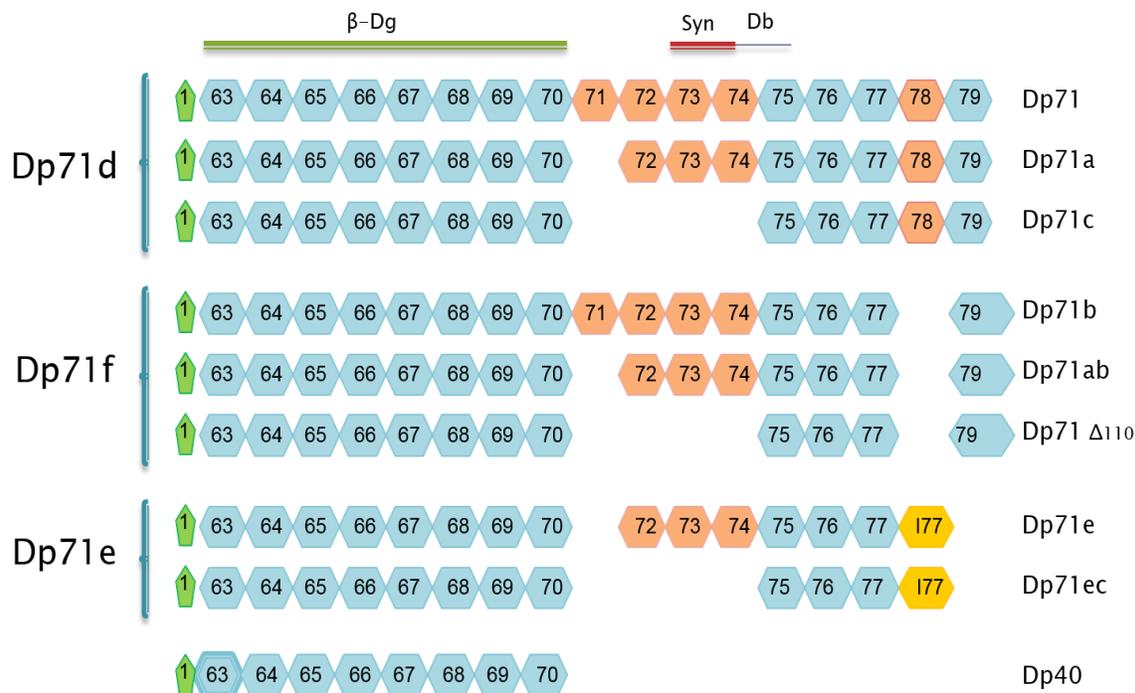


Figura 3. Representación esquemática de las isoformas de Dp71. Se muestra la clasificación de las isoformas de Dp71 en tres grupos (Dp71d, Dp71f y Dp71e), en verde se representa el exón único de la Dp71, en azul los exones que conforman a cada isoforma, en naranja los exones que presentan un procesamiento alternativo (Exón 71, 71 al 74 y/o 78), en amarillo el intrón 77 presente únicamente en la Dp71e y Dp71ec.

1.3 Función de la distrofina Dp71

Dp71 ha sido involucrada en dos principales fenotipos no musculares: retraso mental y disfunción de la retina (Tadayoni *et al.*, 2011). Los pacientes con DMD que presentan mutaciones localizadas en la región genómica de Dp71 manifiestan retraso mental severo (Lidov, 1996), por lo que se cree que la pérdida de la función de esta isoforma corta puede estar relacionada con esta manifestación clínica (Moizard *et al.*, 1998), ya que dicha isoforma es el producto del gen de la distrofina más abundante en cerebro (Lederfein *et al.*, 1992; Jung *et al.*, 1993) y su expresión incrementa durante la diferenciación del SNC (Sarig *et al.*, 1999). También es conocida la importancia de la Dp71 en la formación de sinapsis y la plasticidad cerebral (Daoud *et al.*, 2009a).

La manifestación clínica no muscular más caracterizada de pacientes con DMD es un electroretinograma anormal (ERG), donde se observa una reducción de la amplitud de onda b en un 80% de los pacientes con DMD (Sigesmund *et al.*, 1994). Para determinar el papel de la Dp71 en el fenotipo retinal asociado a DMD, se han utilizado las células gliales de Müller (RMG) ya que desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad funcional de la retina (Bringmann *et al.*, 2001). La utilización de este modelo celular ha sido determinante en revelar el papel de la Dp71 en la regulación de los canales de agua (acuaporina AQP4) y potasio (Kir4.1) teniendo una participación importante en la homeostasis retinal del agua y el mantenimiento de la barrera hemato-retiniana (Kofuji *et al.*, 2000; Fort *et al.*, 2008).

Además, datos obtenidos de otro modelo celular (células PC12) han sido clara evidencia de la participación de Dp71 en varios procesos celulares incluyendo la diferenciación neuronal (Acosta *et al.* 2004; Aragón *et al.*, 2011), adhesión celular (Cerna *et al.*, 2006) y en el ciclo de división celular (Villarreal-Silva *et al.*, 2010).

1.4 Línea celular PC12 como modelo de estudio de la Dp71

Las células PC12 derivan de un feocromocitoma de rata (tumor de la médula suprarrenal de la glándula adrenal que se origina de las células cromafinas) que sintetizan una gran cantidad de catecolaminas (dopamina y norepinefrina) (Greener y Tischler, 1976), por lo que es una línea celular que ha sido utilizada extensamente como un modelo para estudiar los mecanismos de señalización intracelular asociados con la diferenciación neuronal, proliferación o apoptosis (Liu *et al.*, 2006). Esta línea celular adquiere un fenotipo neuronal en presencia de NGF y ha permitido la caracterización de la vía de señalización que lleva a la diferenciación neuronal (Szeberényi y Erhardt, 1994; Friedman W., 1999). Asimismo ha sido utilizada como un modelo neuronal *in vitro* para el estudio de la expresión diferencial y localización subcelular de las isoformas de Dp71 (Cisneros *et al.*, 1996; González *et al.*, 2000; Marquez *et al.*, 2003; Ilarraza-Lomeli, *et al.*, 2007; Aragón *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que las células PC12 expresan solamente isoformas de Dp71 además de la Dp40. Dp71a (carece del exón 71), Dp71c (carece de los exones 71-74) ambas proteínas fueron descritas previamente como Dp71d; y Dp71ab (carece de los exones 71 y 78) descrita previamente como Dp71f (Márquez *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito que esta línea celular expresa también a la Dp71e que carece del exón 71, 78 y 79 y a la Dp71ec que carece de los exones del 71 al 74, 78 y 79, ambas proteínas presentan la secuencia del intrón 77 (Saint *et al.*, 2012). La expresión de estas isoformas se regula durante el proceso de diferenciación neuronal en células PC12 inducida por NGF.

Uno de los hallazgos importantes sobre el papel de la distrofina Dp71 en la diferenciación neuronal, se obtuvo mediante la utilización de un RNA antisentido para la distrofina Dp71 en la línea celular PC12. Debido a que estas células tienen la capacidad de responder al NGF y adquirir un fenotipo neuronal, la ausencia de Dp71 inhibió la diferenciación inducida por NGF. Este resultado señala a la distrofina Dp71 como una molécula importante para la diferenciación neuronal (Acosta *et al.*, 2004). En esta misma línea celular Aragón y colaboradores (2011) generaron una mutante denominada Dp71 Δ_{78-79} , que carece de los exones 78 y 79, con la finalidad de estudiar el papel de los dominios que comparten las isoformas de Dp71 (exones 63-77 sin 71), observando que la presencia de estos exones y la ausencia de los dos últimos (exón 78 y 79) estimulan el proceso de diferenciación neuronal y que la expresión de la Dp71 Δ_{78-79} regula la expresión de las isoformas endógenas de Dp71a y Dp71ab (Aragón *et al.*, 2011). Por todo lo antes mencionado esta línea celular se ha convertido en un modelo adecuado para estudiar el papel que desempeña la Dp71 durante la diferenciación neuronal.

1.4.1 Diferenciación neuronal en células PC12

La diferenciación neuronal involucra procesos como: migración, crecimiento direccional de axones, sinaptogénesis y supervivencia selectiva. La vía intracelular que activa este proceso puede ser estimulada por dos clases de señales: por factores de crecimiento neuronal como el NGF y por moléculas de adhesión celular (CAMs) (Keegan y Halegoua, 1993), que desencadenan la activación y participación de segundos mensajeros. Los factores de crecimiento neuronal presentan gran afinidad por el receptor TrkA desencadenando la

activación de la vía MEK/MAPK a través de la proto-oncoproteína Ras (Szeberényi y Erhardt, 1994).

El NGF pertenece a la familia de las neurotrofinas y existe como un complejo formado por varias subunidades, el receptor del NGF pertenece a la familia de los Trk (receptores tirosina cinasa) y se ha denominado TrkA. La vía de señalización de TrkA pertenece a la vía de activación de las MAPK (Szeberényi y Erhardt, 1994).

La vía TrkA involucra la vía de Ras, cuando el ligando NGF se une al receptor TrkA éste se dimeriza, la actividad intrínseca de tirosina cinasa de cada receptor fosforila a su receptor compañero en dos residuos (Tyr490 y Tyr785), que son responsables de la unión a diferentes moléculas adaptadoras con dominios SH2 encargadas de la propagación de la señal como Shc y de reclutar al complejo Grb2/Sos y Grb2 se une al factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF), por su parte la proteína Sos facilita la activación de Ras mediante el intercambio de GDP (forma inactiva de Ras) por GTP (forma activa de Ras) (Basu *et al.*, 1994). La proteína Ras activada recluta y lleva a la membrana a la proteína serina/treonina cinasa Raf-1 activándola. Raf-1 activada fosforila a la proteína serina treonina cinasa MEK, la cual a su vez fosforila a la proteína serina/treonina cinasa ERK. ERK activa se transloca al núcleo y también por fosforilación, activa a CREB (principal factor transcripcional responsable de la inducción y el mantenimiento de la diferenciación neuronal mediada por NGF) (Friedman, 1999; Vaudry *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2008).

Los receptores TrkA también pueden activar dos vías de señalización alternas muy importantes que participan en diferentes procesos celulares, la vía PI3 cinasa que conduce a la activación de Akt cinasa y la vía de PLC que conduce a la liberación Ca^{2+} intracelular y a la activación de PKC. La vía de PI3 cinasa participa principalmente en la supervivencia celular, mientras que las vías de Ras y de PLC estimulan los procesos responsables de la diferenciación neuronal. En células PC12, el tratamiento con NGF provoca la activación de A-Raf, B-Raf y c-Raf-1 aunque con un patrón temporal diferente (Wixler *et al.*, 1996), sin embargo los efectos producidos por NGF son atribuidos únicamente a B-Raf (Oshima *et al.*, 1993). Una vez activada B-Raf, ésta activa mediante fosforilación a las cinasas MEK1 y MEK2 iniciando así la vía de señalización MEK/MAPK (Figura 4).

En células PC12, para bloquear la activación de la vía MEK/MAPK inducida por Trk, se deben mutar simultáneamente los residuos Tyr490 y Tyr785 del receptor. Sin embargo, a pesar de la mutación en el residuo Tyr490 se ha observado la activación de las MAPK sugiriendo la participación de PLC γ como vía alterna (Stephens *et al.*, 1994). PLC γ se une al residuo Tyr785 del receptor TrkA a través de un dominio SH2, esta asociación provoca la fosforilación y la consecuente activación de PLC γ (Vetter *et al.*, 1991), una vez activada PLC γ degrada fosfolípidos de membrana para generar dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃). IP₃ se une a un receptor en el retículo endoplasmático induciendo la salida al citoplasma de iones Ca²⁺ (Berninger *et al.*, 1993), el DAG algunas veces, conjuntamente con el Ca²⁺ actúa como cofactor de la proteína cinasa C (PKC), la cual activa a Raf desencadenando la cascada MEK/MAPK.

La fosforilación y activación del factor transcripcional CREB también juega un papel crítico en la neurogénesis y diferenciación neuronal (Dworkin y Mantamadiotis, 2010) regulando la expresión de genes como: BDNF, c-fos y Arc (Ortega-Martínez, 2015). Varias cascadas de señalización convergen en la activación de este factor transcripcional incluyendo la participación de las proteínas cinasas C (PKC), cinasas A (PKA), cinasa-3 fosfatidilinositol (PI3K)/Akt y proteínas cinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMK).

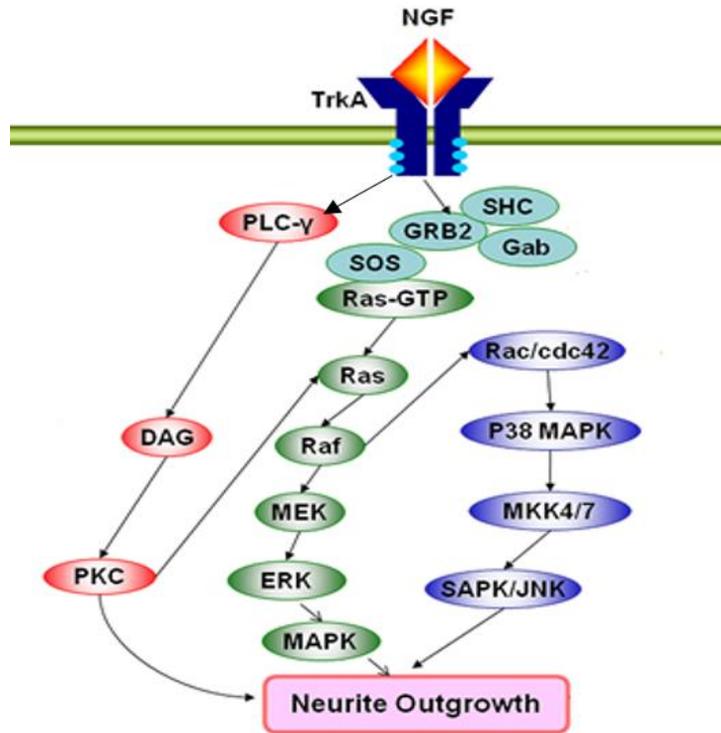


Figura 4. Vía MEK/MAPK activada por TrkA en la línea celular PC12, durante la diferenciación celular. La unión de NGF a su receptor TrkA hace posible la dimerización de éste y la activación de su capacidad tirosina-cinasa para unir moléculas señalizadoras con dominios SH2 encargadas de la propagación, como SHC. Estas moléculas se encargan de reclutar al complejo Grb2/Sos, Grb2 se une al factor intercambiador de nucleótidos de guanina y la proteína Sos facilita la activación de Ras para pasar de su forma inactiva (GDP) a la forma activa (GTP). La proteína Ras activada recluta y lleva a la membrana a la proteína serina/treonina cinasa Raf activándola. Raf fosforila a la proteína serina treonina cinasa MEK, la cual a su vez fosforila a la proteína serina/treonina cinasa ERK, ésta última proteína activa se transloca al núcleo. PLC γ también está implicada en la activación de las MAPK ya que se une al residuo Tyr785 del receptor TrkA a través del dominio SH2, lo que provoca la fosforilación y activación de PLC γ quien una vez activada degrada fosfolípidos de membrana para generar dos segundos mensajeros; diacilglicerol (DAG) y Ca²⁺, el DAG algunas veces conjuntamente con el Ca²⁺ actúa como cofactor de la proteína quinasa C (PKC), la cual activa a Ras desencadenando la cascada MEK/MAKP (Modificado de Nishimura *et al.*, 2008).

1.4.2 Moléculas que participan en el crecimiento neurítico en células PC12

La formación de neuritas involucra cambios coordinados entre el citoesqueleto de actina y la red de microtúbulos. La familia Rho de pequeñas GTPasas participa en la organización del citoesqueleto de actina y los subsecuentes cambios morfológicos en varios tipos celulares (Hall, 1998). La activación de la familia de proteínas Rho requiere cambios catalizados por factores de intercambio de nucleótidos-guanidina (GEFs) para pasar de su estado inactivo GDP a su estado activo GTP, su activación es regulada por proteínas activadoras GTPasas (GAPs) (Sasaki y Takai, 1998). Se han identificado 14 miembros de esta familia de proteínas: RhoA, B y C, Rac1, 2 y 3, Cdc42, Rnd1, 2 y 3, RhoD, TC10, RhoH/TTF y RhoG.

Estudios recientes han mostrado que las proteínas de la familia Rho (Rac y Cdc42) desempeñan un papel crítico en la regulación de los cambios en el citoesqueleto requeridos para el crecimiento de neuritas en respuesta al NGF en células PC12 (Chen *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 1998). En estas células, RhoG también desempeña un papel importante en el crecimiento de las neuritas a través de la activación de Rac1 y Cdc42 (Katoh *et al.*, 2000). Sin embargo el mecanismo involucrado en la regulación de la actividad de Rac y Cdc42 durante el crecimiento de neuritas en células PC12 no ha sido elucidado.

1.4.3 Neurosecreción en células PC12

Las células PC12 adquieren un fenotipo de neuronas tipo simpáticas en respuesta al factor de crecimiento nervioso (NGF), son capaces de sintetizar, almacenar y liberar por exocitosis catecolaminas, principalmente dopamina y noradrenalina, las cuales son liberadas bajo depolarización dependiente de Ca^{2+} (Greene y Rein, 1977). Estas células presentan dos tipos de vesículas secretoras; vesículas de núcleo denso (*large dense core vesicle*, LDCV) y microvesículas tipo sinápticas (*synaptic-like microvesicle*, SLMV). Las LDCV contienen catecolaminas, su tamaño varía entre 40 a más de 100 nm y tienen una característica de núcleo denso, probablemente debido a su contenido de proteínas (Kelly, 1991; Trimble *et al.*, 1991). Estos gránulos tienen una distribución en el citoplasma, en terminales nerviosas, en el cuerpo celular y dendritas pero no en la misma densidad como las vesículas sinápticas clásicas, este tipo de vesículas son equivalentes a los gránulos secretores de células endocrinas. El otro

tipo de vesículas en células neuroendócrinas, las SLMV, almacenan acetilcolina (Greene y Tischler, 1976; Travis y Wightman, 1998), son similares a las vesículas sinápticas (*small synaptic vesicles*, SSV) de neuronas, tienen un tamaño entre 40 a 50 nm y están localizadas muy cerca de la membrana presináptica (Südhof y Jahn, 1991; Edwards, 1992).

LDCV y SSV difieren con respecto a la composición de su membrana y contenido. LDCV como gránulos cromafines de la medula adrenal son caracterizados por una variedad de proteínas integrales de membrana como citocromo b561 y dopamina-p-hidroxilasa (Winkler, 1990). La composición membranal de las SSV comprende proteínas integrales de membrana como sinaptofisina, proteínas SV-2, sinatotagminas y proteínas asociadas, entre ellas las sinapsinas y las proteínas pequeñas de unión a GTP como Rab3a (Südhof, 1991).

2. Proteómica

El término “proteoma” fue utilizado por primera vez en 1994 para describir al conjunto de proteínas de un genoma, proveniente de un sistema biológico (Wilkins, *et al.*, 1995). La descripción del proteoma permite tener una imagen de todas las proteínas expresadas en un momento dado y bajo determinadas condiciones. La palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina: la proteómica, la cual se encarga de identificar el conjunto de proteínas expresadas de un genoma. Este término se ha asociado con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2DE, entre otras tecnologías. La 2DE combinada con la identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS) es actualmente una de las herramientas más utilizadas en proteómica (Lahm y Langen, 2000).

2.1 Herramientas de la proteómica

2.2.1 2DE

La 2DE permite separar miles de proteínas en un solo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas. Esta tecnología se basa en la separación de proteínas en función de su punto isoeléctrico (pI) o de la carga neta, seguida de una separación en función de su masa molecular (O’Farrell, 1975; Görg *et al.*, 2004). La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF), durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, es decir, su pI. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (PAGE-SDS) (Figura 5). La alta resolución de esta técnica se basa en que los dos métodos de separación utilizan parámetros independientes, con los cuales se crea un mapa de proteínas que refleja cambios en los niveles de expresión, isoformas o modificaciones post-traduccionales. Una de las ventajas de esta metodología es la capacidad de estudiar modificaciones post-traduccionales tales como fosforilaciones, glucosilaciones o proteólisis, ya que estas modificaciones hacen que las proteínas aparezcan en distintos puntos ya sea por variaciones del pI (eje horizontal) o variaciones de la masa molecular (eje vertical) (Jensen, 2000).

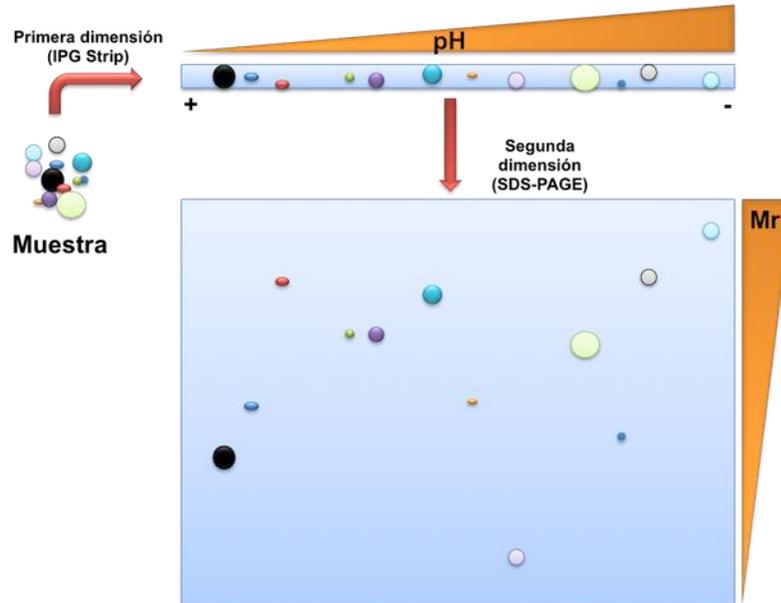


Figura 5. Representación esquemática de una electroforesis bidimensional. La muestra es separada en una primera dimensión (IEF) en función de su pI y en una segunda dimensión (PAGE-SDS) en función de su peso molecular. (Tomado de www.proteomeplus.wordpress.com).

Para la visualización de las manchas correspondientes a las proteínas existen varios métodos de tinción, los cuales difieren principalmente en el grado de sensibilidad (límite de detección) y la compatibilidad con el procesamiento posterior por MS. Entre las tinciones de proteínas más utilizadas se encuentran: la tinción con plata la cual es muy sensible y debe ser compatible con el tratamiento para MS; la tinción con colorantes fluorescentes (Cy3, Cy5, Sypro Ruby, etc.) presenta buena sensibilidad y compatibilidad con MS pero la extracción de las manchas diferenciales es laboriosa y el equipo necesario para su lectura es muy costoso; la tinción con “Coomasie Brilliant Blue” coloidal, aunque con menor sensibilidad tiene la ventaja de ser muy reproducible y compatible con MS.

La aplicación principal de la 2DE es la proteómica de expresión ya que la expresión de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma semicuantitativa. La aparición o desaparición de manchas nos proporciona información sobre la expresión diferencial de proteínas y la intensidad de las manchas permite conocer los niveles de expresión.

2.2.2 MS

El desarrollo rápido de la proteómica ha sido posible gracias al progreso en la instrumentación analítica, especialmente en MS, técnica que debido a su rapidez y elevada sensibilidad se ha convertido en el mejor método de identificación de proteínas a gran escala, este método también permite la caracterización de modificaciones post-traduccionales que presentan relevancia fisiológica, tales como la glucosilación y la fosforilación. Para analizar las proteínas por MS éstas deben ser convertidas a péptidos mediante proteólisis, que generalmente se realiza usando tripsina.

La MS se basa en la producción de iones en fase gaseosa de una mezcla de biomoléculas y la separación de los mismos en un analizador de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Para lograr la formación, separación y detección de estos iones, los espectrómetros de masas están formados por una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga de los iones en fase gaseosa así como de un procesador que registra los resultados. En el análisis por ionización/desorción láser asistida por una matriz acoplada a un detector por tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS), los péptidos generados por digestión con tripsina se ionizan por aplicación de un rayo láser que incide en la matriz en la que se depositan las muestras, los iones generados viajan a diferente velocidad (dependiendo de su masa) hacia un sistema detector, sitio del MS en el cual se registran tanto el tiempo de vuelo como la carga de los iones y esto permite generar los patrones espectrales de los péptidos. En el análisis por LC-ESI-MS/MS, se establece una interface entre un cromatógrafo de líquidos y un espectrómetro de masas, una muestra líquida previamente digerida y separada en una nano columna cromatográfica, al salir de ésta se aplica alto voltage y se forma un aerosol produciendo una nube de microgotas con múltiples iones cargados (electrospray ionization, ESI), el solvente se evapora y los iones son liberados hacia el analizador de masas acoplado en tándem (MS/MS); las cargas de los iones se detectan, registran y generan los espectros.

2.2.3 Bioinformática

Los datos generados en un espectrómetro de masas son visualizados en forma de picos, a la representación gráfica de estos se les denomina espectro de masas. Existe una

amplia variedad de plataformas informáticas que usan los datos de MS para identificar proteínas a partir de las secuencias primarias generadas por digestión *in silico*, que se encuentran en las bases de datos. En la actualidad se cuenta con bases de datos en las cuales es posible identificar rápidamente un gran número de proteínas con gran precisión, la única limitante es que la proteína caracterizada no hubiera sido identificada previamente y no haya registro de ella o porque el genoma (o al menos el transcriptoma) del organismo en estudio no haya sido reportado. Las bases de datos más empleadas actualmente se representan en la tabla 1. Las bases de datos como Mascot y Profound permiten evaluar la similitud entre los valores *m/z* de los espectros de masas obtenidos y los teóricos, asignando una puntuación, valor probabilístico o *score* estadístico que indica la correlación entre los valores experimentales y los teóricos (Cottrell J. S. y London U., 1999).

Tabla 1. Bases de datos más utilizadas para la identificación de proteínas

Base de datos	Características
ProFound	Peptide mass fingerprinting y secuenciación. Considera propiedades de la proteína, y preparación de la muestra. Calcula peso molecular, pI, etc.
MOWSE	Peptide mass fingerprinting y secuenciación.
MASCOT	Mapeo de masa de péptidos y secuenciación (uninterpreted MS/MS).
SEQUEST	Secuenciación (uninterpreted MS/MS).
FindMod	Modificaciones post-traduccionales.
FASTA	Base de datos de proteínas y nucleótidos.

2.2 Análisis proteómico en células PC12

Diversos análisis proteómicos se han realizado para explorar el mecanismo molecular por el cual la línea celular PC12 adquiere el fenotipo neuronal en respuesta a NGF (Huang *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009). Se ha demostrado que el crecimiento neurítico inducido por NGF en estas células altera la expresión del 10% de las proteínas después de cuatro días de tratamiento con NGF; 11 proteínas disminuyen y 26 incrementan de un total de 425 proteínas analizadas, donde la proteína más altamente regulada

corresponde a un fragmento derivado de cromogranina B de 43 kDa con un incremento en sus niveles de expresión de 200% (Huang *et al.*, 2001). Posteriormente mediante la utilización de 2DE y MALDI-TOF/TOF/ MS se generó una base de datos del proteoma de PC12 identificando un total de 1080 proteínas con alta confianza (Yang *et al.*, 2006). Por otra parte, mediante el uso de una estrategia de proteómica secuencial donde se combinaron diversos sistemas de proteómica de expresión diferencial y cuantitativa acoplada a LC-MS en tándem y pruebas bioquímicas y moleculares, se pudieron identificar 1482 proteínas, entre las cuales se encontraron algunas altamente reguladas relacionadas con diferenciación celular como son la proteína neurosecretora de VGF, neuromodulina, cromogranina A, anexina A2, periferina, MAP1B, AHNAK y secretogranina 2 (Kobayashi *et al.*, 2009).

3. Justificación

Se ha demostrado que las isoformas de la Dp71 (Dp71a, Dp71ab y Dp71e) desempeñan un papel importante en la diferenciación neuronal y que la expresión de una mutante de distrofina denominada Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ estimula la diferenciación inducida por NGF en células PC12. Sin embargo, se desconocen los mecanismos por los que dicha mutante promueve la diferenciación, por lo que comparar el proteoma de células PC12 no diferenciadas y diferenciadas expresando o no la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, nos permitiría identificar proteínas diferencialmente expresadas y aportar conocimientos relevantes sobre su participación en este proceso. Además, conocer el papel que tienen estas proteínas ayudaría a comprender como ocurre el proceso de diferenciación neuronal debido a la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

4. Hipótesis

La expresión constitutiva de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ podría modificar el perfil de expresión de proteínas que participen en el proceso de diferenciación neuronal de la línea celular PC12.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Identificar por análisis proteómico a las proteínas cuya expresión se modifique durante el proceso de diferenciación neuronal en células PC12-C11.

5.1.1 Objetivos específicos

2. Analizar la expresión diferencial de proteínas durante el proceso de diferenciación neuronal en células PC12-C11 por medio de 2DE.
3. Identificar las proteínas cuya expresión se modifique sustancialmente, durante el proceso de diferenciación de células PC12-C11 mediante MS.
4. Seleccionar a las proteínas con relevancia biológica.
4. Validar el cambio en el nivel de expresión de las proteínas de interés biológico por Western Blot e inmunofluorescencia.
5. Elucidar si alguna de las proteínas con expresión diferencial tiene relación directa con la estimulación de la diferenciación observada en las células PC12-C11.

6. Materiales y métodos

6.1 Cultivo celular y diferenciación

Las células PC12-C11 y PC12 fueron crecidas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero de caballo y 5% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 1 mg/ml de estreptomina y 0.25 µg/ml de micostatina a 37°C en una atmosfera conteniendo 5% CO₂. La diferenciación de las células fue inducida por la adición de 50 ng/ml de NGF (Invitrogen) al medio de cultivo diluido 1:10 durante un periodo de 6 días, con cambio de medio cada 3 días. Las células fueron cultivadas a 60-80% de confluencia en cajas de 100 mm de diámetro pre-tratadas con colágena para la obtención de extractos proteicos y con Poly-L-lisina (100 µg/ml) para los ensayos de inmunofluorescencia.

6.2 Obtención de extractos totales de proteínas

Las células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas y diferenciadas fueron removidas de las cajas de cultivo, empastilladas a 7,000 rpm durante 5 minutos a 4°C, lavadas en PBS y sonicadas en 200 µl del buffer de lisis [urea 7M, tiourea 2M, 4% de CHAPS, 2% de un buffer de gradiente de pH inmovilizado (IPG), pH 3-10 No Lineal (NL), 40 mM de DTT], suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, Inc.) con las siguientes condiciones: 50% de amplitud y ciclos de 15 segundos seguidos de 30 segundos de descanso durante 2:30 minutos. Las proteínas obtenidas fueron precipitadas por la adición de acetona fría durante toda la noche a -20°C, la pastilla obtenida fue resuspendida en el buffer de hidratación (urea7M, tiourea2M, 2% de CHAPS, 2% de Buffer IPG, pH 3-10 NL, DTT 40 mM) suplementada con inhibidores de proteasas. Para eliminar las sustancias que pudieran interferir con el IEF las muestras obtenidas se limpiaron utilizando el kit comercial 2-D Clean-Up (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para determinar el estado de fosforilación, los extractos de proteínas totales fueron obtenidos con las mismas condiciones de sonicación mencionadas anteriormente empleando el buffer de lisis (Tris HCl 20 mM pH 7.8, EDTA 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, Na₃CO₄ 1 mM, pirofosfato de sodio 10 mM) suplementado con el inhibidor de fosfatasa NaF 11

mM y un coctel de inhibidores de proteasas (Complete, Roche, Inc.). La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford.

6.3 Análisis proteómico

6.3.1 2DE

Para el análisis proteómico diferencial se utilizó el análisis de proteínas mediante 2DE. Para la primera dimensión, 200 µg de proteína en buffer de hidratación complementado con 0.05% de azul de bromofenol fueron utilizados para rehidratar tiras prefabricadas IPG pH 3-10, No lineal, 7cm (GE Healthcare) durante 16 h a temperatura ambiente (Ta). La primera dimensión se corrió en un equipo Isoelectric Focusing System Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare). Las condiciones de corrida del IEF siguieron un incremento de voltaje en cuatro pasos: 300 V (200 Vh), gradiente lineal de 1000 V (300 Vh), gradiente lineal a 5000 V (4500 Vh) y finalmente a 5000 V (2000 Vh). Para correr la segunda dimensión (PAGE-SDS), después del IEF, las tiras fueron tratadas en buffer de equilibrio (urea 6 M, 30% v/v de glicerol, 2% w/v de SDS, 75 mM de Tris-HCl, pH 8.8, 1% w/v de DTT y 0.002% w/v de azul de bromofenol,) por 15 minutos, seguido de un segundo tratamiento en el mismo buffer donde el DTT fue reemplazado por 2.5% w/v de yodoacetamida durante el mismo tiempo.

Después de equilibrar las tiras, las proteínas se separaron en segunda dimensión por PAGE-SDS al 12% utilizando el sistema Mini-Protean Tetra system (BIO-RAD) a 80 V por 3 h. Tras la segunda dimensión, las proteínas fueron teñidas con Bio-Safe Coomassie Stain (BIO-RAD) una tinción compatible con MS, siguiendo el manual que proporciona el fabricante. Los experimentos fueron realizados utilizando cuatro réplicas biológicas independientes (mediciones paralelas de muestras que determinan la variabilidad biológica de un organismo obtenidas en las mismas condiciones) para células PC12-C11 y PC12 diferenciadas y no diferenciadas.

6.3.3 Análisis de imágenes

Los perfiles proteicos de cada muestra fueron escaneados utilizando el Gel Doc™ EZ Imager (BIO-RAD). Para evaluar la expresión diferencial de las proteínas, las imágenes

digitalizadas fueron analizadas utilizando el software ImageMaster 2D versión 6.0 (GE Healthcare), siguiendo el manual del fabricante. Las manchas de proteínas presentes en cada gel fueron detectadas e igualadas automáticamente entre los geles a comparar. Este proceso requiere adicionalmente una revisión manual y en ocasiones la edición y corrección de alguna de las manchas obtenidas automáticamente. El porcentaje del volumen para cada mancha detectada fue determinado por el software. Para el análisis de expresión diferencial el porcentaje del volumen de cada mancha detectada fue analizado aplicando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar el porcentaje volumen para cada mancha entre las células PC12-C11 y PC12 y así seleccionar las manchas con expresión diferencial. Se consideró estadísticamente significativo un valor de P menor o igual a 0.05 y un cambio mayor a 1.5 veces en los niveles de expresión.

6.4 Identificación de proteínas

6.4.1 Digestión enzimática de las proteínas de interés

Las manchas proteicas que mostraron un cambio mayor a 1.5 veces fueron escindidos manualmente de los geles 2DE, y colocadas en solución de lavado [50% (v/v) etanol, 50 mM (v/v) ácido acético] hasta su completa destinción. Posteriormente fueron deshidratadas con 200 µl de ACN por 5 minutos y digeridas durante toda la noche con 200 ng de tripsina (G-biosciences) en NH₄HCO₃ 50 mM, ACN al 5%. Los péptidos fueron eluidos dos veces con 50% de ACN/ 0.1% de TFA. El volumen de péptidos obtenido fue secado al vacío y resuspendido en 30% de ACN/ 0.1% de TFA para el análisis por MS.

6.4.2 Análisis por espectrometría de masas

6.4.2.1 MALDI-TOF/TOF

Los péptidos eluidos fueron concentrados hasta un volumen aproximado de 2 µl y fueron cocristalizados en una placa de acero inoxidable en presencia de una solución de 5 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA) en 50% de ACN y 0.1% de Ácido Trifluoroacético (TFA). Posteriormente, las muestras fueron analizadas empleando un

espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 plus de ABSciex (Foster City, CA) o un Autoflex Speed MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) en modo de reflexión. Cada espectro de MS fue obtenido mediante un acumulado de 1000 disparos en un rango de masas de 850-4000 Da con una intensidad de láser de 3100. Se programó el equipo para seleccionar los 100 precursores más intensos con una mínima relación señal-ruido (S/N) de 20. Los iones de los precursores seleccionados fueron fragmentados activando la celda de colisión CID (Collision Induced Dissociation), y fueron adquiridos mediante un acumulado de 3000 disparos con una intensidad de láser de 3800. Los espectros de MS/MS generados se compararon a través del software MASCOT (MatrixScience) versión 2.5.1 contra una base de datos de *Rattus norvegicus* (descargada de NCBI, 216987 secuencias) usando el algoritmo MS/MS Ions Search. Los parámetros de búsqueda fueron:

- Enzima de corte: Tripsina.
- Modificaciones fijas: Carbamidometilación en Cisteínas.
- Modificaciones variables: Oxidación en Metioninas.
- Se usó la masa monoisotópica
- Tolerancia para los espectros de MS: 1 Da
- Tolerancia para los espectros de MS/MS: 0.5 Da
- Missed cleavages permitidos: 1

Puntuaciones de proteínas mayores a 37 para MALDI-TOF/TOF se consideraron significativas ($P \leq 0.05$).

6.4.2.2 LC-MS/MS

El análisis LC-MS/MS fue realizado con un equipo Ultimate3000 Nano HPLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado con una trampa de iones HCTultra (Bruker Daltonics). La separación LC fue preparada en una columna PepMap100 (0.075 mm ID, tamaño de partícula 3- μ m, 15 cm) a un flujo de 300 nL/min con un gradiente lineal desde 0% a 35% de 5% de H₂O, 95% de ACN, 0.1% de ácido fórmico por 35 minutos. Las proteínas fueron identificadas utilizando el servidor MASCOT (MatrixScience) utilizando la base de datos de *Rattus norvegicus* de SwissProt y TrEMBL. Los parámetros de búsqueda fueron:

- Enzima de corte: Tripsina.
- Modificaciones fijas: Carbamidometilación en Cisteínas.
- Modificaciones variables: Oxidación en Metioninas.
- Se usó la masa monoisotópica
- Tolerancia para los espectros de MS: 0.5 Da
- Tolerancia para los espectros de MS/MS: 0.5 Da
- Missed cleavages permitidos: 2

Al menos dos péptidos identificados con un puntaje de 31 para LC-MS/MS se consideraron significativos ($P \leq 0.05$).

6.5 Western Blot

Los extractos de proteínas totales de células PC12-C11 y PC12 diferenciadas fueron obtenidos como se describió previamente en el apartado 6.2. Se utilizaron 40 μ g de proteínas totales resuspendidas en buffer de muestra para electroforesis (50 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 2% de β -mercaptoetanol, 4% de glicerol, 0.1% de azul de bromofenol) y separadas electroforéticamente en PAGE-SDS al 12% en un sistema Mini-PROTEAN III (BIO-RAD), aplicando 80 V durante la migración de las proteínas por la porción concentradora del gel y 100 V en la porción resolutive del gel. La corrida se detuvo cuando el azul de bromofenol, llegó al final del borde inferior del gel. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa aplicando 400 mA durante una hora en una cámara de transferencia del sistema Mini-PROTEAN III (BIO-RAD), finalizada la transferencia las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 10% en TBST-1X (10 mM de Tris-HCl pH 7.8, 0.15 M de NaCl, 0.05% de Tween 20), durante 1 h a Ta. Posteriormente las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 2), diluidos en TBST-1X. Después de la incubación se realizaron 3 lavados con TBST-1X de 10 minutos cada uno, posteriormente la membrana fue incubada por 1 h a Ta con los anticuerpos secundarios IgG de cabra con especificidad anti-IgG de ratón (A10668, Molecular probes) 1:10000, o IgG de cabra con especificidad anti-IgG de conejo (A10547, Molecular probes) 1:10000, según fuera el caso. Transcurrida la incubación se realizaron 3

lavados más con TBST-1X de 10 minutos cada uno, las bandas fueron detectadas mediante el kit de luminiscencia Lightning Plus ECL (PerkinElmer, Inc.). Las imágenes fueron capturadas empleando el foto documentador Kodak Digital Science ID program. Para determinar la expresión relativa de cada proteína la imagen adquirida fue analizada densitométricamente con el software Image J (US National Institutes of Health). β -actina fue utilizada como control de carga. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.6 Inmunofluorescencia indirecta

Se cultivaron células PC12-C11 y PC12 en cajas de cuatro pozos de 13 mm con cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L-lisina y se diferenciaron durante seis días con NGF. Las células se fijaron con 300 μ l de metanol absoluto por 5 minutos y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos cada lavado. Se agregaron 300 μ l de la solución de bloqueo-permeabilización (Gelatina al 0.2% diluida en PBS + Tritón X-100 al 0.3%) y se incubaron a Ta durante 1 h. Se retiró la solución de bloqueo y se dio un lavado con PBS de 5 minutos. Se adicionaron 50 μ l del anticuerpo primario correspondiente diluido 1:200 en PBS: policlonal de conejo anti-HspB1 (ab12351, Abcam), anti-anexina A5 (ab14196, Abcam) y monoclonal de ratón anti-SYP (H-8, Santa Cruz). Se colocó un parafilm circular en cada uno de los pozos para que la solución del anticuerpo se distribuyera homogéneamente, el anticuerpo primario se dejó incubando toda la noche a 4°C. Una vez finalizada la incubación se retiró el anticuerpo primario y se dieron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Durante el tiempo de espera del primer lavado, se preparó la dilución de los anticuerpos secundarios: Alexa 488 vs ratón 1:200 y Alexa 594 vs conejo 1:200 (Molecular Probes, Invitrogen) y se centrifugó la solución de los anticuerpos a 12,000 rpm durante 10 minutos a Ta. Se cubrió la caja de las células con papel aluminio para protegerla de la luz y se agregaron 50 μ l de la solución de los anticuerpos secundarios diluidos (1:200) a cada uno de los pozos, colocando un parafilm circular para distribuir de manera homogénea la solución del anticuerpo secundario, incubándolo 1 hora a Ta. Las preparaciones se lavaron 3 veces con PBS 1X por 5 minutos cada lavado. Los núcleos se contra-tiñeron con DAPI (1 ng/ml, Sigma) por 5 minutos a Ta, se retiró el DAPI y se dieron 3 lavados de 5 minutos con PBS, finalmente se dio un último lavado de 5 minutos con agua bidestilada filtrada. El

montaje de las preparaciones se realizó en cubre objetos con una gota de medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc.) y éstos se sellaron colocando barniz de uñas alrededor de los cubre objetos. La inmunofluorescencia se visualizó mediante microscopía confocal (Leica TCS SP8); 15-20 Z- secciones ópticas de 0.3 a 0.5 μm de espesor fueron escaneadas para cada muestra a partir de tres experimentos independientes. Para cuantificar la señal fluorescente obtenida para cada proteína analizada (HspB1 y anexina A5) se tomaron 10 campos de cada uno de los tres experimentos a una amplificación de 40X. La intensidad de fluorescencia fue medida de acuerdo al número de pixeles por área utilizando el software LAS AF Lite. La intensidad de fluorescencia de todas las células presentes en cada campo fue promediada y graficada.

Tabla 2. Características de los anticuerpos primarios

Anticuerpo/Casa comercial	Proteína detectada	Dilución	Procedencia
Ab12351/Abcam	HspB1	1:200 WB 1:100 IF	Policlonal de conejo
Ab90537/Abcam	HspB1Ser82	1:100 IF	Policlonal de conejo
Ab17938/Abcam	HspB1Ser86	1:500 WB	Policlonal de conejo
Ab14196/Abcam	Anexina A5	1:200 WB 1:100 IF	Policlonal de conejo
Ab20245/Abcam	Secretogranina-2	1:200 WB	Monoclonal de ratón
Ab7255/Abcam	NF-L	1:5000 WB	Monoclonal de ratón
Ab41528/Abcam	TH	1:100 WB	Policlonal de conejo
Ab175394/Abcam	Aldosa reductasa	1:200 WB	Policlonal de conejo
Anti- β -actin/*	β -actin	1:200 WB	Monoclonal de ratón
sc H-8/Santa Cruz	Sinaptofisina	1:200 IF	Monoclonal de ratón

* Este anticuerpo fue donado por el Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV, México).

WB: Western Blot; IF: inmunofluorescencia.

6.7 Bloqueo inmunológico

Las células PC12-C11 y PC12 fueron crecidas a 70% de confluencia en cajas con colágena en presencia de NGF (50ng/ml), con NGF + anti-HspB1 (10 μ M del anticuerpo anti-HspB1 sc-1049) y NGF + vehículo (solución en el que está resuspendido el anticuerpo) durante 3 días. Los cambios morfológicos fueron observados utilizando el microscopio de contraste de fase Axiovert25 Zeiss a una amplificación de 40X. Durante los 3 días de cultivo, se tomaron 10 campos al azar de cada día de diferenciación monitoreado. Para cada grupo el porcentaje de células que presentaron neuritas mayores en longitud a 1 cuerpo celular fueron cuantificadas utilizando el software Image J (US National Institutes of Health). Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los niveles de HspB1 y pHspB1Ser86 fueron medidos por WB después del tratamiento, estos ensayos fueron realizados por duplicado.

6.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los ensayos de WB, de la cuantificación de intensidad de fluorescencia y del ensayo de bloqueo inmunológico fueron representados como el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado aplicando el test T de Student utilizando el software GraphPad Prism 5. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

7. Resultados

7.1 Obtención de proteínas para su análisis por 2D-PAGE y MS

Como un paso previo para realizar la extracción de las proteínas que se utilizarían para 2DE, primero se verificó la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en las líneas celulares PC12-C11 y PC12 no diferenciadas y diferenciadas, para esto 40 μ g de proteínas totales de cada una de las líneas celulares fueron cargadas en un PAGE-SDS al 10%, se realizó un WB para identificar el epítipo Xpress de la proteína recombinante Xpress-Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (Aragón *et al.*, 2011). Como se esperaba la expresión de la proteína mutante de distrofina sólo está presente en las células PC12-C11 (Figura 6).

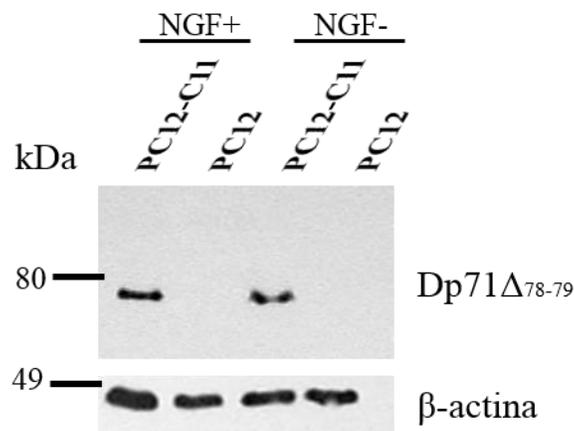


Figura 6. Expresión de la proteína recombinante Xpress-Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Extractos totales de proteínas de células PC12-C11 y PC12 diferenciadas (NGF+) y no diferenciadas (NGF-) fueron analizadas por WB utilizando un anticuerpo que reconoce el epítipo Xpress. Al lado izquierdo del gel se indica el marcador de peso molecular en kDa. β -actina fue utilizada como control de carga.

Una vez verificada la expresión de la proteína de interés se procedió a realizar una curva de crecimiento para monitorear el tiempo de replicación de las células PC12-C11 y PC12 y además, determinar la concentración de proteína obtenida respecto al número de células sembradas (Tabla 3). La curva de crecimiento mostró que el crecimiento de las células PC12-C11 es mayor comparado con las células PC12 desde el tercer día de crecimiento y

esto es más evidente al sexto día (Figura 7). Los resultados obtenidos sugieren que la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ altera el ritmo de crecimiento de las células PC12-C11.

Tabla 3. Concentración de proteína obtenida a partir de diferente número de células

No. de células	Concentración de proteínas			
	µg/µl		µg totales	
	PC12-C11	PC12	PC12-C11	PC12
300000	0.36	0.37	7.2	7.4
500000	0.60	0.62	12	12.4
1000000	1.20	1.24	24	24.8
2000000	2.41	2.49	48.2	49.8

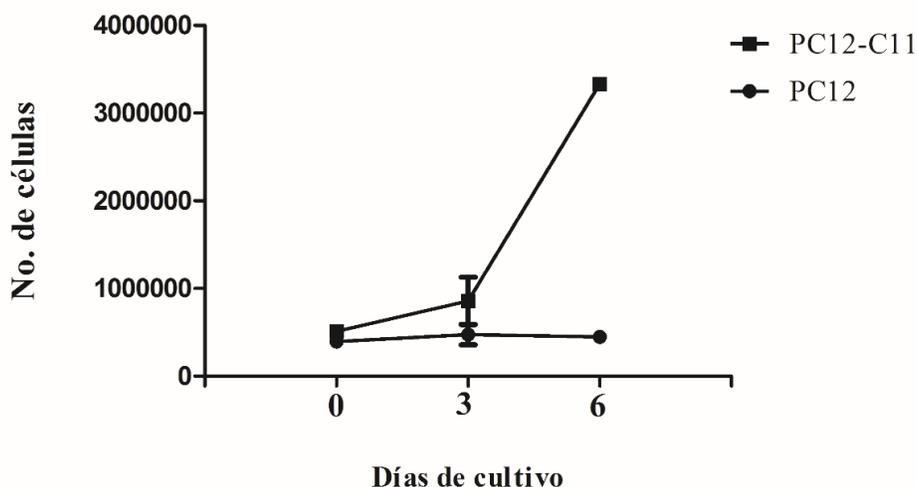


Figura 7. Curva de crecimiento de células PC12-C11 y PC12. 3×10^5 células PC12-C11 y PC12 fueron crecidas en medio DMEM. El medio fue cambiado cada tercer día y el número de células fue contado al tercer y sexto día de crecimiento. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes. En el eje de las X se representan los días de crecimiento y en el eje de las Y el número de células.

Para la obtención de proteínas de células no diferenciadas se sembraron 3 cajas p100 con 2.0×10^6 células PC12-C11 y 4 cajas p100 con 2.5×10^6 células PC12 por cada réplica biológica. Para la obtención de proteínas de células diferenciadas se sembraron 2 cajas p100 con 1.5×10^6 células PC12-C11 y 4 cajas p100 con 1.5×10^6 células PC12 por cada réplica biológica. Después de determinar el número de células requeridas para obtener los μg de proteínas necesarios para el IEF se procedió a realizar la extracción de las proteínas totales de las líneas celulares a analizar, como se describe en materiales y métodos. Una vez obtenidos los extractos proteicos, se cargaron 40 μg de cada extracto para verificar la integridad de cada una de las muestras obtenidas mediante PAGE-SDS al 10%. Se realizaron cuatro réplicas biológicas para cada condición; células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas y diferenciadas a los 6 días con NGF (Figura 8A y B). Como se puede observar la integridad de las proteínas de las muestras obtenidas fue buena. Para poder realizar el análisis de expresión diferencial y que este fuera comparativo, se normalizaron las muestras obtenidas por WB, cargando 40 μg de cada extracto proteico y utilizando como control de carga β -actina (Figura 8C y D).

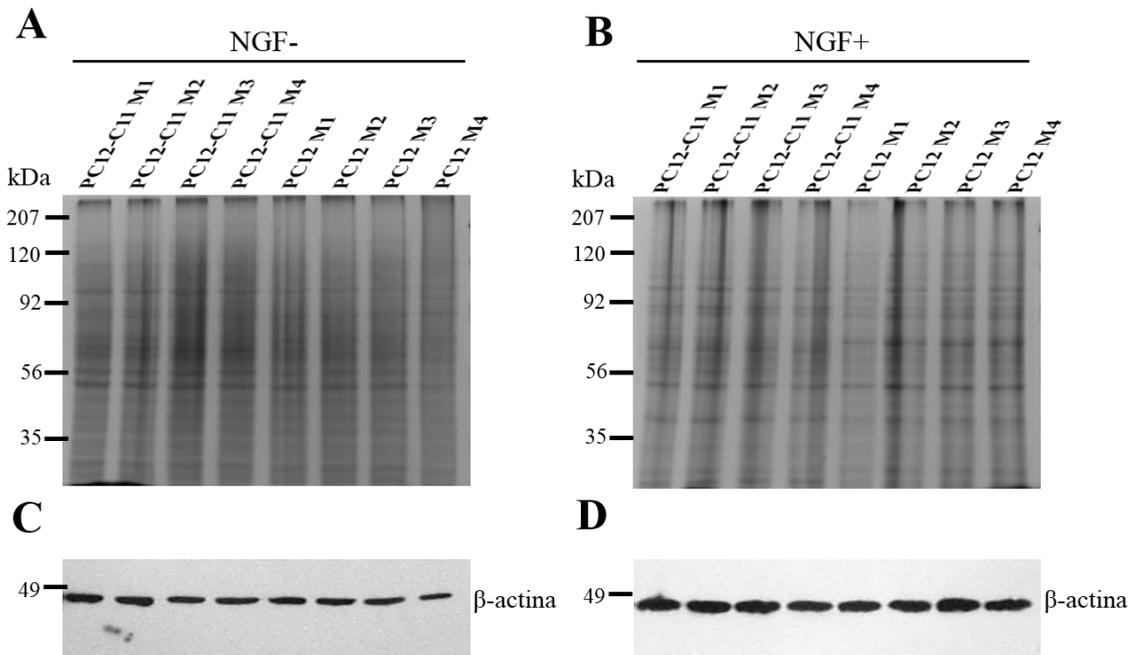


Figura 8. Integridad de los extractos de proteínas de las células PC12-C11 y PC12. A. Réplicas biológicas (M1-M4) de los extractos de células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas (NGF-). B. Réplicas biológicas (M1-M4) de los extractos de células PC12-C11 y PC12 diferenciadas (NGF+). C y D. Detección de β -actina utilizada como control de carga. Al lado izquierdo de cada imagen se indica el marcador de peso molecular en kDa.

7.2 Análisis proteómico

7.2.1 Perfil proteómico

Para poder realizar el análisis proteómico comparativo entre la línea celular PC12-C11 y PC12, se utilizaron geles de electroforesis bidimensional (2D-PAGE) para cada condición: cuatro réplicas biológicas para PC12-C11 (Figura 9) y cuatro para PC12 (Figura 10) sin diferenciar, lo mismo para los extractos proteícos de células diferenciadas a 6 días con NGF, cuatro para células PC12-C11 (Figura 11) y cuatro para células PC12 (Figura 12). Para rehidratar las tiras IPG (pH 3-10, NL, 7cm) se utilizaron 200 μ g de extractos totales de proteína de cada muestra y se separaron por 2DE, como se describe en materiales y métodos. Tras la tinción con Coomassie coloidal, se pudo observar una buena resolución de las

proteínas, ya que las manchas visualizadas en cada gel presentaron una buena separación a lo largo del gradiente de pH utilizado (pH 3-10), a pesar de que se utilizaron geles de 7cm. Para reducir las variables que pudieran influir en la obtención de un patrón proteico diferente entre cada réplica biológica, y cada condición a comparar, tanto la primera como la segunda dimensión fueron corridas al mismo tiempo en grupos de 8; las cuatro réplicas biológicas de PC12-C11 y PC12 no diferenciadas así como las muestras diferenciadas.

Antes de iniciar con el análisis de expresión diferencial, fue necesario evaluar la reproducibilidad de los perfiles proteicos obtenidos, para lo cual se comparó el total de manchas presentes en las réplicas biológicas en cada condición mediante el uso del software ImageMaster 2D Platinum versión 6.0.

Las imágenes de los 2D-PAGE de las cuatro réplicas biológicas obtenidas con el software ImageMaster 2D Platinum 6.0, fueron utilizadas para seleccionar la que presentó una mayor resolución de las manchas y con la cual se construyó un gel denominado gel maestro; las muestras se alinearon antes de realizar el apareamiento entre las tres réplicas y el gel maestro seleccionado. Las manchas presentes en cada réplica fueron detectadas automáticamente, el programa muestra las manchas que coinciden en verde y las que no coinciden en rojo (Figuras 13-16) y proporciona el valor de reproducibilidad expresado en %.

Para cada grupo de réplicas a comparar se eligió el gel bidimensional obtenido de la muestra uno (M1) como gel maestro, por mostrar la mayoría de las manchas detectadas una mejor visualización con respecto a las otras muestras. Para las réplicas biológicas de las células PC12-C11 y PC12 sin diferenciar el valor de reproducibilidad obtenido fue del 94.77% y 91.01%, respectivamente (Figuras 13 y 14). Para las réplicas biológicas de las células PC12-C11 y PC12 diferenciadas a 6 días con NGF el valor de reproducibilidad obtenido fue del 92.97% y 94.70%, respectivamente (Figuras 15 y 16). Los valores de reproducibilidad obtenidos fueron altos, arriba del 91%. Cabe mencionar que el software acepta valores de reproducibilidad arriba del 75%, lo que asegura un análisis de expresión diferencial confiable.

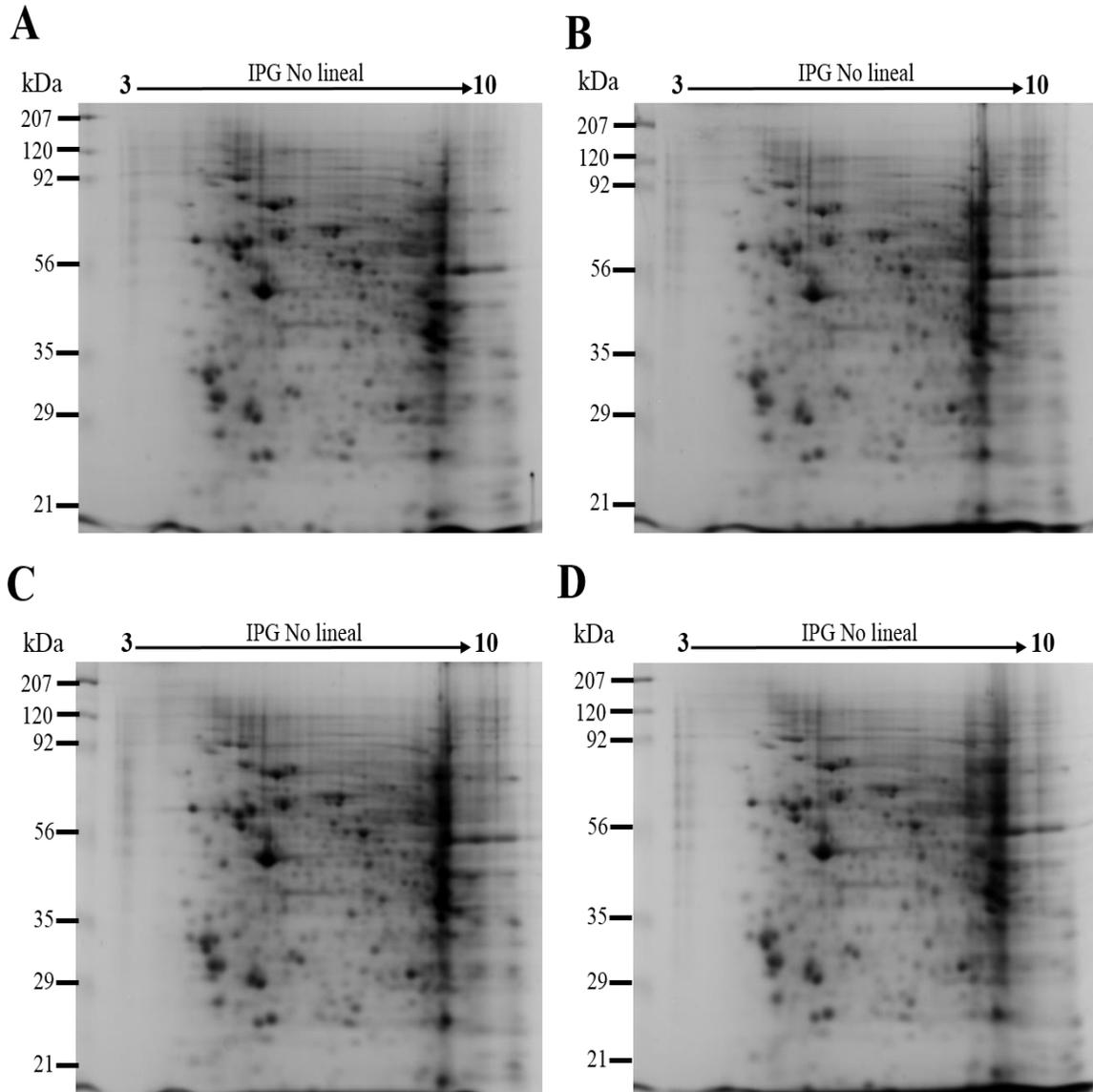


Figura 9. Perfiles proteómicos de células PC12-C11 no diferenciadas obtenidos por 2DE. 200 µg de proteínas totales fueron separados por IEF en un rango de pH de 3-10 NL y en geles PAGE-SDS al 12%. Los geles fueron teñidos con Coomassie Coloidal. A-D. Cuatro réplicas biológicas de células PC12-C11 no diferenciadas. La flecha indica el rango de gradiente de pH inmovilizado (IPG) utilizado. Al lado izquierdo de cada imagen se indica el marcador de peso molecular en kDa.

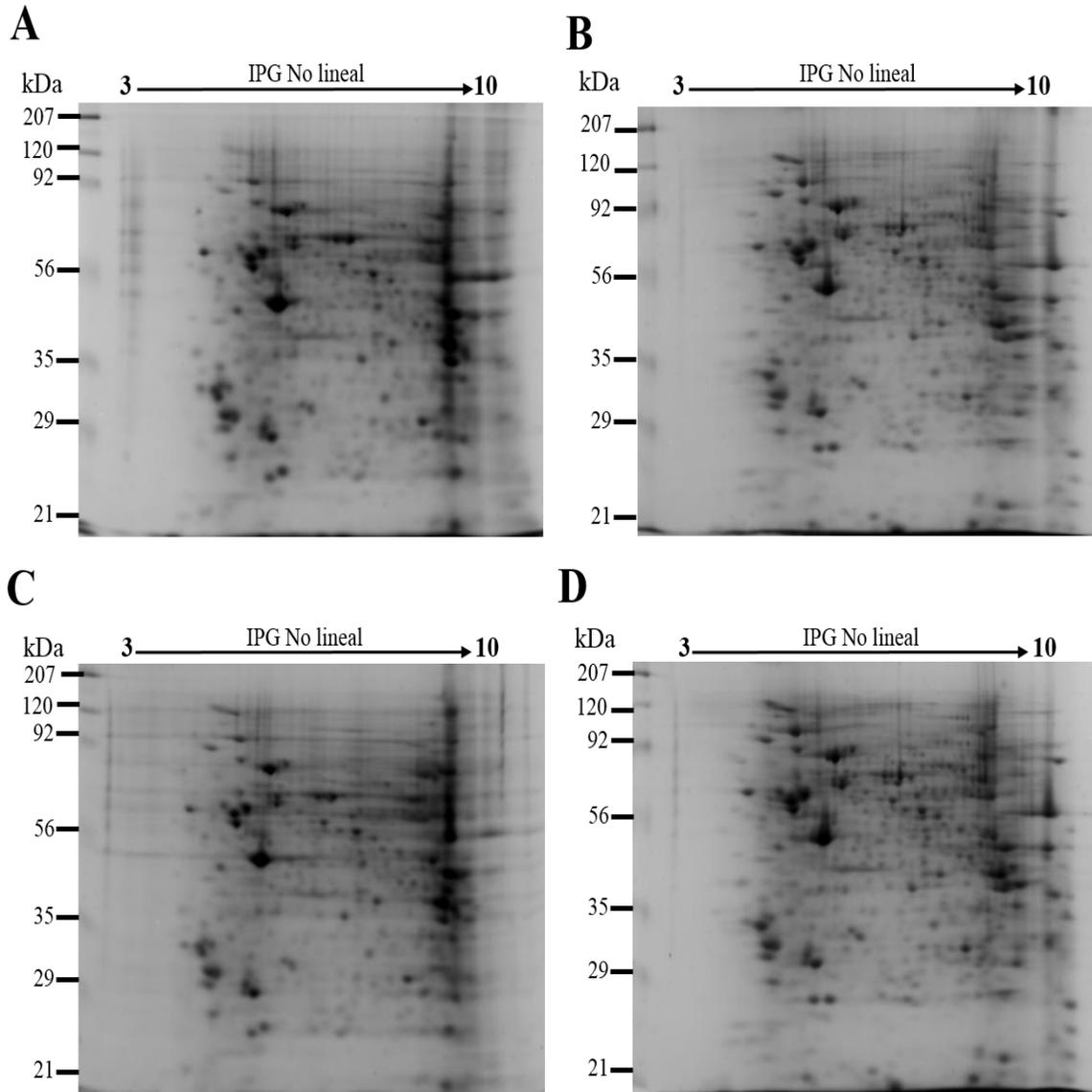


Figura 10. Perfiles proteómicos de células PC12 no diferenciadas obtenidos por 2DE. 200 μ g de proteínas totales fueron separados por IEF en un rango de pH de 3-10 NL y en geles PAGE-SDS al 12%. Los geles fueron teñidos con Coomassie Coloidal. A-D. Cuatro réplicas biológicas de células PC12 no diferenciadas. La flecha indica el rango de gradiente de pH inmovilizado (IPG) utilizado. Al lado izquierdo de cada imagen se indica el marcador de peso molecular en kDa.

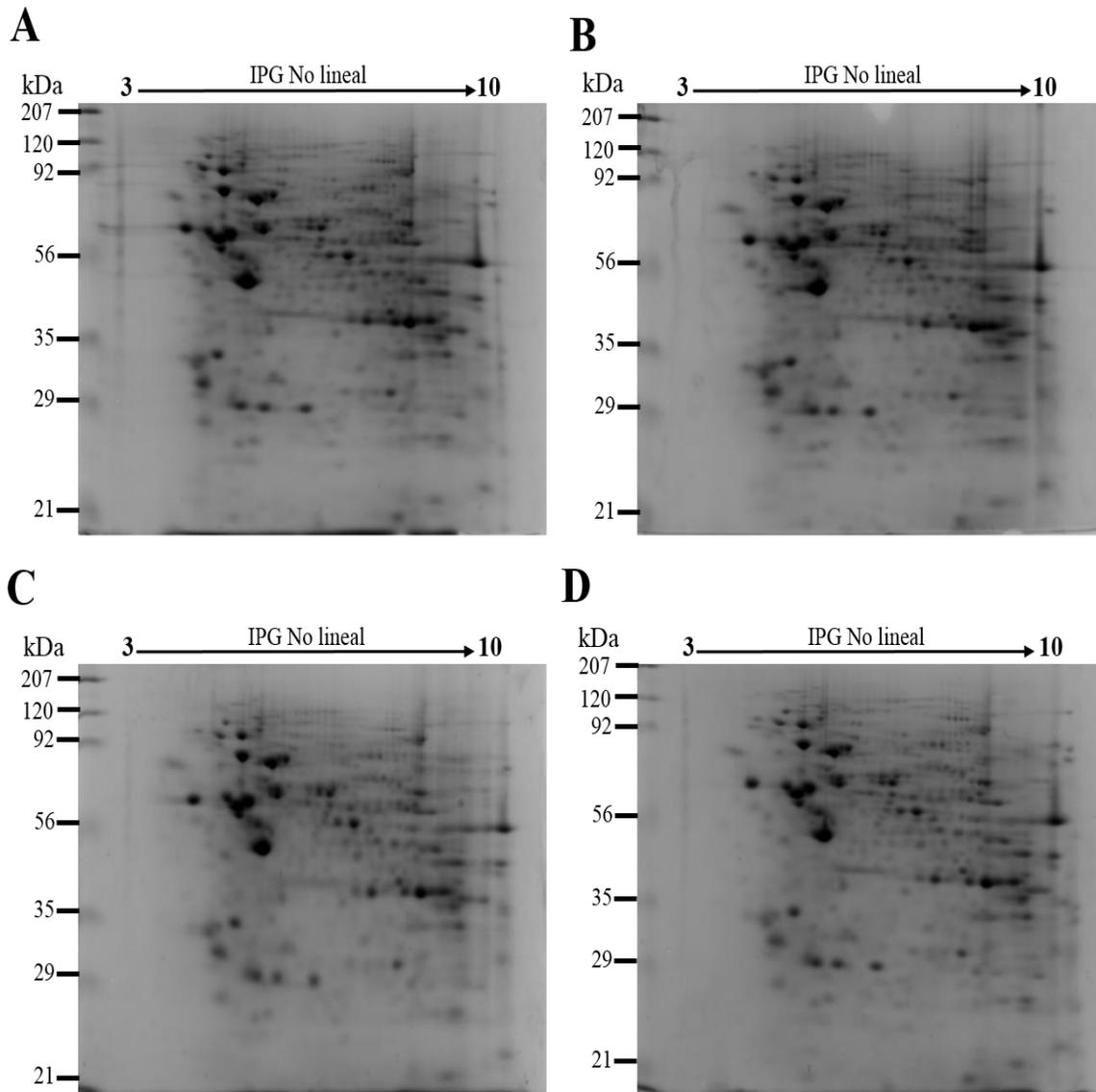


Figura 11. Perfiles proteómicos de células PC12-C11 diferenciadas obtenidos por 2DE. 200 μ g de proteínas totales fueron separados por IEF en un rango de pH de 3-10 NL y en geles PAGE-SDS al 12%. Los geles fueron teñidos con Coomassie Coloidal. A-D. Cuatro réplicas biológicas de células PC12-C11 diferenciadas a 6 días con NGF. La flecha indica el rango de gradiente de pH inmovilizado (IPG) utilizado. Al lado izquierdo de cada imagen se indica el marcador de peso molecular en kDa.

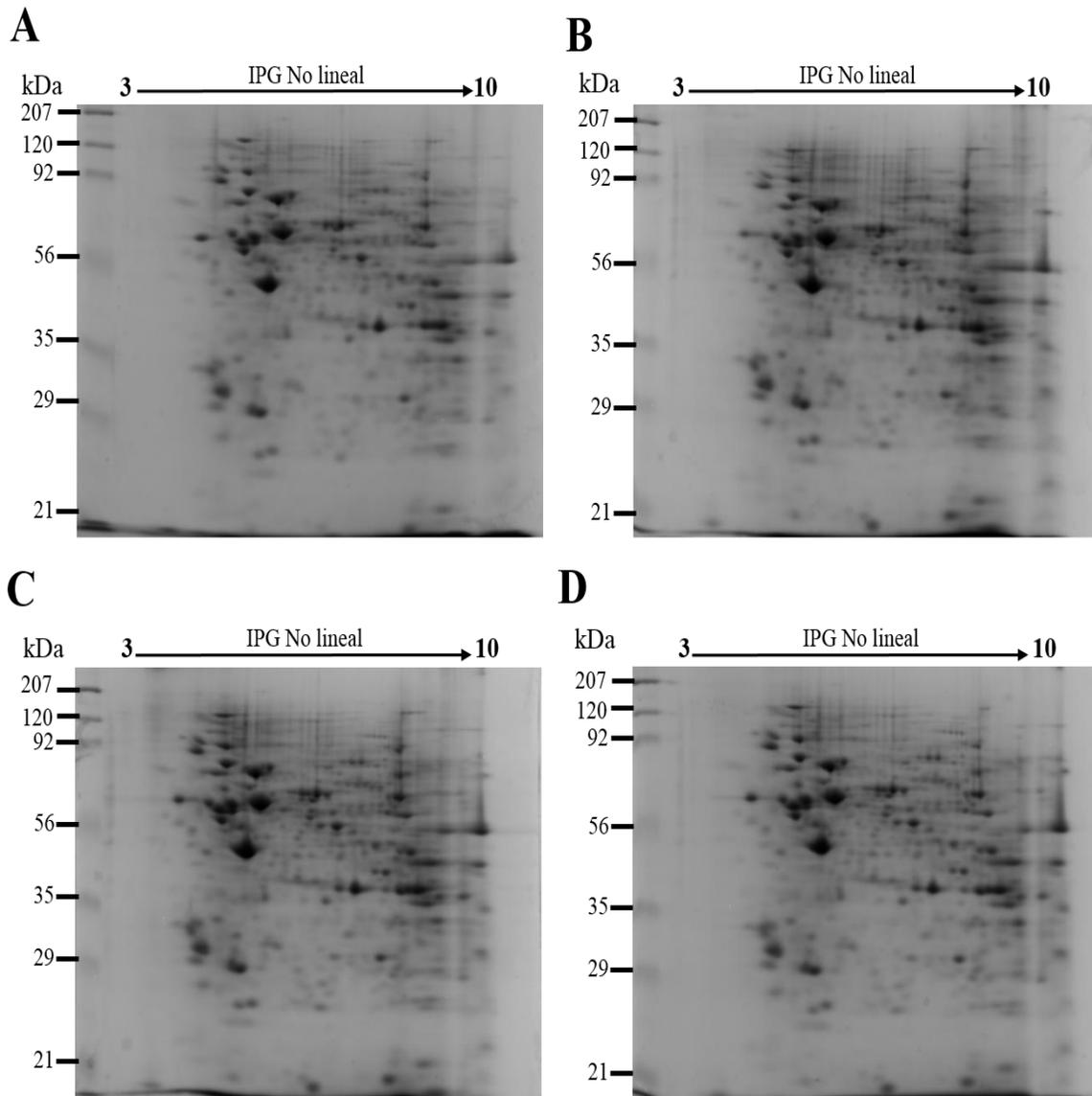


Figura 12. Perfiles proteómicos de células PC12 diferenciadas obtenidos por 2DE. 200 μ g de proteínas totales fueron separados por IEF en un rango de pH de 3-10 y en geles PAGE-SDS al 12%. Los geles fueron teñidos con Coomassie Coloidal. A-D. Cuatro réplicas biológicas de células PC12 diferenciadas a 6 días con NGF. La flecha indica el rango de gradiente inmovilizador de pH (IPG) utilizado. Al lado izquierdo de cada imagen se indica el marcador de peso molecular en kDa.

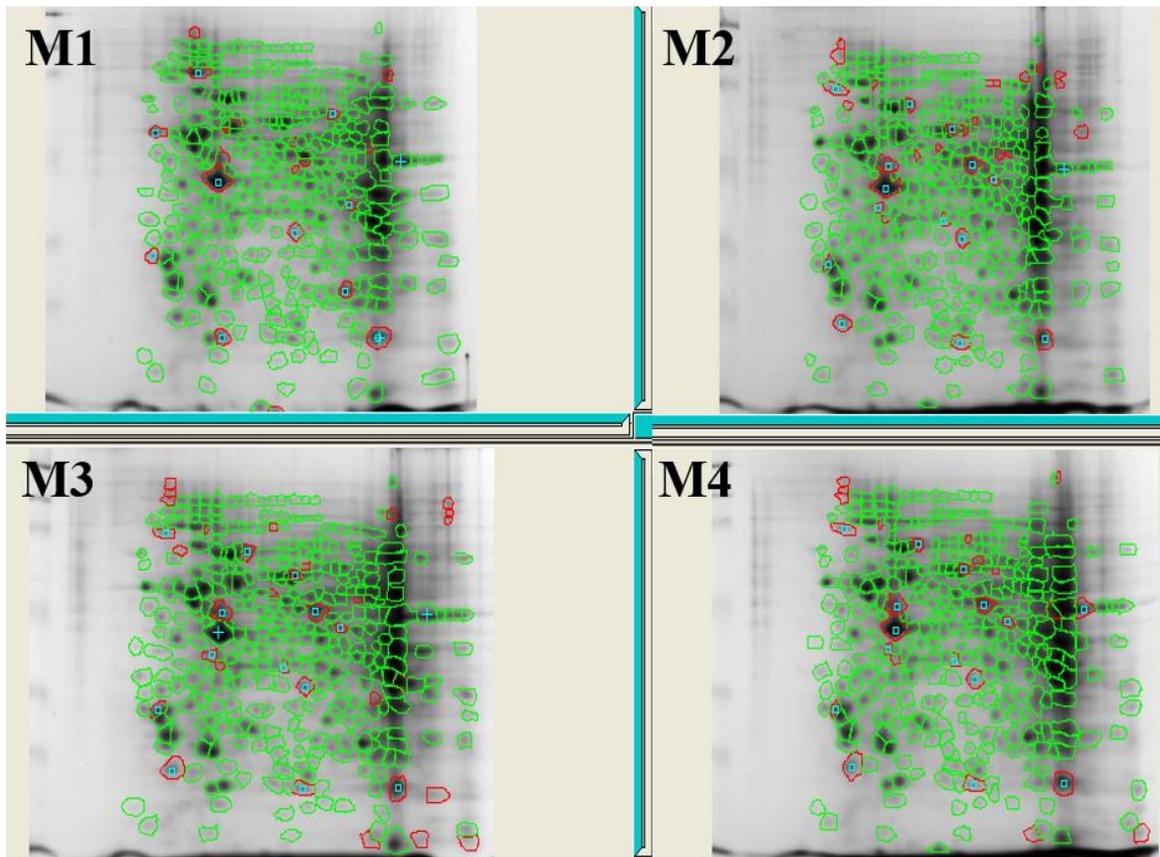


Figura 13. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12-C11 no diferenciadas. Las imágenes de los perfiles proteicos obtenidos por 2DE de las cuatro réplicas biológicas de células PC12-C11 mostradas en la figura 9 (M1-M4) fueron creadas utilizando el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. La imagen de la muestra 1 (M1) fue seleccionada como gel maestro porque la mayoría de las manchas de los 4 geles están representadas con un 94.77% de reproducibilidad. Los círculos verdes indican las manchas que coinciden con el gel maestro seleccionado (M1), los círculos rojos indican las manchas que no coinciden.

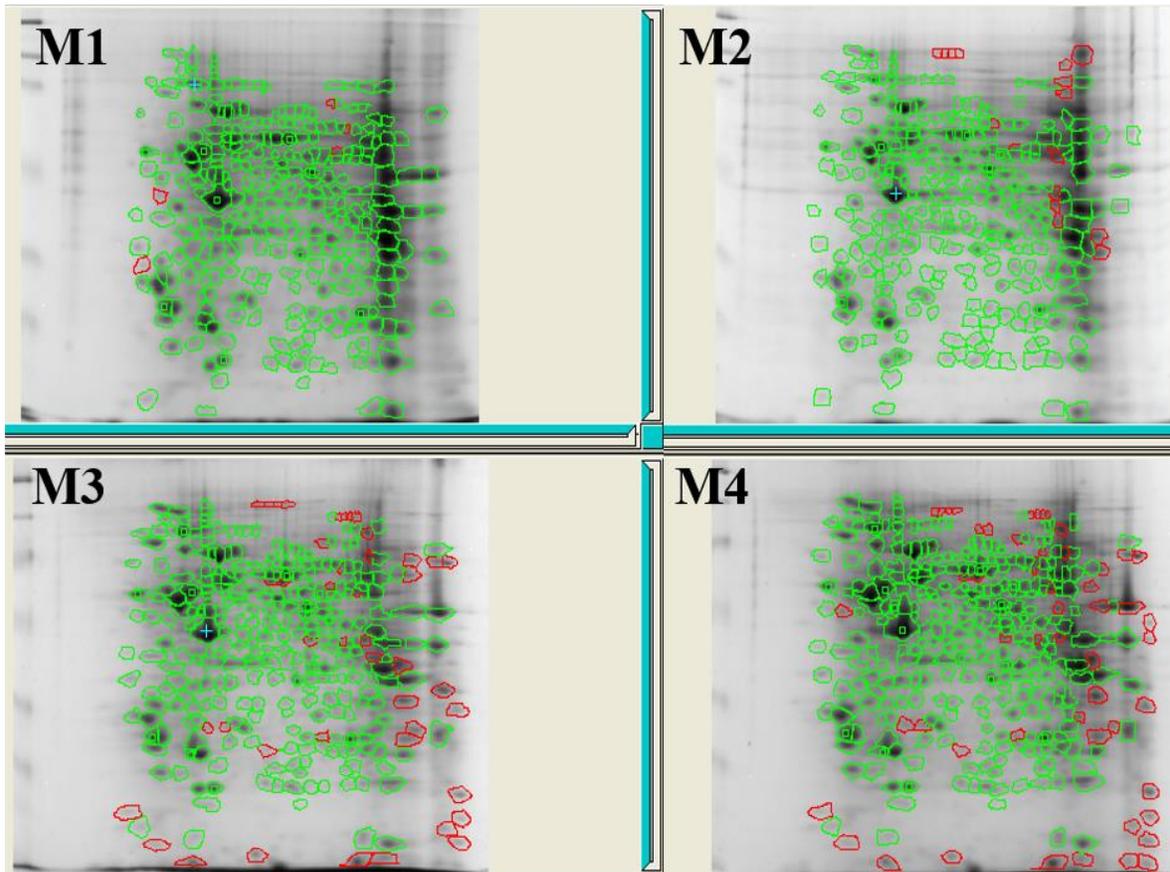


Figura 14. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12 no diferenciadas. Las imágenes de los perfiles proteicos obtenidos por 2DE de las cuatro réplicas biológicas de células PC12 mostradas en la figura 10 (M1-M4) fueron creadas utilizando el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. La imagen de la muestra 1 (M1) fue seleccionada como gel maestro porque la mayoría de las manchas de los 4 geles están representadas con un 91.01% de reproducibilidad. Los círculos verdes indican las manchas que coinciden con el gel maestro seleccionado (M1), los círculos rojos indican las manchas que no coinciden.

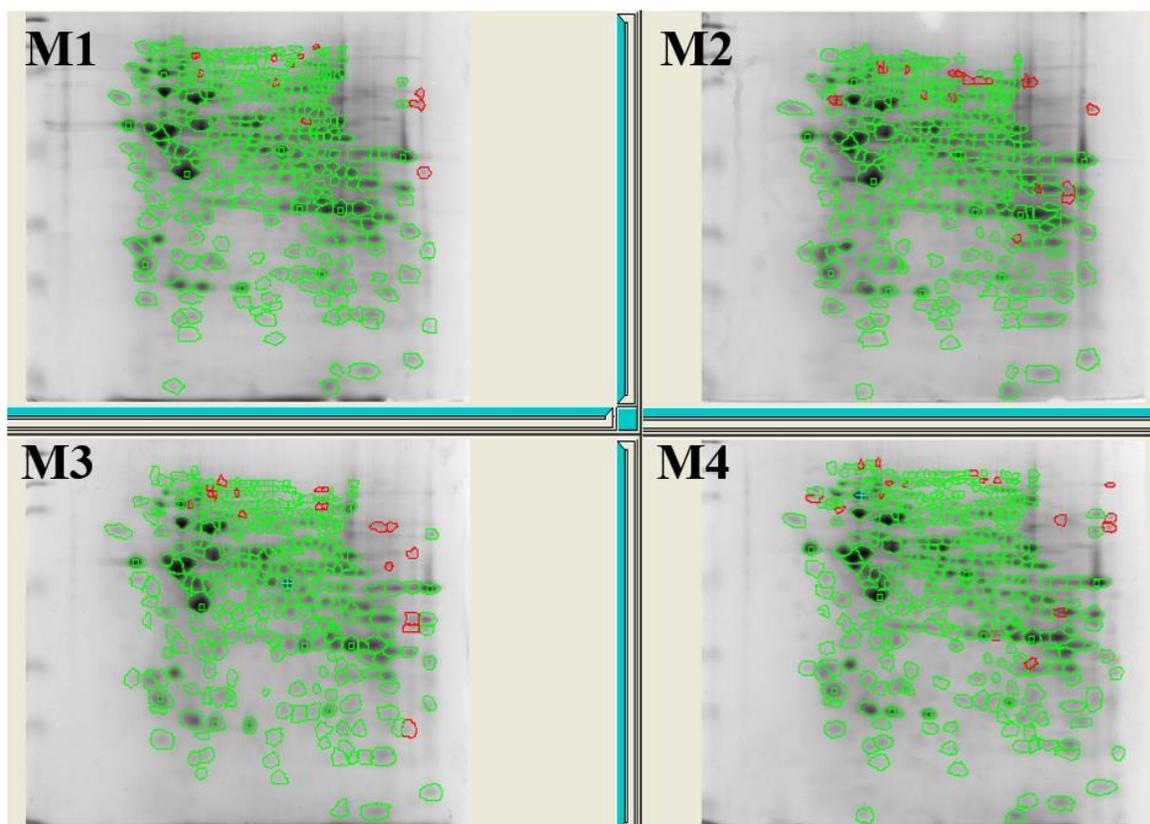


Figura 15. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12-C11 diferenciadas. Las imágenes de los perfiles proteicos obtenidos por 2DE de las cuatro réplicas biológicas de células PC12-C11 mostradas en la figura 11 (M1-M4) fueron creadas utilizando el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. La imagen de la muestra 1 (M1) fue seleccionada como gel maestro porque la mayoría de las manchas de los 4 geles están representadas con un 92.97% de reproducibilidad. Los círculos verdes indican las manchas que coinciden con el gel maestro seleccionado (M1), los círculos rojos indican las manchas que no coinciden.

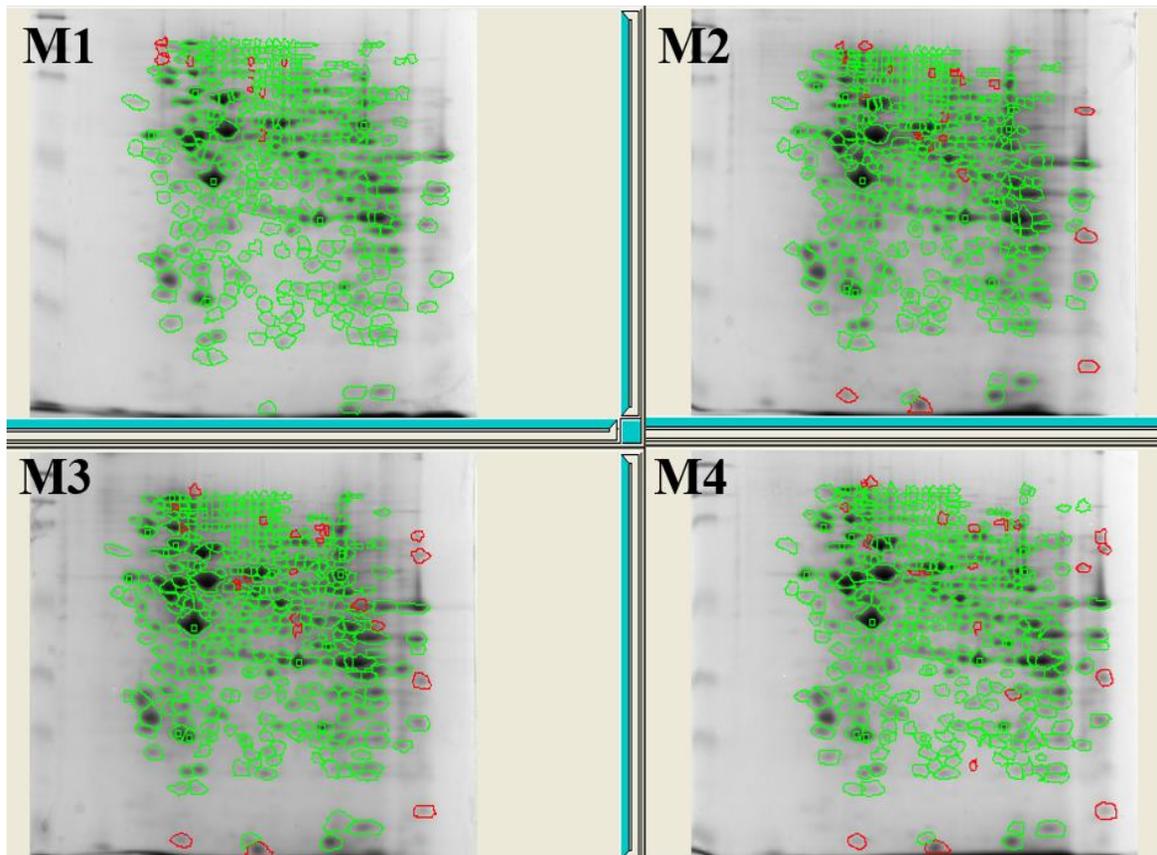


Figura 16. Análisis de los geles independientes utilizados para la elaboración del gel maestro de proteínas de células PC12 diferenciadas. Las imágenes de los perfiles proteicos obtenidos por 2DE de las cuatro réplicas biológicas de células PC12 mostradas en la figura 12 (M1-M4) fueron creadas utilizando el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. La imagen de la muestra 1 (M1) fue seleccionada como gel maestro porque la mayoría de las manchas de los 4 geles están representadas con un 94.70% de reproducibilidad. Los círculos verdes indican las manchas que coinciden con el gel maestro seleccionado (M1), los círculos rojos indican las manchas que no coinciden.

7.2.3 Determinación del perfil proteómico de expresión diferencial

Una vez determinado el valor de reproducibilidad de las réplicas biológicas, se realizó el análisis comparativo entre el perfil de expresión de las células PC12-C11 y PC12 sin diferenciar y diferenciadas para seleccionar aquellas manchas que disminuyeron o aumentaron su abundancia, en ambas condiciones. Para determinar la abundancia de las proteínas, el % volumen de cada mancha fue cuantificado y comparado utilizando el software ImageMaster 2D Platinum, las manchas que mostraron una variación de 1.5 veces o más fueron consideradas como expresadas de manera diferencial. Para trabajar con un conjunto de datos más representativos se incluyeron sólo aquellas manchas que presentaran un valor de $P \leq 0.05$ tras aplicar la prueba de Mann-Whitney utilizada por el software.

En células no diferenciadas se detectaron 323 manchas pero solamente cuatro de ellas mostraron un expresión diferencial, esto corresponde al 1.2% del total de las manchas analizadas (Figura 17A y B). Para poder apreciar los cambios en la expresión diferencial de las manchas seleccionadas en ausencia de NGF éstos se muestran en una vista ampliada (Figura 17C). Cabe resaltar que sin NGF, en las células PC12-C11 tres de las cuatro manchas seleccionadas mostraron mayor abundancia (N2-N4) y una mostró disminución (N1) (Tabla 5). En las células diferenciadas (en presencia de NGF), el % de las manchas con expresión diferencial fue mayor, de las 391 manchas detectadas el 4% de éstas, que corresponden a 15 manchas mostraron expresión diferencial, 8 de ellas exhibieron mayor abundancia (D1, D3, D6, D10-D14) y 7 la disminuyeron (D2, D4, D5, D7, D8, D9, D15) (Figura 18A y B, Tabla 5). Las manchas con expresión diferencial en presencia de NGF son representadas en una vista ampliada (Figura 18C). En la tabla 4, se representa el porcentaje de expresión diferencial obtenido para cada condición comparada. El % volumen obtenido de cada mancha con expresión diferencial en ambas condiciones fue graficado (Figura 19). En la tabla 4 se proporcionan los valores de % volumen utilizados para la elaboración de la gráfica, además del cambio en número de veces en la variación de la expresión de las manchas seleccionadas. Nuestros resultados indican que en células no diferenciadas cuatro manchas se expresan de manera diferencial mientras que en células diferenciadas 15 manchas presentan una expresión diferencial cuando la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ es expresada en células PC12.

Tabla 4. Valores de la expresión diferencial obtenidos entre los grupos comparados

Grupos comparados PC12-C11 vs PC12	Manchas detectadas	Expresión diferencial	% Expresión diferencial
No diferenciadas (N)	323	4	1.2
Diferenciadas (D)	391	15	4

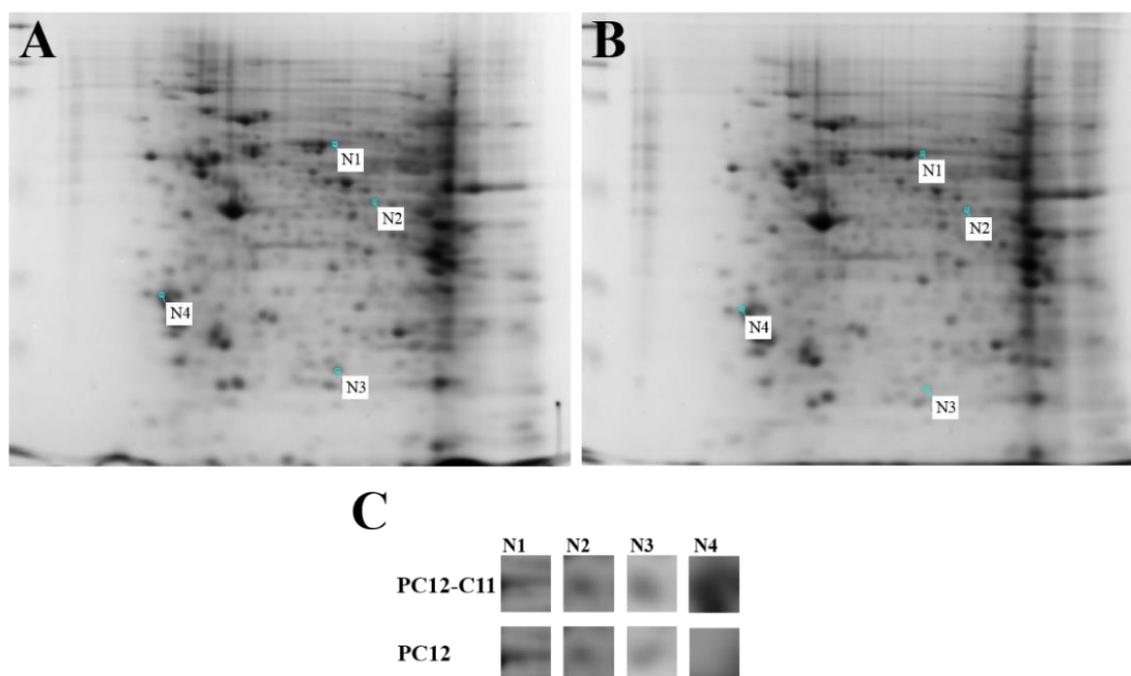


Figura 17. Expresión diferencial de proteínas de células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas. Comparación del perfil proteómico obtenido entre células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas con el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. N1 a N4 indican las manchas con expresión diferencial. A. Células PC12-C11. B. Células PC12. C). Vista ampliada de las manchas expresadas diferencialmente.

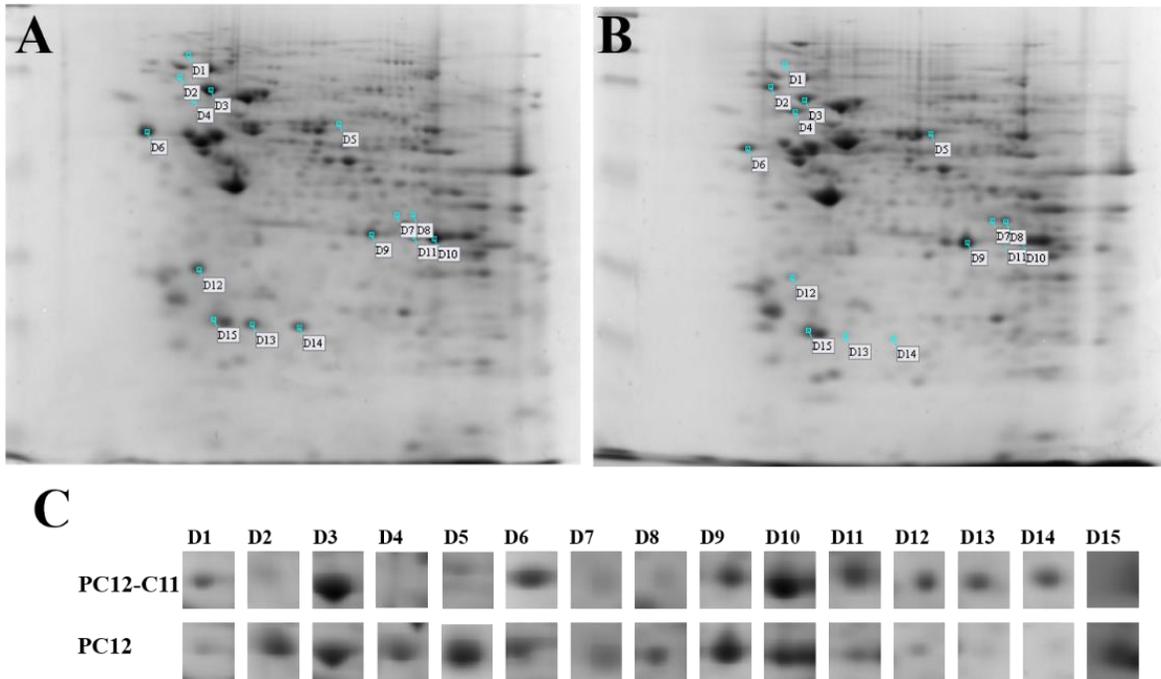
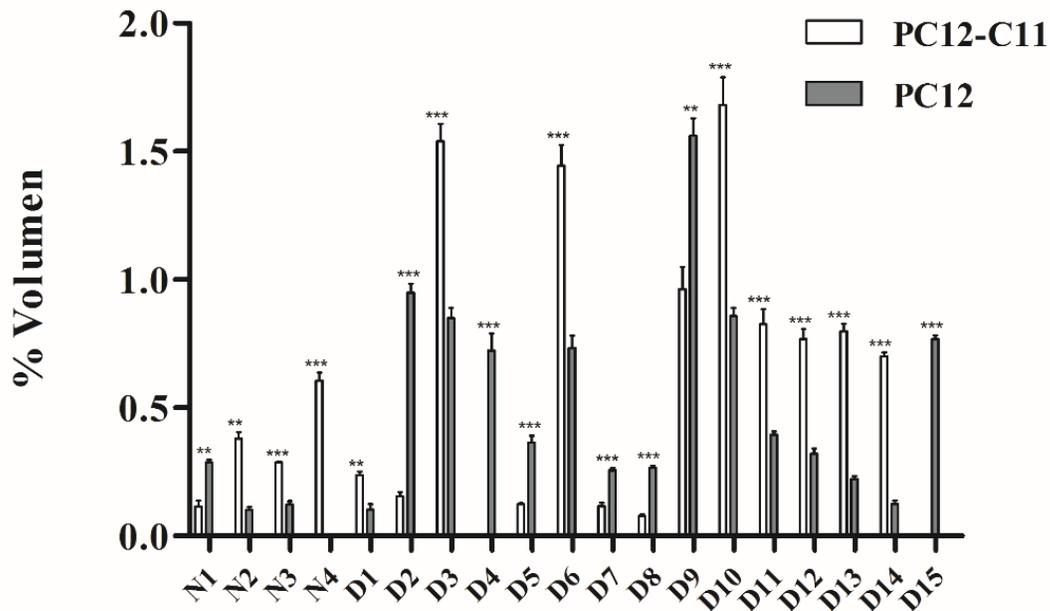


Figura 18. Expresión diferencial de proteínas de células PC12-C11 y PC12 diferenciadas. Comparación del perfil proteómico obtenido entre células PC12-C11 y PC12 diferenciadas con el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. D1 a D15 indican las manchas con expresión diferencial. A. Células PC12-C11. B. Células PC12. C). Vista ampliada de las manchas expresadas diferencialmente.

Tabla 5. Valores del % volumen de las manchas con expresión diferencial

Mancha ID	% Volumen PC12-C11	% Volumen PC12	Cambio
N1	0.1140	0.2875	-2.52
N2	0.3785	0.1007	+3.76
N3	0.2868	0.1231	+2.33
N4	0.6066	0.0000	n.a
D1	0.2365	0.1028	+2.30
D2	0.1539	0.9490	-6.17
D3	1.5371	0.8749	+1.76
D4	0.0000	0.7213	n.a
D5	0.1235	0.3633	-2.94
D6	1.4416	0.7318	+1.97
D7	0.1154	0.2557	-2.22
D8	0.0771	0.2663	-3.46
D9	0.9614	1.5981	-1.66
D10	1.6780	0.8564	+1.96
D11	0.8902	0.4094	+2.17
D12	0.7655	0.3350	+2.29
D13	0.7961	0.2229	+3.57
D14	0.6991	0.1336	+5.23
D15	0.0000	0.7672	n.a

n.a.: no aplica ya que el % de volumen sólo fue obtenido para una de las dos células PC12-C11 o PC12.



Manchas con expresión diferencial

Figura 19. Porcentaje volumen de las manchas expresadas diferencialmente en células PC12-C11 y PC12. El % volumen de cada mancha con expresión diferencial de células no diferenciadas (N1 a N4) y diferencias (D1 a D15) fue calculado utilizando el software ImageMaster 2D Platinum 6.0. La gráfica muestra el promedio \pm la desviación estándar de las cuatro réplicas biológicas analizadas. El análisis estadístico fue preparado aplicando la prueba T de Student utilizando el software GraphPad Prism 5. Un valor de $P \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.005$, * $P < 0.01$.

7.2.4 Identificación de proteínas expresadas de manera diferencial

Para determinar la identidad de las proteínas diferencialmente expresadas, las manchas de interés fueron escindidas directamente de los 2D-PAGE, se destiñeron hasta transparencia y se realizó el proceso de digestión peptídica descrito en materiales y métodos. Los péptidos obtenidos para cada proteína fueron analizados por MS. Las manchas D12 y D14 fueron identificados en la Unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica, LaNSE-CINVESTAV por MALDI-TOF/TOF; las manchas D9 y D13 fueron identificadas por

MALDI-TOF/TOF y las restantes (U1-U4 y D1-D8, D10, D11, D15) por LC-MS/MS, en colaboración con la Sorbonne Universités, UPMC, Plateforme P3S en Paris, Francia. Todas las manchas analizadas se identificaron satisfactoriamente. Las características de las proteínas identificadas, como nombre, número de acceso a la base de datos, peso molecular, pI, número de péptidos identificados, % de secuencia cubierta y valor de score obtenidos se muestran en la Tabla 6. En algunas manchas (N2, N4, D8, D10, D11 y D15) se identificaron más de dos proteínas. En algunos casos se identificó a la misma proteína en dos diferentes manchas, lo que podría deberse a distintas isoformas de la proteína, tal fue el caso para anexina A2 (D8, D10 y D11), GAPDH (D10 y D11) y HspB1 (D13 y D14). Entre las proteínas identificadas con expresión diferencial, en células diferenciadas, las dos más altamente reguladas fueron: la proteína HspB1 con dos diferentes isoformas que aumentaron su abundancia, la isoforma con pI 6.2 incremento 5.2 veces (D13) y la isoforma con pI 5.8 incremento 3.5 veces más (D14), así como anexina A5 mostrando un incremento de 2.2 veces (D12) en células PC12-C11.

Tabla 6. Proteínas identificadas por MS

Mancha ID	Variación	Cambio en num. de veces	MS	Base de datos	No. de acceso	Nombre de la proteína	Gen	PE	SV	MW [kDa]	pI	Score	Mach pept	SC (%)	RMS90 [ppm]
U1	-	2.5	LC-MS/MS	SP	Q62952	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	1	2	61.9	6.0	1359.5	24	45.3	62.6
				SP	P11598	Protein disulfide-isomerase A3	Pdia3	1	2	56.6	5.8	366.7	8	17.6	36.9
				SP	P04177	Tyrosine 3-monooxygenase	Th	1	3	55.9	5.7	279.5	5	12.7	91.0
				SP	Q6P799	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Sars	1	3	58.6	5.8	242.2	4	9.8	45.4
				SP	P49088	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	Asns	2	3	64.2	6.0	154.5	4	6.1	73.6
U2	+	3.7	LC-MS/MS	SP	P85834	Elongation factor Tu, mitochondrial	Tufm	1	1	49.5	7.9	1321.0	23	60.8	41.1
				SP	P41562	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	Idh1	1	1	46.7	6.6	835.6	16	37.9	64.5
				SP	P10760	Adenosylhomocysteinase	Ahcy	1	3	47.5	6.1	594.4	10	28.2	68.0
				SP	P85515	Alpha-centractin	Actr1a	1	1	42.6	6.2	508.6	8	33	41.8
				SP	P60711	Actin, cytoplasmic 1	Actb	1	1	41.7	5.2	410.7	7	32	64.6
				Tr	B1WC67	Protein Slc25a24	Slc25a24	2	1	52.9	8.9	396.5	6	21.5	75.9
				SP	P36506	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2	Map2k2	2	1	44.3	6.7	313.1	5	16.5	59.2
				SP	P26284	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial	Pdha1	1	2	43.2	9.4	264.8	5	11.3	33.3
				SP	P04182	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	Oat	1	1	48.3	6.6	221.9	4	10.7	31.6
SP	Q6P9U8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	Eif3h	2	1	39.9	6.2	128.9	3	11.6	93.9				
U3	+	2.3	LC-MS/MS	SP	O88767	Protein DJ-1	Park7	1	1	20.0	6.4	506.8	10	56.6	62.7
				SP	P97576	GrpE protein homolog 1, mitochondrial	Grpe1l	1	2	24.3	9.4	311.9	4	37.3	89.2
				SP	P70470	Acyl-protein thioesterase 1	Lypl1a	1	1	24.7	6.1	208.6	3	21.7	72.4
				SP	O35244	Peroxisome oxidin-6	Prdx6	1	3	24.8	5.6	163.0	4	17.9	62.9
				SP	Q9Z0V6	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial	Prdx3	1	2	28.3	8.0	134.8	3	12.1	88.3
U4	+	n.a.	LC-MS/MS	SP	P62260	I4-3-3 protein epsilon	Ywhae	1	1	29.2	4.5	1096.1	19	79.6	59.0
				SP	Q63610	Tropomyosin alpha-3 chain	Tpm3	1	2	29.0	4.6	699.1	11	40.3	55.9
				SP	P09495	Tropomyosin alpha-4 chain	Tpm4	1	3	28.5	4.5	602.8	9	37.9	75.7
				Tr	B5DEN5	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	Eef1b2	1	1	24.7	4.4	531.2	7	37.8	63.1
				SP	P08082	Clathrin light chain B	Cltb	1	1	25.1	4.4	187.8	3	13.5	44.5

D1	+	2.3	LC-MS/MS	SP	Q66HD0	Endoplasmic	Hsp90b1	1	2	92.7	4.6	1923.8	33	37.1	72.1
				SP	P19527	Neurofilament light polypeptide	Nefl	1	3	61.3	4.5	294.9	6	12.7	58.2
				SP	P20156	Neurosecretory protein VGF	Vgf	1	3	68.1	4.5	208.0	4	7.5	85.7
				SP	Q9Z1P2	Alpha-actinin-1	Actn1	1	1	102.9	5.1	113.2	3	4.1	158.8
D2	-	6.1	LC-MS/MS	SP	P10362	Secretogranin-2	Scg2	2	1	71.0	4.6	1348.9	28	46.4	57.9
				SP	P20156	Neurosecretory protein VGF	Vgf	1	3	68.1	4.5	1037.2	16	33.4	50.6
D3	+	1.7	LC-MS/MS	SP	P06761	78 kDa glucose-regulated protein	Hspa5	1	1	72.3	4.9	2563.2	38	48.8	61.9
				Tr	G3V6E4	Acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	Acbd3	4	1	60.3	4.8	263.0	4	12	7.4
				Tr	B2RYP4	Protein Snx2 OS=Rattus norvegicus GN=Snx2 PE=2 SV=1	Snx2	2	1	58.5	4.9	148.8	3	7.3	83.7
				SP	Q7TNY6	Golgi resident protein GCP60	Acbd3	2	3	60.4	4.9	173.0	3	8.9	6.1
D4	-	n.a.	LC-MS/MS	SP	P19527	Neurofilament light polypeptide	Nefl	1	3	61.3	4.5	1648.5	30	47.2	62.5
				SP	P20156	Neurosecretory protein VGF	Vgf	1	3	68.1	4.5	251.7	5	15.1	50.5
D5	-	2.9	LC-MS/MS	SP	Q62952	Dihydropyrimidinase-related protein 3	Dpysl3	1	2	61.9	6.0	1542.9	28	54	54.4
				SP	P04177	Tyrosine 3-monooxygenase	Th	1	3	55.9	5.7	575.5	9	33.1	73.6
				SP	P05370	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6pdx	1	3	59.3	5.9	515.1	8	28	77.6
				SP	P11598	Protein disulfide-isomerase A3	Pdia3	1	2	56.6	5.8	454.8	8	24	66.5
				SP	P49088	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	Asns	2	3	64.2	6.0	387.9	6	17.5	69.6
				SP	Q6P799	Serine--tRNA ligase, cytoplasmic	Sars	1	3	58.6	5.8	280.0	5	15.6	95.0
D6	+	1.9	LC-MS/MS	SP	P18418	Calreticulin	Calr	1	1	48.0	4.2	679.9	14	30	71.1
				SP	Q6P9V9	Tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	1	1	50.1	4.8	368.4	6	18	56.8
				SP	P04785	Protein disulfide-isomerase	P4hb	1	2	56.9	4.7	358.7	7	13	92.7
D7	-	2.2	LC-MS/MS	Tr	B1WC26	N-acetylneuraminic acid synthase	Nans	2	1	40.0	6.4	633.1	13	30.9	72.0
				SP	Q5XI22	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Acat2	1	1	41.1	7.1	513.1	8	37.3	71.1
				SP	P15651	Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	Acads	1	2	44.7	9.3	313.2	4	15.8	44.1
				SP	Q6AYD9	Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 19, mitochondrial	Nudt19	2	1	39.9	6.5	303.5	5	23.5	24.0
				SP	Q64559	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	Acot7	1	4	42.7	9.6	302.9	5	14.7	78.0
D8	-	3.4	LC-MS/MS	SP	Q5XI22	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	Acat2	1	1	41.1	7.1	732.1	10	65	81.3
				SP	Q64559	Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase	Acot7	1	4	42.7	9.6	424.3	7	21.5	78.9
				Tr	Q9QX80	CARg-binding factor A	Hnrmpab	2	1	30.8	8.7	238.7	3	22.5	44.2

				SP	Q07936	Annexin A2	Anxa2	1	2	38.7	8.6	162.1	3	12.1	83.1
D9	-	1.6	MALDI	SP	P07943	Aldose reductase	Akr1b1	1	3	35.8	6.3	124.0	13	46.8	50.9
D10	+	1.9	LC-MS/MS	SP	Q07936	Annexin A2	Anxa2	1	2	38.7	8.6	1587.6	25	62.8	69.6
				SP	P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	1	3	35.8	9.0	701.2	14	41.7	30.9
D11	+	2.1	LC-MS/MS	SP	Q07936	Annexin A2	Anxa2	1	2	38.7	8.6	1507.8	25	64	51.1
				SP	P04797	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	1	3	35.8	9.0	561.4	11	28.2	25.2
				Tr	C8YL70	DNA-directed polymerase delta interacting protein 2	Poldip2	2	1	41.8	9.5	279.6	4	12.5	67.0
				SP	P63018	Heat shock cognate 71 kDa protein	Hspa8	1	1	70.8	5.2	261.0	4	10.5	33.8
D12	+	2.2	MALDI	NC	P14668	Annexin A5	Anxa5	1	3	35.7	4.9	926.0	15	66.5	10.2
D13	+	3.5	MALDI	SP	P42930	Heat shock protein beta-1	Hspb1	1	1	22.9	6.1	161.0	13	63.1	4.5
D14	+	5.2	MALDI	NC	P42930	Heat shock protein beta-1	Hspb1	1	1	22.9	6.1	690.0	12	82	6.5
D15	-	n.a.	LC-MS/MS	SP	Q00981	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	Uchl1	1	2	24.8	5.0	541.1	10	53.8	94.4
				SP	Q5XI73	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	Arhgdia	1	1	23.4	5.0	448.1	9	30.4	53.1
				SP	Q6AYZ1	Tubulin alpha-1C chain	Tuba1c	1	1	49.9	4.8	211.9	3	9.8	54.9
				SP	P60711	Actin, cytoplasmic 1	Actb	1	1	41.7	5.2	165.6	4	13.1	105.6

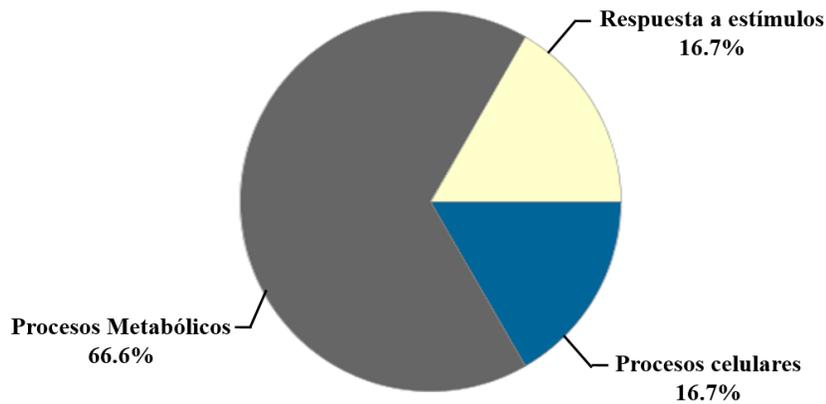
Mancha ID	Número de identificación de la mancha.
Variación	(-) = regulación negativa; (+) = regulación positiva
Base de datos	SP = SwissProt / Tr = Trembl / NC = NCBInr
No. de acceso	Número de acceso de acuerdo a la base de datos
PE	<i>Protein Existence</i> : es el valor numérico que describe la existencia de la proteína.
SV	<i>Sequence Version</i> : es el número de versión de la secuencia.
MW [kDa]	Peso molecular teórico
pI	Punto isoelectrico teórico
Score	Mascot score: es la probabilidad de que el emparejamiento entre los datos experimentales y la base de datos sea un evento aleatorio.
Macth Pept	Número de péptidos identificados
SC	Secuencia cubierta
RMS90 [ppm]	<i>Root mean square (RMS) error of the set of matched mass values is given in ppm.</i>
n.a.	No aplica, debido a que el valor de % Volumen sólo fue obtenido para una de las dos líneas celulares PC12-C11 o PC12.

7.2.5 Clasificación funcional de las proteínas identificadas

Con el propósito de obtener información global sobre las proteínas identificadas, se utilizó el sistema de clasificación PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) versión 10.0. La aplicación PANTHER clasifica a un grupo de genes o proteínas dentro de los grupos ontológicos a los que pertenecen sobre la base de datos del Gene Ontology (GO) (Thomas *et al.*, 2003). Las proteínas pueden ser agrupadas en función del proceso biológico en el que intervienen, la función molecular que desempeñan o bien en función del componente celular en donde está descrito que se localiza la proteína. Mediante el empleo de esta herramienta se realizó la agrupación de las proteínas identificadas en base a los procesos biológicos en los que participan. Las proteínas con regulación negativa identificadas en células no diferenciadas fueron agrupadas en 3 categorías (Figura 20A), el mayor porcentaje de proteínas fueron clasificadas en la categoría de procesos metabólicos con un 66.6% principalmente procesos metabólicos primarios (anabolismo y catabolismo). Las proteínas con regulación positiva fueron agrupadas en 8 categorías (Figura 20B). El grupo de clasificación principal fue la categoría de procesos metabólicos con un 34.9%, además de los procesos metabólicos primarios también se ven afectados los procesos metabólicos de lípidos, proteínas y modificación de proteínas. En la tabla 7 se muestran las proteínas asignadas a cada una de las categorías.

Las proteínas con regulación negativa identificadas en células diferenciadas fueron agrupadas en 7 categorías (Figura 21A), el mayor porcentaje de proteínas fueron clasificadas en la categoría de procesos metabólicos con un 43.4% principalmente procesos metabólicos primarios (anabolismo y catabolismo), así como el metabolismo de lípidos, carbohidratos, polisacáridos y procesos de modificación de proteínas. Las proteínas con regulación positiva fueron agrupadas en 10 categorías (Figura 21B). La categoría de clasificación principal fue la de procesos metabólicos con un 25.0%, además de los procesos metabólicos primarios también se ven afectados los procesos metabólicos de lípidos, proteínas, modificación de proteínas, plegamiento de proteínas y glicólisis. Las otras categorías más sobresalientes fueron: respuesta a estímulos, componentes de organización celular y biogénesis (organización de citoplasma, citoesqueleto y morfogénesis), procesos celulares y procesos de desarrollo, con un valor de 13.9% cada una. En la tabla 8 se muestran las proteínas asignadas a cada una de las categorías.

A



B

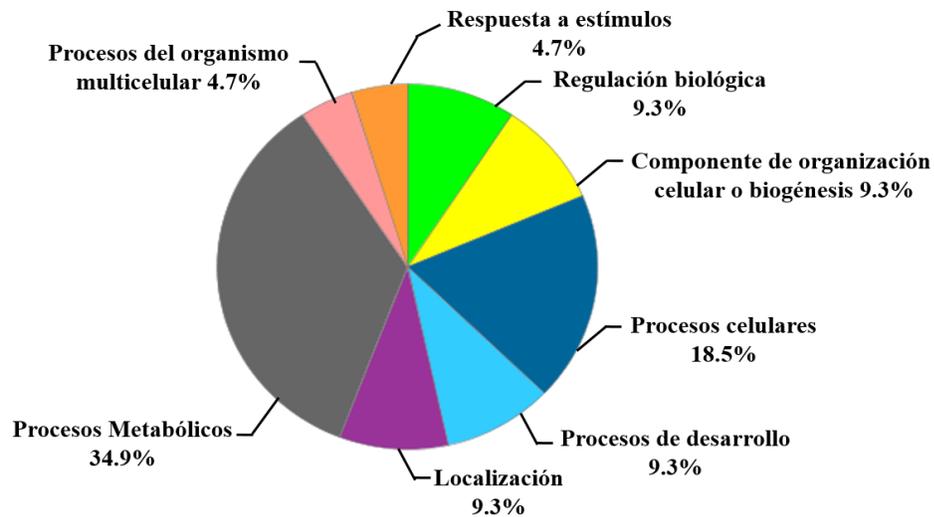


Figura 20. Clasificación funcional de las proteínas identificadas en células no diferenciadas.

Mediante el uso de la herramienta PANTHER se muestra la clasificación de las proteínas identificadas en células no diferenciadas en base a los procesos biológicos en los que participan; es importante señalar que el sistema de clasificación empleado puede atribuir varias clases a una misma proteína. A. Clasificación funcional de proteínas con regulación negativa. B. Clasificación funcional de proteínas con regulación positiva. El grupo más abundante de proteínas reguladas negativa o positivamente pertenece a la categoría de procesos metabólicos con un 66.6% y 34.9% respectivamente.

Tabla 7. Clasificación en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas en células no diferenciadas

Procesos Biológicos	Proteínas con regulación negativa
Procesos metabólicos (66.6%)	Protein disulfide-isomerase A3 Dihydropyrimidinase-related protein 3 Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] Serine--tRNA ligase, cytoplasmic
Procesos celulares (16.7%)	Protein disulfide-isomerase A3
Respuesta a estímulos (16.7%)	Protein disulfide-isomerase A3
Procesos Biológicos	Proteínas con regulación positiva
Procesos metabólicos (34.9%)	Acyl-protein thioesterase 1 Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 Peroxiredoxin-6 Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial Protein Slc25a24 Elongation factor Tu, mitochondrial Adenosylhomocysteinase Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H Ornithine aminotransferase, mitochondrial Protein DJ-1 Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2 Tropomyosin alpha-4 chain GrpE protein homolog 1, mitochondrial Tropomyosin alpha-3 chain
Procesos celulares (18.5%)	Acyl-protein thioesterase 1 Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 Actin, cytoplasmic 1 Adenosylhomocysteinase 14-3-3 protein epsilon Alpha-centractin Tropomyosin alpha-4 chain Tropomyosin alpha-3 chain

Regulación biológica (9.3%)	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 Elongation factor Tu, mitochondrial Protein DJ-1 Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2
Componente de organización celular o biogénesis (9.3%)	Actin, cytoplasmic 1 Alpha-centractin Tropomyosin alpha-4 chain Tropomyosin alpha-3 chain
Procesos de desarrollo (9.3%)	Actin, cytoplasmic 1 Alpha-centractin Tropomyosin alpha-4 chain Tropomyosin alpha-3 chain
Localización (9.3%)	Protein Slc25a24 Actin, cytoplasmic 1 Clathrin light chain B Alpha-centractin
Procesos del organismo multicelular (4.7%)	Tropomyosin alpha-4 chain Tropomyosin alpha-3 chain
Respuesta a estímulos (4.7%)	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 2 Protein DJ-1

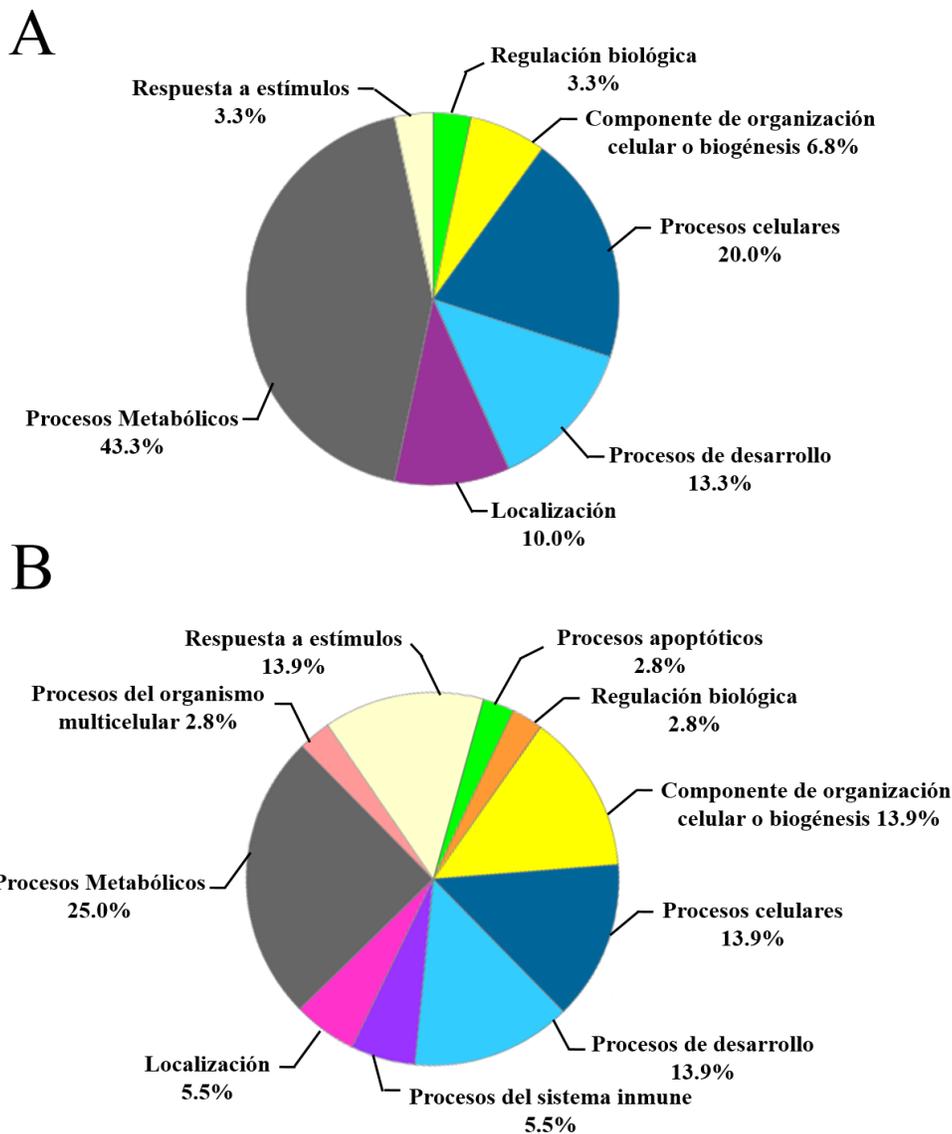


Figura 21. Clasificación funcional de las proteínas identificadas en células diferenciadas. Mediante el uso de la herramienta PANTHER se muestra la clasificación de las proteínas identificadas en células diferenciadas en base a los procesos biológicos en los que participan; es importante señalar que el sistema de clasificación empleado puede atribuir varias clases a una misma proteína. A. Clasificación funcional de proteínas con regulación negativa. B. Clasificación funcional de proteínas con regulación positiva. El grupo mas abundante de proteínas reguladas negativa o positivamente pertenece a la categoría de procesos metabólicos con un 66.6% y 34.9% respectivamente.

Tabla 8. Clasificación en función de los procesos biológicos en los que participan las proteínas identificadas en células diferenciadas

Procesos Biológicos	Proteínas con regulación negativa
Procesos metabólicos (43.3%)	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic Rho GDP-dissociation inhibitor 1 N-acetylneuraminic acid synthase Cytosolic acyl coenzyme A thioester hydrolase Protein disulfide-isomerase A3 Short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial Dihydropyrimidinase-related protein 3 Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] Serine--tRNA ligase, cytoplasmic Aldose reductase Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
Procesos celulares (20.0%)	Tubulin alpha-1C chain Neurofilament light polypeptide Rho GDP-dissociation inhibitor 1 Protein disulfide-isomerase A3 Actin, cytoplasmic 1 Secretogranin-2
Procesos de desarrollo (13.3%)	Tubulin alpha-1C chain Neurofilament light polypeptide Actin, cytoplasmic 1 Annexin A2
Localización (10.0%)	Tubulin alpha-1C chain Actin, cytoplasmic 1 Aldose reductase
Componente de organización celular o biogénesis (6.8%)	Neurofilament light polypeptide Actin, cytoplasmic 1
Regulación biológica (3.3%)	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
Respuesta a estímulos (3.3%)	Protein disulfide-isomerase A3
Procesos Biológicos	Proteínas con regulación positiva
Procesos metabólicos (25.0%)	Heat shock protein beta-1

	78 kDa glucose-regulated protein Annexin A5 Protein disulfide-isomerase Heat shock cognate 71 kDa protein Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Endoplasmin Calreticulin Annexin A2
Procesos celulares (13.9%)	Alpha-actinin-1 Tubulin alpha-1B chain Protein disulfide-isomerase Protein Snx2
Procesos de desarrollo (13.9%)	Alpha-actinin-1 Tubulin alpha-1B chain Protein disulfide-isomerase Annexin A2
Componente de organización celular o biogénesis (13.9%)	Alpha-actinin-1 78 kDa glucose-regulated protein Heat shock cognate 71 kDa protein Protein Snx2
Respuesta a estímulos (13.9%)	Heat shock protein beta-1 78 kDa glucose-regulated protein Protein disulfide-isomerase Heat shock cognate 71 kDa protein Endoplasmin
Localización (5.5%)	Tubulin alpha-1B chain Protein Snx2
Procesos del sistema inmune (5.5%)	Heat shock protein beta-1 Heat shock cognate 71 kDa protein
Regulación biológica (2.8%)	Protein disulfide-isomerase
Procesos apoptóticos (2.8%)	Protein disulfide-isomerase
Procesos del organismo multicelular (2.8%)	Heat shock protein beta-1

7.3 Validación

7.3.1 Validación de proteínas expresadas diferencialmente

Con el fin de validar los resultados obtenidos con el análisis proteómico, se seleccionaron las dos proteínas más altamente reguladas en células diferenciadas: HspB1 y anexina A5. HspB1 participa en el crecimiento neurítico, en la reestructuración del citoesqueleto y anexina A5 es una proteína asociada a membrana con actividad de canal de calcio. De las proteínas con niveles de regulación disminuidos, seleccionamos las proteínas secretogranina-2 (D2), neurofilamento de cadena ligera (NF-L, D4), tirosina hidroxilasa (TH, D5) y aldosa reductasa (D9), debido a que éstas son proteínas importantes durante la diferenciación neuronal en células PC12. Los niveles de expresión fueron medidos por WB utilizando anticuerpos específicos en contra de cada una de las proteínas mencionadas (Tabla 2). Las bandas visualizadas presentaron una regulación similar a lo obtenido en el análisis de imágenes de los 2D-PAGE (Figura 22A); la cuantificación de la expresión relativa de cada proteína se realizó analizando los resultados de tres experimentos independientes (Figura 22B). Como se esperaba, HspB1 mostró un incremento de 6.3 veces, anexina A5 de 2.2 veces, muy similar al incremento observado en el análisis por 2DE. Mientras que NF-L mostró una disminución de 8.4 veces, secretogranina-2 de 5.1 veces, TH de 2.3 y aldosa reductasa de 2.4 veces, con valores similares a los observados antes. Los resultados obtenidos por WB corroboraron que estas proteínas presentan una regulación debido a la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

7.3.2 Validación funcional de HspB1

Para determinar si la proteína más altamente regulada, identificada como HspB1, presentaba una relación directa con la estimulación de la diferenciación inducida por NGF en células PC12-C11 en presencia de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, empleamos un ensayo de bloqueo inmunológico utilizando un anticuerpo policlonal en contra de HspB1. Cultivos de células PC12 y PC12-C11 fueron crecidos por tres días en presencia de NGF, NGF + anti-HspB1 y NGF + vehículo (solución en el que está resuspendido el anticuerpo), para asegurarse que el efecto observado fuera solo por la acción del anti-HspB1 y no por

efectos ocasionados por el vehículo. Los cultivos se prepararon como se describe en materiales y métodos. Se tomaron imágenes en un microscopio invertido para determinar el porcentaje de células diferenciadas en 10 campos al azar para cada uno de los puntos a monitorear (1, 2 y 3 días de diferenciación).

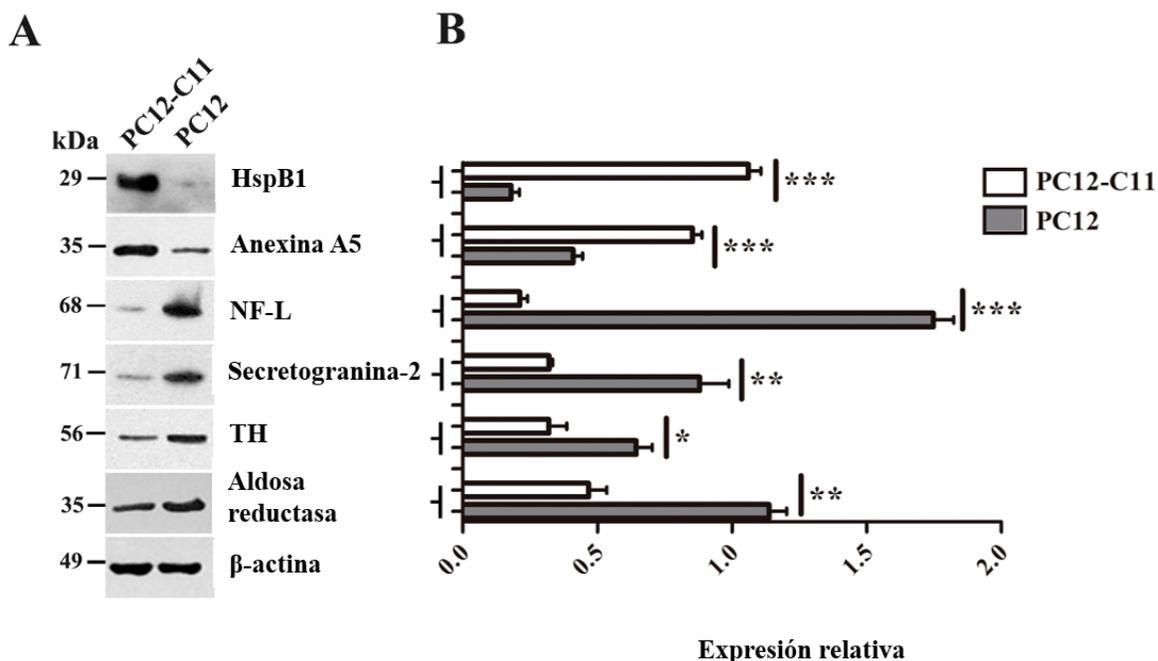
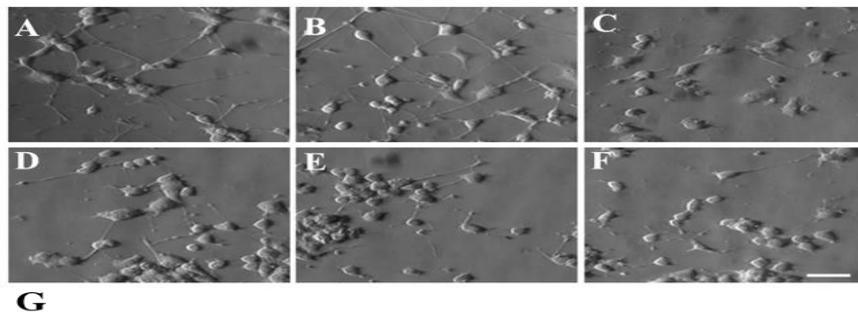


Figura 22. Validación de proteínas expresadas diferencialmente durante la diferenciación de células PC12-C11 por WB. Extractos de proteínas totales de células PC12-C11 y PC12 diferenciadas por 6 días fueron analizados por WB utilizando los anticuerpos correspondientes. A. Expresión de HspB1, anexina A5, NF-L, secretogranina-2, TH y aldosa reductasa. B. Expresión relativa de HspB1, anexina A5, NF-L, secretogranina-2, TH y aldosa reductasa normalizadas con respecto a β -actina. La grafica representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.005$, * $P < 0.01$.

El tratamiento con el anticuerpo anti-HspB1 afectó drásticamente el porcentaje de diferenciación de las células PC12-C11; desde el primer día de tratamiento el cuerpo de las células adquirió una morfología redonda y las neuritas se observaron mucho más cortas. El

efecto más drástico se observó al tercer día de diferenciación donde las células crecidas con NGF + vehículo (Figura 23A) o sólo en presencia de NGF (Figura 23B), presentan un crecimiento neurítico evidente en comparación con las células crecidas con el anticuerpo anti-HspB1, donde el crecimiento neurítico se ve drásticamente disminuido (Figura 23C). Esto indica que HspB1 tiene una participación importante en la extensión de neuritas en las células PC12-C11. Mientras que para las células PC12 el tratamiento con el anticuerpo anti-HspB1 no altera el porcentaje de diferenciación obtenido, puesto que la morfología de las células crecidas con NGF (Figura 23D), NGF + vehículo (Figura 23E) y NGF + anti-HspB1 (Figura 23F) es muy similar, lo cual era de esperarse pues estas células no expresan HspB1 en este intervalo de tiempo monitoreado.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación del número de células que presentaron neuritas de longitud mayor a un cuerpo celular mostraron lo siguiente: en PC12-C11 se observó un porcentaje de diferenciación de 17.41% en presencia de NGF, de 17.0% con NGF + vehículo y de 3.7% en presencia de NGF + anti-HspB1 al primer día de diferenciación; al segundo día 21.2% en presencia de NGF, 20.49 % con NGF + vehículo y de 4.22% en presencia de NGF + anti-HspB1, al tercer día de diferenciación 20.71% en presencia de NGF, 21.70% con NGF + vehículo y de 5.38% en presencia de NGF + anti-HspB1. Estos valores indican que el tratamiento recibido con el anticuerpo anti-HspB1 disminuye drásticamente el porcentaje de células diferenciadas (Figura 23G). PC12 presenta un porcentaje de diferenciación de 9.46% en presencia de NGF, 8.17% con NGF + vehículo y de 8.65% en presencia de NGF + anti-HspB1 al primer día de diferenciación, al segundo día de 13.63% en presencia de NGF, 14.03% con NGF + vehículo y de 12.02% en presencia de NGF + anti-HspB1, al tercer día de diferenciación 15.94% en presencia de NGF, 15.59% con NGF + vehículo y de 12.26% en presencia de NGF + anti-HspB1. Estos resultados indican que no hubo ninguna alteración en la diferenciación de estas células al recibir el tratamiento con el anticuerpo anti-HspB1 y sugieren que el bloqueo inmunológico de HspB1 afecta la diferenciación inducida por NGF en células PC12-C11, principalmente en el proceso de neuritogénesis.



G

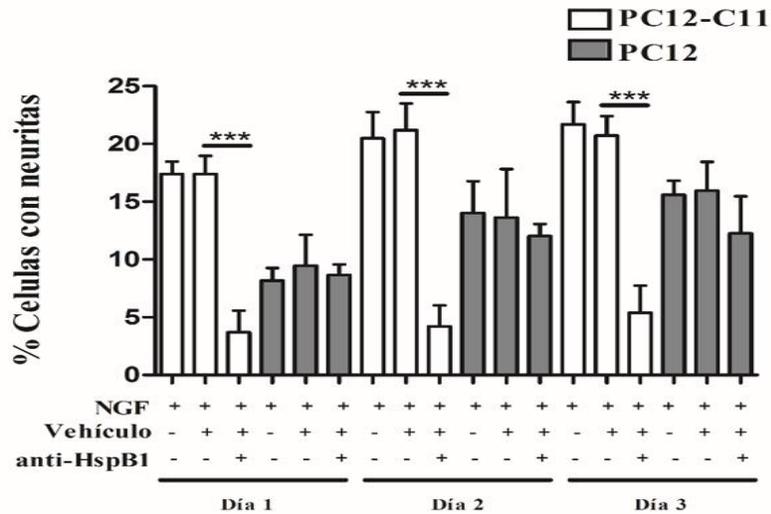


Figura 23. Efecto del anti-HspB1 sobre la diferenciación inducida por NGF en células PC12-C11. A-C. Células PC12-C11 con tres días de diferenciación. A. NGF. B. NGF + vehículo. C. NGF + anti-HspB1. D-F. Células PC12 con tres días de diferenciación. D. NGF. E. NGF + vehículo. F. NGF + anti-HspB1. G. Porcentaje de células diferenciadas. El porcentaje de células que presentaron neuritas mayores a un cuerpo celular fue determinado como se describe en materiales y métodos en diferentes condiciones: NGF, NGF + vehículo y NGF + anti-HspB1. Los datos mostrados representan el promedio \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. *** $P < 0.001$. La barra blanca en F representa la escala de 50 μm .

Debido a la importancia que HspB1 pudiera tener en el crecimiento neurítico de las células PC12-C11, monitoreamos los niveles de expresión de esta proteína durante los primeros 6 días de la diferenciación. Se observó un incremento muy evidente de esta proteína HspB1 después de añadir el NGF los días 1 y 2 y a partir del día 3 y hasta el 6 la expresión de esta se mantuvo constante (Figura 24A). Se cuantifico la expresión relativa de esta proteína y se comprobó el incremento en su expresión que presenta durante los 6 días de

diferenciación inducida por NGF, en presencia de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (Figura 24B).

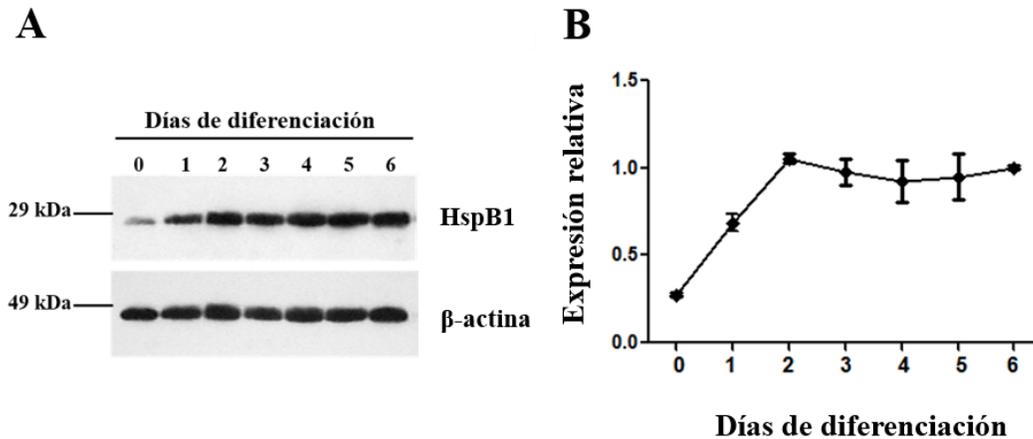


Figura 24. Expresión de HspB1 durante la diferenciación de células PC12-C11. Extractos de proteínas totales de 0 a 6 días de diferenciación de células PC12-C11 fueron analizadas por WB para monitorear la expresión de HspB1. A. Expresión de HspB1 durante 0-6 días de diferenciación. B. Expresión relativa de HspB1, normalizada con respecto a β -actina. La grafica representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

En base a los resultados obtenidos sobre la regulación positiva de HspB1, la identificación de dos manchas para esta proteína (Tabla 6) y su papel esencial en el crecimiento neurítico en células PC12-C11 (Figura. 23). También se ha reportado que la fosforilación de HspB1 promueve la polimerización de actina favoreciendo la reestructuración del citoesqueleto y contribuyendo así al crecimiento axonal (Guay *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2013). Debido a estos antecedentes nos dimos a la tarea de monitorear el estado de fosforilación de HspB1 después del tratamiento con el anti-HspB1. Los principales sitios de fosforilación de HspB1 en humano son los residuos Ser15, Ser78 y Ser82; en rata son la Ser15 y Ser86. El principal sitio de fosforilación en humanos es en la Ser82, el cual es un sitio ortólogo a la Ser86 en rata (Landry *et al.*, 1992; Kostenko *et al.*, 2009). Para determinar la especificidad del anticuerpo utilizado en el ensayo de bloqueo inmunológico, medimos la expresión de HspB1 y los niveles de fosforilación en la Ser86 de

esta proteína por WB. De manera interesante, los niveles de HspB1 y pHspB1Ser86 disminuyeron después del tratamiento con el anticuerpo. Además, se observó que el nivel de fosforilación medido al tercer día de diferenciación es similar al nivel de HspB1 en células PC12-C11 no tratadas (Figura 25A y B).

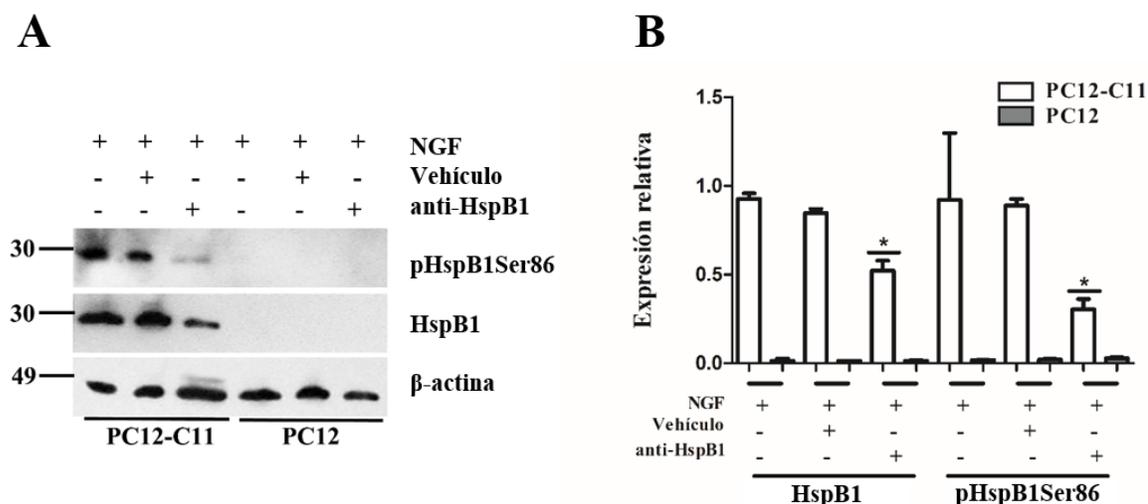


Figura 25. Expresión de HspB1 y pHspB1Ser86 después del tratamiento con el anticuerpo. Extractos de proteínas totales de células PC12-C11 y PC12 con 3 días de diferenciación obtenidas después del tratamiento con el anticuerpo anti-HspB1 fueron analizadas por WB para monitorear el nivel de HspB1 y pHspB1Ser86. A. Expresión de HspB1 y pHspB1Ser86 normalizada con respecto a β-actina. B. Expresión relativa de HspB1 normalizada con respecto a β-actina y expresión relativa de HspB1Ser86 normalizada con respecto a HspB1. La grafica representa el promedio ± desviación estándar de dos experimentos independientes. *P < 0.05.

7.4 Localización celular de HspB1 y anexina A5

Para determinar la distribución celular de HspB1 y anexina A5 a los 6 días de diferenciación en células PC12-C11 y PC12 se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos específicos contra estas proteínas (Tabla 1). Se utilizó sinaptofisina como marcador de diferenciación neuronal mostrado en verde, HspB1, anexina A5 se muestran en rojo y los núcleos teñidos con DAPI en azul. La localización celular de HspB1 en células PC12-C11 diferenciadas se observó principalmente en el citoplasma y

también a lo largo de las neuritas (Figura 26B). En contraste, en células PC12, la inmunoreactividad para HspB1 fue muy baja (Figura 26E). La localización celular de anexina A5 en células PC12-C11 se observó predominantemente en citoplasma, a lo largo de las neuritas y un poco en el núcleo (Figura 26H), mientras que para células PC12 la localización celular de anexina A5 fue citoplasmática y muy poco a lo largo de las neuritas, la inmunoreactividad también fue más baja que en células PC12-C11 (Figura 26K). Para validar por otra vía el incremento observado en el análisis por 2DE, se cuantificó la intensidad de fluorescencia observada en los ensayos de localización por IF de las dos proteínas más altamente reguladas (HspB1 y anexina A5); como era de esperarse la cuantificación de estas dos proteínas mostró que la inmunoreactividad para HspB1 fue de 3.3 veces mayor en células PC12-C11 con respecto a las células PC12, mientras que para anexina A5 el incremento observado fue de 2.0 veces más. Adicionalmente, nos dimos a la tarea de monitorear la distribución celular de pHspB1Ser82 de manera interesante esta proteína se observó principalmente en el núcleo y en menor proporción en el citoplasma y a lo largo de las neuritas en células PC12-C11 (Figura 27). Estos resultados comprueban que tanto HspB1 como Anexina5, así como la translocación de pHspB1Ser82 al núcleo son reguladas por la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

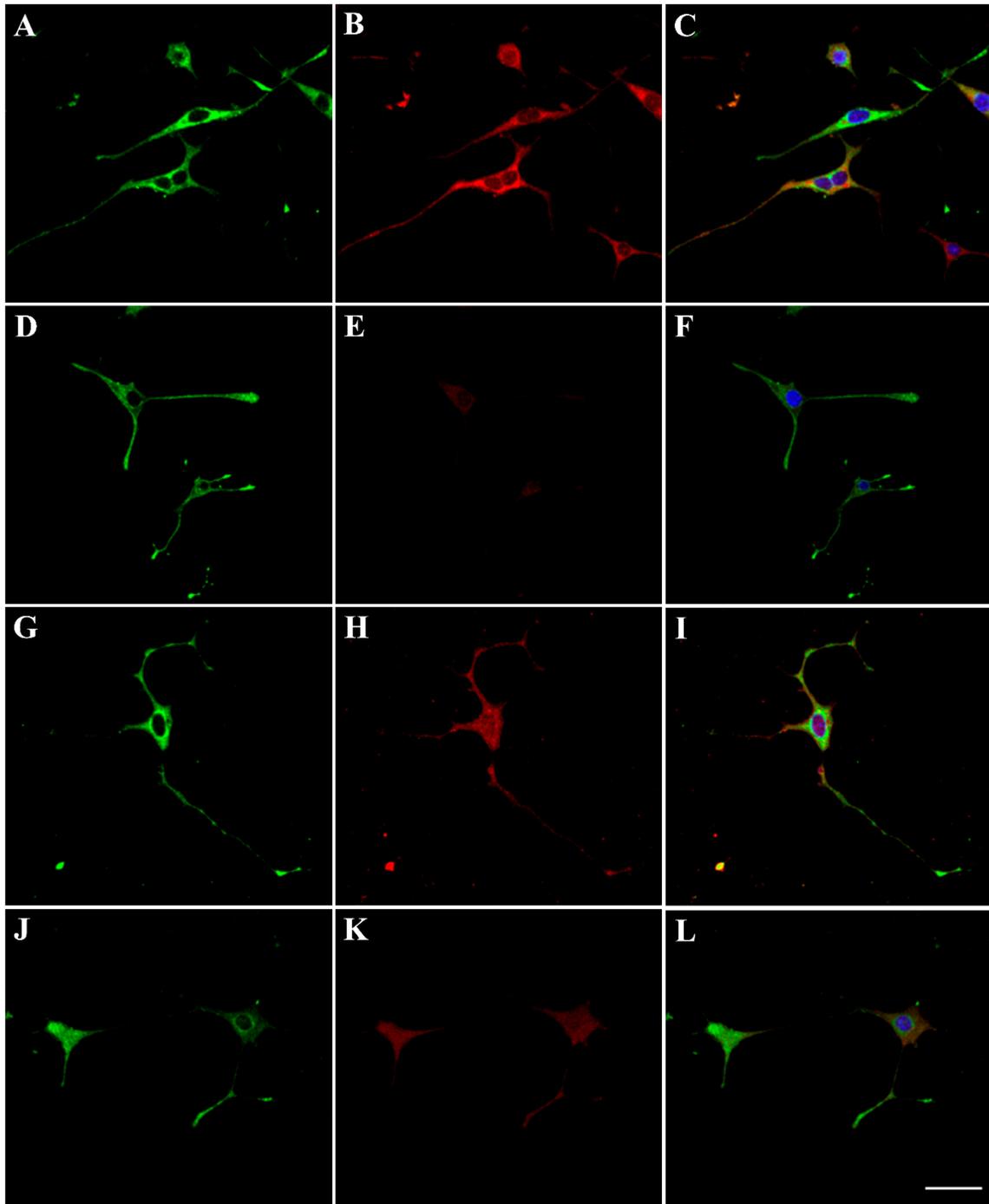


Figura 26. Localización celular de HspB1 y anexina A5 en células PC12-C11 y PC12 diferenciadas. Células PC12-C11 y PC12 crecidas en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de HspB1 y anexina A5. A-L representa una sola sección ecuatorial Z a partir de imágenes de microscopía confocal que muestran la localización celular de cada proteína. Paneles A, D, G y J representan la localización celular de la proteína sinaptofisina

(verde) utilizado como un marcador neuronal. B y E) Localización celular de HspB1 (rojo) en células PC12-C11 y PC12, respectivamente. H y K) Localización celular de anexina A5 (rojo) en células PC12-C11 y PC12, respectivamente. C) Merge de la imagen A y B. F) Merge de la imagen D y E. I) Merge de la imagen G y H. L) Merge de la imagen J y K. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 25 μm .

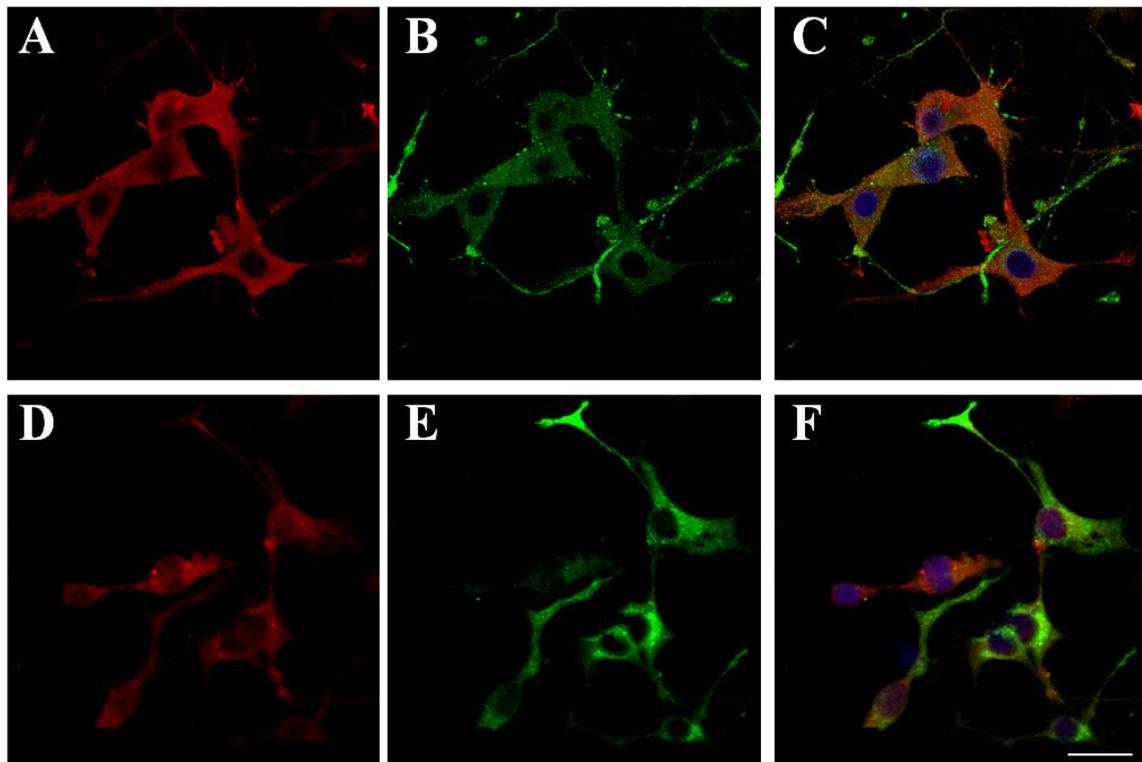


Figura 27, Localización celular de pHspB1Ser82 en células PC12-C11 diferenciadas. Células PC12-C11 crecidas en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina fueron fijadas y marcadas para la inmunodetección de HspB1 y pHspB1Ser82. A-F representa una sola sección ecuatorial Z a partir de imágenes de microscopía confocal que muestran la localización celular de cada proteína. Paneles B y E muestran la localización celular de la proteína sinaptofisina (verde) utilizado como un marcador neuronal. A y D) Localización celular de HspB1 y de pHspB1Ser82 (rojo), respectivamente. C) Merge de la imagen A y B. F) Merge de la imagen D y E. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La barra blanca representa la escala de 25 μm .

Los resultados obtenidos indican que HspB1 es la responsable de promover el crecimiento neurítico observado en las células PC12-C11 que expresan la mutante de distrofina $Dp71\Delta_{78-79}$. Por lo cual proponemos un modelo para esquematizar la participación de HspB1 en este proceso celular (Figura 28).

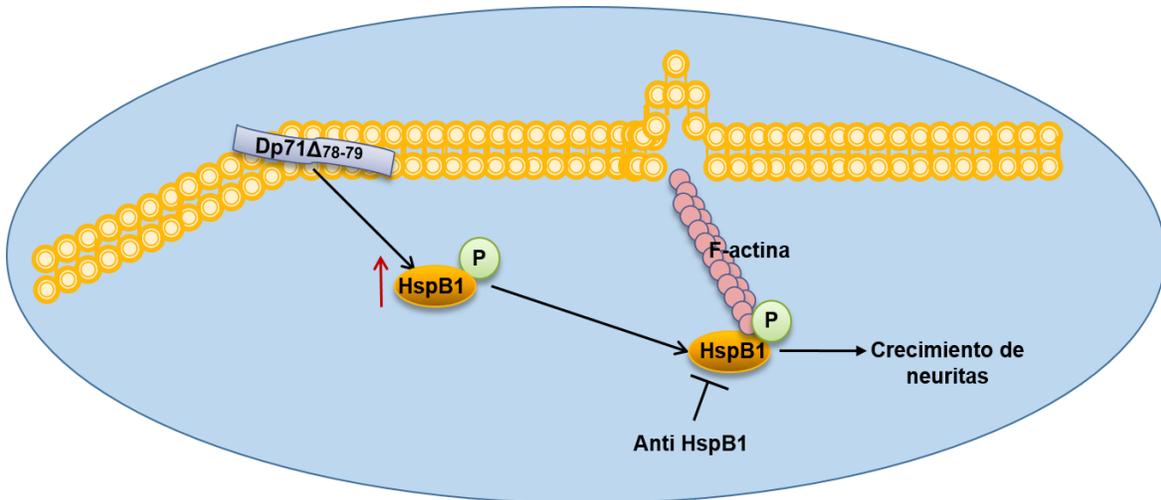


Figura 28. Participación de HspB1 en el crecimiento neurítico de células PC12-C11. La expresión de la mutante de distrofina $Dp71\Delta_{78-79}$ altera el perfil de expresión de células PC12-C11 aumentando la expresión y fosforilación de HspB1. HspB1 fosforilada interactúa con los filamentos de actina para promover crecimiento neurítico a través de la reestructuración del citoesqueleto. El crecimiento neurítico de las células PC12-C11 fue afectado por un anticuerpo policlonal anti HspB1, tanto el nivel de HspB1 como el de HspB1Ser86 disminuyeron considerablemente, sugiriendo que la expresión y fosforilación de HspB1 son esenciales para el crecimiento neurítico de las células PC12-C11.

8. Discusión

La línea celular PC12 ha sido ampliamente utilizada como modelo para estudiar la diferenciación neuronal debido a que la adición de NGF permite la adquisición de un fenotipo de neuronas tipo simpáticas (Greener y Tischler 1976). Se han realizado diversos estudios utilizando herramientas proteómicas para identificar proteínas relacionadas con la diferenciación inducida por NGF en esta línea celular (Huang., *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009). Se ha reportado que la diferenciación inducida por NGF en células PC12 durante cuatro días, altera el 10% de las proteínas expresadas donde la proteína con la regulación más elevada fue un fragmento derivado de la cromogranina B de 43 kDa, la cual presentó un incremento de 200%, sugiriendo que esta proteína puede servir como un marcador de la diferenciación inducida por NGF en células PC12 (Huang., *et al.*, 2001). Por otra parte, una estrategia de proteómica secuencial mediante el análisis de expresión diferencial cuantitativa acoplado a un exhaustivo análisis de MS en tándem, contribuyó a construir la base de datos del proteoma de células PC12. En este estudio se identificaron a las proteínas con mayor regulación relacionadas con la diferenciación celular como la proteína neurosecretora VGF, neuromodulina, cromogranina A, anexina A2, periferina, MAP1B, AHNAK y secretogranina 2 (Kobayashi *et al.*, 2009).

Con el propósito de comprender cómo la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, que carece de los exones 78 y 79, estimula la diferenciación neuronal en células PC12-C11 (Aragón *et al.*, 2011), en este estudio se comparó el perfil proteómico de células PC12-C11 y PC12 no diferenciadas y diferenciadas (Figura 17 y 18). Este análisis nos permitió identificar proteínas que se expresan diferencialmente en presencia de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. En estos ensayos se identificaron varias proteínas en un misma mancha lo cual puede explicarse por el uso de geles de 7 cm, donde el espacio para separar las proteínas es limitado y varias proteínas con pesos moleculares y pI parecidos pueden migrar en la misma posición. Por ésto se seleccionaron las proteínas con un mayor número de péptidos identificados, las cuales podrían ser las responsables de la variación observada, sin embargo no podemos excluir la participación de alguna de las proteínas menos abundantes. El listado de todas las proteínas identificadas se muestra en la tabla 6. Los resultados obtenidos indican que en células no diferenciadas se altera la expresión del 1.2% de las manchas (1 mancha es regulada

negativamente y 5 presentaron una regulación positiva de un total de 323 manchas analizadas.

La proteína regulada negativamente fue identificada como dihidropirimidinase 3, la cual ha sido reportada que es necesaria para la señalización de la clase 3 de semaforinas y la subsecuente remodelación del citoesqueleto (Fukata *et al.*, 2002), se le atribuye un papel importante en la guía axonal (Yuasa-Kawada *et al.*, 2003), así como en el colapso del cono de crecimiento neuronal y la migración celular (Goshima *et al.*, 1995). De manera interesante, los niveles de expresión de esta proteína también disminuyeron en células PC12-C11 diferenciadas, señalando la importancia de explorar este efecto en el cono de crecimiento de estas células. Las proteínas que presentaron una regulación positiva fueron el factor de elongación Tu mitocondrial, IDH, DJ-1, 14-3-3E y la tropomiosina-3. La proteína 14-3-3E ha sido asociada con la activación de la exocitosis de catecolaminas (Morgan *et al.*, 1992), también ha sido implicada en la reorganización de la red de actina para facilitar el movimiento de gránulos secretores (Roth *et al.*, 1995). La tropomiosina-3 esta implicada en la estabilización del citoesqueleto de actina. Es posible que la expresión de la tropomiosina-3 pueda ayudar a la estabilización del citoesqueleto de actina permitiendo el crecimiento de neuritas en ausencia del estímulo de NGF. Por otra parte, DJ-1 es una proteína multifuncional que tiene un papel de protección en contra del estrés oxidativo (Ariga *et al.*, 2013), por lo cual el incremento observado de esta proteína podría sugerir un efecto neuroprotector. El aumento de la expresión de la proteína 14-3-3E y la tropomiosina-3 podrían explicar los cambios morfológicos observados en células PC12-C11 no diferenciadas; las células PC12 son redondas, mientras que las células PC12-C11 son de forma ovalada e incluso sin NGF muestran crecimiento de neuritas (Aragón *et al.*, 2001).

El efecto de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en el perfil de proteínas de células PC12-C11 diferenciadas fue más evidente, 4%, que corresponde a 15 manchas de un total de 391 analizadas, se regulan de manera diferencial (Figura 18). Entre las proteínas reguladas positivamente, tres pertenecen a la familia de proteínas de choque térmico (sHsp): endoplasmina, GRP-78 y HspB1. La HspB1 fosforilada está involucrada en la reestructuración del citoesqueleto, la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés que contribuye al crecimiento axonal (Guay *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2013), mientras que en estado

no fosforilado la proteína inhibe *in vitro* la polimerización de actina (Miron *et al.*, 1991). De manera relevante, HspB1 fue la proteína con la regulación positiva más elevada, además fue identificada en dos manchas con un incremento en su expresión de 3.5 (mancha D13) y 5.2 (mancha D14) veces. Este incremento fue validado por WB (Figura 22) y por inmunofluorescencia (Figura 26) sugiriendo que esta proteína puede desempeñar un papel importante en la estimulación del crecimiento neurítico en células PC12-C11.

Es conocido que la localización celular puede ser importante para las funciones de las proteínas. HspB1 ha sido descrita como parte del filamento dentro de dendritas o axones y en componentes de sinapsis (Schmidt *et al.*, 2012). En las células PC12-C11 HspB1 fue localizada no sólo en el citoplasma, sino también a lo largo de las neuritas (Figura 26B). Debido a la expresión incrementada de esta proteína en las células PC12-C11 y a la distribución celular observada, se puede inferir que esta proteína puede tener un papel importante en el crecimiento de neuritas; su función puede implicar un control de polimerización de actina induciendo cambios en la remodelación del citoesqueleto requeridos para promover el crecimiento neurítico. La importancia funcional del incremento en la expresión de HspB1 fue determinada por un ensayo de bloqueo inmunológico en contra de esta proteína donde el crecimiento neurítico de las células PC12-C11 se afectó drásticamente en presencia de un anticuerpo policlonal anti-HspB1 (Figura 23). La función de HspB1 se vio afectada debido a la disminución de sus niveles de expresión y fosforilación después del tratamiento con el anticuerpo. Estos resultados demostraron que tanto la expresión y fosforilación de HspB1 es esencial para el crecimiento neurítico de las células que expresan la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Por otra parte, el crecimiento neurítico de células PC12 no se afectó tras el tratamiento con el anticuerpo, debido a que la expresión de HspB1 en estas células es muy baja, lo cual sugiere que el crecimiento neurítico de estas células es independiente de la participación de HspB1. Sin embargo, ha sido reportado que cuando PC12 es estimulada a diferenciación a través de un polipéptido activador de la adenil ciclasa de pituitaria (PACAP), HspB1 es altamente regulada (Cosette *et al.*, 2006).

La participación de HspB1 para promover la polimerización de actina y favorecer el crecimiento neurítico depende de su estado de fosforilación (Guay *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2013). La cinasa p38 juega un papel central en la fosforilación de

HspB1 (Landry *et al.*, 1992; Stokoe *et al.*, 1992; Rouse *et al.*, 1994). Sin embargo, otros reportes indican que PKC y PKA también contribuyen a la fosforilación de HspB1 (Maizels *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2007). En una sublínea de PC12 (células PC6), se ha descrito una vía de transducción de señales $G\alpha$ -Src-Rin-HspB1 que promueve el crecimiento neurítico por medio de la activación de HspB1 a través de PKA (Shi *et al.*, 2008). En este trabajo, mediante WB se comprobó que las células PC12-C11 diferenciadas a tres días con NGF muestran fosforilación de la Ser86 de HspB1 (sitio ortólogo de la Ser82 de humano) (Figura 25), sugiriendo una activación de esta proteína la cual puede ser responsable de promover el crecimiento neurítico en células PC12-C11. Esto podría ser a través de la re-estructuración del citoesqueleto de actina pues se ha reportado que HspB1 mantiene la integridad del citoesqueleto interactuando con varios elementos incluyendo filamentos de actina o monómeros de actina, tubulina, neurofilamentos y microtúbulos (Wettstein *et al.*, 2012). Además se ha reportado que el estado de fosforilación de HspB1 influye en el crecimiento neurítico de neuronas sensoriales primarias (Williams *et al.*, 2011).

Anexina A2 y anexina A5 fueron proteínas que también presentaron una regulación positiva. Las anexinas son proteínas de unión a calcio involucradas en el tráfico membranal, interacciones membrana-citoesqueleto, actividad de canal de calcio y transducción de señales (Lizarbe *et al.*, 2013). Se ha mostrado que anexina A2 tiene la habilidad para agrupar los filamentos de actina y tener un papel importante en su polimerización (Grieve *et al.*, 2012). Anexina A5 es una proteína asociada a membrana con actividad de canales de calcio (Gerke *et al.*, 2005), se ha visto que modula la afinidad por los iones calcio para crear una unión cooperativa (Gauer *et al.*, 2013), el dominio N- terminal puede estar involucrado en la regulación de las funciones asociadas a membrana (Smith *et al.*, 1994). Se ha visto también que anexina A5 puede entrar en el núcleo después de la estimulación de la señalización de tirosina-cinasa (Mohiti *et al.*, 1997) y en respuesta al estrés oxidativo (Sacre y Moss 2002). Sin embargo, hasta ahora no ha sido demostrado que esta proteína pueda tener un papel esencial en la diferenciación neuronal. Por otra parte al ser anexina A5 la segunda proteína más altamente regulada en células diferenciadas, los cambios en sus niveles de expresión se validaron por ensayos de WB e inmunofluorescencia y además determinamos la localización celular de esta proteína. En las células PC12-C11 se distribuye en el citoplasma y en menor proporción a lo largo de las neuritas (Figura 26H), como era de esperarse la

inmunoreactividad detectada para anexina A5 en células PC12 fue baja (Figuras 26K). El incremento observado en la expresión de esta proteína podría sugerir un papel importante de los canales iónicos para regular los niveles del calcio citosólico en células PC12-C11.

Sorpresivamente, nuestros resultados mostraron que algunas proteínas que desempeñan un papel importante en la diferenciación neuronal de células PC12 son reguladas negativamente (secretogranina-2, proteína secretora de VGF, NF-L, TH y aldosa reductasa). Se ha sugerido que la secretogranina-2 y la proteína secretora de VGF tienen un papel importante en la secreción (Possenti *et al.*, 1989; Taupenot *et al.*, 2003). Se ha reportado que el incremento de secretogranina-2 durante el tratamiento con NGF está correlacionado con el grado de diferenciación neuronal presente en células PC12 (Laslop *et al.*, 1992). La reducción en la expresión de estas proteínas en células PC12-C11 podría sugerir una alteración de las vías de secreción o un cambio en el tipo de vesículas sinápticas secretadas. TH cataliza la conversión de tirosina a L-DOPA, el primer paso para la biosíntesis de catecolaminas (Kvetnansky *et al.*, 2009), mientras que aldosa reductasa participa en la reducción de 3,4-Dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL), un metabolito tóxico producido por la deaminación oxidativa de dopamina a 3,4-dihidroxifeniletanol (DOPET) (Lamensdorf *et al.*, 2000). La baja regulación de estas proteínas podría sugerir una alteración en la secreción de catecolaminas, principalmente dopamina en células PC12-C11.

Se ha visto que el incremento en la expresión y fosforilación de proteínas de neurofilamento contribuyen a la extensión y la estabilización de los procesos neuronales en células PC12 (Clark *et al.*, 1991), también se ha sugerido la participación de los neurofilamentos en el control del calibre axonal (Hoffman *et al.*, 1988) y se ha demostrado que el grado de diferenciación de las células PC12 se puede cuantificar por la expresión de NF-L (Schimmelpfeng *et al.*, 2004). La disminución observada del NF-L pueden sugerir una alteración del calibre axonal en células PC12-C11.

Otra de las proteínas reguladas negativamente en células PC12-C11 es Rho GDP, la cual está implicada en la reorganización del citoesqueleto de actina (Sasaki *et al.*, 1998), cuando la proteína Rho GDP aumenta su expresión previene una alteración parcial de la red de actina que conduce a exocitosis (Komuro *et al.*, 1996). Es conocido que la reorganización de los filamentos de actina puede estar involucrada en el tráfico vesicular como exocitosis y

endocitosis (Muallem *et al.*, 1995; Trifaro *et al.*, 1993; Vitale *et al.*, 1995). La regulación negativa de esta proteína puede sugerir un efecto positivo en la reorganización de los filamentos de actina favoreciendo el tráfico vesicular, principalmente exocitosis.

Los niveles de expresión bajos de todas estas proteínas relevantes en la diferenciación neuronal, podrían sugerir que el crecimiento neurítico observado en células PC12-C11 requiere un nivel bajo de estas proteínas comparado con las células PC12; sería interesante explorar si el tráfico vesicular está afectado en estas células.

Algunas de las proteínas identificadas en este estudio como anexinas, tropomiocinas y proteínas de choque térmico, se consideran contaminantes debido a que son proteínas cuya expresión se ve alterada en varios estudios proteómicos (Petraik *et al.*, 2008), lo cual no es el caso para este estudio, donde los cambios detectados en los 2D-PAGE para HspB1 y anexina A5 fueron validados por ensayos de WB e inmunofluorescencia y además fue demostrada la relevancia biológica de regulación positiva de HspB1 en el crecimiento neurítico de las células PC12-C11.

Tomando en cuenta los resultados descritos en este trabajo podemos mencionar que la expresión de la distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ que posee los exones 63-77 y que carece de los exones 71, 78 y 79 alteran el perfil de expresión de las células PC12. La diferencia principal fue un aumento en la expresión de HspB1, la cual desempeña un papel esencial en la diferenciación neuronal. Los resultados de este estudio proporcionan una base sólida para explorar el mecanismo por el cual el mutante de distrofina promueve el crecimiento neurítico en células PC12.

9. Conclusiones

- El análisis proteómico de las células PC12-C11 y PC12 (sin diferenciar y diferenciadas 6 días con NGF) demostró que algunas proteínas se expresan de manera diferencial cuando la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ es expresada en células PC12-C11.
- Células PC12-C11 sin diferenciar muestran una expresión diferencial del 1.2% de las manchas analizadas (1 es regulada negativamente y 5 presentan regulación positiva).
- Células PC12-C11 diferenciadas muestran una expresión diferencial del 4% del total de manchas analizadas, (10 manchas son reguladas negativamente y 7 presentan una regulación positiva).
- HspB1 fue la proteína más sobre expresada en células PC12-C11 diferenciadas, con un incremento de 3.5 (mancha D13) y 5. 2 (mancha D14) veces con respecto a las células PC12.
- El ensayo de bloqueo inmunológico en contra de HspB1 demostró que esta proteína tienen una participación importante en el proceso de neuritogénesis, pues en presencia del anti-HspB1 el crecimiento neurítico inducido por NGF en células PC12-C11 fue afectado debido a la disminución en los niveles de expresión y fosforilación de esta proteína después del tratamiento con el anticuerpo.
- El incremento gradual de la expresión de la proteína HspB1 durante los días 0 a 6 de diferenciación, así como su distribución a lo largo de las neuritas y lo ya reportado en la literatura, soporta la idea de que esta proteína es responsable del crecimiento neurítico que se ve estimulado en células PC12-C11, debido a la expresión de la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.
- Las proteínas identificadas proveen información relevante para la exploración del mecanismo por el cual la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ promueve el crecimiento neurítico.

10. Perspectivas

- Determinar el mecanismo molecular a través del cual Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ estimula la expresión de HspB1 y el crecimiento neurítico de las células PC12-C11 e identificar a las moléculas efectoras que contribuyen a la estimulación de este proceso celular.
- Determinar la vía de señalización que activa la fosforilación de HspB1.
- Se ha reportado que la Dp71 es capaz de interactuar con actina a través de su extremo amino terminal por lo que explorar si la mutante de distrofina Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ puede tener una interacción directa con los filamentos de actina que contribuyan a la reestructuración del citoesqueleto, favoreciendo de esta manera el crecimiento de neuritas, contribuiría al esclarecimiento de cómo la mutante de distrofina promueve dicho proceso.
- Sería importante determinar si los niveles de calcio intracelular se ven afectados debido a la sobreexpresión de las anexinas A2 y A5 y explorar si estas proteínas tienen una relación directa con la estimulación del crecimiento neurítico observado en células PC12-C11, el calcio podría estar actuando como un segundo mensajero para activar una ruta de señalización específica.
- Medir los niveles de expresión de las proteínas que fueron reguladas negativamente (NF-L, secretogranina-2, TH y aldosa reductasa) y que están asociadas con el grado de diferenciación de las células PC12 a tiempos más cortos de diferenciación (1, 2 y 3 días). Esto para determinar si en este sistema estas proteínas podrían ser de expresión temprana.
- Debido a la disminución de la expresión de TH y aldosa reductasa, sería muy relevante determinar si la síntesis de catecolaminas (dopamina y norepinefrina) se ve afectada en este sistema.
- Determinar que proteínas interactúan con Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y si HspB1 y/o anexinas colocalizan con esta distrofina mutante.

11. Referencias

- Acosta R., Montañez C., Fuentes-Mera L., Gonzalez E., Gómez P., Quintero-Mora L., Mornet D., Álvarez-Salas L. M. and Cisneros B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res.* 296, 265-275.
- Aragón J., Romo-Yañez J., Martinez H. A., Ceja V., Rendon A. and Montañez C. (2011). Characterization of Dp71 Δ 78-79, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of Neurochemistry.* 119, 697-707.
- Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Romo-Yañez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Márquez, L., ... & Montañez, C. (2015). Identification of Dp71 isoforms expressed in PC12 cells: subcellular localization and colocalization with β -dystroglycan and α 1-syntrophin. *Journal of Molecular Neuroscience*, 1-9.
- Ariga, H., Takahashi-Niki, K., Kato, I., Maita, H., Niki, T., and Iguchi-Ariga, S. M. (2013). Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- Austin, R. C., Howard, P. L., Dsouza, V. N., Klamut, H. J. and Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Molecular Genetics.* 4, 1475-1483.
- Basu T., Warne P. H. and Downward J. (1994). Role of Shc in the activation of Ras in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Oncogene.* 9, 3483-91.
- Berninger B., García D. E., Inagaki N., Hahnel C. and Lindholm D. (1993). BDNF and NT-3 induce intracellular Ca²⁺ elevation in hippocampal neurones. *Neuroreport.* 12, 1303-1306.
- 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 4.8 kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum Mol Genet.* 1, 103-109.
- 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.

Bringmann, A., & Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci*, 6, E72-E92.

Cerna J., Cerecedo D., Ortega A., García-Sierra F., Centeno F., Garrido E., Mornet D. and Cisneros B. (2006). Dystrophin Dp71f associates with the beta1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion. *J Mol Bio*. 362, 954-965.

Chen X. Q., Tan I., Leung T. and Lim L. (1999). The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem*. 274, 19901–19905.

Cisneros B., Rendon A., Genty V., Aranda G., Marquez F., Mornet D. and Montañez C. (1996). Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci. Lett*. 213, 107–110.

Clark, E. and Lee, V. Y. (1991). Dynamics of mammalian high-molecular-weight neurofilament subunit phosphorylation in cultured rat sympathetic neurons. *Journal of neuroscience research*, 30, 116-123.

Clarke, J. P., and Mearow, K. M. (2013). Cell stress promotes the association of phosphorylated HspB1 with F-actin. *PloS one*, 8, e68978.

Coffey A. J., Roberts R. G., Green E. D., Cole C. G., Butler R., Anand R., Giannelli F. and Bentley D. R. (1992). Construction of a 2.6-Mb contig yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics*. 12, 474–484.

Cottrell J. S. and London U. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *electrophoresis*, 20(18), 3551-3567.

Crawford G. E., Faulkner J. A., Crosbie R. H., Campbell K. P., Froehners. C. and Chamberlain J. S. (2000). Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol*. 150, 1399–1410.

Cosette, P., Coquet, L., *et al.*, Identification of proteins regulated by PACAP in PC12 cells by 2D gel electrophoresis coupled to mass spectrometry. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1070, 380-387.

Daniels R. H., Hall P. S. and Bokoch G. M. (1998). Membrane targeting of p21-activated kinase 1 (PAK1) induces neurite outgrowth from PC12 cells. *EMBO J.* 17, 754–764.

Daoud F., Candelario-Martínez A., Billard J.M., Avital A., Khelifaoui M., Rozenvald Y., Guegan M., Mornet D., Jaillard D., Nudel U., Chelly J., Martínez-Rojas D., Laroche S., Yaffe D., and Vaillend C. (2009a). Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS one.* 4, e6574.

Daoud F., Angeard N., Demerre B., Martie I., Benyaou R., Leturcq F., Cossée M., Deburgrave N., Saillour Y., Tuffery S., Urtizberea A., Toutain A., Echenne B., Frischman M., Mayer M., Desguerre I., Estournet B., Réveillère C., Penisson-Besnier., Cuisset J. M., Kaplan J. C., Héron D., Rivier F. and Chelly J. (2009b). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet.* 18, 3779-94.

Deconinck N. and Dan B. (2007). Pathophysiology of duchenne muscular dystrophy: Current hypotheses. *Pediatr Neurol.* 36, 1-7.

Dworkin S. and Mantamadiotis T. (2010). Targeting CREB signalling in neurogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 14, 869–879.

Edwards, R. H., Selby, M. J., Mobley, W. C., Weinrich, S. L., Hruby, D. E., & Rutter, W. J. (1988). Processing and secretion of nerve growth factor: expression in mammalian cells with a vaccinia virus vector. *Molecular and cellular biology*, 8(6), 2456-2464.

Enríquez-Aragón, J. A., Cerna-Cortés, J., De León, M. B., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport*, 16(3), 235.

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.

Friedman W. J. and Greene L. A. (1999). Neurotrophin signaling via Trks and p75. *Exp Cell Res.* 253, 131-142.

Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., ... & Rendon, A. (2008). Kir4. 1 and AQP4 associate with Dp71-and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia*, 56(6), 597-610.

Fukata, Y., Itoh, T. J., Kimura, T., Ménager, C., Nishimura, T., Shiromizu, T., and Kaibuchi, K. (2002). CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nature cell biology*, 4(8), 583-591.

Gauer, J. W., Knutson, K. J., Jaworski, S. R., Rice, A. M., *et al.*, Membrane modulates affinity for calcium ion to create an apparent cooperative binding response by annexin A5. *Biophysical journal* 2013, 104, 2437-2447.

Gerke, V., Creutz, C. E., and Moss, S. E. (2005). Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(6), 449-461.

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

Görg, A., Weiss, W., & Dunn, M. J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4(12), 3665-3685.

Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., and Strittmatter, S. M. (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. . *Nature*, 376, 509-514.

Greenberg D. S., Schatz Y., Levy Z., Pizzo P., Yaffe D. and Nudel U. (1996). Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Hum Mol Genet.* 5, 1299–1303.

Greener L. A. and Tischler A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73, 2424–2428.

Greene, L. A., & Rein, G. (1977). Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. *Brain research*, 129(2), 247-263.

Grieve, A. G., Moss, S. E., Hayes, M. J., Annexin A2 at the interface of actin and membrane dynamics: a focus on its roles in endocytosis and cell polarization. *International journal of cell biology* 2012, 2012.

Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J. N., Huot, J., and Landry, J. (1997). Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of cell science*, 110, 357-368.

Hall A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279, 509–514.

Hoffman E.P., Brown R.H., and Kunkel L.M. (1987). Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 51, 919-28.

Hoffman, P. N., Koo, E. H., Muma, N. A., Griffin, J. W., and Price, D. L. (1988). Role of neurofilaments in the control of axonal caliber in myelinated nerve fibers. *Intrinsic determinants of neuronal form and function*, 37, 389-402.

Huang C. M., Shui H. A., Wu Y. T., Chu P. W., Lin K. G., Kao L. S. and Chen S. T. (2001). Proteomic analysis of proteins in PC12 cells before and after treatment with nerve growth factor: increased levels of a 43-kDa chromogranin B-derived fragment during neuronal differentiation. *Molecular Brain Research*. 92, 181-192.

Huang, S. Y., Tsai, M. L., Chen, G. Y., Wu, C. J., & Chen, S. H. (2007). A systematic MS-based approach for identifying in vitro substrates of PKA and PKG in rat uteri. *Journal of proteome research*, 6(7), 2674-2684.

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. and Chelly J. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 7506–7510.

Ibarra-Lomeli R., Cisneros B., Romo Y. J., Cervantes G., Mornet D. and Montañez C. (2007). Dp71, utrophin and beta-dystroglycan expression and distribution in PC12/L6 cell cocultures. *Neuroreport*. 18, 1657–1661.

Jensen O. N. (2000). Modification-specific proteomics: systematic strategies for analysing post-translationally modified proteins. *Trends in Biotechnology*, 18, 36-42.

Jung D., Filliol D., Metz-Boutigue M. H. and Rendon A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul Disord.* 3, 515–518.

Katoh H., Yasui H., Yamaguchi Y., Aoki J., Fujita H., Mori K. and Negishi M. (2000). Small GTPase RhoG is a key regulator for neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 20, 7378-87.

Keegan K. and Halegoua S. (1993). Signal transduction pathways in neuronal differentiation. *Current opinion in Neurobiology.* 3, 14-19.

Kelly, R. B. (1991). Secretory granule and synaptic vesicle formation. *Current opinion in cell biology*, 3(4), 654-660.

Kobayashi D., Kumagai J., Morikawa T., Wilson-Morifuji M., Wilson A., Irie A., and Araki N. (2009). An integrated approach of differential mass spectrometry and gene ontology analysis identified novel proteins regulating neuronal differentiation and survival. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(10), 2350-2367.

Koenig M., Monaco A. P. and Kunkel L. M. (1998). The complete sequence of dystrophin predicts a rod- shaped cytoskeletal protein. *Cell.* 53, 219-228.

Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K. R., Surbeck, L. W., Lester, H. A., & Newman, E. A. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4. 1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *The Journal of Neuroscience*, 20(15), 5733-5740.

Komuro, R., Sasaki, T., Takaishi, K., Orita, S., and Takai, Y. (1996). Involvement of Rho and Rac small G proteins and Rho GDI in Ca²⁺-dependent exocytosis from PC12 cells. *Genes to Cells*, 1, 943-951.

Kostenko, S., Moens, U., Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cellular and molecular life sciences* 2009, 66, 3289-3307.

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). *J Biol Chem* 269, 2870–2876.

Kunkel L. M., Beggs A. H. and Hoffman E. P. (1989). Molecular genetics of Duchenne and Becker muscular dystrophy: Emphasis on improves diagnosis. *Clin Chem.* 35, B21-4.

Kvetnansky, R., Sabban, E. L., Palkovits, M., Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews* 2009, 89, 535-606.

Lahm H. W., and Langen H. (2000). Mass spectrometry: a tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis*, 21(11), 2105-2114.

Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J., *et al.*, Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 1992, 267, 794-803.

Lamensdorf, I., Eisenhofer, G., Harvey-White, J., Hayakawa, Y., Kirk, K., & Kopin, I. J. (2000). Metabolic stress in PC12 cells induces the formation of the endogenous dopaminergic neurotoxin, 3, 4-dihydroxyphenylacetaldehyde. *Journal of neuroscience research*, 60(4), 552-558.

Laslop, A., and Tschernitz, C. (1992). Effects of nerve growth factor on the biosynthesis of chromogranin A and B, secretogranin II and carboxypeptidase H in rat PC12 cells. *Neuroscience*, 49, 443-450. Lebon, A., Seyer, D.,

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. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 5346–5350.

Lenk U., Hanke R., Thiele H. and Speer A. (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet.* 2, 1877–1881.

Lidov H. G. (1996). Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol.* 6, 63–77.

Liu J., Zheng X., Yin F., Hu Y., Guo L., Deng X., Chen G., Jiajia J. and Zhang H. (2006). Neurotrophic property of geniposide for inducing the neuronal differentiation of PC12 cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 24, 419-424.

Lizarbe, M. A., Barrasa, J. I., Olmo, N., Gavilanes, F., Turnay, J., Annexin-phospholipid interactions. Functional implications. *International journal of molecular sciences* 2013, 14, 2652-2683.

Maizels, E., Peters, C., KLINE, M., Cutler, R., SHANMUGAM, M., & HUNZICKER-DUNN, M. (1998). Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the δ isoform of protein kinase C. *Biochem. J.* 332, 703-712.

Mandel J. L. (1989). Dystrophin. The gene and its product. *Nature.* 339, 584-6.

Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velazquez, F., Depardon, F., and Montanez, C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118, 957-966.

Miron, T., Vancompernelle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., and Geiger, B. (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *The Journal of cell biology*, 114, 255-261.

Mohiti, J., Caswell, A. M., and Walker, J. H., (1997). The nuclear location of annexin V in the human osteosarcoma cell line MG-63 depends on serum factors and tyrosine kinase signaling pathways. *Experimental cell research*, 234, 98-104.

Moizard MP, 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? *Am J Med Genet.* 80, 32-41.

Moizard M. P., Toutain A., Fournier D., Berret F., Raynaud M., Billard C., Andres C. and Moraine C. (2000) Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Gene.* 8, 552-556.

Monaco A. P., Walker A. P., Millwood I., Larin Z. and LehraCH H. (1992). A yeast artificial chromosome contig containing the complete Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*. 12, 465–473.

Morales-Lazaro, S. L., Gonzalez-Ramirez, R., Gomez, P., Tapia-Ramirez, V., de Leon, M. B. and Cisneros, B. (2010). Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: opposite roles of Sp1 and AP2 alpha in Dp71 promoter activity. *Journal of Neurochemistry*. 112, 474-485.

Morgan, A. and Burgoyne, R. D., (1992). Exo1 and Exo2 proteins stimulate calcium-dependent exocytosis in permeabilized adrenal chromaffin cells. *Nature*, 355, 833-836.

Muallem, S., Kwiatkowska, K., Xu, X., and Yin, H. L. (1995). Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *The Journal of cell biology*, 128, 589-598.

Nishimura T1., Ishima T., Iyo M. and Hashimoto K. (2008). Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways. *PLoS One*, 3(7), e2558.

O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*, 250(10), 4007-4021.

Oshima M., Sithanandam G., Rapp U.R. and Guroff G. (1991). The phosphorylation and activation of B-raf in PC12 cells stimulated by nerve growth factor. *J Biol Chem*. 35, 23753-23760.

Ortega-Martínez, S. (2015). A new perspective on the role of the CREB family of transcription factors in memory consolidation via adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8.

Perronnet, C., & Vaillend, C. (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *BioMed Research International*, 2010.

Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., *et al.*, Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 2008, 8, 1744-1749.

Petrof B. J. (1998). The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biochem.* 179, 111-23.

Possenti, R., Eldridge, J., Paterson, B., Grasso, A., and Levi, A. (1989). A protein induced by NGF in PC12 cells is stored in secretory vesicles and released through the regulated pathway. *The EMBO journal*, 8, 2217.

Rando T. A. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 24, 1575-94.

Rapaport D., Lederfein D., Den Dunnen J. Y., Grootsholten P. M., Van Ommen G. J., Fuchs O., Nudel U. and Yaffe D. (1992). Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation.* 49, 187–193.

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. *Biol Chem.* 380, 431-42.

Roth, D., and Burgoyne, R. D., (1995). Stimulation of catecholamine secretion from adrenal chromaffin cells by 14-3-3 proteins is due to reorganisation of the cortical actin network. *FEBS letters*, 374, 77-81.

Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., ... & Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, 78(6), 1027-1037.

Sacre, S. M., and Moss, S. E., (2002). Intracellular localization of endothelial cell annexins is differentially regulated by oxidative stress. *Experimental cell research*, 274, 254-263.

Saint M. A., Aragón J., Depardon-Benítez F., Sánchez-Trujillo A., Mendoza-Hernández G., Ceja V. and Montañez C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J.* 1, 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. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1-10.

Sasaki T. and Takai Y. (1998). The Rho small G protein family-Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control. *Bio-chem. Biophys. Res. Commun.* 245, 641–645.

Schmidt, T., Bartelt-Kirbach, B., and Golenhofen, N. (2012). Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/ α B-crystallin in cultured hippocampal neurons. *Histochemistry and cell biology*, 138, 407-418.

Schimmelpfeng, J., Weibezahn, K.-F., and Dertinger, H. (2004). Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. *Journal of neuroscience methods*, 139, 299-306.

Sciandra F., Gawlik K. I., Brancaccio A. and Durbeej M. (2007). Dystroglycan: a possible mediator for reducing congenital muscular dystrophy?. *Trends Biotechnol.* 25, 262-268.

Shi, G.-X., Jin, L., Andres, D. A., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 38-mediated Rin activation requires Src and contributes to the regulation of HSP27 signaling during neuronal differentiation. *Molecular and cellular biology* 2008, 28, 4940-4951.

Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A. M., Westall, C. A., Panton, C. M., Powell, B. R., ... & Ray, P. N. (1994). Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology*, 101(5), 856-865.

Smith, P. D., and Moss, S. E. (1994). Structural evolution of the annexin supergene family. *Trends in Genetics*, 10, 241-245.

Stephens R. M., Loeb D. M., Copeland T. D., Pawson T., Greene L. A. and Kaplan D. R. (1994). Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC-gamma 1 to mediate NGF responses. *Neuron*. 12, 691–705.

Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., & Gaestel, M. (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS letters*, 313(3), 307-313.

Südhof, T. C., & Jahn, R. (1991). Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron*, 6(5), 665-677.

Szeberényi J. and Erhardt P. (1994). Cellular components of nerve growth factor signaling. *Biochimica et Biophysica Acta*. 187-202.

Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L. E., & Cisneros, B. (2012). Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular neurobiology*, 45(1), 43-60.

Taupenot, L., Harper, K. L., and O'Connor, D. T., (2003). The chromogranin–secretogranin family. *New England Journal of Medicine*, 348, 1134-1149.

Thomas, P. D., Campbell, M. J., Kejariwal, A., Mi, H., Karlak, B., Daverman, R., Diemer, K., Muruganujan, A., & Narechania, A. (2003). PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome research*, 13(9), 2129-2141.

Tinsley J. M., Blake D. J. and Davies K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2 kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet*. 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. *Mol Neurobiol*. 2, 287-97.

Travis, E. R., & Wightman, R. M. (1998). Spatio-temporal resolution of exocytosis from individual cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27(1), 77-103.

Trifaro, J., and Vitale, M. (1993). Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends in neurosciences*, 16, 466-472.

Trimble, W. S., Linial, M., & Scheller, R. H. (1991). Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal. *Annual review of neuroscience*, 14(1), 93-122.

Vaudry, D., Stork, P. J. S., Lazarovici, P., & Eiden, L. E. (2002). Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science*, 296(5573), 1648-1649.

Vetter M. L., Martin-Zanca D., Parada L. F., Bishop J. M. and Kaplan D. R. (1991). Nerve growth factor rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by a

kinase activity associated with the product of the trk protooncogene. *Biochemistry*. 88, 5650-5654.

Villarreal-Silva, M., Suárez-Sánchez, R., Rodríguez-Muñoz, R., Mornet, D., & Cisneros, B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochemical research*, 35(3), 366-373.

Vitale, M., Seward, E., and Trifaro, J.-M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron*, 14, 353-363.

Wettstein, G., Bellaye, P. S., Micheau, O., & Bonniaud, P. (2012). Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity?. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(10), 1680-1686.

Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Keli O., Golaz O., Sanchez J.C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., Williamns K.L and Hochstrasser, D.F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino-acid analysis. *Bio/technology*, 14, 61-65.

Williams, K. L., & Mearow, K. M. (2011). Phosphorylation status of heat shock protein 27 influences neurite growth in adult dorsal root ganglion sensory neurons in vitro. *Journal of neuroscience research*, 89(8), 1160-1172.

Williams, K. L., Rahimtula, M., and Mearow, K. M. (2006). Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons in vitro. *Journal of neuroscience research*, 84, 716-723.

Winkler, H., & Fischer-Colbrie, R. (1990). Common membrane proteins of chromaffin granules, endocrine and synaptic vesicles: properties, tissue distribution, membrane topography and regulation of synthesis. *Neurochemistry international*, 17(2), 245-262.

Wixler V., Smola U., Schuler M. and Rapp U. (1996). Differential regulation of Raf isozymes by growth versus differentiation inducing factors in PC12 pheochromocytoma cells. *FEBS Lett.* 385, 131-137.

Yang W., Liu P., Liu Y., Wang Q., Tong Y., and Ji J. (2006). Proteomic analysis of rat pheochromocytoma PC12 cells. *Proteomics*, 6(10), 2982-2990.

Yiu E. M. and Kornberg A. J. (2008). Duchenne muscular dystrophy. *Neurol India*. 56, 236-247.

Yuasa-Kawada, J., Suzuki, R., Kano, F., Ohkawara, T., Murata, M., and Noda, M. (2003). Axonal morphogenesis controlled by antagonistic roles of two CRMP subtypes in microtubule organization. *European Journal of Neuroscience*, 17, 2329-2343.

12. Anexos