



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Identificación de proteínas asociadas a la distrofina mutante
Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11”**

Tesis que presenta

Q.F.B. EDUARDO FELICIANO MONTEERRUBIO LEDEZMA

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directora de la Tesis

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Ciudad de México.

Agosto 2017

Durante el desarrollo de este trabajo el alumno Eduardo Feliciano Monterrubio Ledezma fue becario del consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro: 705235.

Este trabajo se realizó en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Doctora Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda y con la asesoría del Doctor Javier Hernández Sánchez y el Doctor Luis Marat Alvarez Salas. Con el apoyo de CONACyT con el proyecto cuyo número de registro es 222054.

Agradecimientos

A la Doctora Cecilia Montañez por permitirme realizar mi trabajo de tesis en su laboratorio y por sus consejos.

A el Doctor Luis Marat por sus acertados consejos que enriquecieron mi trabajo y mi persona.

A el Doctor Javier Hernández por sus preguntas que ayudaron a formarme y por su oportuna asesoría dura.

A Alejandra, Jorge y Víctor, que me auxiliaron durante el desarrollo de mi trabajo en cuestiones teóricas y técnicas.

A Fernanda, por ayudarme a crecer personalmente con tu madurez y por tu cariño y amor, te amo.

A mis compañeros de laboratorio que siempre estuvieron ahí para aconsejarme y apoyarme cuando lo necesitaba, muchas gracias.

A mis papás Claudio y Aurelia y mis hermanos por su confianza en mí y por ayudarme a ser la persona que soy hoy en día.

A Gio, Alex, Sergio, Nati y Diana por su amistad.

A Iva, Ian y de nuevo a Fernanda por su invaluable amistad consejos y momentos que pasamos juntos, Gracias (4WHJ).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introducción.....	1
1.1. El gen de la distrofina.....	2
1.2. La estructura de la distrofina.....	3
1.3. El complejo de proteínas asociadas a distrofina.....	4
1.4. La distrofina Dp71 y sus isoformas.....	8
1.5. Complejo de proteínas asociadas a Dp71.....	11
1.6. Células PC12.....	16
1.7. Células PC12-C11.....	17
2. Justificación.....	20
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos particulares.....	22
5. Materiales y métodos.....	23
5.1. Modelamiento in-silico.....	23
5.2. Cultivo celular.....	23
5.3. Lisado de células en condiciones desnaturalizantes.....	24
5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e inmunodetección en fase sólida.....	25
5.5. Cross-linking.....	26
5.6. Lisado de células en condiciones nativas.....	27
5.7. Co-inmunoprecipitación.....	27
5.8. Gel azul nativo y transferencia de proteínas.....	28
5.9. Tinción con azul de Coomassie coloidal.....	29
5.10. Análisis estadístico.....	29
6. Resultados.....	30
6.1. Modelos in-silico de las proteínas Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ , Dp71d Δ ₇₁ , Dp71f Δ ₇₁ y Dp71e Δ ₇₁ , mediante I-TASSER.....	30

6.2. Expresión de las proteínas NF-L, TH y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ , durante el proceso de diferenciación en células PC12-C11.....	33
6.3. Identificación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉	39
6.3.1. Preservación de los complejos en los que participa Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mediante Cross-linking.....	39
6.3.2. Identificación de complejos de proteínas en los que Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ participa mediante Co-Imunoprecipitación.	41
6.3.3. Identificación de los complejos en los que participa Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mediante Gel azul nativo.	44
6.3.4. Identificación de proteínas asociadas a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mediante SDS-PAGE e inmunodetección en fase sólida.	46
7. Discusión.	49
8. Conclusiones.....	55
9. Perspectivas.	56
10. Bibliografía.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gen DMD y las proteínas distrofinas.....	3
Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina.....	7
Figura 3. Composición en exones de las isoformas de Dp71, Dp40 y la distrofina mutante Dp71 Δ ₇₈₋₇₉	10
Figura 4. Complejo de proteínas asociadas a Dp71f en el proceso adhesión celular.	13
Figura 5. Complejo de proteínas asociadas a Dp71d en el núcleo.....	14
Figura 6. Complejo de proteínas asociadas a Dp71f Δ ₇₁ en células PC12 durante diferenciación con NGF.....	15
Figura 7. Incremento en la formación de neuritas en las células PC12-C11.....	18
Figura 8. Proteína HspB1.....	19
Figura 9. Estructuras in-silico de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ , Dp71d Δ ₇₁ , Dp71f Δ ₇₁ y Dp71e Δ ₇₁	31
Figura 10. Alineamientos entre la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y Dp71d Δ ₇₁ , Dp71f Δ ₇₁ y Dp71e Δ ₇₁	32
Figura 11. Esquema experimental de la curva de diferenciación.....	34
Figura 12. Expresión de NF-L y TH en células PC12-C11 durante diferenciación. ...	35
Figura 13. Expresión de NF-L y TH en células PC12-C11 no diferenciadas.....	36
Figura 14. Expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 durante diferenciación....	37
Figura 15. Expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 sin NGF.....	38
Figura 16. Cross-linking entre proteínas.....	39
Figura 17. Cross-linking de células PC12-C11.....	40
Figura 18. Fundamento del experimento de Co-inmunoprecipitación.....	41
Figura 19. Inmunoprecipitación de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉	42
Figura 20. Co-inmunoprecipitación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉	43
Figura 21. Complejos de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ identificados por inmunodetección en fase sólida.....	44
Figura 22. Complejos de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ teñidos con azul de coomassie coloidal.....	45
Figura 23. Identificación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 no diferenciadas.....	46
Figura 24. Identificación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 diferenciadas por un día con NGF.....	46

Resumen.

Dp71 tiene la función de andamio, es decir, es capaz de localizar proteínas en lugares específicos de la membrana plasmática y formar complejos con diferentes proteínas, por ejemplo: con β -dístroglicano, dístrobrevinas, sintrofinas. A través de procesamiento alternativo del mRNA, Dp71 produce 3 grupos de isoformas que difieren únicamente en el arreglo de los exones 78 y 79: Dp71d, Dp71f y Dp71e. La mayoría de las isoformas son capaces de formar complejos y estos son distintos. Estos complejos participan en diferentes procesos celulares como diferenciación celular. Con el objetivo de estudiar el papel de los exones de Dp71, en nuestro grupo de trabajo, se creó la mutante Dp71 Δ_{78-79} , que carece de los exones 78 y 79. Esta mutante se transfectó en la línea celular PC12, dando origen a la clona PC12-C11, estas células extendieron más neuritas a tiempos más cortos al ser diferenciadas con NGF en comparación con las células PC12. Posteriormente, a través de un estudio proteómico, nuestro grupo de trabajo encontró que HspB1, una proteína relacionada con crecimiento de neuritas, estimula este fenotipo. Para determinar si había diferencias estructurales entre la Dp71 Δ_{78-79} y Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} , en el presente trabajo se realizó una predicción de estructuras terciarias *in-silico* de estas proteínas, empleando I-TASSER, posteriormente, se alinearon las estructuras usando el programa Chimera. Se concluyó que no existe homología estructural entre las isoformas analizadas y la mutante, ni entre las diferentes isoformas. Con el propósito de entender cómo Dp71 Δ_{78-79} estimula el proceso de diferenciación, se identificaron proteínas que interactúan con esta mutante mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos muestran que, Dp71 Δ_{78-79} interactúa con β -dístroglicano de 30 kDa y con HspB1 a un día de diferenciación con NGF, tiempo en el que la expresión de Dp71 Δ_{78-79} alcanza su punto máximo. En conclusión, la Dp71 Δ_{78-79} podría estimular el crecimiento de neuritas a través de su unión con HspB1.

Abstract.

Dp71 is a scaffold protein that forms complexes with several proteins including β -dystroglycan, syntrophin and dystrobrevin. Through alternative mRNA splicing, Dp71 originates 3 groups of isoforms which differ on the arrangement of 78 and 79 exons: Dp71d, Dp71f and Dp71e. Each isoform integrates different complexes, thereby, regulating many cellular processes like cell differentiation. With the aim of studying the function of Dp71 exons, our work group generated the mutant Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, which lacks exons 78 and 79. This mutant was transfected into PC12 cell-line giving rise to the subline PC12 clone 11 (PC12-C11). Under NGF-induced differentiation, these cells extended more and longer neurites in less time compared to PC12 cells. More recent, our work group reported, through a proteomic approach, that HspB1 protein stimulates this phenotype.

In the present work, the structural differences between Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ and Dp71d Δ ₇₁, Dp71f Δ ₇₁ and Dp71e Δ ₇₁ isoforms were predicted *in-silico* using I-TASSER software and aligned with Chimera software. The conclusion is that there is not structural homology between the Dp71 isoforms and the Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mutant. To understand the role of the mutant in this process, proteins that interacts with Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ were probed using co-Immunoprecipitation assays. Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ interacts with β -dystroglycan of 30 kDa and HspB1 within 24 hours of NGF treatment. In conclusion, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ could stimulates neurite outgrowth through HspB1 interaction.

1. Introducción.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD) son distrofinopatías que se caracterizan por un deterioro progresivo del tejido muscular y un déficit cognitivo no progresivo. Ambos son padecimientos recesivos ligados al cromosoma X, originados por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la familia de proteínas llamadas distrofinas. La forma agresiva (letal) es la DMD, que termina en paro cardíaco, que se debe a una ausencia total de la proteína distrofina de longitud completa. Esta ausencia es causada por mutaciones sin sentido que generan un corrimiento en el marco de lectura, o a mutaciones puntuales en la región rica en cisteínas de la distrofina. La forma menos agresiva (no letal) es la BMD en la cual las mutaciones no alteran el marco de lectura; sin embargo, producen una disminución en la expresión de la distrofina o una alteración en su funcionamiento (Rumeur E L. 2015).

Los individuos que presentan DMD o BMD manifiestan un déficit cognitivo no progresivo. En el caso de la DMD, se manifiesta una dificultad de aprendizaje, atención y lenguaje. Aunque aún no se conocen las bases moleculares asociadas a estas alteraciones, se ha reportado que las personas afectadas con BMD presentan déficit cognitivo cuando una mutación disminuye la expresión de Dp71, o cuando estas mutaciones están presentes en los exones 75 y 76. Además, se encontró que los pacientes con DMD cuya mutación altera la expresión de todas las distrofinas salvo de Dp71, presentan desempeño cognitivo normal o cercano a lo normal (Daoud F. et al. 2009). Otro estudio sitúa a los pacientes afectados con DMD con un coeficiente intelectual, por debajo de lo normal (Cotton S M. et al. 2005).

1.1. El gen de la distrofina.

El gen de la distrofina (*DMD*) es el más grande del ser humano, comprende 2.4 megabases de longitud. Este gen se localiza en el locus p21 del cromosoma X (de 31,119, 219 a 33,339,609 pb). El gen *DMD* da origen a varios productos de diferentes tamaños, que reciben su nombre con la abreviación de la palabra dystrophin protein (en inglés) “Dp”, seguida de un número que corresponde al peso molecular aproximado en kilodaltons (kDa): Dp427 de 427 kDa, Dp260 de 260 kDa, Dp140, de 140 kDa, Dp116 de 116 kDa, Dp71 de 71 kDa y Dp40 de 40 kDa.

El gen *DMD* (figura 1) contiene 3 promotores en el extremo 5' regulados de manera independiente denominados promotor B (cerebro), M (musculo) y P (Purkinje), que dan origen a 3 productos de Dp427, estos, presentan variaciones en su extremo amino terminal. Y, 4 promotores internos que dan origen a distrofinas más pequeñas; promotor R (retina) que expresa a Dp260, B3 (cerebro 3) que expresa a Dp140, S (células de Schwann) que expresa a Dp116 y G (general) que expresa a Dp71 y Dp40 (Rumeur E. L. 2015, Constantin B. 2014). Dp40 se origina a través del procesamiento alternativo del mRNA (siglas en inglés de: ácido ribonucleico mensajero) se puede insertar una señal de poliadenilación que da origen a Dp40 (Tozawa T. *et al.* 2012).

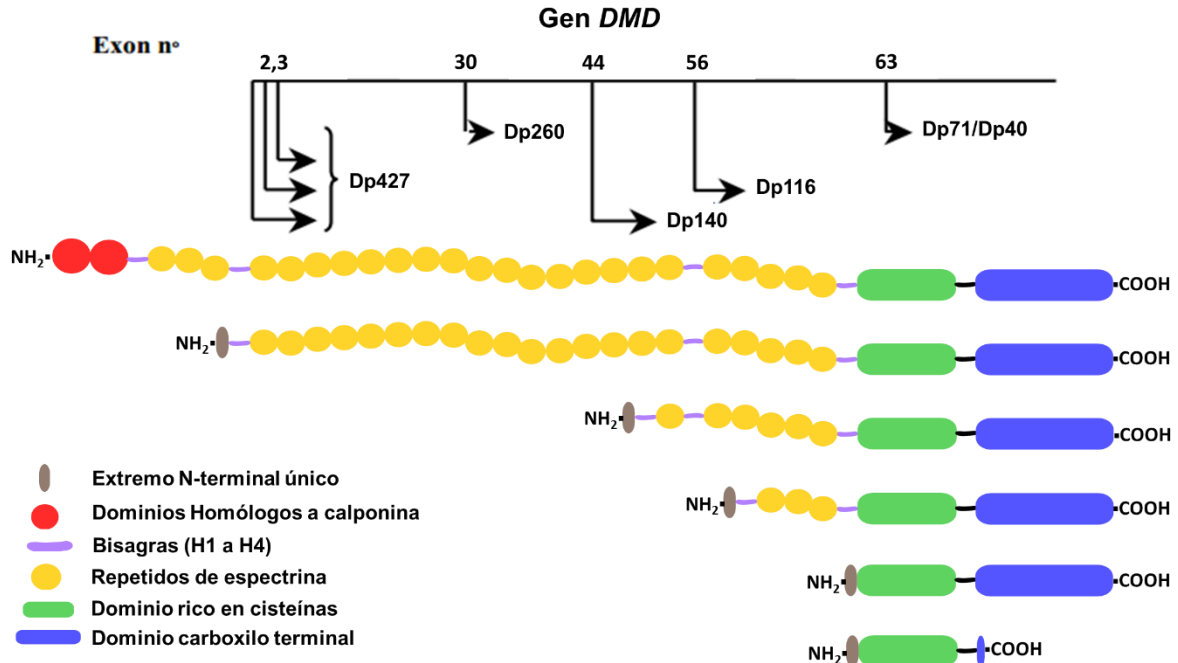


Figura 1. Gen *DMD* y las proteínas distrofinas.

En la parte superior se observa una representación del gen *DMD*, se señalan los exones en los cuales están localizados los 3 promotores (región 5') que dan origen a las distrofinas de longitud completa y los 4 promotores internos, a partir de los cuales se generan las distrofinas cortas. En la parte de inferior se muestra esquemáticamente la composición en dominios de las diferentes distrofinas.

1.2. La estructura de la distrofina.

Aunque no se ha obtenido la estructura cristalizada de la proteína Dp427 se sabe que dentro de su secuencia contiene 4 dominios que le permiten interactuar con otras proteínas (figura 1):

El primer dominio es el extremo amino terminal que comprende los exones 1-8 y es el sitio de unión a F-actina y a queratina a través de 2 dominios homólogos a calponina (CH1 y CH2). El segundo dominio, es la parte central de la proteína en forma de barra, se encuentra codificada en los exones 8 a 61 y está constituido por repetidos de espectrina intercalados con 4 bisagras (H1-H4) ricas en prolina. Esta parte interactúa con otras proteínas tales como

filamentos de actina, filamentos intermedios, microtúbulos, óxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS), entre otras. El tercer dominio abarca los exones 62 a 69 y contiene una región rica en cisteínas, compuesta a su vez por un motivo WW que tiene una longitud de 40 aminoácidos con forma de ranura única, dentro de la cual se encuentran residuos conservados de triptófano y de tirosina conservados. Este motivo es capaz de interactuar con secuencias PPXY (secuencia presente en β -dístroglicano) y secuencias lineales de péptidos fosforilados (Huang X. et al. 2000). Además, esta región de la proteína tiene 2 motivos Mano EF (mano EF 1 y mano EF 2), cuya función es estabilizar la interacción entre la región WW y β -dístroglicano. Por último, el motivo dedo de zinc (ZZ), localizado dentro del dominio rico en cisteínas, que parece esencial para la unión de β -dístroglicano con distrofina y con calmodulina, ésta última de manera calcio dependiente. Adicionalmente, el motivo ZZ es esencial para la localización nuclear de Dp71 (Suárez-Sánchez R. et al. 2014). El cuarto dominio de la distrofina corresponde al extremo carboxilo terminal (exones 69 a 79), dentro de éste existe una estructura hélice superenrollada (en inglés coiled coil: CC1 y CC2) que sirve de unión para distrobrevinas y sintrofinas (Rumeur E. L. 2015, Constantin B. 2014, Muthu M. et al. 2012).

A través de estos dominios la distrofina cumple la función de servir como andamio para una serie de proteínas que conforman el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC, en inglés), también conocido como complejo de distrofina-glucoproteínas (DGC, en inglés).

1.3. El complejo de proteínas asociadas a distrofina.

Dentro del dominio rico en cisteínas y carboxilo terminal se encuentran las regiones de unión a proteínas del DAPC. Las proteínas que conforman al DAPC se localizan en la membrana plasmática, aunque también se han

encontrado en núcleo. El DAPC participa en la estabilidad de la membrana plasmática, sirviendo de puente entre la matriz extracelular y el citoplasma, contribuyendo a la organización del citoesqueleto, participando en señalización y localización de otras proteínas en zonas específicas de la membrana plasmática (figura 2) (Constantin B. 2014, Tadayoni R. *et al.* 2012). Las proteínas que forman parte de este complejo son:

Las **sintrofina**s son un grupo de 5 proteínas homologas que se expresan en diferentes tipos celulares: α 1-sintrofina se expresa en células musculares, en el sarcolema, β 1-sintrofina en fibras musculares rápidas, β 2-sintrofina en la unión neuromuscular, γ 1- sintrofina en neuronas y, γ 2-sintrofina en neuronas. Los sitios de unión de las sintrofinas se encuentran entre los exones 73 y 75 de la proteína distrofina, así mismo, en algunas isoformas de la distrofina estos exones son eliminados a través de procesamiento alternativo del mRNA lo que permite la composición de varios DAPC con distinta estequiometria (Constantin B. 2014).

Las sintrofinas contienen un dominio PDZ flanqueado por 2 dominios homólogos a Plekstrina 1 (PH_N y PH_C), adyacentes a estos se encuentra otro dominio PH-2 y un extremo amino terminal único de sintrofina (SU), que facilita la unión de proteínas relacionadas con señalización intracelular, tales como nNOS, cinasas, proteína G (a través del dominio PH_N y PH_C), calmodulina (a través del extremo amino terminal) y canales iónicos a través del dominio PDZ, Nav1.5 de sodio y TRPC1, 4 de calcio (Constantin B. 2014).

El grupo de las **distrobrevinas**, está conformado por: α -distrobrevina codificada en el gen *DTNA* que se expresa en músculo y cerebro. Se han reportado 5 isoformas: las isoformas 1, 2 y 3 transcritas a partir de promotores localizados en el extremo 5' del gen y las isoformas 4 y 5 cuyos promotores son internos. Además, la β -distrobrevina que se expresa en tejido no muscular, codificada por el gen *DTNB*. Las distrobrevinas se unen a la distrofina a través de motivos de hélices superenrolladas (coiled coil) localizada en los exones

74-75 de la distrofina y 14-15 de la distrobrevina. Estas proteínas cuentan con dos sitios de unión a sintrofina ubicados en “tándem” dentro de un exón que puede removerse por procesamiento alternativo del mRNA. El primer sitio se localiza en la región variable 3 (vr3) que corresponde al exón 13 y el segundo sitio se localiza en el exón 14. El extremo carboxilo terminal de las isoformas de distrobrevina es homólogo al de la distrofina a excepción de la isoforma α -distrobrevina-3, cuya localización es nuclear y carece del extremo carboxilo terminal. La isoforma α -distrobrevina-1 posee una tirosina que sirve de sustrato para las enzimas tirosina cinasas (Blake D J. *et al.* 2002, Newey S. *et al.* 2002, Sadoulet-Puccio H. M. *et al.* 1997).

El grupo de los **distroglicanos** se expresa en músculo y en cerebro. La unión entre β -distroglicano y distrofina ocurre entre los exones 62 y 71 de la distrofina (en los dominios WW, EF1, EF2 y ZZ) y la región rica en prolinas (en específico PPXY) de β -distroglicano, formando una unión WW-PPXY, donde la tirosina puede ser fosforilada. La porción carboxilo terminal del β -distroglicano (en específico PPXY), es capaz de unirse al dominio SH3 de la proteína adaptadora Grb2, una proteína cinasa que junto con Sos1 es capaz de actuar como un intercambiador de GTP/GDP. A su vez, β -distroglicano se une a α -distroglicano, el cual interactúa con la laminina de la matriz extracelular. (Blake D J. *et al.* 2002, Constantin B. 2014, Waite, A. *et al.* 2009)

Y por último los **sarcoglicanos**, son proteínas transmembranales que presentan una alta glicosilación. Este grupo está conformado por seis miembros: α - y β -sarcoglicanos, expresados principalmente en tejido muscular; δ - y γ -sarcoglicanos, expresados en músculo y en otros tejidos y; ϵ - y ζ -sarcoglicanos expresados principalmente en cerebro. Este grupo es capaz de formar un sub-complejo heterotetramérico dentro del DAPC. Aunque la función aún no se entiende del todo, este sub-complejo parecen aumentar la fuerza de unión entre la distrofina y α - y β -distroglicano (Blake D J. *et al.* 2002, Waite, A. *et al.* 2012). A pesar de que se han reportado sub-complejos de

sarcoglicanos incompletos, la asociación tetramérica parece ser funcionalmente importante para el ensamblaje y el tráfico de las proteínas de sarcoglicano. Sin embargo, ϵ -sarcoglicano parece tener la capacidad de localizarse en la membrana sin ayuda de otros sarcoglicanos. Adicionalmente, ϵ -sarcoglicano, se ha relacionado con la neurotransmisión dopaminérgica (Waite A. et al. 2009).

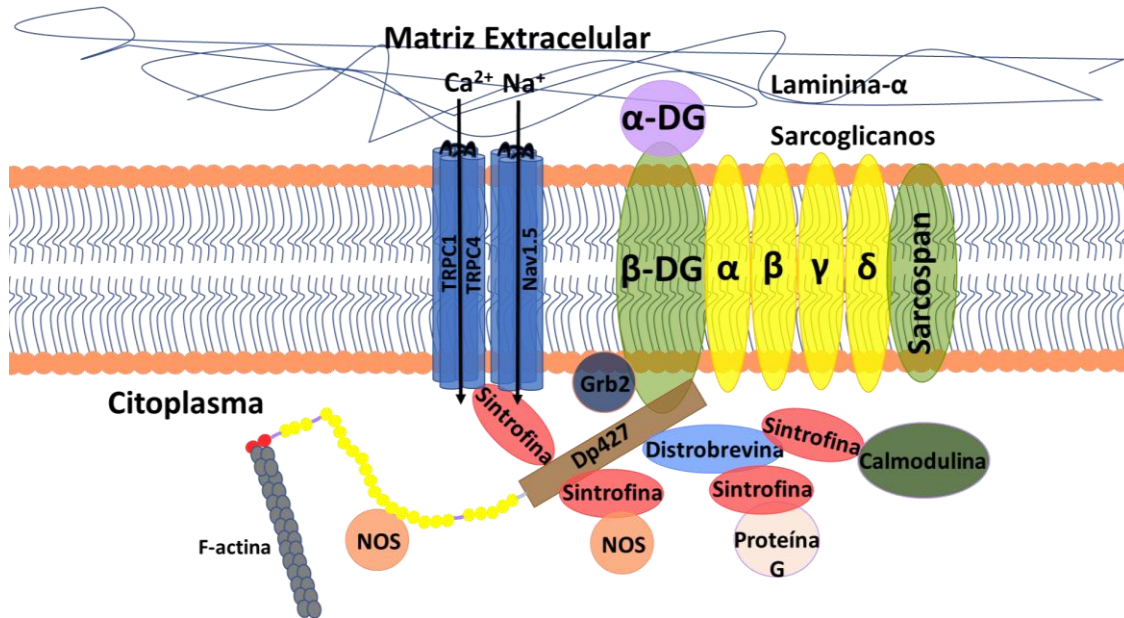


Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina.

La Dp427 que se encuentra en el músculo es capaz de interactuar de manera directa e indirecta con un gran número de proteínas que participan en: señalización citoplasmática (Proteína G, Grb2, NOS, calmodulina), citoesqueleto (F-actina), adhesión a la matriz extracelular (α -dystroglicano), canales iónicos, como el canal receptor de potenciales transitorios de cationes 1 y 4 (TRPC1/4) y el canal cardíaco de sodio activado por voltaje 1.5 (Nav1.5) (Constantin B. 2014)

1.4. La distrofina Dp71 y sus isoformas.

Dada la importancia de Dp71 en el déficit cognitivo en DMD y BMD, resulta de interés el estudio de esta distrofina. Adicionalmente, otros estudios han reportado la participación de Dp71 en varios procesos celulares como: homeostasis de iones y agua, señalización celular, ciclo celular, arquitectura nuclear y diferenciación celular (Acosta R. *et al.* 2004, Tadayoni R. *et al.* 2012).

La distrofina Dp71 comprende los exones 63 a 79 del gen *DMD* y un exón 1 específico (extremo amino terminal), que es capaz de unirse a F-actina. Además, la Dp71 solo conserva el dominio rico en cisteínas, así como el extremo carboxilo terminal de la Dp427. Debido al procesamiento alternativo del mRNA de Dp71, que se presenta en los exones 71, 71-74, 78 y el intrón 70, se expresan diversas isoformas de esta proteína. Estas isoformas se pueden organizar en 3 grupos de acuerdo a su extremo carboxilo terminal (figura 3); El grupo Dp71d, las isoformas de este grupo presentan los exones 78 y 79 del gen *DMD*. Los miembros son: Dp71d (antes denominada Dp71), Dp71d Δ 71, antes denominada Dp71a (el símbolo Δ indica que el exón señalada enseguida está ausente), Dp71d Δ 74, Dp71d Δ 71,74, Dp71d Δ 71,73-74 y Dp71d Δ 71-74, antes denominada Dp71c. El grupo Dp71f cuyos integrantes presentan una delección del exón 78, la cual, genera la sustitución del exón 79 por 31 aminoácidos nuevos, constituyendo un exón 79 diferente. En este grupo se encuentra: Dp71f, antes denominada Dp71b, Dp71f Δ 71, antes denominada Dp71ab, Dp71f Δ 74 y Dp71f Δ 71-74, antes denominada Dp71 Δ 110. Recientemente se ha descubierto un nuevo grupo de isoformas de la distrofina llamado Dp71e, tiene un extremo carboxilo terminal único, con la delección el último aminoácido del exón 77 y la adición de 10 aminoácidos nuevos, provenientes del intrón 77, que previenen la traducción de los exones 78 y 79. Este grupo está conformado por: Dp71e Δ 71, antes denominada Dp71e y Dp71f Δ 71-74, antes denominada Dp71ec. (Aragón J. *et al.* 2017, Saint Martín A. *et al.* 2012).

Hasta ahora la distrofina más pequeña reportada es Dp40 derivada del promotor de Dp71. Esta isoforma se genera a partir de la inserción de un sitio de poliadenilación situado en el intrón 70, provocando que esta isoforma presente los exones 63 a 70 del gen *DMD*. Se ha reportado que esta distrofina se localiza en vesículas sinápticas y es capaz de interactuar con proteínas presinápticas como syntaxina-1A, la proteína asociada al sinaptosoma 25 (siglas en inglés, SNAP25) y la proteína de membrana asociada a vesículas (siglas en inglés, VAMP2) (Tozawa T. *et al.* 2012). Así mismo, se ha encontrado en membrana plasmática, citoplasma y núcleo de células PC12 diferenciadas con NGF, desempeñando una función hasta ahora desconocida (Aragón J. *et al.* 2015).

Dp71 se expresa de forma ubicua y es la distrofina presente en mayor medida en el cerebro. Se ha reportado su expresión en cultivos de neuronas hipocampales donde colocaliza con el transportador hipocampal de glutamato y PSD-95, en densidades post sinápticas glutamatérgicas, y en regiones de crecimiento del cono neural. *In vivo*, se localiza en densidades post sinápticas de las regiones CA1-3, en el giro dentado del hipocampo, en el bulbo olfatorio, en las prolongaciones citoplasmáticas terminales de astrocitos perivasculares y en glía de Müller en retina (Daoud F, Candelario-Martínez A. *et al.* 2009, Waite A. *et al.* 2012).

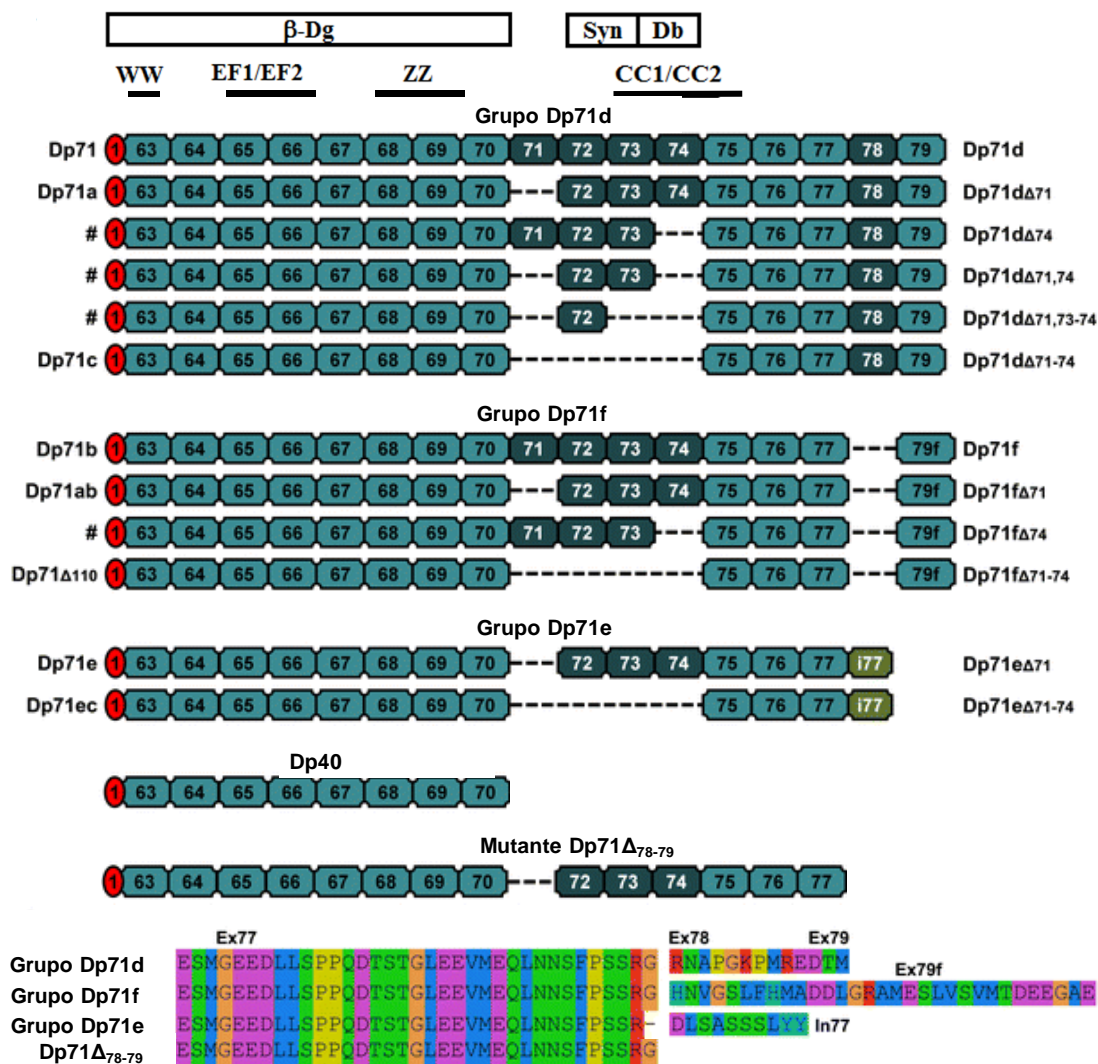


Figura 3. Composición en exones de las isoformas de Dp71, Dp40 y la distrofina mutante Dp71_{Δ78-79}.

En la parte superior se muestran los motivos WW, EF1/EF2 y ZZ de unión a β -dístroglican, así como los motivos CC1/CC2 de unión a sintrofinas (Syn) y distrobrevinas (Db). En la parte central están representados los 3 grupos de Dp71, el grupo Dp71d, el grupo Dp71f, el grupo Dp71e. También se muestra la isoforma Dp40 y la mutante Dp71_{Δ78-79}. En la parte inferior se representa el alineamiento de los aminoácidos de los últimos exones de los grupos Dp71d, Dp71f, Dp71e y la mutante Dp71_{Δ78-79} (Aragón J. *et al.* 2011, Aragón J. *et al.* 2017).

1.5. Complejo de proteínas asociadas a Dp71.

La Dp71 es capaz de formar complejos similares a los conformados por Dp427 ya que ambas presentan regiones homólogas, sin embargo, Dp71 es incapaz de suplir la función de la Dp427. La composición de los complejos formados por Dp71 varía debido a la existencia de una gran diversidad de isoformas tanto de Dp71 como de otros miembros del DAPC, como es el caso de las distrobrevinas, sintrofinas y sarcoglicanos, por lo que se han caracterizado diferentes DAPC en varios tipos celulares.

En lisados hipocampales de ratas se encontró que Dp71 es la única distrofina presente y por co-inmunoprecipitación se encontró que Dp71d se encuentra asociada con α 1-distrobrevina, α 2-distrobrevina, α -sintrofina, γ 1-sintrofina y β -dístroglicano. Adicionalmente, tanto Dp71d, como Dp71f se encuentran en complejo con las subunidades del receptor glutamatérgico GluR1-3 del receptor AMPA, las subunidades NR2A-B del receptor NMDA, PSD-95 y el canal rectificante de potasio 1 activado por proteínas G. De manera interesante también se encontraron 2 proteínas tirosina cinasas relacionadas con el crecimiento de neuritas, morfogénesis de espinas dendríticas y plasticidad sináptica: la cinasa de adhesión focal (FAK) y proto oncogen tirosina proteincinasa (C-src). La Dp71 parece funcionar como un modulador o localizador para estas proteínas, ya que su ausencia causa una deslocalización de nNOS, PSD-95, NMDAr y FAK, aunque, siguen uniéndose en ausencia de Dp71. De esta manera la maduración de la sinapsis glutamatérgica de neuronas corticales e hipocampales se altera (Daoud F, Candelario-Martínez A. *et al.* 2009).

Por otro lado, en neuronas hipocampales cultivadas *in vitro* se caracterizaron complejos de proteínas asociados tanto a Dp71d (presente principalmente en neuronas GABAérgicas bipolares) como a Dp71f (principalmente en neuronas multipolares glutamatérgicas) en los "speckles"

nucleares y se encontró que ambas isoformas se unen a las mismas proteínas: α -sintrofina, α -dístroglicano, β -dístroglicano y nNOS, aunque, Dp71f se une adicionalmente a α -dístrobrevina-1, α -dístrobrevina-2 y Dp71d a β -dístrobrevina (Rodríguez-Muñoz R. *et al.* 2015).

Así mismo, en retina se han reportado complejos asociados a Dp71f localizados al final de las prolongaciones citoplasmáticas de las células gliales de Müller. Dp71f forma un complejo similar al DAPC y está conformado por β -y α -dístroglicano, δ - y ϵ -sarcoglicano, α 1-sintrofina, α 1-dístrobrevina. Además, a este complejo se le une F-actina, laminina de la matriz extracelular (asociación mediada por α -dístroglicano), la proteína PSD-93 (unión mediada por α 1-sintrofina, posiblemente mediante los dominios PDZ de ambas proteínas), el canal de potasio Kir4.1 y acuaporina 4. De esta manera, este complejo mantiene la conductancia de iones potasio concentrada al final de las prolongaciones citoplasmáticas y el equilibrio osmótico en las células gliales de Müller. Sin embargo, en ausencia de Dp71f, se pierde este equilibrio osmótico y la conductancia se deslocaliza a otras zonas de la célula glial de Müller (Claudepierre T. *et al.* 2000, Fort P. E. *et al.* 2008).

Dp71f tiene un papel importante en adhesión celular ya que es un componente estructural del complejo de adhesión β 1-integrina, al interactuar con FAK, α -actinina, talina, actina y β 1-integrina en células PC12 (Figura 4). De la misma manera, se observó en células PC12 transfectadas con un antisentido contra Dp71, una alteración en la composición de este complejo y en consecuencia las células PC12 pierden capacidad de adhesión (Cerna J. *et al.* 2006).

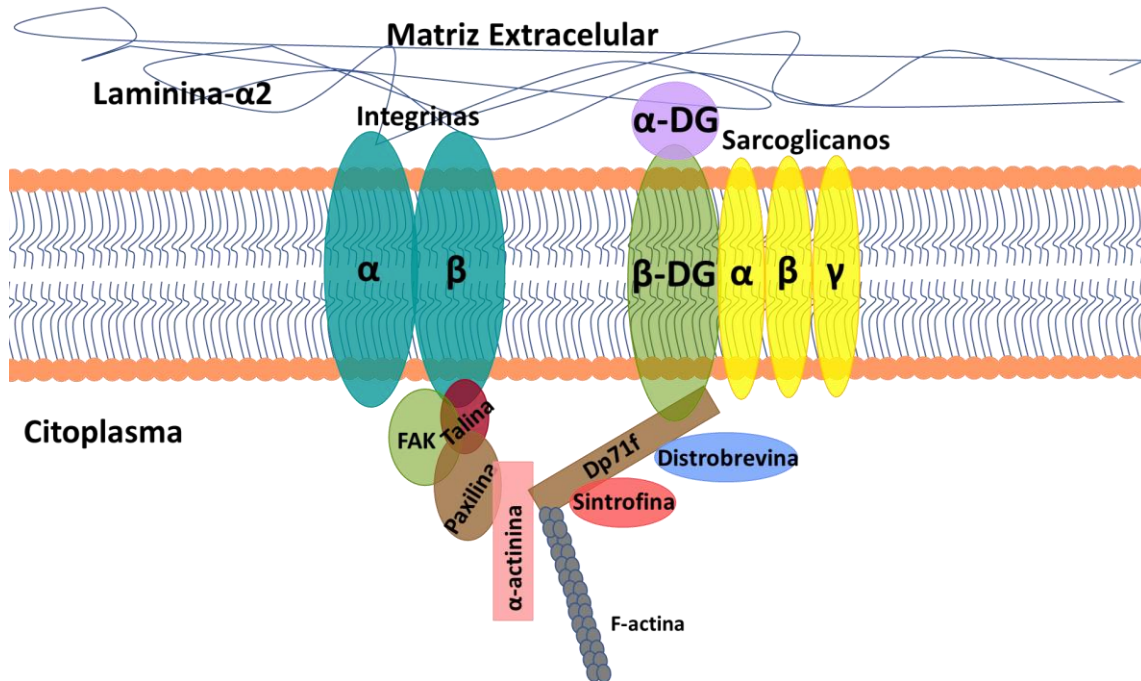


Figura 4. Complejo de proteínas asociadas a Dp71f en el proceso adhesión celular.

El complejo de proteínas asociadas a Dp71f es capaz de interactuar con otros complejos como el complejo de integrinas. Esta asociación es indispensable durante la adhesión celular y el proceso de diferenciación en células PC12 (Tadayoni R. *et al.* 2012).

Por otro lado, Dp71d forma un complejo en el núcleo (figura 5) conformado por β-distroglicano, α-sarcoglicano, distrobrevina, sintrofina, emerina y lamina B1. Así, Dp71d mantiene la estructura de la envoltura nuclear, al conservar la correcta localización de la proteína emerina. Dp71d es capaz de interactuar con lamina B1 y con β-distroglicano, en la zona del surco de división durante la citocinesis y en el huso mitótico. De esta manera Dp71 juega un papel importante durante el ciclo celular y la división celular (Villarreal-Silva M. *et al.* 2010, Suárez-Sánchez, R. *et al.* 2014).

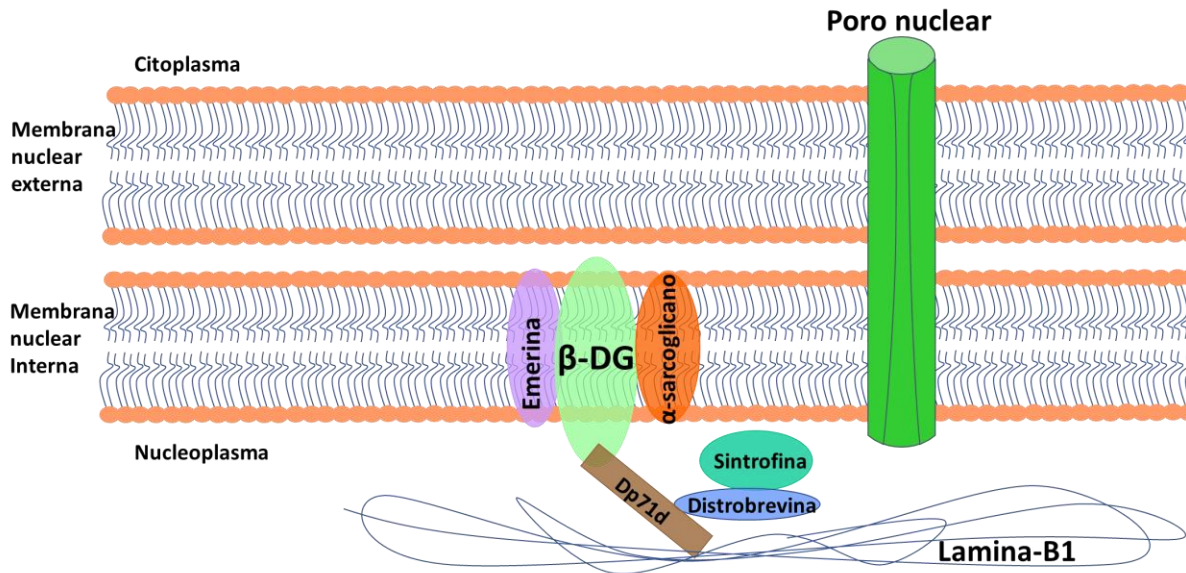


Figura 5. Complejo de proteínas asociadas a Dp71d en el núcleo

Cuando Dp71d se trasloca al núcleo es capaz de interactuar con proteínas de la envoltura nuclear como emerina. Además, interactúa con lamina-B1, un filamento que forma parte del nucleoesqueleto (Tadayoni R. *et al.* 2012).

Dp71f Δ_{71} en células PC12 no diferenciadas forma un complejo con β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -distrobrevina, α -, β - y γ -sarcoglicano, antes de diferenciación. Este complejo se modifica en células tratadas por 12 días con el factor de crecimiento neuronal (NGF). En estas condiciones, Dp71f Δ_{71} se une a β -dístroglicano, α 1-sintrofina, β -distrobrevina, δ -sarcoglicano y nNOS, tras 12 días de diferenciación con NGF, ver figura 6 (Romo-Yáñez J. *et al.* 2007). Este cambio en la composición del complejo sugiere que Dp71 podría estar participando en el proceso de diferenciación.

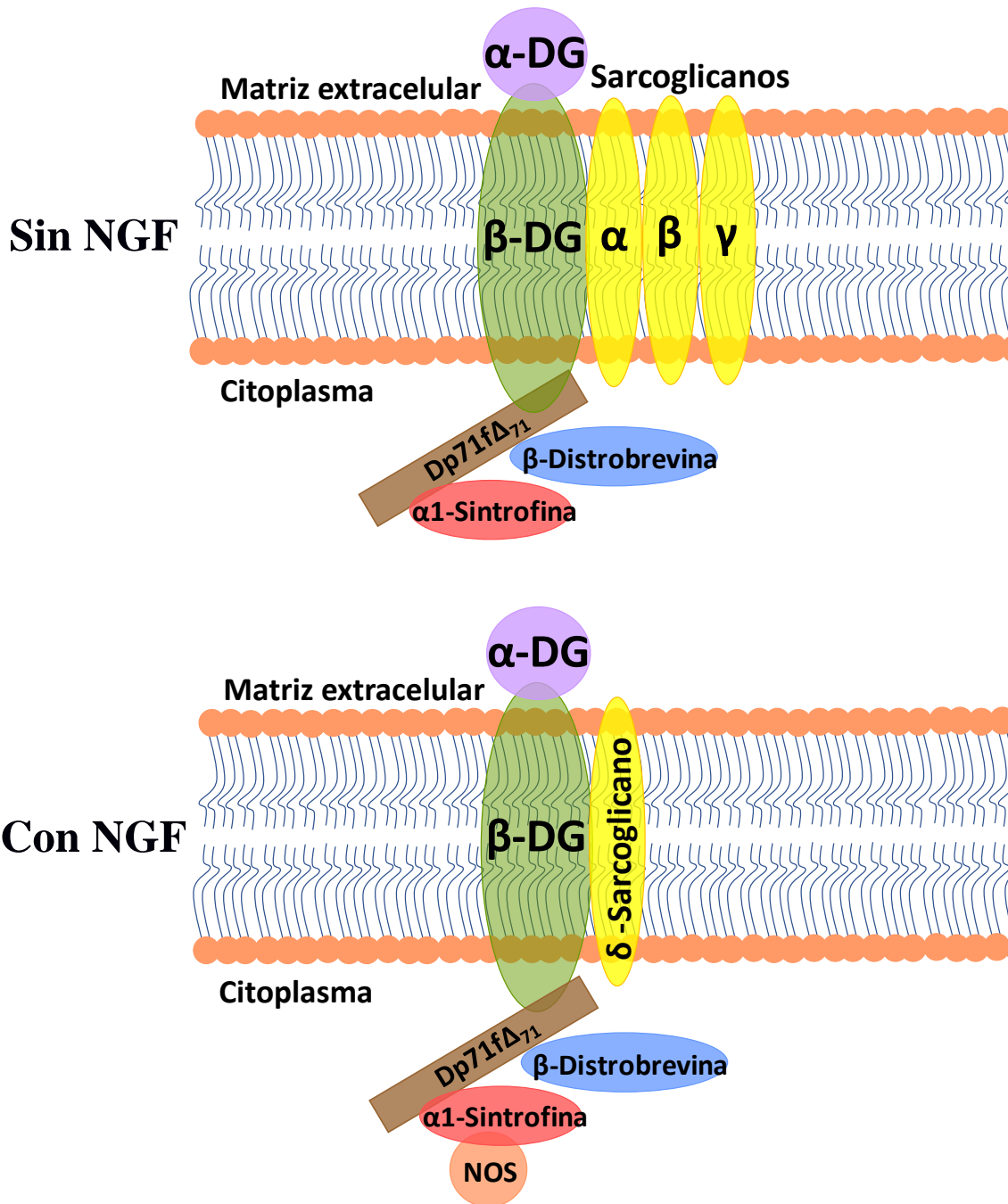


Figura 6. Complejo de proteínas asociadas a Dp71f Δ ₇₁ en células PC12 durante diferenciación con NGF.

En la parte superior se esquematiza el complejo de proteínas asociadas a Dp71f Δ ₇₁ en células PC12 sin diferenciar. En este complejo participan: α 1-sintrofina, β -distrobrevina, α y β distroglicano, y α , β , γ sarcoglicano. En la parte inferior se muestra el complejo de proteínas asociadas a Dp71f Δ ₇₁ en células PC12 diferenciadas que consta de: α 1-sintrofina, β -distrobrevina, α y β distroglicano, δ -sarcoglicano y NOS (Romo-Yáñez J. et al. 2007).

1.6. Células PC12.

Las células PC12 derivan de un feocromocitoma adrenal de rata, un tumor neuro-endocrino. Estas células tienen un origen embrionario en la cresta neural, un grupo de células que dan origen a varios linajes celulares, incluyendo a neuronas periféricas, entéricas y glía. Las células PC12 tras ser estimuladas con NGF, son capaces de diferenciarse, cesar su proliferación y adquirir un fenotipo tipo neurona simpática, capaz de excitarse eléctricamente secretar y de liberar neurotransmisores como dopamina, epinefrina, norepinefrina y acetilcolina (Fujita K. *et al.* 1989). El NGF induce esta diferenciación, mediante su unión con el receptor tirosin cinasa TrkA, enseguida la región citoplasmática de TrkA se autofosforila iniciando una vía de señalización que provoca la fosforilación rápida y sostenida de la familia de cinasas ERK, lo cual induce crecimiento de neuritas (Vaudry, D. *et al.* 2002). Las células PC12 expresan solamente las isoformas de Dp71 (Marquez F. *et al.* 2003, Rosas-Vargas H. *et al.* 2000), lo cual las hace un modelo apropiado para estudiar el papel de Dp71 durante el proceso de diferenciación y proliferación.

Se han realizado varios estudios en los que se muestra que Dp71 tiene un papel relevante en el proceso de diferenciación, en particular el crecimiento de neuritas. Se ha reportado que tras estimular a las células PC12 con NGF, se observa un aumento en la expresión de Dp71f, a partir del día 3 de diferenciación, localizándose principalmente en membrana y prolongaciones neuríticas. Mientras que, el nivel de expresión de Dp71d se mantiene constante, aunque su localización cambia hacia el núcleo (Marquez F. *et al.* 2003). Posteriormente, la inhibición de la expresión de todas las isoformas de Dp71 empleando un antisentido, se observó una disminución en la generación de crecimiento de neuritas tras la inducción de diferenciación con NGF y cAMP (adenosina monofosfato cíclico). Sorprendentemente, los primeros eventos que ocurren durante el proceso de diferenciación siguen inalterados: la

disminución en la proliferación celular y la activación de ERK1/2. Así mismo, MAP2 una proteína importante para el ensamble de microtúbulos durante el crecimiento de neuritas, se ve disminuida (Acosta R. *et al.* 2004).

1.7. Células PC12-C11.

Los resultados reportados sugieren que Dp71d y Dp71f podrían tener diferentes funciones, Dp71d parece tener un papel importante en núcleo y Dp71f en la membrana plasmática. Aparentemente estas diferencias están dadas por la diferente composición de los exones 78 y 79. Con el fin de entender el papel del extremo carboxilo terminal en las funciones de Dp71, se procedió a crear una mutante de la isoforma de distrofina de 71 kDa, que carece los exones 78 y 79, es decir, comprende de los exones 63 a 77, sin el exón 71. Adicionalmente, en el extremo amino terminal se le agregó una bandera de seis histidinas y un epítipo Xpress para hacer el seguimiento de la proteína, a esta mutante se le nombró Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Esta distrofina mutante fue trasfectada de manera estable en las células PC12. A través de una selección con zeocina, se obtuvo la sublínea celular PC12 Clona 11 (PC12-C11). Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal se encontró que Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 se localiza exclusivamente en la periferia celular y a lo largo de las extensiones neuríticas, tras 6 días de diferenciación con NGF (Aragón J. *et al.* 2011). En células PC12 Tet-On que sobre expresan Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ de manera inducible (PC12 clona B10), se determinó la localización de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y esta se encontró en la periferia de la membrana plasmática y citoplasma (Herrera-Salazar A. *et al.* 2016).

Además, las células PC12-C11 tienen una tasa de diferenciación más alta que las células PC12 silvestres (con base en su morfología) ya que extienden un mayor número de neuritas y éstas son más largas que las que desarrollan las células PC12 tras el estímulo con NGF (Figura 6).

Adicionalmente, las células PC12-C11 desarrollan un fenotipo diferenciado a los 4-6 días de tratamiento con NGF, en comparación con las células PC12 que lo alcanzan a 9-12 días (Aragón J. *et al.* 2011). Es decir, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ favorece el crecimiento de neuritas y aumenta la tasa de diferenciación.

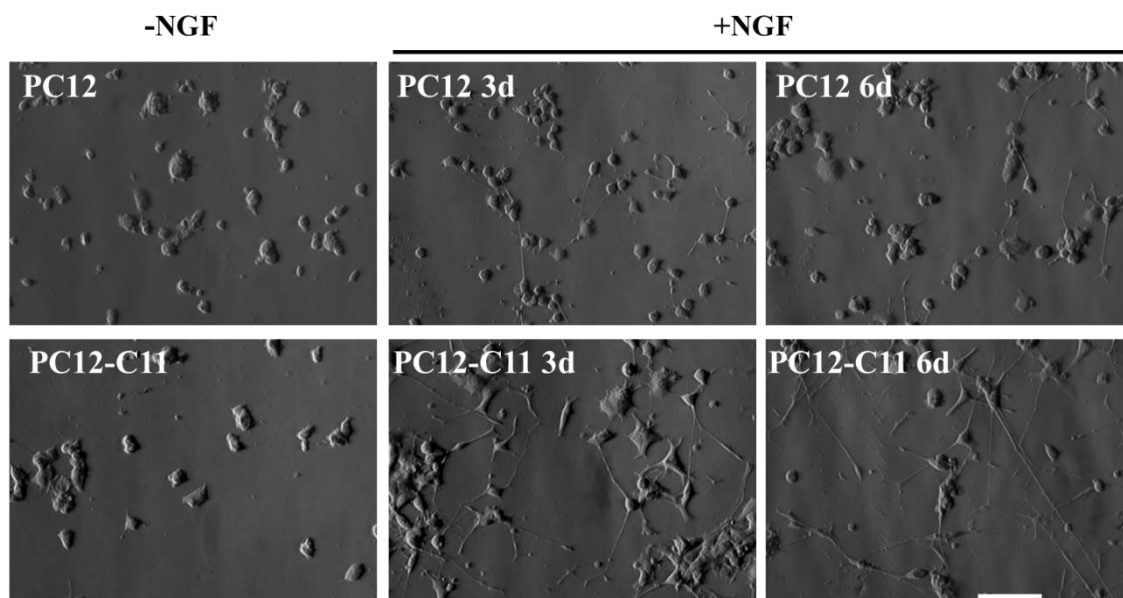


Figura 7. Incremento en la formación de neuritas en las células PC12-C11.

Se muestran imágenes en campo claro de las células PC12 y PC12-C11 durante el proceso de diferenciación con NGF. Las células fueron cultivadas sin NGF y con NGF por 3 y 6 días. (d=día). En los 3 paneles superiores se muestra a las células PC12 en un proceso de diferenciación con NGF. En los 3 paneles inferiores se muestra a las células PC12-C11 en un proceso de diferenciación con NGF. Las células PC12-C11 son capaces de presentar mayor número de neuritas (y más extensas) por célula que las células PC12 (Aragón J. *et al.* 2011).

Para entender cómo Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ podría estar promoviendo este aumento en la formación de neuritas, se realizó un análisis proteómico de células PC12-C11. Se encontró que los niveles de expresión de algunas proteínas se ven alterados respecto a las células control. En células PC12-C11, a 6 días de diferenciación, bajan los niveles la expresión de algunas proteínas relacionadas con los procesos de diferenciación como NF-L, (neurofilamento de cadena ligera, importante para el crecimiento radial del

axón), secretogranina-2, relacionada con el empaque de neuropéptidos en vesículas, TH (tirosin hidroxilasa), encargada de convertir tirosina en L-DOPA, un precursor de dopamina. Por otro lado, entre otras proteínas, HspB1 aumenta su expresión, siendo la proteína con la mayor regulación positiva. (Merino-Jiménez C. *et al.* 2016). HspB1 es una proteína que está relacionada con la respuesta al estrés celular (por calor y proteotoxicidad) y con crecimiento de neuritas (Read DE, Gorman AM. 2009). Interesantemente, al realizar un bloqueo inmunológico contra HspB1 se observa una disminución significativa en crecimiento de neuritas en células PC12-C11 tratadas con NGF por 3 días (Merino-Jiménez C. *et al.* 2016). Es decir, HspB1 estimula el crecimiento de neuritas en mayor medida. HspB1 tiene dos funciones principalmente, la primera sucede cuando no está fosforilada, en esta condición, HspB1 se oligomeriza y actúa como chaperona, así, reestructura proteínas mal plegadas. La segunda función de HspB1 ocurre cuando los residuos serina 15 y 86 son fosforilados. HspB1 fosforilada es capaz de estabilizar el citoesqueleto a través de su interacción con tubulina y filamentos de actina, promoviendo el crecimiento de neuritas (figura 8) (O'Reilly AM. *et al.* 2010).

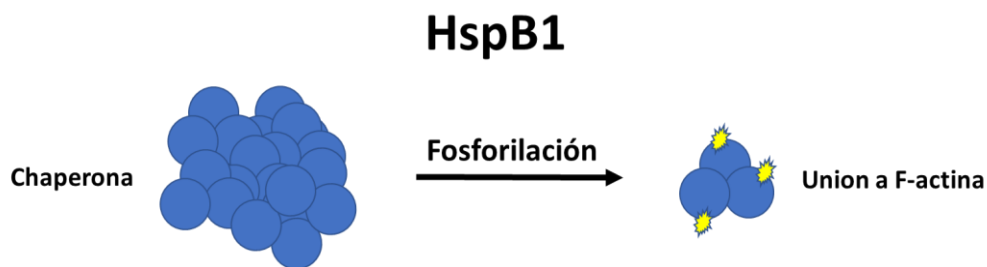


Figura 8. Proteína HspB1

HspB1 no fosforilada es capaz de oligomerizarse y actuar como chaperona, favoreciendo el correcto plegamiento de proteínas mal estructuradas. Cuando HspB1 (circulo azul) es fosforilada (estrellas amarillas) en los residuos 15 y 86, es capaz de interactuar con F-actina y tubulina, de esta manera estabiliza el citoesqueleto, promoviendo el crecimiento de neuritas durante la diferenciación (O'Reilly AM. *et al.* 2010).

Justificación.

Las evidencias indican que la propiedad de Dp71 de servir como andamio y unirse a diversas proteínas es primordial para su función. Se sugiere que cada una de sus isoformas puedan tener una función distinta, ya que la localización subcelular y la composición de los complejos que forman son diferentes. Con el propósito de entender el papel que desempeñan las diferentes regiones y el extremo carboxilo terminal de Dp71 se generó la mutante Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Las células PC12-C11 que sobreexpresan esta proteína mutante estimulan el proceso de crecimiento de las neuritas, en presencia de NGF. Con el propósito de entender cómo la distrofina mutante Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ estimula el crecimiento neurítico en las células PC12-C11, en este trabajo se llevó a cabo la identificación de las proteínas que se asocian a esta distrofina, conocimientos que contribuirán a entender la función de los exones 63 al 77 de Dp71.

3. Hipótesis.

La distrofina mutante Dp71 Δ_{78-79} forma parte de un complejo que participa en el crecimiento de neuritas en las células PC12.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Identificar proteínas que estén asociadas a la distrofina mutante Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, en células PC12-C11.

4.2. Objetivos particulares.

1. Realizar modelos *in-silico* de las proteínas Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, Dp71d Δ ₇₁, Dp71f Δ ₇₁ y Dp71e Δ ₇₁, mediante I-TASSER y comparar las estructuras predichas.
2. Evaluar la expresión de la proteína Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, NF-L y TH durante el proceso de diferenciación en células PC12-C11.
3. Identificar proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

5. Materiales y métodos.

5.1. Modelamiento *in-silico*.

Las secuencias de Dp71d Δ_{71} (Número de acceso: NP_036830.2), Dp71f Δ_{71} (Número de acceso: NP_001005244.1) y Dp71e Δ_{71} (Numero de acceso: AEA76517.1) fueron obtenidas de la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Estas secuencias fueron reportadas por nuestro grupo de trabajo. Para obtener la secuencia de Dp71 Δ_{78-79} se utilizó como molde la secuencia de Dp71d Δ_{71} , a la cual, se le removieron los últimos 13 aminoácidos, correspondientes a los exones 78 y 79. Los modelos terciarios de las proteínas Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} , Dp71e Δ_{71} y Dp71 Δ_{78-79} se obtuvieron utilizando la herramienta Iterative Threading ASSEmby Refinement (I-TASSER) <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. Posteriormente se realizaron alineamientos de estructuras entre Dp71 Δ_{78-79} y cada una de las isoformas (Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} , Dp71e Δ_{71}) y se obtuvo en Root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) que nos indica la distancia promedio entre los átomos de los aminoácidos de la cadena principal superpuestos. Los parámetros del alineamiento fueron: algoritmo; Needleman-Wunsc y la Mátriz; BLOSUM-62. Se utilizó el programa Chimera 1.11.2rc para obtener las imágenes de las estructuras, así como para realizar los alineamientos entre las proteínas.

5.2. Cultivo celular.

Las células PC12-C11 fueron cultivadas en placas de plástico con medio de crecimiento Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con suero de caballo al 10% inactivado por calor (Gibco, Rockville, MD, USA), 5% de suero fetal bovino (Gibco), 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ micostatina, 100 U/ml de penicilina

(Gibco), 1 mg/ml de estreptomicina y (Gibco y 200 µg/mL de zeocina (Invitrogen) a 37°C en una atmósfera saturada de agua con CO₂ al 5%. El medio se cambió cada 3 días. Para diferenciar a las células, se cultivaron en placas cubiertas con colágena en medio de crecimiento diluido 1:10 para sincronizar por 3 días (las concentraciones de antibióticos se mantuvieron sin diluir). Posteriormente se cambió el medio por medio de crecimiento diluido adicionado con 50 ng/mL de NGF. Para las curvas de diferenciación, las células fueron sembradas en placas p30 con 400,000 células al día 0 y 1 de diferenciación, 300,000 células para los días 2 y 3, y 200,000 células para el día 6. Las células PC12 fueron cultivadas en las mismas condiciones, sin usar zeocina. Se omitió el uso antibiótico durante la diferenciación para ambas líneas celulares. El medio completo se cambió 2 veces por semana y el medio bajo en suero con o sin NGF cada 3 días.

5.3. Lisado de células en condiciones desnaturalizantes.

Las células PC12-C11 que fueron usadas para realizar las curvas de diferenciación se lisaron de la siguiente manera: la cosecha se hizo por raspado de caja, en seguida se empastillaron las células por centrifugación a 2,655 g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS alternados con centrifugaciones a 2655 g por 5 minutos a 4°C, al final de los lavados se resuspendió el precipitado de células en un volumen de 150 a 400 µl del tampón de lisis "T" (Tris-HCl 250 mM, EDTA 1 mM y cocktail de inhibidor de proteasas complete (roche) 1X, a pH=8) y se pasaron las células a un tubo de 1.5 ml. A continuación, se sonicaron las muestras en hielo por 2 minutos 15 segundos a una amplitud de 50% con un pulso de 15 segundos y un descanso de 30 segundos. Finalmente, se centrifugaron los lisados a 17,949 g por 15 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Para cuantificar la proteína se

empleó la técnica de Bradford utilizando el reactivo de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad). Las muestras se almacenaron a -20°C.

5.4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) e inmunodetección en fase sólida.

A 40µg de lisados celulares se les agregó el tampón de muestra 1 para obtener una concentración final de 50 mM Tris-HCl pH=7, 2% Dodecilsulfato sódico, 2% β-mercaptoetanol, 4% glicerol y 0.1% azul de bromofenol. Estos lisados fueron calentados a ebullición por 5 minutos. Posteriormente se corrieron en un SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico) al 12% (relación acrilamida-bisacrilamida; 30:0.8). Posteriormente, se realizó la transferencia húmeda por 1 hora a 100 volts en membranas de nitrocelulosa, se bloquearon las membranas por 2 horas en una solución al de TBS-T (100 µM tris-HCl, 1.5 M NaCl, 0.5% tween-20, pH=8) con leche en polvo libre de grasas al 5%. Después, se realizaron de 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios. Los anticuerpos que se utilizaron fueron: anti-Xpress de ratón (R910-25, invitrogen) a una dilución de 1:200, anti-NF-L de ratón (Ab7255, Abcam) 1:2,000, anti-TH de conejo (Ab41528, Abcam) 1:200, LG5 de conejo (anti-β-distroglicano) 1:200, anti-HspB1 de conejo (Ab12351, Abcam) 1:500, anti-FAK (Sc-558, santa cruz) 1:500, anti-β-actina de ratón (Sc-47778, santa cruz) 1:50. Tras lavar 3 veces con TBS-T las membranas recién incubadas con el anticuerpo primario se incubaron por un tiempo de 1 a 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario en una solución de TBS-T, con leche en polvo baja en grasa al 5%. Los anticuerpos secundarios usados fueron: anti-ratón de cabra (A10668, Invitrogen) 1:10,000 y anti-conejo de cabra (A10547, Invitrogen) 1:10,000. Ambos anticuerpos secundarios están conjugados a la

peroxidasa de rábano. Al final se reveló mediante una reacción quimioluminiscente adicionando el sustrato de la enzima (Western Lightning Plus-ECL) en placas radiográficas o utilizando un analizador fluorográfico de barrido (Typhoon). Las intensidades de las bandas fueron cuantificadas usando el programa ImageJ. Para normalizar la expresión de las proteínas evaluadas, se midieron las intensidades de las bandas y estas fueron divididas sobre la intensidad de la banda de actina (control de carga).

5.5. Cross-linking.

Las células PC12-C11 fueron cosechadas por raspado de cajas p100 a una confluencia del 90%. En seguida, se precipitaron las células por centrifugación a 2,655 g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS alternados con centrifugaciones a 2,655 g por 5 minutos a 4°C, al final de los lavados se resuspendió el precipitado de células en una solución de PBS adicionada con paraformaldehído (PFA) al 0.5 y 1% para inducir cross-linking. Se incubó por 15 minutos, tras los cuales se agregó glicina (0.125 M concentración final) para detener la reacción. Para lisar a las células, estas se incubaron por 20 minutos en hielo con agitación utilizando el tampón de lisis BE-2 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% tritón X-100, pH=7.4). El lisado se centrifugó por 15 minutos a 17,949 g a 4°C. Se preservó el sobrenadante y se agregó el tampón de muestra 2 (concentración final: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 1% tritón X-100, 5 mM EDTA, 1X de “cocktail” de inhibidores de proteasas de roche). 20 µl de lisados se corrieron en un SDS-PAGE en gradiente del 4 al 15% (relación acrilamida-bisacrilamida: 30:0.8). Previo a la corrida en el gel, las muestras se calentaron por 15 minutos de manera independiente bajo 2 condiciones: a ebullición, para revertir el cross-link y a 65°C, para desnaturalizar proteínas sin afectar el cross-link. Después, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa como se

describió previamente y se continuó con la inmunodetección en fase sólida.

5.6. Lisado de células en condiciones nativas.

Las células PC12 y PC12-C11 se cultivaron en cajas p100 hasta obtener una confluencia del 90% y fueron cosechadas de la siguiente manera: se retiró el medio de las cajas y se agregaron 5 ml de PBS con EDTA 0.5 mM y se rasparon las cajas para obtener las células. En seguida se precipitaron las células por centrifugación a 2,655 g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS alternados con centrifugaciones a 2,655 g por 5 minutos a 4°C, al final de los lavados se resuspendió el precipitado de células en el tampón de lisis nativo (20 mM Bis-tris, 500 mM Ácido gama aminocaproico, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, Glicerol 10%, 0.5% Tritón X-100, 1X de "cocktail" de inhibidores de proteasas de roche, pH=7) y se incubó por 30 minutos en hielo con agitación constante. A continuación, el lisado se centrifugó por 15 minutos a 17,949 g a 4°C. Se preservó el sobrenadante, el cual fue cuantificado para determinar la concentración de proteína. Para esto, se empleó la técnica de Bradford. Se utilizó el reactivo de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio Rad). Se almacenaron las muestras a 4°C.

5.7. Co-inmunoprecipitación.

Las células se cultivaron hasta obtener el 90% de confluencia. Para co-inmunoprecipitar se emplearon de 800 a 1,000 µg de lisados totales de células PC12-C11. Como control negativo se emplearon células PC12 (no expresan a la Dp71Δ₇₈₋₇₉). Primero se bloquearon estos lisados con proteína G-sefarosa (15 µl por cada 400 µl de lisado) (P3296, sigma-aldrich) por hora y media a 4°C en agitación constante. Después, se centrifugaron las muestras a 17,949

g a 4°C por 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante, con el anticuerpo monoclonal anti-hisX6 (sc-53073, santa cruz), 8 µg para 1,000 µg de lisado total. Para los precipitados negativos en lugar de anticuerpo se agregó un volumen igual del tampón de lisis nativo. Posteriormente, se incubó la muestra con 35 µl de proteína G-sefarosa por 2 horas a 4°C con agitación constante. Al termino, se centrifugaron las muestras a 17,949 g a 4°C por 15 minutos y se guardó el sobrenadante. Por otro lado, los precipitados se lavaron 3 veces con 1 ml del tampón de lisis nativo. Entre cada lavado se centrifugó a 17,949 g por 15 minutos a 4°C. Al final los precipitados se dejaron en un volumen aproximado de 50 µl en el tampón de lisis nativo (para los geles nativos) o se resuspendió en el tampón de muestra 1 (para SDS-PAGE).

5.8. Gel azul nativo y transferencia de proteínas.

Los precipitados y 100 µg de lisados totales fueron corridos en geles de poliacrilamida en condiciones nativas a un voltaje constante de 100 volts a 4°C en un gel en gradiente de resolución del 12% (0.5 M ácido gama aminocaproico, 0.005 mM Bis-tris, 18.5% glicerol, relación acrilamida-bisacrilamida; 30:0.8, pH=7) al 4% (preparado como el gel al 12% sin glicerol) y un gel concentrador al 3.2%. Para correr estos geles se emplearon los tampones de: Ánodo (50 mM bis-tris, pH=7) y cátodo (15 mM bis-tris, 50 mM tricina, 0.02% azul de coomassie G-250, pH=7), a la mitad de corrida el tampón de cátodo fue cambiado por el tampón de cátodo sin azul de coomassie G-250. A continuación, se transfirieron las proteínas a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) usando el tampón de cátodo sin colorante, por 3 horas 30 minutos a 30 mAmp y 20 v. Se destiñó la membrana con metanol y se bloqueó la membrana tal como se describió previamente y se incubo con el anticuerpo primario anti-Xpress y el anticuerpo secundario anti-ratón. Se

revelo la membrana como se mencionó previamente.

5.9. Tinción con azul de Coomassie coloidal.

Una vez terminada la electroforesis, se obtuvo el gel, al cual se le realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con dH₂O (agua destilada). Posteriormente se incubaron los geles por 1 hora con agitación constante en solución fijadora (30% etanol, 10% ácido acético) y se lavaron con dH₂O por 5 minutos en agitación constante. Tras el lavado, se incubó toda la noche a temperatura ambiente con azul de coomassie coloidal (Bio-safe, coomassie G-250 Stain). Se retiró el colorante y se realizó un lavado con dH₂O hasta que se visualizaron las bandas.

5.10. Análisis estadístico.

Para realizar el análisis estadístico se aplicó la prueba ANOVA de una vía ya que nos permite determinar si alguno de los grupos presenta diferencias significativas. Esta prueba es adecuada para realizar comparaciones de medias entre más de 2 grupos independientes en estudios donde solo hay una variable. Para comparar entre grupos se realizó una prueba *post-hoc* de Dunnett, esta prueba permite determinar diferencias entre grupos con varianzas diferentes. Para disminuir las varianzas de nuestros grupos, todos los datos de las curvas de NF-L y TH fueron transformados utilizando la función \sqrt{Y} . Estos análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad-Prism 6. Se asumió que los datos se comportaban normalmente y se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con una $p < 0.5$.

6. Resultados.

6.1. Modelos *in-silico* de las proteínas Dp71 Δ_{78-79} , Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} , mediante I-TASSER.

Con el objetivo de saber si las modificaciones en los exones 78 y 79 que caracterizan a cada grupo y la carencia de estos exones en la mutante Dp71 Δ_{78-79} , podrían ser suficientes para generar un cambio notorio en la estructura terciaria general de la proteína, se decidió realizar modelamientos *in-silico* de las estructuras de Dp71 Δ_{78-79} (C-score=0.02), Dp71d Δ_{71} (C-score=-0.01), Dp71f Δ_{71} (C-score=-0.16) y Dp71e Δ_{71} (C-score=-0.07). Se eligieron estas isoformas ya que son las que presentan mayor similitud en secuencia respecto a Dp71 Δ_{78-79} . En la figura 9 se muestran las estructuras obtenidas *in-silico* de las proteínas. Los colores azul y amarillo se representan los motivos WW y EF1/EF2, respectivamente. En todas las estructuras de las isoformas, estos dominios presentaron una conformación distinta entre sí. Lo mismo sucede con el dominio ZZ relacionado con importe nuclear que esta coloreado en rojo. Igualmente, los motivos CC1 y CC2 coloreados en verde presentaron una conformación diferente entre cada isoforma evaluada y la Dp71 Δ_{78-79} . Sugiriendo que todas las estructuras son diferentes entre si.

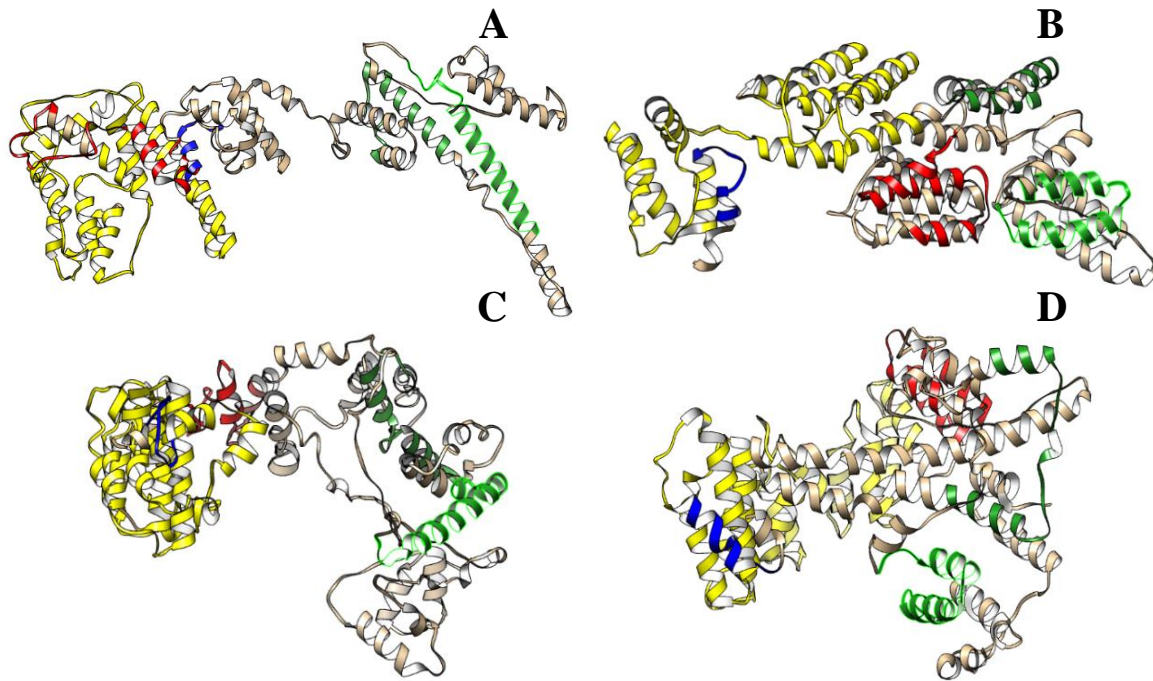


Figura 9. Estructuras *in-silico* de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, Dp71d Δ ₇₁, Dp71f Δ ₇₁ y Dp71e Δ ₇₁.

Las estructuras fueron obtenidas con el programa I-TASSER y modeladas con Chimera. A) Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. B) Dp71d Δ ₇₁. C) Dp71f Δ ₇₁. D) Dp71e Δ ₇₁. El color azul representa el dominio WW, en amarillo se muestra los dominios EF1/EF2, en rojo el dominio ZZ y en verde el dominio CC1/CC2.

Con el propósito de confirmar estas diferencias en estructuras entre la mutante y las isoformas Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} , se realizaron alineamientos entre Dp71 Δ_{78-79} y estas isoformas. El alineamiento entre Dp71 Δ_{78-79} y Dp71d Δ_{71} dio un RMSD de 34.623 angstroms entre 591 pares de átomos (figura 10A); Dp71f Δ_{71} dio un RMSD de 32.244 angstroms entre 591 pares de átomos (figura 10B); y Dp71e Δ_{71} dio un RMSD de 37.374 angstroms entre 591 pares de átomos (figura 10C). Las estructuras predichas de Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} no son homólogas a la estructura predicha de Dp71 Δ_{78-79} . En conclusión, la ausencia en los exones 78 y 79 tiene un impacto importante en la estructura general de Dp71.

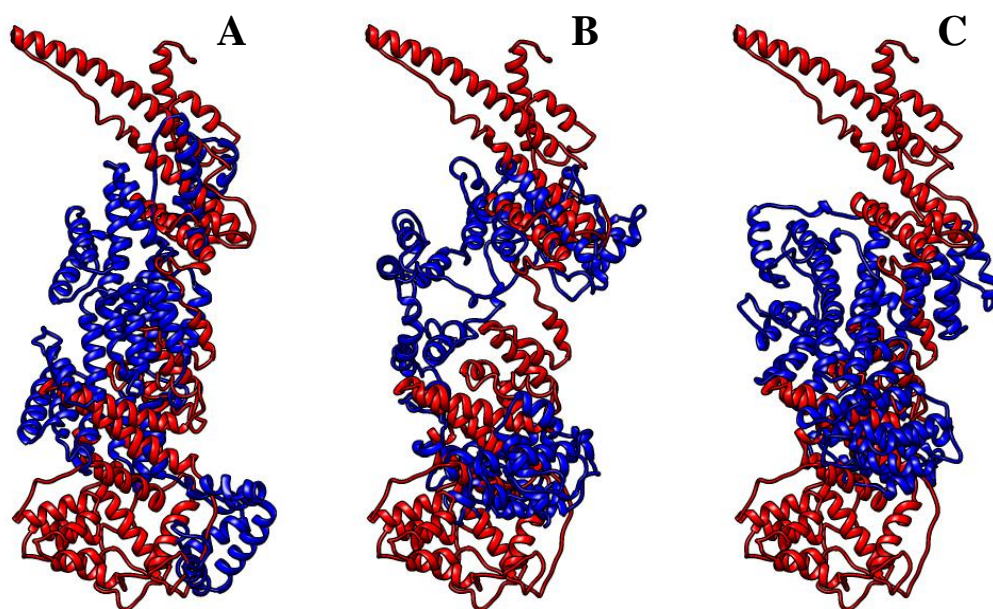


Figura 10. Alineamientos entre la Dp71 Δ_{78-79} y Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} .

Las estructuras fueron obtenidas con el programa I-TASSER y alineadas con Chimera. A) Dp71 Δ_{78-79} con Dp71d Δ_{71} . B) Dp71 Δ_{78-79} con Dp71f Δ_{71} . C) Dp71 Δ_{78-79} con Dp71e Δ_{71} . El color rojo representa la estructura de la Dp71 Δ_{78-79} y el azul las estructuras de Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} .

6.2. Expresión de las proteínas NF-L, TH y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, durante el proceso de diferenciación en células PC12-C11.

El segundo objetivo de este proyecto consistió en analizar la cinética de expresión de las proteínas: neurofilamento ligero (NF-L), tirosina hidroxilasa (TH) y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, tanto en células PC12-C11 diferenciadas con NGF como no diferenciadas. NF-L es una proteína que se expresa en células PC12 durante el proceso de diferenciación (Yuan A. *et al.* 2012), importante para el crecimiento radial del axón (Lee VM. 1985). TH es la enzima encargada de convertir tirosina en L-DOPA. Se ha reportado que la actividad de esta enzima disminuye durante el proceso de diferenciación en células PC12 (Greene LA y Tischler AS 1976). Ambas proteínas se utilizaron como marcadores de diferenciación para corroborar que las células PC12-C11 están pasando por un proceso de diferenciación al ser tratadas con NGF. También se evaluaron los niveles de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ para identificar las condiciones en donde presenta una mayor expresión. Para esto se cultivaron células PC12-C11 sin NGF (día 0) y con NGF a los días 1, 2, 3 y 6. Se evaluaron los niveles de expresión de NF-L, TH y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y se normalizaron respecto a la expresión de actina en todos las inmunodetecciones. En la figura 11 se muestra un esquema de este experimento.

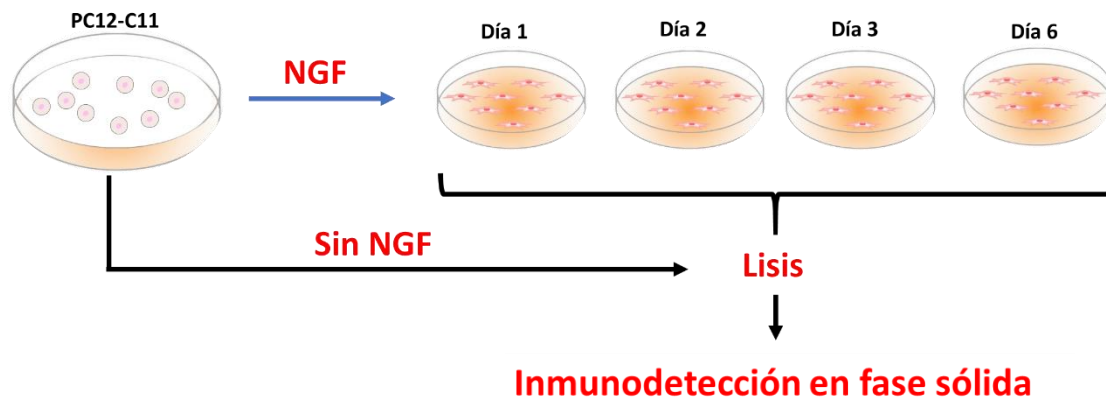


Figura 11. Esquema experimental de la curva de diferenciación.

Las células PC12-C11 fueron sembradas sobre placas recubiertas con colágena y tratadas con o sin NGF por 1, 2, 3 y 6 días de cultivo, en los cuales las células fueron cosechadas y lisadas como se indica en materiales y métodos. Estos lisados fueron corridos en un SDS-PAGE al 12% para el posterior análisis de expresión de las proteínas NF-L, TH y Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ por inmunodetección en fase sólida.

Las células PC12-C11 presentaron un aumento en la expresión de NF-L a partir del primer día de tratamiento con NGF respecto al día 0 (Figura 11A y 11C). Además, los niveles de expresión no variaron en los días posteriores. Por otro lado, TH mantiene sus niveles de expresión hasta el día 3 respecto al día cero y al día 6 de tratamiento con NGF disminuye su expresión (Figura 11B y 11C). En la figura 11C se observan las inmunodetecciones representativas, con flechas están señaladas las bandas de NF-L y TH.

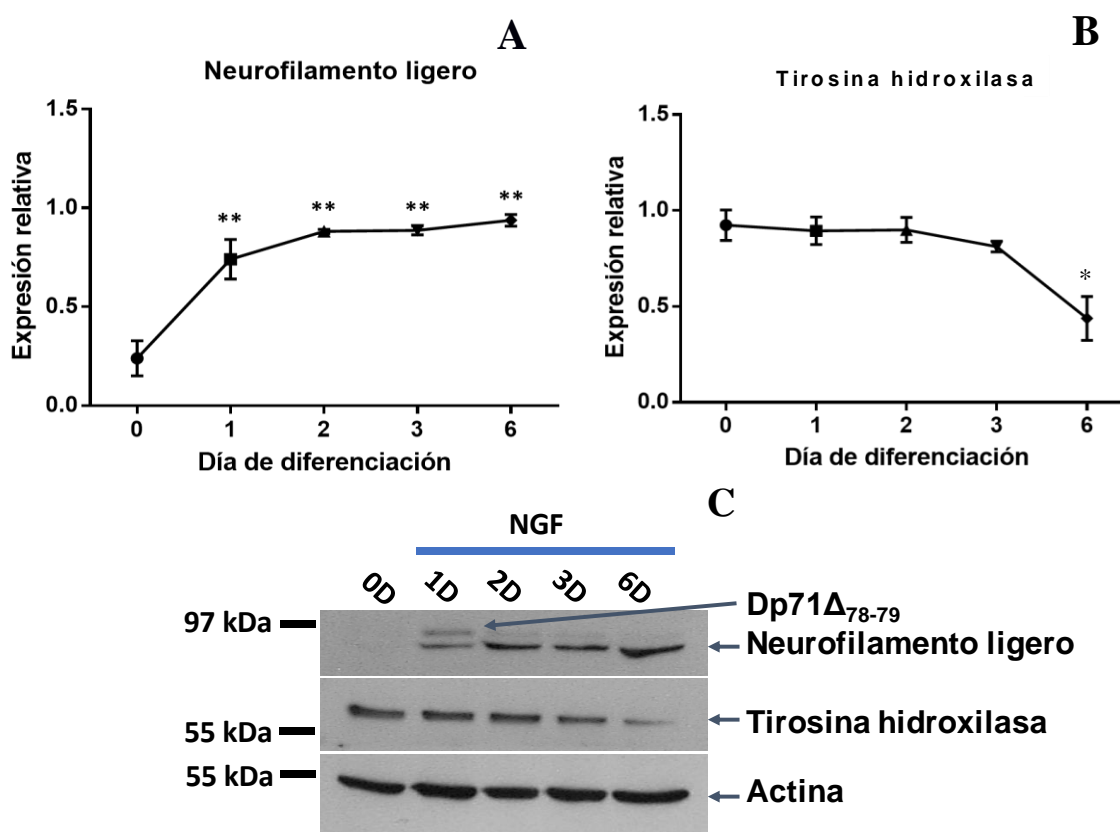


Figura 12. Expresión de NF-L y TH en células PC12-C11 durante diferenciación.

Las células fueron cultivadas en placas cubiertas con colágena y diferenciadas con NGF durante los días señalados previamente (D = día). Se realizó una inmunodetección en fase sólida utilizando los anticuerpos anti-NF-L, anti-TH y anti-β-actina (como control de carga). A) Se graficó la expresión de NF-L. B) Se graficó la expresión de TH. C) Se muestran las inmunodetecciones representativas de NF-L y TH. β-actina se utilizó como control de carga *P < 0.05 y **P < 0.01 muestran diferencias significativas con respecto al control (día 0). Las gráficas muestran el promedio ± SD de 2 experimentos independientes.

Con el fin de conocer los niveles de expresión de NF-L y TH, en células no diferenciadas, se analizaron las células cultivadas en ausencia de NGF los días 0, 1, 2, 3 y 6. Como se observa en la Figura 13A y 13C, la expresión de NF-L fue imperceptible y la expresión de TH disminuyó conforme avanzan los días de cultivo (figura 13B).

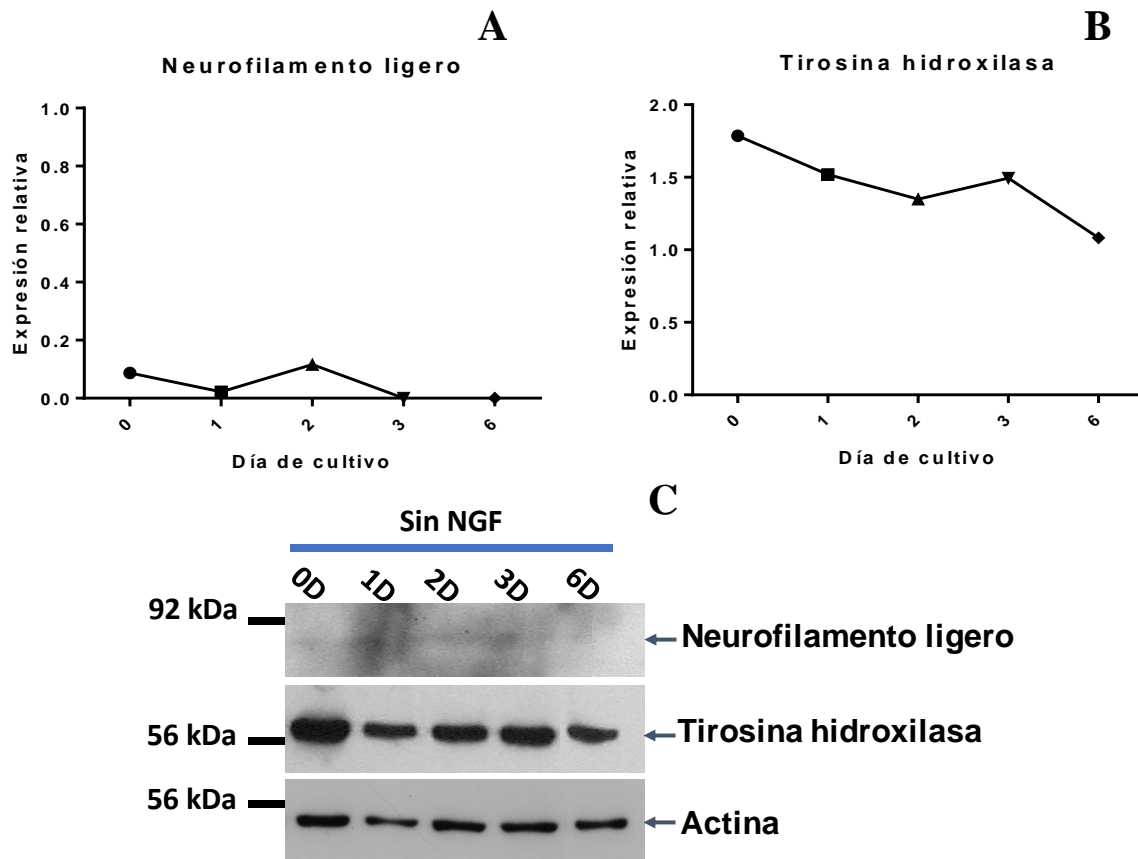


Figura 13. Expresión de NF-L y TH en células PC12-C11 no diferenciadas.

Las células fueron cultivadas en placas tratadas con colágena, sin NGF durante los días señalados previamente (D= día). Se realizó una inmunodetección en fase sólida utilizando los anticuerpos anti-NF-L, anti-TH y anti- β -actina. A) Se graficó la expresión de NF-L. B) Se observa la gráfica de expresión de TH. C) Se grafica la expresión de NF-L y TH. β -actina se utilizó como control de carga. No fue posible realizar duplicado de este experimento.

Una vez que se evaluaron los marcadores de diferenciación NF-L y TH, tras es estímulo con NGF, se determinó la expresión de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. En la figura 13A se muestra los niveles de expresión de la mutante Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ durante el proceso de diferenciación. Se observó un aumento estadísticamente significativo en los días 1, 2 y 3 respecto al día 0, además, en el día 1 es cuando ocurrió la mayor expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Sin embargo, en los días posteriores la expresión disminuye paulatinamente, hasta el día 6, cuando los niveles de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ son semejantes a los del día 0. En la figura 13B se observan las inmunodetecciones en fase sólida representativas.

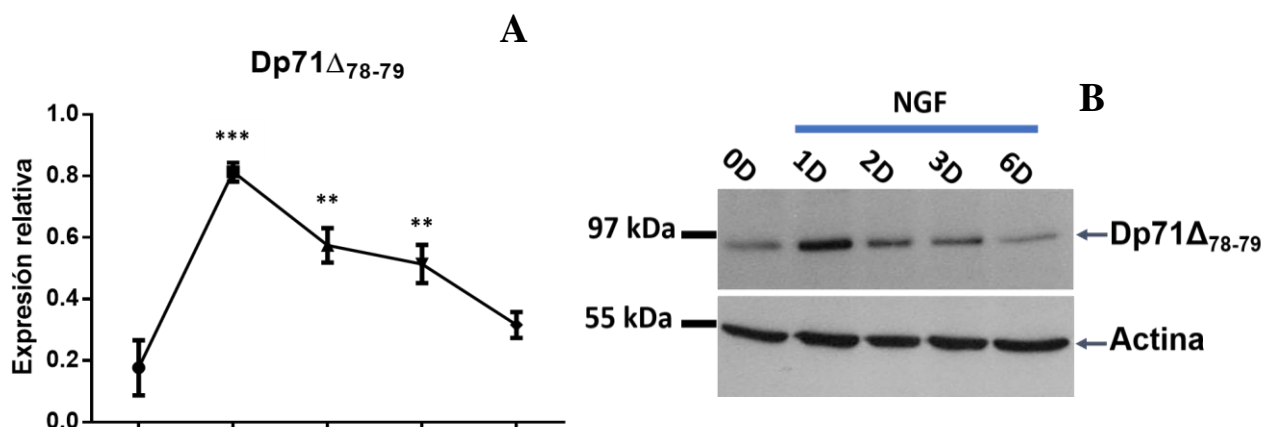


Figura 14. Expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 durante diferenciación.

Las células fueron cultivadas en placas tratadas con colágena y diferenciadas con NGF durante los días señalados previamente (D = día). Se realizó una inmunodetección en fase sólida utilizando los anticuerpos anti-Xpress y anti- β -actina. A) Se graficó la expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. B) Se muestran las inmunodetecciones representativas de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. β -actina se utilizó como control de carga **P< 0.01 y ***P<0.001 muestran diferencias significativas con respecto al control (día 0). La gráfica muestra el promedio \pm SD de 2 experimentos independientes.

Para descartar que el aumento en la expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ se deba a otro factor, se evaluaron los niveles de expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células no diferenciadas (sin NGF) a los mismos días de cultivo (0, 1, 2, 3 y 6). Como se observa en la Figura 15A la expresión Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ disminuyó ligeramente al primer día de cultivo y esta expresión no cambió durante los días posteriores.

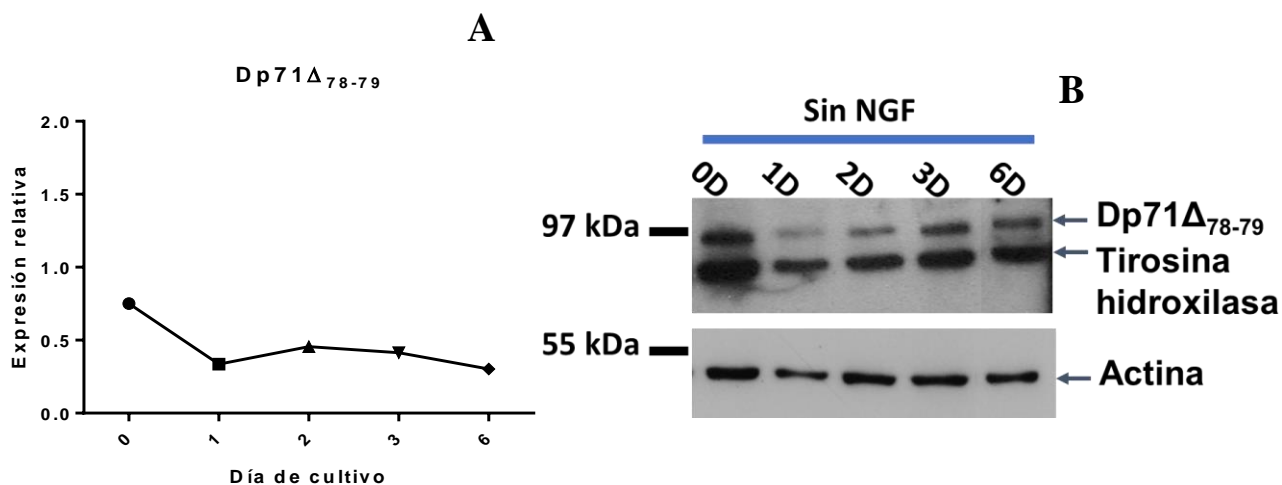


Figura 15. Expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 sin NGF.

Las células fueron cultivadas en placas tratadas con colágena, sin NGF durante los días señalados previamente (D = día). Se realizó una inmunodetección en fase sólida utilizando los anticuerpos anti-Xpress y anti- β -actina. A) Se graficó la expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. B) Se muestran las inmunodetecciones representativas de NF-L y TH. β -actina se utilizó como control de carga. No fue posible realizar duplicado de este experimento.

6.3. Identificación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

Con el propósito de determinar la posible función de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, se buscaron proteínas que interactúan con esta mutante. Para la identificación de estas proteínas se abordaron diferentes metodologías para cumplir con este objetivo, tales como, cross-linking, co-inmunoprecipitación, gel azul nativo, SDS-PAGE e inmunodetecciones en fase sólida.

6.3.1. Preservación de los complejos en los que participa Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mediante Cross-linking.

Esta técnica consiste en utilizar PFA para convertir las interacciones entre proteínas no covalentes a covalentes, preservando los complejos durante las manipulaciones posteriores de la muestra. Esta unión se revierte calentando la muestra a ebullición, de esta manera, las proteínas ahora pueden ser identificadas por espectrometría de masas. En la figura 16 se muestra un esquema de esta técnica.

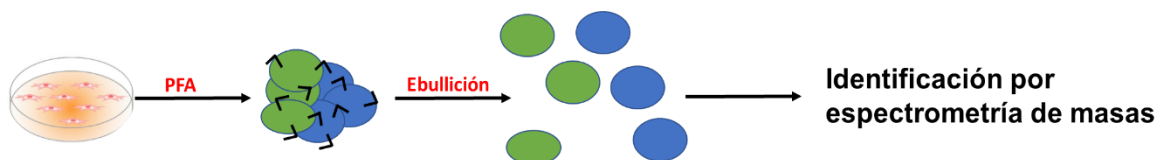


Figura 16. Cross-linking entre proteínas.

Las células PC12-C11 son tratadas con PFA, esto provoca que las proteínas que se encuentren a menos de 2 angstroms de distancia se unan de manera covalente. Esta unión puede ser revertida calentando la muestra a ebullición, para su posterior identificación por espectrometría de masas (Klockenbusch C., Kast J. 2010).

Con el objeto de identificar proteínas asociadas a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, se procedió a obtener extractos totales de células tratadas con PFA, tal como se describe en materiales y métodos. En la figura 17 se muestra la inmunodetección en fase sólida en la que se identificó a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Se observa que en los carriles cuarto y sexto hay un retraso en la migración electroforética, respecto a la banda de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ desnaturalizada, así como sin PFA. En conclusión, se lograron preservar complejos donde Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ está presente. Aunque se lograron preservar complejos de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, no se siguió con esta metodología ya que, datos no publicados de nuestro grupo de trabajo demostraron que el rendimiento en la identificación de proteínas usando esta técnica es bajo.

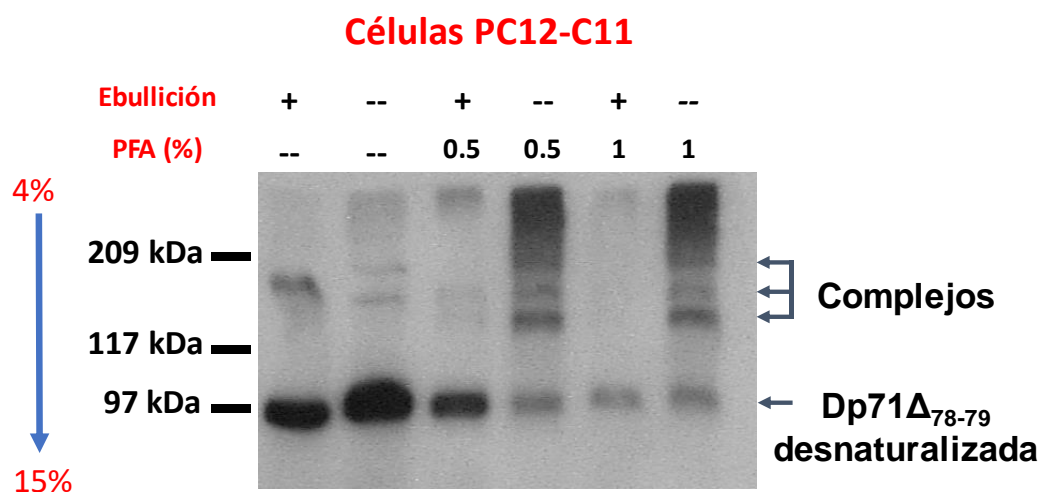


Figura 17. Preservación de los complejos en los que participa Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mediante Cross-linking.

Se corrieron las muestras en un gel en gradiente de 4 a 15% y en seguida, se realizó una inmunodetección con el anticuerpo anti-Xpress. + = los extractos fueron ebullicidos, -- = los extractos fueron calentados a 65°C, 0.5 = las células fueron tratadas con PFA al 0.5%, 1 = las células fueron tratadas con PFA al 1%. Las flechas del lado derecho señalan la migración electroforética de los complejos en los que se encuentra la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (parte superior) y la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (parte inferior) desnaturalizada. El experimento fue realizado por duplicado.

6.3.2. Identificación de complejos de proteínas en los que $Dp71\Delta_{78-79}$ participa mediante co-Immunoprecipitación.

La siguiente técnica empleada fue la de co-inmunoprecipitación. El objetivo de esta metodología es separar del lisado celular, los complejos en los que solamente participa $Dp71\Delta_{78-79}$. Esta técnica consiste en precipitar a $Dp71\Delta_{78-79}$ y a las proteínas con las que esté interactuando, usando un anticuerpo, en este caso, se usó un anticuerpo contra la bandera de 6 histidinas que $Dp71\Delta_{78-79}$ lleva en su extremo amino-terminal. Para precipitar los complejos, se utilizó sefarosa-proteína G. La proteína-G se es capaz de unirse de manera no covalente con los anticuerpos y la sefarosa le da el peso necesario para precipitar a los complejos. En la figura 17 se muestra un esquema de esta técnica.

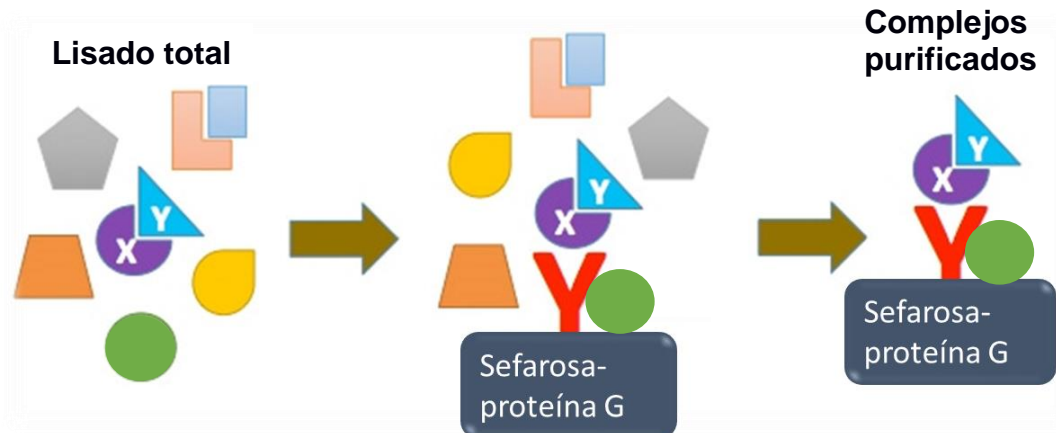


Figura 18. Fundamento del experimento de Co-inmunoprecipitación.

La mezcla de complejos que se encuentran en el lisado, son tratados con un anticuerpo que va dirigido contra la proteína X. Así mismo, se adiciona sefarosa-proteína G, que permite la precipitación de los complejos. Al final se obtienen los complejos (Y) en los que está presente la proteína X unida al anticuerpo, sefarosa-proteína G y las proteínas que se unen inespecíficamente a la sefarosa-proteína G y al anticuerpo.

Se realizó una inmunodetección en fase sólida contra la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ de los inmunoprecipitados de células PC12-C11. Se utilizaron las células PC12 como control negativo, porque estas células no expresan a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (figura 19). Sólo los carriles que corresponden a las células PC12-C11 presentan marca de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ demostrando la especificidad de la precipitación del anticuerpo para la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Además, en el precipitado negativo (no se agregó el anticuerpo anti-hisX6 para precipitar) de PC12-C11 no hay marca de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, indicando que esta proteína solo precipita en presencia del anticuerpo anti-hisX6. Entre la marca de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y el marcador de 55 kDa se observa una banda que corresponde a la cadena pesada del anticuerpo anti-hisX6. Esta marca se observa solo en los precipitados positivos y sus sobrenadantes, tanto en células PC12-C11 como en PC12. En este experimento se concluye que el anticuerpo anti-hisX6 es capaz de inmunoprecipitar a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ de manera específica.

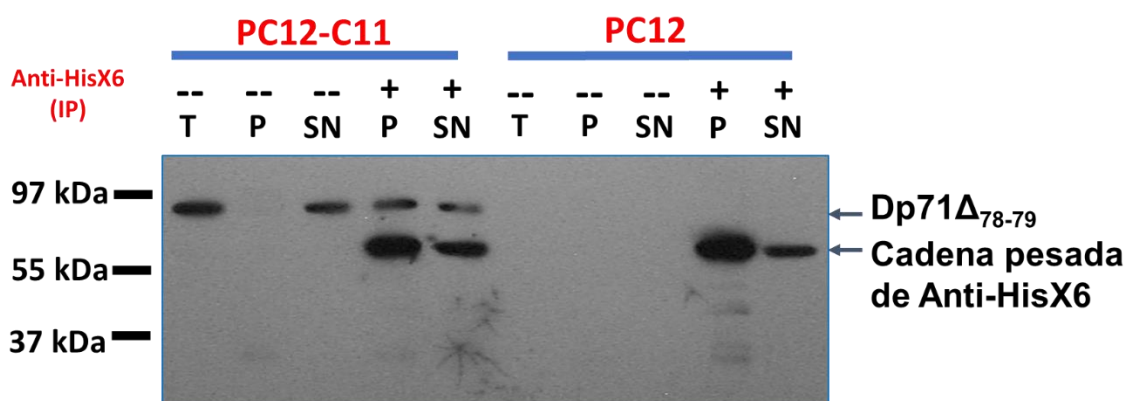


Figura 19. Inmunoprecipitación de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

Los inmunoprecipitados de células PC12-C11 y PC12 fueron corridos en un SDS-PAGE al 12% y a continuación, se realizó una inmunodetección utilizando el anticuerpo anti-Xpress, tal como se describe en materiales y métodos. Las flechas del lado derecho señalan la migración electroforética de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y de la cadena pesada del anticuerpo anti-hisX6. T = lisado total, P = precipitado, SN = sobrenadante, -- = sin anticuerpo anti-hisX6, + = con anticuerpo anti-hisX6. Esta nomenclatura se usará en los siguientes resultados. El experimento se realizó por duplicado.

Para determinar la precipitación de otras proteínas además de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, se tiñeron los SDS-PAGE de los inmunoprecipitados con azul de coomassie coloidal. Como se muestra en la figura 19, en el precipitado positivo de las células PC12-C11 se observan un mayor número de bandas, algunas de estas con mayor intensidad, en comparación con el precipitado negativo de PC12-C11, demostrando que la presencia de anticuerpo anti-hisX6 causa una mayor precipitación de proteínas. Además, se observa un número e intensidad menor de bandas en los precipitados positivo y negativo de las células PC12 en comparación con el precipitado positivo de las células PC12-C11, demostrando que la presencia de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ causa la precipitación de un mayor número de proteínas, debido a que están interactuando con Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, corroborando la co-inmunoprecipitación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

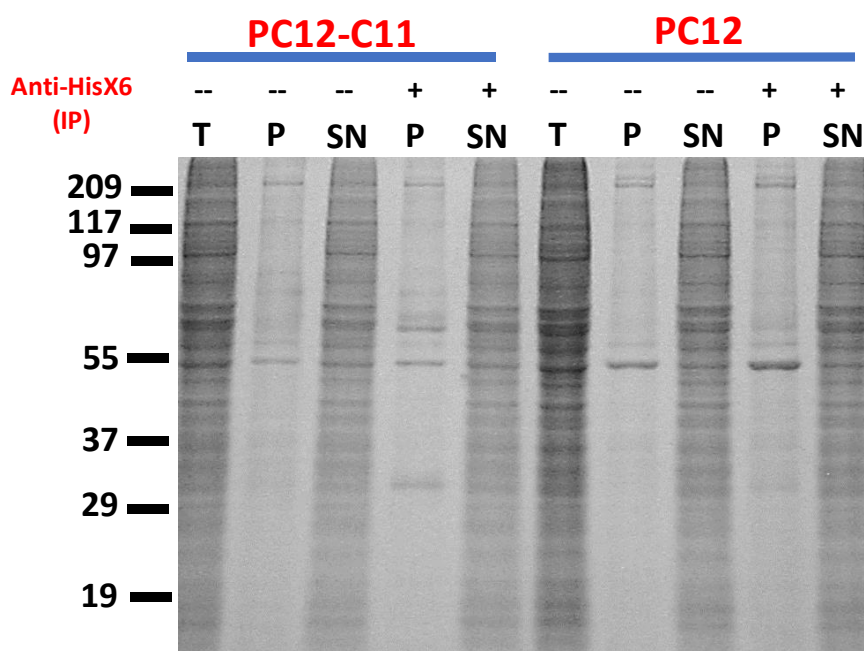


Figura 20. Co-inmunoprecipitación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

Los inmunoprecipitados de células PC12-C11 y PC12 fueron corridos en un SDS-PAGE al 12%. Posteriormente fueron teñidos con azul de coomassie coloidal. T = lisado total, P = precipitado, SN = sobrenadante, -- = sin anticuerpo anti-hisX6, + = con anticuerpo anti-hisX6. Esta nomenclatura se usará en los siguientes resultados. El experimento con células PC12-C11 fue realizado por duplicado y con células PC12 1 vez.

6.3.3. Identificación de los complejos en los que participa Dp71 Δ 78-79 mediante Gel azul nativo.

Con el objetivo de aislar los complejos co-inmunoprecipitados, se utilizó el gel azul nativo, ya que este permite preservar las uniones no covalentes y las conformaciones nativas de las proteínas, que mantienen a los complejos unidos. El gel azul nativo no contiene ningún agente desnaturante, caotrópico o reductor que pudiera afectar la estructura de las proteínas; además, las concentraciones de sales se mantienen bajas para evitar que éstas disocien los complejos. Primero se realizó una inmunodetección en fase sólida de Dp71 Δ 78-79 para identificar a los complejos que esta mutante estaría presente. Se identificaron 3 bandas de posibles complejos en el precipitado positivo de las células PC12-C11, la primera entre los pesos 1,048 kDa y 720 kDa, la segunda cerca del peso de 720 kDa y la tercera de aproximadamente 480 kDa (figura 21). En el precipitado positivo de las células PC12 se observa un barrido que corresponde a el anticuerpo anti-hisX6.

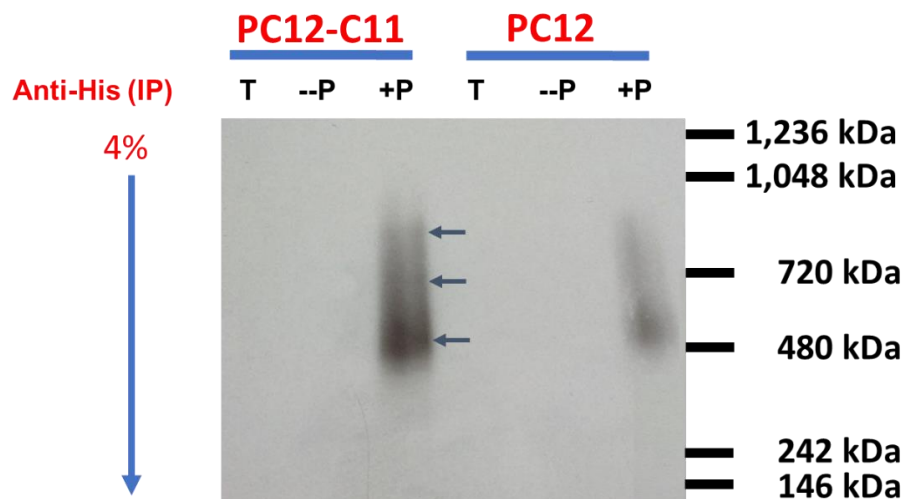


Figura 21. Complejos de proteínas asociadas a Dp71 Δ 78-79 identificados por inmunodetección en fase sólida.

Las co-inmunoprecipitaciones de células PC12-C11 y PC12 fueron corridas en un gel azul nativo en gradiente del 4 al 12%, posteriormente se realizó una inmunodetección contra Dp71 Δ 78-79. T = lisado total, P = precipitado, -- = sin anticuerpo anti-hisX6, + = con anticuerpo anti-hisX6. Las flechas a indican los complejos en los que está Dp71 Δ 78-79. El experimento fue realizado 1 vez.

Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de coomassie coloidal y se lograron ubicar las 3 bandas (figura 22), las mismas que se encontraron en la inmunodetección en fase sólida previa; sin embargo, estas bandas no fueron lo bastante intensas para identificarlas por espectrometría de masas, quizás porque los complejos al estar unidos a la proteína G-sefarosa y al anticuerpo, podrían estar siendo retenidos en el pozo del gel. Por los que se tuvo que probar otra técnica para identificar a las proteínas que interactúan con la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

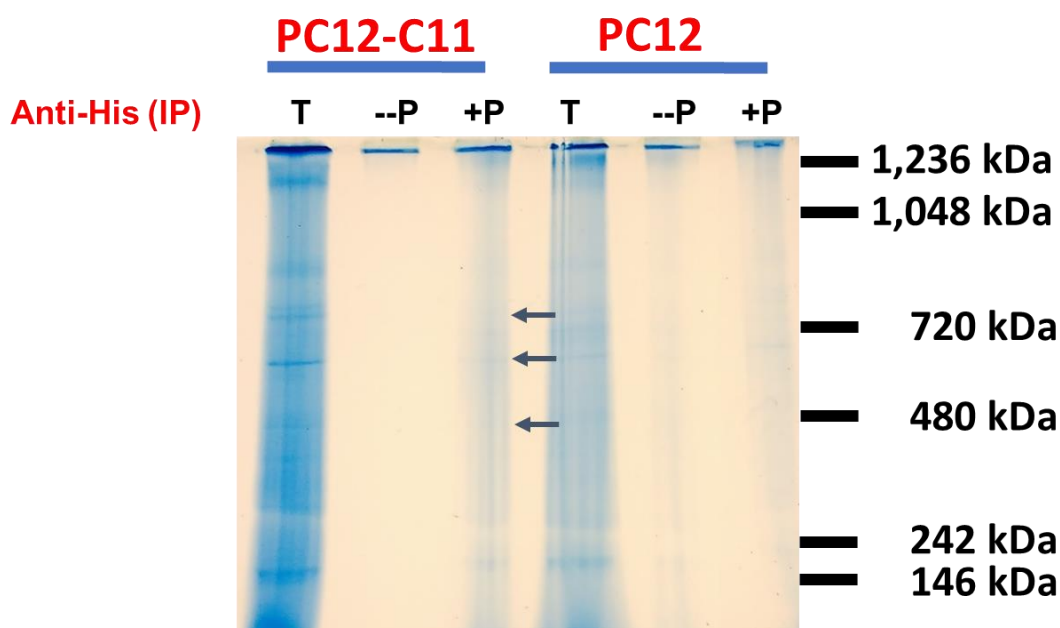


Figura 22. Complejos de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ teñidos con azul de coomassie coloidal.

Las co-inmunoprecipitaciones de células PC12-C11 y PC12 fueron corridas en un gel azul nativo en gradiente del 4 al 12%, posteriormente se tiñeron los complejos con azul de coomassie coloidal, tal como se menciona en materiales y métodos. Las flechas a indican los complejos en los que está Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ que fueron encontrados en la figura 21. T = lisado total, P = precipitado, -- = sin anticuerpo anti-hisX6, + = con anticuerpo anti-hisX6. El experimento fue realizado por duplicado.

6.3.4. Identificación de proteínas asociadas a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ mediante SDS-PAGE e inmunodetección en fase sólida.

Debido a que no se lograron identificar a las proteínas con las que interactúa la mutante por geles nativos, se procedió a correr los co-inmunoprecipitados de células PC12-C11 no diferenciadas en un SDS-PAGE para la posterior identificación de candidatos por inmunodetección en fase sólida. Se probaron las interacciones de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con FAK, β -distroglicano y HspB1. En la figura 23 se observa como la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ no interactúa con ninguna de estas proteínas.

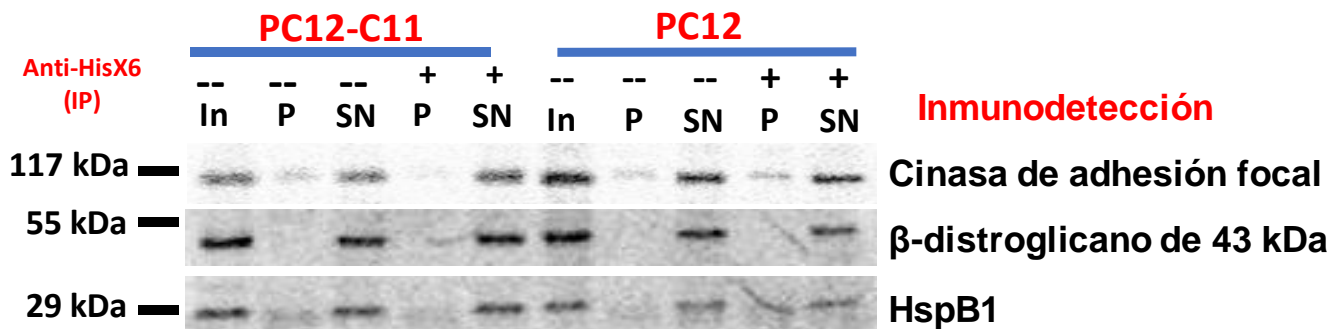


Figura 23. Identificación de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 no diferenciadas.

Los co-inmunoprecipitados fueron corridos en un SDS-PAGE al 12%. Posteriormente, se realizó una inmunodetección contra la cinasa de adhesión focal, β -distroglicano y HspB1. T = lisado total, P = precipitado, SN = sobrenadante, -- = sin anticuerpo anti-hisX6, + = con anticuerpo anti-hisX6. Las flechas de la derecha señalan las bandas correspondientes a las proteínas probadas por inmunodetección en fase sólida. El experimento con células PC12-C11 fue realizado por duplicado y con células PC12 1 vez.

Posteriormente, las células PC12-C11 fueron diferenciadas por un día con NGF ya que a este tiempo es cuando Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ presenta una mayor expresión. A continuación, se realizó la co-inmunoprecipitación y las inmunodetecciones en fase sólida tal como se describe en materiales y métodos, para evaluar la interacción entre la mutante y FAK, β -dístroglicano y HspB1. En la figura 24A se observa marca de FAK tanto en el precipitado positivo como en el precipitado negativo de células PC12-C11, sugiriendo que la interacción es inespecífica, por esta razón no se realizó el experimento en células PC12.

Por otro lado, se muestra que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ podría interactuar con β -dístroglicano de 30 kDa y con HspB1 fosforilada y HspB1 no fosforilada (figura 24B). Para comprobar que las interacciones entre la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con β -dístroglicano de 30 kDa y HspB1, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-hiX6 en células PC12 diferenciadas por un día como control, ya que estas no expresan a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (figura 24B). Cuando se inmunodetectó a β -dístroglicano, se observó una banda ligeramente arriba de la marca de β -dístroglicano de 30 kDa en el precipitado positivo de las células PC12. Es decir que la banda observada de β -dístroglicano de 30 kDa en el precipitado de las células PC12-C11 es distinta a la observada en las células PC12. Así mismo, cuando se inmunodetectó a HspB1, solo se observó una banda en el precipitado positivo de las células PC12, a diferencia del inmunoprecipitado positivo de las células PC12-C11 donde se encontraron 2 bandas que podrían corresponder a HspB1 fosforilada y no fosforilada. En conclusión, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ interactúa con β -dístroglicano de 30 kDa y con una HspB1, la HspB1 fosforilada o la no fosforilada.

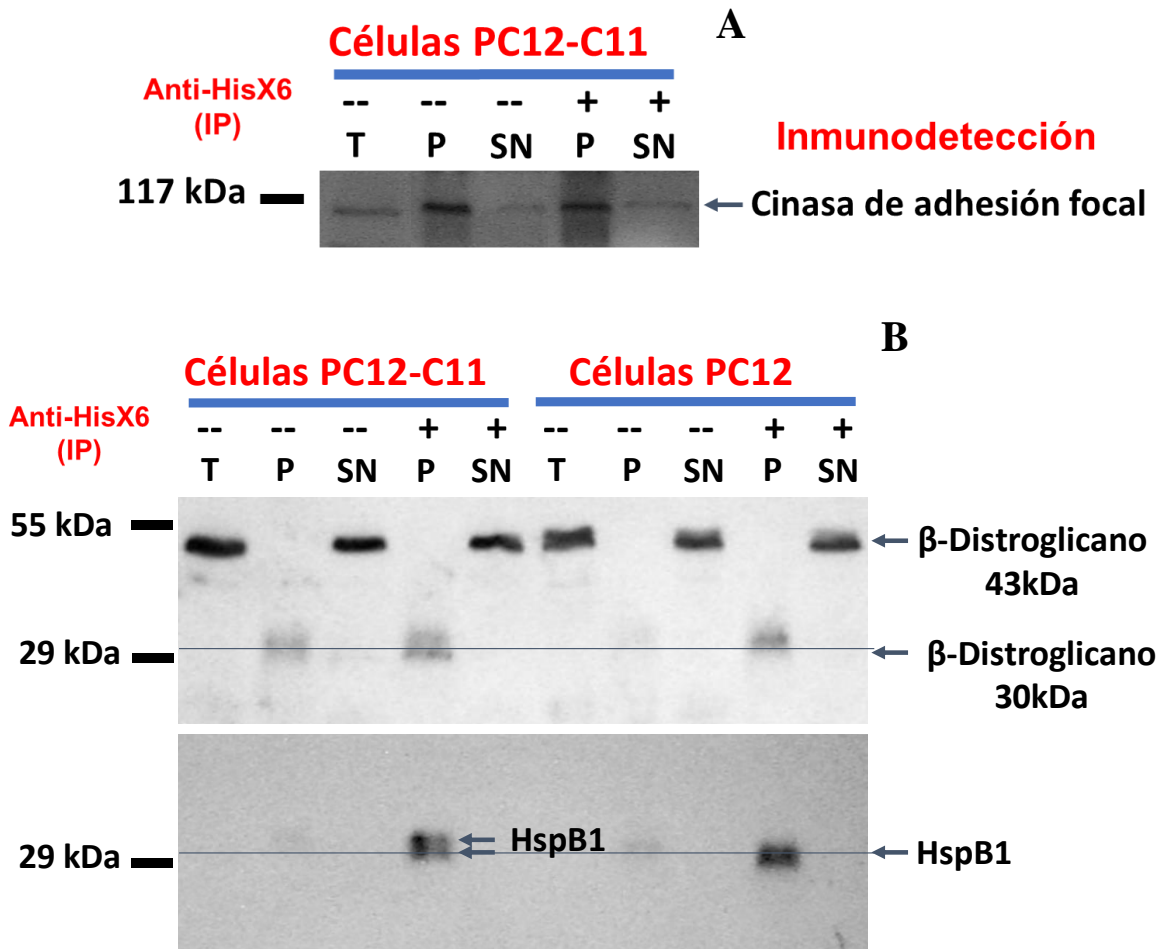


Figura 24. Identificación de proteínas asociadas a Dp71 Δ 78-79 en células PC12-C11 diferenciadas por un día con NGF.

Los co-inmunoprecipitados fueron corridos en un SDS-PAGE al 12%. Posteriormente, se realizó una inmunodetección contra: A) la cinasa de adhesión focal en células PC12-C11 y B) β -distroglicano y HspB1 en células PC12-C11 y células PC12 (control). T = lisado total, P = precipitado, SN = sobrenadante, -- = sin anticuerpo anti-hisX6, + = con anticuerpo anti-hisX6. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las proteínas probadas y la línea horizontal sirve como referencia para comparar las migraciones electroforéticas de las bandas. El experimento de co-inmunoprecipitación para evaluar FAK en células PC12-C11 solo se realizó una vez y el experimento de coimmunoprecipitación para evaluar β -distroglicano y HspB1 en células PC12-C11 se realizó 2 veces, mientras que en células PC12 una vez.

7. Discusión.

Ya que no se ha cristalizado ninguna de las isoformas de Dp71, el modelamiento *in-silico* resulta una buena metodología para el estudio de estas proteínas. A través de este aproximamiento se encontró que, Dp71 Δ_{78-79} no guarda similitud con Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} . Es decir que la presencia y/o usencia de los 2 últimos exones (78 y 79) tiene un efecto importante en la estructura general de Dp71, ya que las isoformas Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} tampoco se parecen entre si. Esto podría dar razón de por qué cada isoforma de Dp71 se localiza en compartimentos celulares diferentes y es capaz de formar complejos distintos. Este procesamiento alternativo de los exones 78 y 79, generaría una disposición terciaria distinta de los diferentes motivos, por ejemplo, el motivo ZZ, relacionado con importe nuclear, o los motivos WW, EF1/EF2 (sitio de unión a β -dístroglicano), los motivos CC1/CC2 (donde se unen sintrofinas y distrobrevinas) y el extremo amino terminal, mediante el cual se unen componentes del citoesqueleto como F-actina. De esta manera, diferentes isoformas de distrobrevinas, sintrofinas, dístroglicanos y otras proteínas con función en señalización citoplasmática, adhesión celular, diferenciación, ciclo celular, división celular, etcétera, se unirían de manera diferente a cada isoforma de Dp71, generando un enorme abanico de complejos distintos en diversos compartimentos celulares.

Durante el proceso de diferenciación de células PC12-C11, la proteína neurofilamento ligero comienza a expresarse desde el primer día de diferenciación en presencia de NGF, comparado con el día 0 y con el cultivo de células PC12-C11 sin NGF, en dónde no se detecta la expresión de esta proteína. NF-L es un filamento intermedio importante durante el desarrollo neuronal, para el crecimiento radial del axón, el mantenimiento del calibre del axón y la conducción de impulsos eléctricos a través del axón. (Yuan A. *et al.* 2012). Se ha reportado que NF-L empieza a aparecer en células PC12 diferenciadas con NGF a partir del cuarto día de diferenciación (Lee V M.

1985); sin embargo, en células PC12-C11 comienza a aparecer desde el primer día. Esto sugiere que la expresión estable de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, acelera el proceso de diferenciación en células PC12. Por otro lado, TH disminuye su expresión hasta el sexto día de diferenciación con NGF en células PC12-C11, aunque, esto también se observa cuando las células no son tratadas con NGF, por lo que su disminución se podría deber al tiempo que las células permanecen en cultivo, aunque aún faltaría reproducir esta observación.

La expresión de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ se ve aumentada en presencia de NGF. Esto es interesante ya que la mutante fue clonada con un promotor de citomegalovirus (CMV), es decir que su aumento en la expresión podría no ser causado por una regulación durante la transcripción, sino que tendría que ver con eventos traduccionales o post-traducionales. Para descartar que esta regulación suceda durante la transcripción, sería necesario evaluar los niveles de mRNA de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ durante la diferenciación, de tal modo que, si la expresión del transcrito no varía, el aumento en la presencia de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, podría deberse a eventos regulatorios posteriores como la traducción y eventos post-traducionales de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Debido a que Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ carece de los exones 78 y 79 se abre la pregunta: estos exones, ¿qué papel jugaran estos exones durante la traducción de Dp71 o en eventos post-traducionales? En nuestro grupo de trabajo se clonaron varias isoformas de Dp71 (que se expresan de manera endógena) utilizando el mismo plásmido usado para Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, sin embargo, a pesar de que las células sobrevivieron a las selecciones de zeocina, no se consiguió expresar ninguna isoforma, salvo a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ (datos no publicados). Con estos resultados, las isoformas de Dp71 podrían entrar en un proceso de regulación de la célula que hasta la fecha no se ha descrito. Todos estos resultados sugieren que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ resulta interesante para el estudio de los mecanismos de regulación de las isoformas de Dp71.

Como se ha demostrado, la sobre expresión de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ estimula

la diferenciación en células PC12-C11 (Merino-Jiménez C. *et al.* 2016, Aragón J. *et al.* 2011). En este trabajo se planeó identificar a las proteínas que se unen a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ utilizando diferentes técnicas. La primera fue cross-linking con PFA, para preservar los complejos en los que Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ pudiera estar participando. Sin embargo, experimentos realizados en nuestro grupo de trabajo, de manera simultánea a la realización de este proyecto, mostraron la identificación ineficiente de proteínas por espectrometría de masas, se decidió no seguir con esta técnica. Esta baja eficiencia en la identificación de proteínas podría deberse al mecanismo poco específico por el cual el paraformaldehído actúa. A tiempos y concentraciones bajas, los blancos del PFA son las cadenas laterales de lisina y triptófano, y el extremo amino terminal. A tiempos más largos PFA actúa sobre todos los aminoácidos (Sutherland B W. *et al.* 2008). Sin embargo, a tiempos cortos se corre el riesgo de no preservar completamente los complejos. Esto sugiere que aún hay que hacer mejoras en el protocolo de esta técnica. También, se intentó acoplar la técnica de inmunoprecipitación con la de gel azul nativo y una posterior inmunodetección en fase sólida. Con esta técnica se lograron ver complejos; sin embargo, no se pudieron obtener bandas definidas con la suficiente intensidad como para identificar a las proteínas de estos complejos. Por otro lado, cuando los inmunoprecipitados fueron corridos en un SDS-PAGE y el gel fue teñido, se observó un bandeo intenso, descartando la idea de que no se estuvieran inmunoprecipitando suficientes proteínas. Esto puede deberse a que, en condiciones nativas, los complejos siguen unidos a el anticuerpo y a la sefarsa-proteína G. Esto provoca que mientras el gel está corriendo los complejos sigan unidos evitando que entren al gel. Una alternativa a este inconveniente sería la separación de los complejos del anticuerpo y la proteína G, sin remover en el proceso a las proteínas que componen al complejo. Una opción que podría funcionar es utilizar un ensayo de competencia (Swamy M. *et al.* 2006), para este caso usando un péptido de 6 histidinas, con el objetivo de que el anticuerpo anti-hisX6 lo reconozca, liberando a los complejos.

Debido a que con las técnicas anteriores no se consiguió identificar a los complejos de proteínas asociadas a Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, se procedió a evaluar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación seguidos de SDS-PAGE e inmunodetección la interacción entre Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y 3 candidatas: FAK y β -dístroglicano y HspB1. Se eligieron FAK, β -dístroglicano porque en otros estudios se ha demostrado la interacción de estas proteínas con isoformas de Dp71, FAK interactúa con el grupo Dp71f y β -dístroglicano con los grupos Dp71d y Dp71f (Tadayoni R. *et al.* 2012, Romo-Yáñez J. *et al.* 2007). Así mismo, se eligió a HspB1 porque nuestro grupo de trabajo reportó recientemente que esta proteína juega un papel importante en la diferenciación de células PC12-C11 (Merino-Jiménez C. *et al.* 2016). En este trabajo se reporta que en células PC12-C11 no diferenciadas Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ no interactúa con FAK, β -dístroglicano y HspB1. Esta ausencia en la interacción puede deberse a que la delección en la mutante de los exones 78 y 79 podría alterar la estructura de la Dp71 y con esto, evitar que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ interactúe con estas proteínas, lo que es coherente con los resultados obtenidos en los ensayos comparativos *in-silico*. Otra posibilidad es que, al día cero de diferenciación, la proteína Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ no alcanza los niveles de expresión suficientes para interactuar con estas proteínas. Para abordar esta posibilidad, se diferenciaron a las células PC12-C11 por un día. Se eligió este día de diferenciación porque es cuando la proteína Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ alcanza su mayor nivel de expresión. De manera interesante, a un día de diferenciación la proteína Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ parece interactuar con β -dístroglicano de 30 kDa y HspB1. Para confirmar que la asociación entre Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con β -dístroglicano de 30 kDa y HspB1 sea específica, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación e inmunodetecciones en fase sólida contra β -dístroglicano de 30 kDa y HspB1, en las células PC12 diferenciadas por un día como control, debido a que estas células no expresan a la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. En las células PC12-C11 diferenciadas por 1 día, cuando se probó la interacción de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con β -dístroglicano, se observaron 2 bandas en el precipitado positivo, una que corresponde a β -dístroglicano de 30 kDa y un fondo. Y, en las células PC12 se observó una

banda que corresponde al fondo del precipitado positivo de las células PC12-C11. Esto sugiere que la interacción de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con β -dístroglicano de 30 kDa podría ser específica. Y en las células PC12-C11, cuando se probó de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con HspB1 se observaron 2 bandas que podría corresponder tanto a HspB1 fosforilada como no fosforilada, es decir que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ podría interactuar con estas proteínas. Y, en el precipitado positivo de las células PC12 solo se observó una banda. Sugiriendo que la unión específica ocurre entre la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y sólo una proteína de HspB1 (fosforilada o no fosforilada). Cabe señalar que los ensayos de co-inmuprecipitación en células PC12 sólo se realizaron una vez, por lo que es necesario realizar repeticiones para confirmar este dato. Además, las uniones de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con β -dístroglicano de 30 kDa y HspB1 tendrían que ser validadas con otros ensayos de interacción. Resulta interesante que, bajo las condiciones experimentales de este trabajo, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ no interactúe con β -dístroglicano completa, dado que está reportado que la mayoría de las isoformas de Dp71 forman complejo con esta proteína. Sin embargo, β -dístroglicano de 30 kDa interactúa con la distrofina mutante Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, sugiriendo que la ausencia de los exones 78 y 79 altera los sitios de unión para β -dístroglicano completa. Parece que la secuencia que conserva la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ es suficiente para reconocer a β -dístroglicano de 30kDa, pero se requieren de los exones 78 y 79 (considerando los arreglos que estos pueden formar en cada isoforma de Dp71) para interactuar con β -dístroglicano completa.

Previamente se ha reportado que la presencia de Dp71 es fundamental para el proceso de adhesión celular, ya que el complejo de proteínas asociadas a Dp71 se une al complejo de las β -integrinas, sin embargo, en este trabajo se muestra que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ no interactúa con FAK. Esto podría deberse a que la mutante se encuentra unida a β -dístroglicano de 30 kDa, la cual no tiene la capacidad de anclarse a la membrana plasmática, evitando que la mutante interactúe con FAK. ¿Qué papel desempeñará Dp71 Δ ₇₈₋₇₉? Su interacción con β -dístroglicano de 30 kDa sugiere que esta respuesta podría

encontrarse en el núcleo, ya que se ha encontrado a esta isoforma de β -dístroglicano en núcleo (Lara-Chacón B. *et al.* 2010), por otro lado, la mutante se ha encontrado en membrana plasmática y citoplasma (Aragón J. *et al.* 2011, Herrera-Salazar A. *et al.* 2016). Resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo, revelan que Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ se acumula en núcleo tras la inhibición del transporte nuclear, sugiriendo que esta distrofina mutante entra al núcleo de manera transitoria. Así, Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y β -dístroglicano de 30 kDa podrían unirse y de esta manera traslocarse al núcleo de manera transitoria, quizá para ser modificada o degradada. Por otro lado, la posible interacción con HspB1, sigue 2 opciones. La primera es que Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ podría encontrarse mal estructurada y de esta manera HspB1 con su función de chaperona podría replegarla. La segunda es que HspB1 se encuentra fosforilada y en este estado, junto con Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, interactúan con componentes del citoesqueleto como F-actina y/o tubulina, estabilizándolos, promoviendo el crecimiento de neuritas. Finalmente, conocer la función de la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ podría darnos pistas de la función de los exones que preserva y con esto poder extrapolarla a otras isoformas, por ejemplo, resultados no publicados de nuestro grupo de trabajo, parecen indicar que Dp71e Δ ₇₁ tiene el mismo comportamiento que la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, debido a que un estudio proteómico de las células PC12 que sobre expresan a Dp71e Δ ₇₁ en el sistema de inducción Tet-On, presentan un crecimiento de neuritas aumentado y una sobre expresión de la proteína HspB1, sugiriendo que podría ser posible que Dp71e Δ ₇₁ interactúe con las mismas proteínas con las que lo hace Dp71 Δ ₇₈₋₇₉. Recordemos que la diferencia entre Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y Dp71e Δ ₇₁ es la ausencia del último aminoácido del exón 77 y la adición de 10 aminoácidos del intrón 77. *In-silico* se encontraron diferencias entre las estructuras de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y Dp71e Δ ₇₁, aunque, puede ser que el sitio de unión con HspB1 siga disponible.

8. Conclusiones.

- Las estructuras *in-silico* obtenidas por I-TASSER de Dp71 Δ_{78-79} y Dp71d Δ_{71} , Dp71f Δ_{71} y Dp71e Δ_{71} son diferentes, sugiriendo que el extremo carboxilo terminal (exones 78 y 79) determina la estructura terciaria de las isoformas de Dp71.
- Aumenta la expresión de neurofilamento ligero desde el primer día de diferenciación con NGF en células PC12-C11.
- La expresión de tirosina hidroxilasa disminuye su expresión hasta el día 6 de cultivo, con NGF.
- Aumenta la expresión de Dp71 Δ_{78-79} desde el primer día de diferenciación con NGF en células PC12-C11; esta expresión disminuye en los días de diferenciación posteriores.
- Por cross-linking se lograron preservar complejos en los que se encuentra Dp71 Δ_{78-79} .
- Se lograron observar 3 complejos en los que está presente Dp71 Δ_{78-79} . El primero entre los pesos 1,048 kDa y 720 kDa, el segundo cerca del peso de 720 kDa y el tercero con un peso aproximado de 480 kDa.
- FAK, β -dístroglicano y HspB1 no interactúan con Dp71 Δ_{78-79} en células PC12-C11 no diferenciadas.
- β -dístroglicano de 30 kDa interactúa con Dp71 Δ_{78-79} en células PC12-C11 diferenciadas por 1 día con NGF.
- La distrofina mutante Dp71 Δ_{78-79} , se une a la proteína HspB1, relacionada con la diferenciación de las células PC12.

9. Perspectivas.

- Analizar la expresión de neurofilamento ligero en células PC12 durante diferenciación y compararla con los resultados obtenidos en células PC12-C11.
- Realizar el duplicado del análisis de la expresión de TH y NF-L durante 6 días de cultivos en células PC12-C11 sin NGF.
- Determinar la localización subcelular de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ en células PC12-C11 con y sin NGF.
- Determinar las condiciones experimentales óptimas de cross-linking para obtener los complejos deseados.
- Separar a los complejos de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ del anticuerpo y la proteína G, sin afectar la composición del complejo.
- Repetir la co-inmunoeprecipitación en las células PC12.
- Realizar curvas de diferenciación en células PC12-C11 y PC12, para evaluar la expresión de HspB1 fosforilada y no fosforilada.
- Determinar si la interacción entre Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ y β -dístroglicano de 30 kDa ocurre en el núcleo.
- Determinar si Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ interactúa con HspB1 fosforilada o con HspB1 no fosforilada.
- Corroborar las interacciones de Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ con β -dístroglicano de 30 kDa y HspB1 mediante otras técnicas como: pull-down y microscopía confocal.
- Comprobar si Dp71d Δ ₇₁, Dp71f Δ ₇₁ y Dp71e Δ ₇₁ interactúan con las mismas proteínas con las que interactúa Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.
- Identificar a otras proteínas que formen complejo con la Dp71 Δ ₇₈₋₇₉.

10. Bibliografía

Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental cell research*, 296(2), 265-275.

Aragón, J., González-Reyes, M., Romo-Yáñez, J., Vacca, O., Aguilar-González, G., Rendón, A., Vaillend, C., Montañez, C. (2017). Dystrophin Dp71 Isoforms Are Differentially Expressed in the Mouse Brain and Retina: Report of New Alternative Splicing and a Novel Nomenclature for Dp71 Isoforms. *Molecular Neurobiology*, 1-11.

Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Bermúdez-Cruz, R. M., Bazán, M. L., Soid-Raggi, G., Ceja, V., Coy-Arechavaleta, A. S., Alemán, V., Depardón, F., Montañez, C. (2015). EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40. *Neuroscience letters*, 600, 115-120.

Aragón, J., Martínez-Herrera, A., Romo-Yáñez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Márquez, L., Soid-Raggi, G., Herrera-Salazar A., Montañez, C. (2016). 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.

Aragón, J., Romo-Yáñez, J., Martínez-Herrera, A., Ceja, V., Rendón, A., Montañez, C. (2011). Characterization of Dp71 Δ ₇₈₋₇₉, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *Journal of neurochemistry*, 119(4), 697-707.

Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews*, 82 (2), 291-329.

Cerna, J., Cerecedo, D., Ortega, A., García-Sierra, F., Centeno, F., Garrido, E., Mornet, D., Cisneros, B. (2006). Dystrophin Dp71f associates with the β 1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion. *Journal of molecular biology*, 362(5), 954-965.

Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., Rendon, A. (2000). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *Journal of cell science*, 113(19), 3409-3417.

Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(2), 635-642.

Cotton, S.M. et al. (2005) Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from a meta-analysis. *Dev. Med. Child Neurol.* 47, 257–265.

Daoud F, Candelario-Martínez A, Billard J-M, Avital A, Khelifaoui M, et al. (2009) Role of Mental Retardation-Associated Dystrophin-Gene Product Dp71 in Excitatory Synapse Organization, Synaptic Plasticity and Behavioral Functions. *PLoS ONE* 4(8): e6574.

Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., Cossée M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S, Toutain A, Echenne B, Frischman M, Mayer M, Desguerre I, Estournet B, Réveillère C, Penisson-Besnier, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human molecular genetics*, 18(20), 3779-3794.

Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J A., 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.

Fujita, K., Lazarovici, P., & Guroff, G. (1989). Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells. *Environmental health perspectives*, 80, 127.

Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73(7), 2424-2428.

Herrera-Salazar, A; García-Villegas, R; Aragón, J; Sánchez-Trujillo, A; Ceja, V; Martínez-Herrera, A; Merino-Jiménez, C; Montañez, C. (2015) Overexpression of mutant dystrophin Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ stimulates cell proliferation. *Neuroreport*, 6;27(1): 6-11.

Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, and Eck M J. (2000) Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with β -dystroglycan. *Nat Struct Biol* 7: 634–638.

Klockenbusch, C., Kast, J. (2010). Optimization of Formaldehyde Cross-Linking for Protein Interaction Analysis of Non-Tagged Integrin β 1. *BioMed Research International*, 2010.

Lara-Chacón, B., De León, M. B., Leocadio, D., Gomez, P., Fuentes-Mera, L., Martínez-Vieyra, I., Ortega, A., Jans, D. A., Cisneros, B. (2010). Characterization of an Importin α/β -recognized nuclear localization signal in β -dystroglycan. *Journal of cellular biochemistry*. 110(3), 706-717.

Lee, V. M. (1985). Neurofilament protein abnormalities in PC12 cells: comparison with neurofilament proteins of normal cultured rat sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience*, 5(11), 3039-3046.

Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velazquez, F., Depardon, F., Cervantes, L., Rendón, A., Mornet, D., Rosas-Vargas, H., Mustre, M., Montañez, C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118(4), 957-966.

Merino- Jiménez, C., Aragón, J., Ceja, V., Rodríguez- Martínez, G., Cázares-Raga, F. E., Chardonnet, S., Pionneau, C., Rendón, A., Montañez, C. (2016). Dp71 Δ ₇₈₋₇₉ dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1. *Proteomics*, 16(9), 1331-1340.

Muthu, M., Richardson, K. A., & Sutherland-Smith, A. J. (2012). The crystal structures of dystrophin and utrophin spectrin repeats: implications for domain boundaries. *PloS one*, 7(7), e40066.

Newey, S., Benson, M. A., Ponting, C. P., Davies, K. E., Blake, D. J. (2000). Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Current Biology*, 10(20), 1295-1298.

O'Reilly, A. M., Currie, R. W., Clarke, D. B. (2010). HspB1 (Hsp 27) expression and neuroprotection in the retina. *Molecular neurobiology*, 42(2), 124-132.

Read, D. E., Gorman, A. M. (2009). Heat shock protein 27 in neuronal survival and neurite outgrowth. *Biochemical and biophysical research communications*, 382(1), 6-8.

Rodríguez-Muñoz, R., del Carmen Cárdenas-Aguayo, M., Alemán, V., Osorio, B., Chávez-González, O., Rendon, A., Martínez-Rojas, D., Meraz-Ríos, M. A. (2015). Novel nuclear protein complexes of dystrophin 71 isoforms in rat cultured hippocampal GABAergic and glutamatergic neurons. *PloS one*, 10(9), e0137328.

Romo- Yáñez, J., Ceja, V., Ilarraza- Lomelí, R., Coral-Vázquez, R., Velazquez,

F., Mornet, D., Rendon, A., Montanez, C. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of cellular biochemistry*, 102(1), 82-97.

Rosas-Vargas H, Montañez C, Rendón A, Mornet D, García F, Cisneros B (2000) Expression and localization of utrophin in differentiating PC12 cells. *Neuroreport* 11:1–5.

Rumeur EL. 2015. Dystrophin and the two related genetic diseases, Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 15(3):14-20.

Sadoulet-Puccio, H. M., Rajala, M., Kunkel, L. M. (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12413-12418.

Saint Martín, A., Aragón, J., Depardon- Benítez, F., Sánchez- Trujillo, A., Mendoza- Hernández, G., Ceja, V., Montañez, C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy- terminal end. *FEBS Journal*, 279(1), 66-77.

Suárez-Sánchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K. M., Velez, G., Azuara-Medina, P. M., Gomez, P., Vásquez-Limeta A., Hernández-Hernández O., Lieu K G, Sutherland, B. W., Toews, J., Kast, J. (2008). Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein–protein interactions. *Journal of mass spectrometry*, 43(6), 699-715.

Jans D A. Cisneros, B. (2014). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(5), 985-1001.

Suzuki, A., Yoshida, M., Ozawa, E. (1995). Mammalian alpha 1-and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *The Journal of cell biology*, 128(3), 373-381.

Swamy, M., Siegers, G. M., Minguet, S., Wollscheid, B., Schamel, W. W. (2006). Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Sci. STKE*, 2006(345), pl4-pl4.

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, 43-60.

Tozawa, T., Itoh, K., et al. (2012). The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Molecular neurobiology*, 45(2), 287-297.

Villarreal-Silva M, Suarez-Sanchez R, Rodriguez-Munoz R, Mornet D, Cisneros B (2010) Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochem Res* 35(3):366–373.

Yuan, A., Rao, M. V., Nixon, R. A. (2012). Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci*; 125: 3257-3263

Waite, A., Brown, S. C., Blake, D. J. (2012). The dystrophin–glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends in neurosciences*, 35(8), 487-496.

Waite, A., Tinsley, C. L., Locke, M., Blake, D. J. (2009). The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Annals of medicine*, 41(5), 344-359.

Vaudry D., Stork, P J S., Lazarovici P., Eiden, L. E. (2002). Pathways for PC12

Cell Differentiation: Making the Right Connections. *Science*, 296(5573), 1648-1649.