



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Análisis comparativo de las líneas  
celulares PC12-C11 y PC12-B10 que  
sobreexpresan a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79”**

TESIS

Que presenta

**Q.B.P. Angela Danery Vidales Picazo**

Para obtener el grado de

**Maestra en ciencias**

En la especialidad de

**GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Directora de tesis

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Ciudad de México

Febrero, 2017

Esta tesis fue dirigida por la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda con la asesoría de la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz y el Dr. Luis Marat Álvarez Salas, ambos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Montañez, en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco.

Para la realización del trabajo la Q.B.P. Angela Danery Vidales Picazo fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el número de registro 336587 y el número de apoyo 392907. Se contó con el apoyo del proyecto Conacyt CB-2013-222054.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología facilidades otorgadas para la realización de este proyecto y mi formación profesional.

Mi sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Cecilia Montañez Ojeda, por su orientación, su paciencia y motivación a lo largo de este proyecto, admiro la pasión con la que realiza su trabajo y la humanidad que la caracteriza. En muchos sentidos me siento en deuda con usted por todo lo recibido en este periodo de tiempo.

A mis asesores de tesis la Dra. Rosa Bermúdez Cruz y el Dr. Luis Álvarez Salas por sus excelentes clases, su paciencia y observaciones que aportaron a mi formación profesional.

A los auxiliares del laboratorio Alejandra Sánchez, Clemencia Salas, Jorge Aragón y Víctor Ceja por su apoyo, enseñanzas y disposición siempre en la realización de este proyecto.

A Gabriela Mora y Monserrat Rodríguez por su apoyo en los trámites administrativos, su disposición y amabilidad en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio Lilia, Pablo, Sandra, Mayram, Coztli, Ingrid, Griselda, Candelaria, Iraís, Eduardo, César e Israel, por su apoyo, observaciones y el gran equipo que forman, por su amistad y por lo agradable de su compañía este periodo muchas gracias.

A mi familia, los Picazo y los Vidales que siempre han estado ahí para apoyarme y darme su cariño, amor y buenos consejos, estaré eternamente agradecida por la bendición de formar parte de sus familias.

A mis abuelos Alicia, Angela, Antonio y Manuel por guiarme y educarme, por su amor y sabiduría. Siempre los llevo en mi mente y en mi corazón.

A mi madre Marcela Picazo por tu apoyo en todo momento, por tus palabras y apapachos, por tus locuras y tu amor.

A mi sobrino Diego Antonio Vidales porque eres mi mayor motivo para salir adelante, por tu amor y tus risas, porque todo es más bonito desde que tú estás.

A Oscar Villavicencio por tu apoyo incondicional y tu gran corazón, porque me has dado el impulso para crecer y por encima de todo por el amor que nos tenemos.

A Dios porque siempre ha cuidado de mí y de mis seres queridos, porque siempre me deja ver una luz en el camino y me ha dado la maravillosa vida que tengo.

# ÍNDICE

Índice de Figuras .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
1.1. Distrofia muscular .....	12
1.2. Distrofina: Gen y Proteína.....	13
1.3. Distrofina Dp71 .....	17
1.4. Células PC12.....	23
1.5. Factor de crecimiento neural (NGF).....	24
1.6. Sistema Tet-On.....	25
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
3.1. Objetivo general.....	29
3.2. Objetivos particulares .....	29
<b>4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>30</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
5.1. Cultivos celulares.....	31
5.2. Extracción de DNA genómico .....	31
5.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	32
5.4. PCR .....	33
5.5. Secuenciación.....	34
5.6. Curva de inducción con Doxiciplina .....	35
5.7. Extracción de proteínas celulares.....	35
5.8. Western Blot .....	35
5.9. Curvas de proliferación y diferenciación .....	37
5.10. Análisis morfológicos de diferenciación celular.....	38
5.11. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta.....	38
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
6.1. Caracterización de las clonas C11 y B10 .....	40

6.2. Curvas de proliferación .....	43
6.3. Expresión de marcadores de proliferación.....	48
6.4. Análisis morfológicos en presencia de NGF .....	49
6.5. Expresión de marcadores de diferenciación .....	54
6.5. Inmunofluorescencias .....	57
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>70</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>71</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>72</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS

## Índice de Figuras

Figura 1. Representación esquemática de la organización del gen de la DMD.	15
Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) en el sarcolema. .....	16
Figura 3. Esquema de las isoformas de Dp71. ....	19
Figura 4. Localización subcelular de las proteínas recombinantes c-Myc-Dp71 expresadas en células PC12 Tet-On. ....	20
Figura 5. Características del vector pcDNA4/HisMax©-TOPO-TA.....	21
Figura 6. Composición de los exones de la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 .....	22
Figura 7. Vía de señalización de la diferenciación celular inducida por NGF en células PC12. El NGF es captado por el receptor celular TrkA, que induce la activación de las proteínas Ras, M-Ras y Rap 1 quienes activan una cascada de señalización que producen la diferenciación y adhesión celular (Sun et al., 2006). ....	25
Figura 8. Regulación de genes en el sistema Tet-On, mapa del vector Tet-On y plásmido pTRE2pur-Myc para la expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79.....	27
Figura 9. Diagrama general de trabajo.....	30
Figura 10. Presencia de DNA y mRNA de Dp71 .....	41
Figura 11. Secuencia del DNA de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las clonas C11 y B10.....	41
Figura 12. Expresión de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células B10 y C11.....	42
Figura 13. Curvas de viabilidad y expresión de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células B10.....	43
Figura 14. Curvas de proliferación de las clonas C11 y PC12. ....	44
Figura 15. Curvas de proliferación de las clonas B10, VC y Tet-On .....	45
Figura 16. Curvas de proliferación de las clonas B10, VC y Tet-On. ....	46
Figura 17. Curva de proliferación comparativa entre las clonas B10 y C11.....	46
Figura 18. Expresión de marcadores de proliferación en las clonas B10, VC, C11 y PC12.....	49
Figura 19. Morfología de las clonas C11 y PC12 diferenciadas en presencia de NGF. ....	50
Figura 20. Morfología de las clonas B10, VC y Tet-On en presencia de NGF. .	52
Figura 21. Promedio de longitud de neuritas y porcentaje de diferenciación de las clonas PC12 Tet-On y PC12. ....	54

Figura 22. Expresión de marcadores de diferenciación en las clonas B10, VC, C11 y PC12.....	56
Figura 23. Distribución de la proteína .....	58
Figura 24. Distribución de la proteína cMyc-Dp71 $\Delta$ 78-79 en el área de contacto de las células B10 diferenciadas con NGF y el sustrato. ....	59
Figura 25. Distribución de la proteína .....	60
Figura 26. Distribución de la proteína .....	61

## Índice de Tablas

Tabla 1. Características de los vectores contenidos en la clona B10 (Clontech, 2002, 2012).....	23
Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para Dp71 $\Delta$ 78-79 y $\beta$ actina (Aragon et al., 2011) .....	34
Tabla 3. Anticuerpos para los ensayos de Western Blot e inmunofluorescencias .....	37
Tabla 4. Tasa de crecimiento y tiempos de duplicación de las clonas estudiadas. ....	47



## **ABREVIATURAS**

BSA: Albúmina de suero bovino

dBcAMP: dibutilil-Adenosin Monofosfato cíclico

DMB: Distrofia muscular de Becker

DMD: Distrofia muscular de Duchenne

DPC: Complejo de proteínas asociadas a distrofina

ERK: Cinasas reguladas por señales extracelulares

EGF: Factor de crecimiento epidermal

FAK: Cinasa de adhesión focal

GRB2: Factor de crecimiento unido a receptor de proteína 2

HS: Horse serum

MAP: Proteína cinasa activada por mitógeno

MEK: Proteína cinasa activada por mitógeno

MES: Ácido 2-(n-morfolino) etanosulfónico

MTT: (3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difenil) Bromuro de tetrazolio

NGF: Factor de Crecimiento Neural

nNOS: Sintasa neuronal de óxido nítrico

PI3K: Fosfoinositol 3 cinasa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PLC $\gamma$ : Fosfoinositol fosfolipasa C

PminCMV: Promotor de citomegalovirus

rTetR: Proteína reguladora de tipo reversa del represor Tet

RTK: Receptores de tirosin cinasas

rtTA: Transactivador controlado por tetraciclina

SAPK3: Proteína cinasa serina/treonina 3

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SH3: Dominio homólogo src 3

SNT: Suc-associated neurotrophic factor-induced tyrosine-phosphorylated target

Sos: Son of sevenless homolog

TBS-T: Buffer salino Tris-0.05% de Tween 20

tetO: Secuencia del operador de tet

TetR: Proteína represora de Tet

TRE: Elemento de respuesta a tetraciclina

TrkA: Receptor de tirosin cinasa A

VC: Vector control

## RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne es una enfermedad hereditaria ligada al cromosoma X, la cual causa degeneración muscular progresiva debido a mutaciones en el gen DMD. Este gen posee varios promotores que expresan diferentes distrofinas. La Dp71 está presente principalmente en el cerebro y se ha descrito que pacientes con mutaciones localizadas en la región codificante para Dp71, que afectan significativamente la expresión de la proteína, presentan un cuadro severo de retraso mental. Esta distrofina presenta una variedad de isoformas que difieren en varios exones, así como en su localización celular.

Con el objetivo de estudiar las funciones de las regiones de las isoformas de Dp71, se diseñó una proteína mutante llamada Dp71 $\Delta$ 78-79 que presenta los exones 63-77 y carece de los exones 78 y 79, que le confieren una región carboxilo terminal diferente a las demás isoformas. Esta distrofina mutante fue transfectada en dos sistemas: uno que expresa la proteína de manera constitutiva, generando la clona PC12 C11, la cual presenta una alta tasa de diferenciación, mientras que en el otro sistema, clona PC12 Tet-On B10, la expresión de la proteína mutante es inducible, generando una alta tasa de proliferación.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar en forma comparativa ambas clonas que expresan a la Dp71 $\Delta$ 78-79, observando que las dos clonas presentan una alta tasa de proliferación, determinada por curvas de crecimiento, en donde la clona PC12 Tet-On B10 mostró mayor proliferación celular, así como la expresión incrementada de marcadores moleculares de procesos proliferativos, como FAK, Ciclina B y PCNA. Sin embargo, solo la clona PC12 C11 presentó una alta tasa de diferenciación de acuerdo al análisis morfométrico, con mayor cantidad de neuritas y de mayor longitud y el incremento en la expresión de marcadores moleculares como  $\beta$  III tubulina y HspB1, presentes en el proceso de diferenciación. En conclusión, se observó que la presencia de los exones 63-77 es suficiente para producir una alta tasa de proliferación y diferenciación celular en la línea PC12.

## SUMMARY

Duchenne muscular dystrophy is a hereditary disease linked to the X chromosome. Mutations in the DMD gene cause progressive muscle degeneration. This gene has different promoters encoding for a diversity of proteins called dystrophins. Dp71 is highly expressed in the brain and it has been reported that DMD patients with mutations located in Dp71 coding region, which significantly affect protein expression, show a severe mental retardation. Dp71 presents a variety of isoforms that differ in several exons as well as in their cellular distribution. With the aim of studying the different functions of the Dp71 regions, we generated a Dp71 mutant protein called Dp71 $\Delta$ 78-79, which has exons 63-77 but lacks the exons 78 and 79; therefore, has a different carboxy terminal end than the other Dp71 isoforms. This dystrophin mutant was transfected in a constitutive system, the clone PC12 C11 that has a high rate of differentiation, and in an inducible system; the clone PC12 Tet-On B10, showing a high proliferation rate. This study aimed to evaluate both clones overexpressing Dp71 $\Delta$ 78-79. It was found that both clones have a high proliferation rate, according to the growth curves. PC12 Tet-On B10 clone showed the highest cell proliferation rate and the higher expression of molecular markers involved in proliferation (FAK, cyclin B and PCNA), while PC12 C11 clone showed a high differentiation rate. According to the morphometric analysis, more and longer neurites were observed. A higher expression of differentiation molecular markers as  $\beta$ -III Tubulin and HspB1 was also observed.

In conclusion, it was observed that the expression of exons 63-77 induces a high rate of PC12 cell proliferation and differentiation.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Distrofia muscular

Las distrofias musculares son un grupo de desórdenes hereditarios heterogéneos que comparten características clínicas y que se caracterizan por desarrollar debilidad muscular progresiva que afecta a músculos de las extremidades, axiales y faciales en grados variables (Emery, 2002).

Existen varios tipos de distrofias musculares, pero destacan dos por la severidad en la que se ve afectado el individuo que la padece. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB), son desórdenes causados por mutaciones en el gen DMD el cual codifica para una proteína de citoesqueleto de 427 kDa llamada distrofina (Dp427). La mayoría de las mutaciones en el gen DMD conducen a la ausencia completa de la distrofina, mientras que la presencia de niveles bajos de la proteína truncada se encuentra en los pacientes con DMB (Ahn & Kunkel, 1993; Kunkel et al., 1986; Monaco, Bertelson, Liechti-Gallati, Moser, & Kunkel, 1988).

La DMD es una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X, que produce desgaste progresivo del músculo, afectando a 1 de cada 3500 niños. Los individuos que padecen esta enfermedad se ven forzados a usar silla de ruedas antes de cumplir 12 años, su esperanza de vida es de alrededor de 20 años, y generalmente fallecen debido a fallas respiratorias (Ahn & Kunkel, 1993; Hugnot et al., 1992). Sumado a estos desórdenes, también pueden ocurrir mutaciones en los genes que codifican para los componentes del complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC), las cuales causan otras formas de distrofia muscular como la distrofia muscular congénita y la distrofia muscular del anillo óseo (Blake, Weir, Newey, & Davies, 2002; Davies & Nowak, 2006).

Los primeros síntomas de la DMD se observan generalmente entre los 2 y 5 años de edad, cuando el sujeto presenta marcha de pato, dificultad para subir escaleras, dificultad para correr y retraso al caminar. Posteriormente se observa el comienzo de la pseudohipertrofia de los músculos de la pantorrilla, hay debilidad en las extremidades y se presenta el signo de Gower (el uso de los brazos para ponerse de pie estando en posición recostado). Eventualmente la

fuerza de las extremidades inferiores disminuye, conduciendo a la dependencia a una silla de ruedas. La mayoría de los pacientes mueren en su segunda década de vida, debido a complicaciones respiratorias por la debilidad en los músculos intercostales e infecciones respiratorias, también puede presentarse disfunción cardíaca o cardiopatías (Blake et al., 2002).

Los pacientes con BMD y DMD presentan a menudo discapacidades cognitivas lo cual sugiere que la deficiencia de la distrofina también causa alteraciones en la función cerebral (Blake & Kroger, 2000; Dubowitz & Crome, 1969). Se ha propuesto que la distrofina Dp71 está involucrada en el retraso mental que padece uno de cada tres pacientes con DMD (Hugnot et al., 1992).

Si la mutación causante de la distrofia permite la expresión de una proteína truncada, sin cambio en el marco de lectura, se produce una forma pequeña pero funcional de la distrofina, este escenario causa la BMD. En cambio, si la mutación afecta el marco de lectura de la proteína, entonces se puede producir un codón de paro y una terminación prematura, produciéndose una proteína trunca pequeña, lo que genera niveles bajos de la distrofina o inestabilidad de la misma, resultando el fenotipo de la DMD (Blake et al., 2002; Emery, 2002).

## **1.2. Distrofina: Gen y Proteína**

El gen DMD está localizado en el cromosoma X y es a la fecha el gen humano más largo, con aproximadamente 2.5 Mb de secuencia genómica. El gen está compuesto por 79 exones y codifica para una familia de 7 proteínas diferentes. La longitud del transcrito es de aproximadamente 14 Mb y la proteína codificada por este transcrito fue llamada distrofina debido a que su pérdida causa la distrofia. (Ahn & Kunkel, 1993; Marquez et al., 2003; Muntoni, Torelli, & Ferlini, 2003).

En cuanto a la función de las distrofinas se ha reportado que junto con las demás proteínas pertenecientes al DAPC, conectan el citoesqueleto a la matriz extracelular (Ervasti, 2007), protegen a las fibras musculares de daño mecánico en la contracción y su ausencia hace susceptibles a estas células a daño y necrosis (Le Rumeur, Winder, & Hubert, 2010). La distrofina también juega un papel en procesos de señalización y se relaciona con la modulación del tono

adrenérgico por nNOS (Brenman, Chao, Xia, Aldape, & Bredt, 1995; Ricotti et al., 2015).

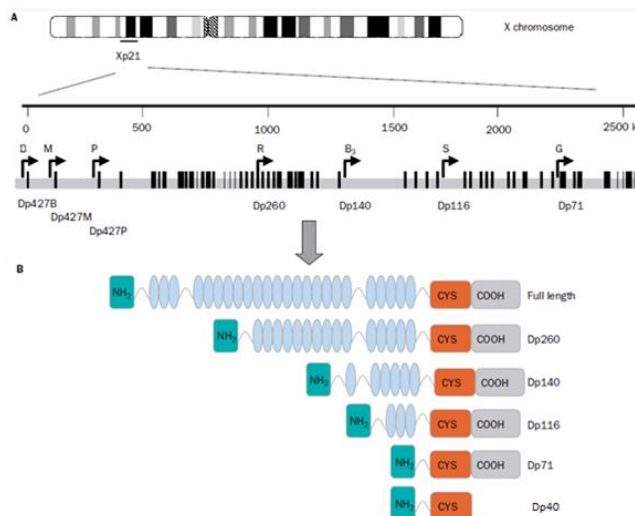
El transcrito de DMD de longitud completa se expresa a partir de tres promotores situados en el extremo 5' del gen, que se regulan de manera independiente y son nombrados de acuerdo al tejido con mayor expresión. El promotor B3 se expresa principalmente en neuronas corticales e hipocampo, el promotor P se expresa en células de Purkinje y músculo esquelético y el promotor M se expresa principalmente en músculo esquelético, cardiomiocitos y en pequeñas cantidades en células gliales (Blake et al., 2002; Boyce, Beggs, Feener, & Kunkel, 1991; Klamut, Gangopadhyay, Worton, & Ray, 1990). Dentro del gen se encuentran cuatro promotores cada uno usa un primer exón único entre los exones 30, 45, 56 y 63, para generar los productos proteicos Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71/Dp40 (Figura 1) (Boyce et al., 1991; Byers, Lidov, & Kunkel, 1993; Chelly et al., 1990; D'Souza et al., 1995; Gorecki et al., 1991; Klamut et al., 1990; Lidov, Selig, & Kunkel, 1995; Nudel et al., 1989)

La distrofina de longitud completa es una proteína de citoesqueleto de 427 kDa y es miembro de la familia de proteínas  $\beta$ -espectrina/ $\alpha$ -actina. Esta familia se caracteriza por un dominio de unión a actina en su extremo amino terminal, seguido por un número variable de unidades repetidas conocidas como repetidos tipo espectrina. En general la proteína contiene 4 regiones distintas: la región amino terminal, una región central, un dominio rico en cisteína y un dominio carboxilo terminal (Ahn & Kunkel, 1993). El dominio central está compuesto por 24 unidades repetidas que son similares a repetidos de triple hélice de espectrina, se cree que estos repetidos dan a la molécula una estructura tipo rodillo flexible, similar a la  $\beta$ -espectrina. Los repetidos están interrumpidos por 4 regiones ricas en prolina, la última región está unida a un dominio WW, el cual es un módulo de unión que presentan proteínas de regulación y señalización. También se ha observado que este dominio se une a sustratos ricos en prolina de manera análoga al dominio homólogo src 3 (SH3). El dominio WW media la interacción entre  $\beta$ -Distroglicano y distrofina, ya que el dominio citoplasmático del  $\beta$ -Distroglicano es rico en prolina; sin embargo, este dominio completo no parece

requerirse para la interacción con el Distroglicano, ya que la isoforma Dp71 posee solo una parte del dominio WW y aun así se une a  $\beta$ -Distroglicano (Blake et al., 2002; Rybakova, Amann, & Ervasti, 1996).

El dominio WW separa al dominio central de la región rica en cisteína y el dominio carboxilo terminal. La región rica en cisteína consiste de dos motivos EF que son similares a los que posee  $\alpha$ -actina y pueden unir  $\text{Ca}^{2+}$ . El dominio ZZ es también parte del dominio rico en cisteína y contiene un número conservado de residuos de cisteína que forman sitios de coordinación para cationes divalentes como el  $\text{Zn}^{2+}$ . Este dominio se une a calmodulina de manera dependiente de calcio, y no parece ser necesario para la interacción entre la distrofina y el  $\beta$ -Distroglicano (Blake et al., 2002; Macias et al., 1996; Ponting, Blake, Davies, Kendrick-Jones, & Winder, 1996).

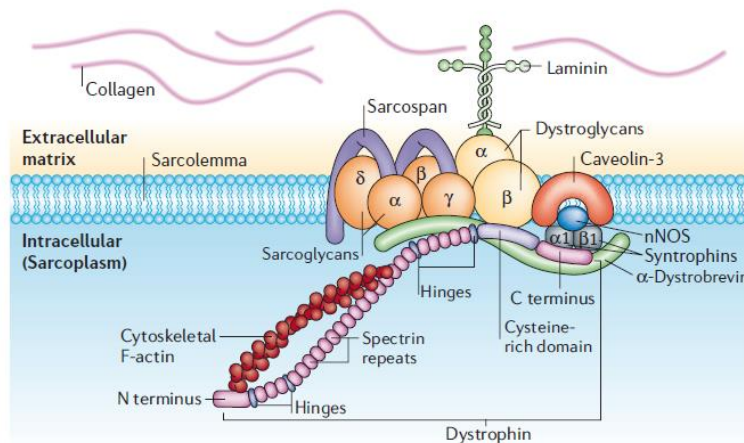
El dominio carboxilo terminal contiene dos regiones de polipéptidos que forman  $\alpha$  hélices y cada una de ellas tiene 7 repetidos conservados similares a los encontrados en zippers de leucina, esta región forma un sitio de unión para distrobrevina y modula la interacción entre sintrofina y otras proteínas asociadas a distrofinas (Blake et al., 2002; Burkhard, Stetefeld, & Strelkov, 2001; Sadoulet-Puccio, Rajala, & Kunkel, 1997). En la figura 1 se muestra un esquema de la estructura de la distrofina y los promotores antes descritos.



**Figura 1. Representación esquemática de la organización del gen de la DMD.** El gen DMD se localiza en el locus Xp21 del cromosoma X. Los diferentes promotores generan isoformas de longitudes variables, que en general presentan una región amino terminal, repetidos tipo espectrina, una región rica en cisteína y un extremo carboxilo terminal (Muntoni et al., 2003).



Se sabe que la distrofina se une al sarcolema del músculo por un complejo de al menos 10 proteínas. Este complejo se extiende desde la membrana y se une por el citoesqueleto de actina, a la lámina basal del músculo, por lo que podría corresponder a un puente que conecta el interior de la fibra muscular con el exterior. A su vez este complejo puede disociarse en tres complejos diferentes; el complejo distroglicano, el complejo sarcoglicano-sarcospan y el complejo de distrofina citoplasmática, como se muestra en la figura 2 (Davies & Nowak, 2006; Ibraghimov-Beskrovnya et al., 1992; Michele & Campbell, 2003).



**Figura 2. Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) en el sarcolema.** Las distrofinas son capaces de asociarse a una gran cantidad de proteínas en la membrana celular y forman un complejo que varía de acuerdo al tejido en el que se encuentre; sin embargo, se puede clasificar en tres grupos, el conjunto sarcoglicano-sarcospan, el grupo distroglicano y el grupo de proteínas citoplasmáticas (Davies & Nowak, 2006).

En cerebro se ha observado que el complejo de DAPC comprende  $\alpha$ - y  $\beta$ -Distroglicano,  $\beta$ 2-sintrofina y distrobrevina. En particular  $\beta$ -Distroglicano es la proteína más abundante en este complejo, y se asocia intracelularmente con distrofina y extracelularmente con  $\alpha$ -Distroglicano, formando un enlace continuo entre la matriz extracelular y el citoesqueleto (Austin, Howard, D'Souza, Klamut, & Ray, 1995; Rosa, Ceccarini, Cavaldesi, Zini, & Petrucci, 1996).

Se ha reportado que  $\beta$ -Distroglicano y sintrofina se unen a Grb2, que es un mediador de la vía de señalización de Ras, sugiriendo un papel importante en la transducción de señales. Grb2 a su vez recluta a la cinasa de adhesión focal (FAK) al DAPC. Por otro lado, la sintrofina también se une a la sintasa neuronal

de óxido nítrico (nNOS), canales de Na<sup>+</sup>, SAPK3, calmodulina y cinasa diacil glicerol ζ (Brenman et al., 1995; Yang et al., 1995).

En el cerebro se han encontrado múltiples complejos de proteínas asociadas a distrofina, la diversidad de estos complejos se debe a la presencia de las diferentes isoformas de las distrofinas y de las DAPs, un ejemplo de ello es la presencia de proteínas como β-distrobrevina y γ-sintrofina en el DAPC neuronal, las cuales no se expresan en complejos musculares. Se cree que la Dp427 se expresa únicamente en células neuronales, ya que se ha encontrado en diferentes poblaciones de neuronas incluyendo células piramidales y de Purkinje. Además, se ha asociado en sinapsis excitatorias e inhibitorias como el complejo GABA-AR-Dp71. También interactúa con proteínas que modulan la organización de los complejos de señalización y sinapsis glutamatérgicas, la pérdida de Dp71 afecta la maduración sináptica (Blake, Nawrotzki, Loh, Gorecki, & Davies, 1998; Daoud et al., 2009; Lidov, Byers, Watkins, & Kunkel, 1990; Waite, Brown, & Blake, 2012).

El complejo Dp71-DAPC se asocia con proteínas claves en señalización como FAK, c-Src y Grb2 que se conocen por contribuir en el crecimiento neurítico, morfogénesis de dendritas y plasticidad sináptica (Lauri, Taira, & Rauvala, 2000; Moeller, Shi, Reichardt, & Ethell, 2006; Robles & Gomez, 2006).

### **1.3. Distrofina Dp71**

La distrofina Dp71 se transcribe a partir de un promotor localizado entre los exones 62 y 63 del gen DMD y es el producto de este gen que se expresa en niveles más altos en el cerebro (Austin et al., 1995; Bar et al., 1990). La expresión de esta distrofina se ha observado en células pluripotentes embrionarias y es el primer producto del gen DMD detectable durante el desarrollo. Además, se ha observado que la Dp71 se expresa en vasos sanguíneos en el cerebro, en terminaciones perivasculares de astrocitos y en cultivos de astrocitos y de células gliales de Müller en retina, lo que sugiere que Dp71 tiene un rol en la barrera hematoencefálica (Aleman et al., 2001; Dalloz et al., 2003).

Su función se asocia con eventos morfogénéticos y de diferenciación terminal de diferentes tejidos y órganos, incluyendo el sistema nervioso central y

periférico, nódulos linfáticos, pulmones y vasos sanguíneos, entre otros (Anderson, Head, Rae, & Morley, 2002; Lumeng, Hauser, Brown, & Chamberlain, 1999; Ricotti et al., 2016; Sarig et al., 1999). También juega un papel importante en procesos de adhesión y proliferación de células neuronales (Enriquez-Aragon et al., 2005; Herrera-Salazar et al., 2016; J. Tan et al., 2015).

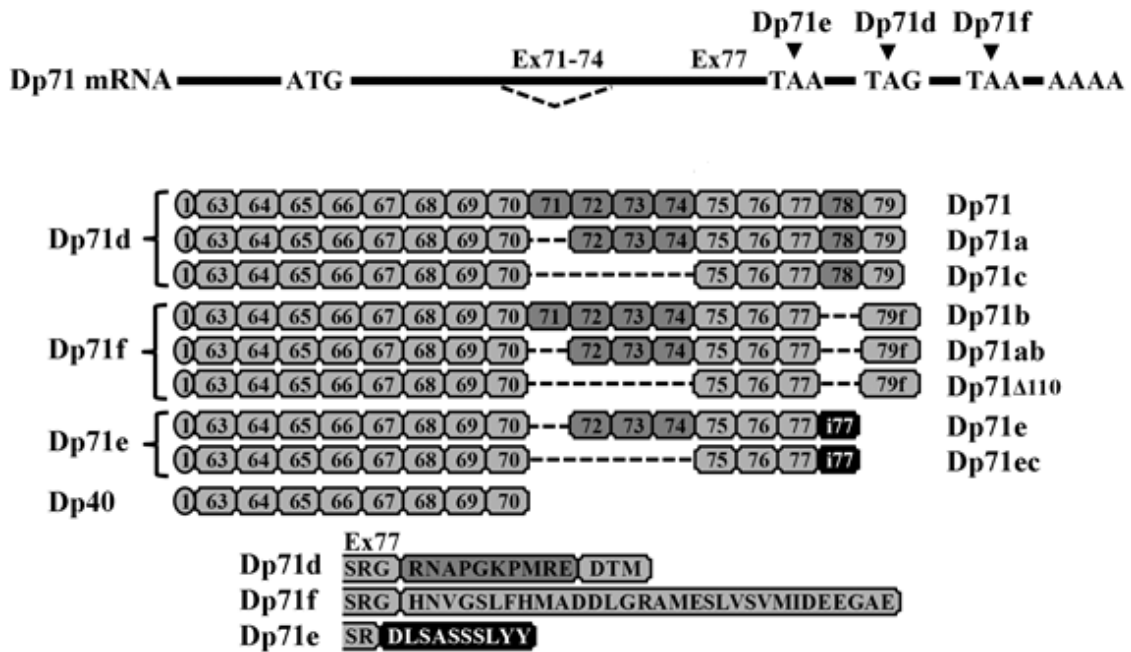
En cerebro de ratones Dp71-null, la pérdida de Dp71 causa la reducción del número de sinapsis maduras, densidad sináptica reducida y alteración de la morfología de la zona activa post-sináptica. Por otro lado el comportamiento de los ratones Dp71-null revela una reducción en el instinto exploratorio, inhibe el reflejo del miedo y afecta el aprendizaje y la memoria, además participa en la reactividad emocional del animal, el cual pierde la curiosidad (Daoud et al., 2009).

Esta isoforma es el producto más abundante del gen DMD en cerebro, se ha descrito que pacientes con mutaciones localizadas en la región codificante para Dp71, que afectan significativamente la expresión de la proteína, presentan un cuadro severo de retraso mental (Bresolin et al., 1994).

Dp71 es el producto estructuralmente más heterogéneo de las isoformas de la distrofina, tiene un amino terminal único de siete aminoácidos y contiene el dominio rico en cisteína y el carboxilo terminal de la distrofina, región crucial para la unión con los complejos de proteínas asociadas con distrofina, y carece del dominio tipo espectrina y del amino terminal común (Bar et al., 1990; Cox, Phelps, Chapman, & Chamberlain, 1993; Hugnot et al., 1992).

Dp71 sufre procesamientos alternativos en los exones 71-74 y 78 en varios tejidos generando múltiples productos de Dp71. El procesamiento en los exones 71-74 no cambia el marco de lectura, mientras que el procesamiento en el exón 78 elimina los 13 aminoácidos del marco original y agrega 31 aminoácidos con función aún desconocida (Austin et al., 1995). El grupo con el exón 78 intacto, el cual es llamado Dp71d, incluye a las isoformas Dp71, Dp71a y Dp71c. En ausencia del exón 78 ocurre un cambio en el marco de lectura dando lugar al grupo llamado Dp71f, que tiene tres variantes, Dp71b (si el exón 71 está presente), Dp71ab (si el exón 71 está ausente) y Dp71 $\Delta$ 110 (carece de los exones 71-74). Por último el grupo denominado Dp71e incluye a las isoformas Dp71e y

Dp71ec, que poseen 34 pares de bases del intrón 77, como se puede observar en la figura 3 (Aragon et al., 2016; Saint Martin et al., 2012).

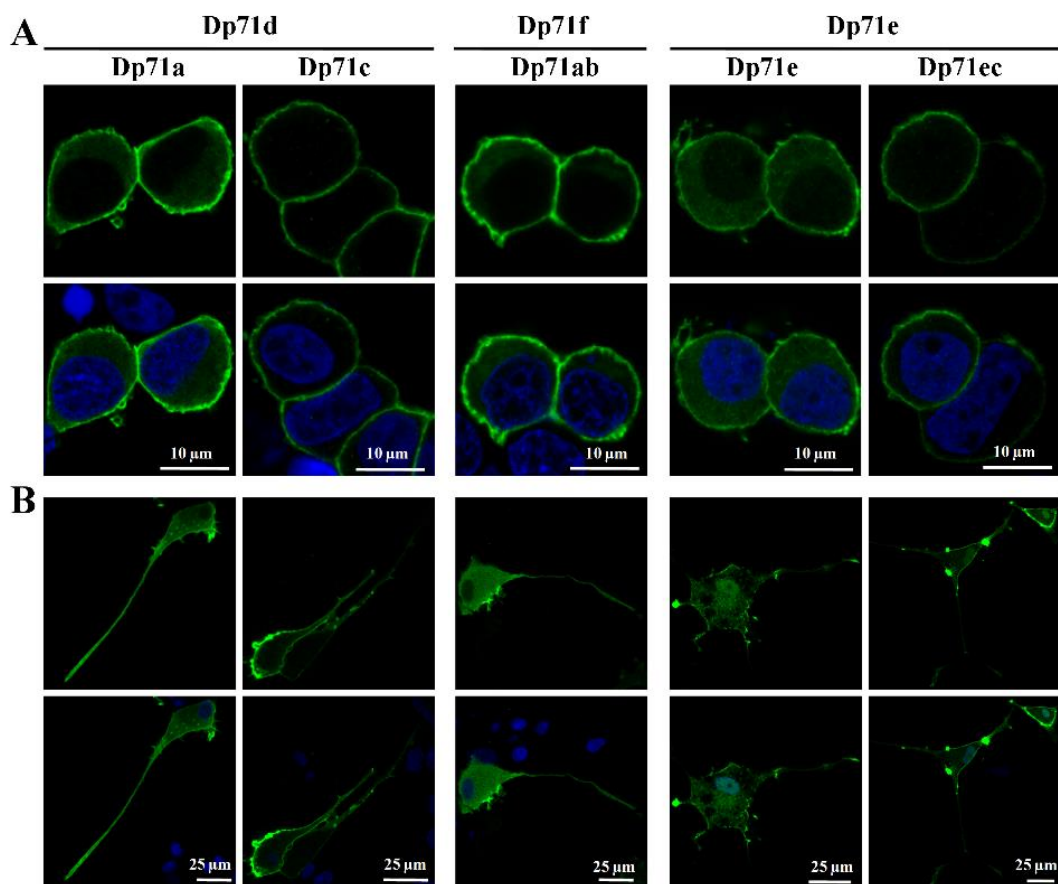


**Figura 3. Esquema de las isoformas de Dp71.** Se indican los codones de paro de los grupos Dp71e (TAA), Dp71d (TAG) y Dp71f (TAA), la localización de los exones 71-74 (Ex71-74) y 77 (Ex77) se muestran en gris oscuro y el esquema del procesamiento alternativo de los exones 71, 71-74 y 78 en líneas punteadas. Se muestran en color gris claro los exones presentes en los tres grupos de las distrofinas Dp71 (Dp71a, Dp71f y Dp71e) así como en la Dp40. (Aragon et al., 2016).

Se ha analizado la localización de las diferentes isoformas de Dp71 en transfectantes transitorias de la línea celular PC12 utilizando proteínas recombinantes que contienen una etiqueta del epítipo c-Myc ligada a la Dp71. Se reportó que las recombinantes c-Myc-Dp71a, c-Myc-Dp71ab, y c-Myc-Dp71e se localizaron principalmente en la membrana y citoplasma celular, mientras que c-Myc-Dp71c y c-Myc-Dp71ec se localizaron en la membrana celular de células no diferenciadas. De manera interesante, las isoformas c-Myc-Dp71a, c-Myc-Dp71e y c-Myc-Dp71ec se localizaron en el núcleo en células diferenciadas con NGF (Figura 4). Adicionalmente, las isoformas se observaron en conos de crecimiento y neuritas de las células diferenciadas, en presencia de NGF (Aragon et al., 2016).

Además del estudio en las células PC12 se ha analizado la localización de la Dp71 en otras líneas celulares como HEK293, donde se encontró la isoforma

Dp71ab en el núcleo, mientras que la Dp71b se encontró en citoplasma y fracciones nucleares (Nishida et al., 2016). Un estudio con células HeLa, C2C12 y N1E115 reportó que la ausencia de los exones 71 y 78 hacen que la Dp71 se localice principalmente en el citoplasma, mientras que la pérdida del exón 78 produce una localización principalmente nuclear (Gonzalez et al., 2000).

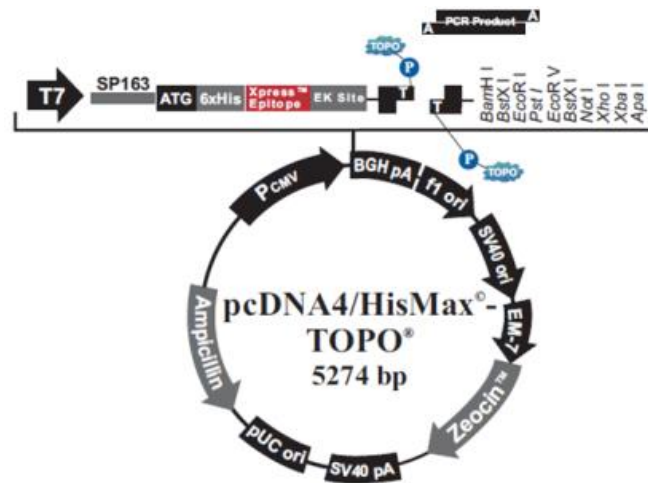


**Figura 4. Localización subcelular de las proteínas recombinantes c-Myc-Dp71 expresadas en células PC12 Tet-On.** (A) Localización subcelular de las proteínas recombinantes c-Myc-Dp71 en células no diferenciadas (B) Localización subcelular de las proteínas recombinantes c-Myc-Dp71 en células diferenciadas a los 6 días de tratamiento con NGF. Verde: Proteínas c-Myc-Dp71, Azul: Núcleos (Aragon et al., 2016). Las barras indican el tamaño en  $\mu\text{m}$ .

Se ha observado que existe una expresión diferencial entre los componentes del DAPC en células PC12 diferenciadas y no diferenciadas. Se reportó la presencia del complejo Dp71ab,  $\beta$ -Distroglicano,  $\alpha$ 1-Sintrofina,  $\beta$ -Distrobrevina y  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  sarcoglicano en células no diferenciadas, mientras que en células diferenciadas se encontró el complejo Dp71ab,  $\beta$ -Distroglicano,  $\alpha$ 1-Sintrofina,  $\beta$ -Distrobrevina, nNOS y  $\delta$  sarcoglicano, lo que sugiere que existe plasticidad del DAPC en el sistema nervioso de acuerdo a las necesidades de la

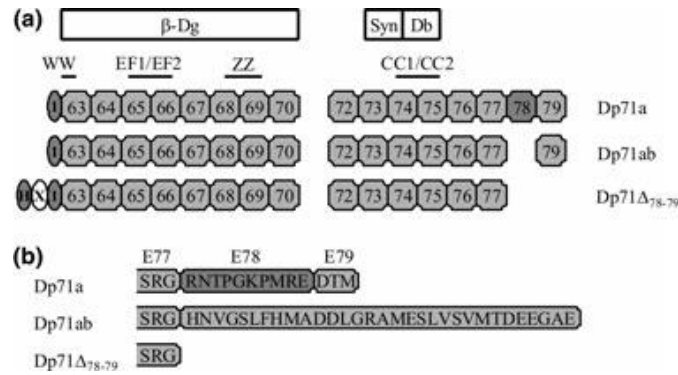
célula. Por ello, se sugiere que Dp71 está involucrada en el anclaje y/o en la organización de componentes específicos de membrana (Romo-Yanez et al., 2007).

Para estudiar el papel de los dominios de Dp71, Aragón y colaboradores (2011) generaron la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79, por delección *in vitro* de los exones 78 y 79. La secuencia de DNA de esta distrofina mutante fue clonada en el vector pcDNA4/HisMax-TOPO-TA, el cual permite agregar una bandera que codifica para el epítipo “Xpress” en el extremo amino de la proteína de interés como se observa en la figura 5 (Aragon et al., 2011).



**Figura 5. Características del vector pcDNA4/HisMax<sup>®</sup>-TOPO-TA.** El vector contiene el promotor de citomegalovirus para regular la expresión del gen de interés y usa como antibiótico de selección Zeocina, que se añade al medio de crecimiento para la y el mantenimiento de las clonas (Invitrogen, 2012).

En este trabajo, Aragón y colaboradores (2011) utilizaron la línea celular PC12 para expresar a la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 y estudiar su efecto. Se aisló la clona denominada C11, la cual en presencia del factor de crecimiento neural (NGF), mostró un nivel alto de expresión de la Dp71 $\Delta$ 78-79. Esto mostró que los exones 63 al 77 son capaces de estimular el proceso de diferenciación neuronal y de regular la expresión de isoformas de Dp71 endógenas. Esta mutante se esquematiza en la figura 6 (Aragon et al., 2011).



**Figura 6. Composición de los exones de la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79.** a) Comparación de Dp71 $\Delta$ 78-79 con otras isoformas de Dp71. b) Distroglicano:  $\beta$ -Dg, Sintrofina: Syn, Distrobrevina: Db. b) Comparación de las secuencias carboxilo terminal de Dp71 $\Delta$ 78-79 con otras isoformas de Dp71. 1: Exón único de Dp71, H: Etiqueta de Histidinas, X: Epítoto Xpress fusionado a Dp71 $\Delta$ 78-79 (Aragon et al., 2011).

En el estudio de la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 se observó que la proteína se localizó mayoritariamente en la periferia celular, sugiriendo que los exones 78-79 pueden participar en la regulación de la localización núcleo/citoplasma de las isoformas de Dp71 (Aragon et al., 2011). Con respecto a la acción del NGF en las células que expresan esta mutante se observó que se estimula el proceso de diferenciación de las células transfectadas, con lo que se confirmó que los exones 68-77 son suficientes para inducir la estimulación de la diferenciación y no se requiere de los exones 78 y 79 (Aragon et al., 2011).

Para continuar con el estudio de la mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 se construyó la clona PC12 Tet-On que contiene un sistema de expresión inducible de la mutación con doxiciclina. Las características de ambos vectores se presentan en la tabla 1. Con esta estrategia se logró obtener la clona PC12 Tet-On B10, la cual fue seleccionada por tener la menor expresión de la proteína sin el inductor y un nivel alto de la misma en presencia de doxiciclina. Trabajos preliminares han mostrado que con este sistema la tasa de proliferación de las células es tres veces más alta que las células control (células transfectadas con el vector sin distrofina), y que pese a la presencia de NGF, la tasa de diferenciación es baja y, la tasa de crecimiento y extensión de neuritas esta disminuida (Herrera-Salazar et al., 2016).

Nombre	Proteína expresada	Marcador de selección en mamíferos	Tamaño (Kb)
pTet-On	rtTA	Neomicina	7.37
pTRE2pur-Myc	Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79	Puromicina	5.2

**Tabla 1. Características de los vectores contenidos en la clona B10** (Clontech, 2002, 2012).

Los estudios de localización celular previamente realizados muestran que, al igual que la clona C11, en la clona B10 la proteína c-Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 se localiza en la periferia celular; sin embargo, la clona B10 también muestra localización de esta proteína en el citoplasma lo que se puede atribuir a la saturación de la membrana por la concentración de ésta proteína (Herrera-Salazar et al., 2016).

#### 1.4. Células PC12

La línea celular PC12 proviene de un feocromocitoma adrenal de rata, que tiene la capacidad de diferenciarse a un fenotipo neuronal en respuesta al NGF. Esta línea celular presenta 40 cromosomas homogéneos y muy cercanos al estado diploide. Estas células acumulan pequeñas vesículas en las neuritas y en sus terminaciones dendríticas. Como respuesta al tratamiento con NGF. También son capaces de sintetizar neurotransmisores como dopamina y catecolamina, entre otros (Greene & Tischler, 1976).

Las células diferenciadas por estímulo del NGF cesan su división celular, presentan extensiones de neuritas, se vuelven eléctricamente excitables, expresan marcadores neuronales y producen microvesículas tipo sinápticas. Al retirar el estímulo de NGF pierden sus neuritas y revierten su fenotipo a células cromafines (Klesse, Meyers, Marshall, & Parada, 1999).

PC12 es un excelente modelo celular para el estudio de las distrofinas Dp71 y Dp40, ya que los transcritos de Dp260, Dp140 y Dp116 no se expresan, siendo Dp71 y Dp40 las únicas distrofinas expresadas en esta línea celular. A la fecha se sabe que estas células expresan las isoformas Dp71ab, Dp71c, Dp71a, Dp71c, Dp71e y Dp71ec (Aragon et al., 2016; Saint Martin et al., 2012), y su expresión es regulada finamente durante la diferenciación celular, los bajos niveles de expresión preceden a la sinaptogénesis mientras que altos niveles de expresión coincide con un aumento rápido del número de uniones sinápticas.



También se ha observado que las isoformas se distribuyen diferencialmente en la célula y son relocalizadas en el proceso de diferenciación debido a las modificaciones post traduccionales como la fosforilación y/o glicosilación, entre otros eventos(Aragon et al., 2016; Marquez et al., 2003).

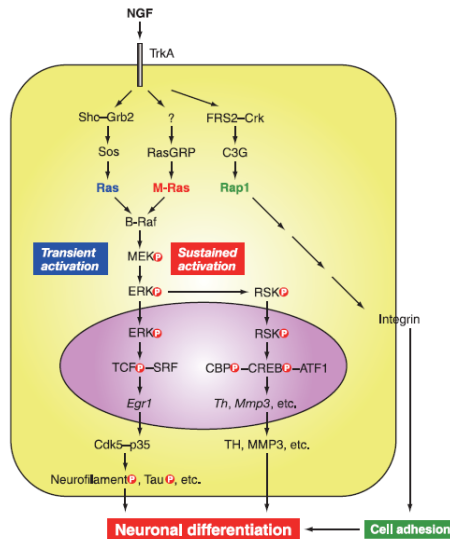
### **1.5. Factor de crecimiento neural (NGF)**

La familia de las neurotrofinas son factores peptídicos solubles que se requieren para el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso de embriones de vertebrados. Esta familia de factores se unen a la familia Trk de los receptores de tirosin cinasas (RTK). Esta unión activa diversas moléculas de señalización intracelulares y como resultado activa señales para la diferenciación de las neuronas sensoriales y simpáticas, con el objetivo de evitar la muerte celular, es necesario el estímulo de las neurotrofinas para la sobrevivencia y diferenciación celular (Klesse et al., 1999; Santos, Verveer, & Bastiaens, 2007).

El factor de crecimiento neural es un miembro de esta familia y se une con alta afinidad al receptor Trk A en la superficie de las células PC12, resultando en la dimerización y transfosforilación del mismo. En su estado fosforilado se une a una gran variedad de moléculas activando diferentes vías de señalización como Ras, PI3K, PLC $\gamma$ , etc. (Klesse et al., 1999; Lee & Juliano, 2004).

La vía Ras se activa con la inducción de NGF en células PC12, estimulando la cascada de cinasas Raf-I, B-raf, MAP cinasa, MEK y cinasas reguladoras de señales extracelulares (ERK 1 y ERK 2), quienes al fosforilarse se traslocan al núcleo permitiendo el crecimiento de neuritas (Sun et al., 2006). En células PC12 se ha observado que el NGF induce la diferenciación celular a través de la activación transitoria de la vía Ras-ERK; sin embargo, esta activación es insuficiente para observar el crecimiento de neuritas, el NGF además induce la activación sostenida de M-Ras-ERK, ambas vías de señalización son capaces de activar la diferenciación celular, como se muestra en la figura 7 (Sun et al., 2006). La activación con NGF es suficiente para producir neuritogénesis en células PC12, se ha observado un aumento en los niveles del transcrito y de la proteína Dp71 en presencia al NGF (Marquez et al., 2003), sugiriendo que la Dp71 tiene un papel en la función y desarrollo neuronal. Se ha reportado que la expresión

de la proteína Dp71 se incrementa en paralelo con el desarrollo cerebral, indicando que la Dp71 juega un papel relevante en el desarrollo del sistema nervioso central (Jung, Filliol, Metz-Boutigue, & Rendon, 1993; Moizard et al., 2000).

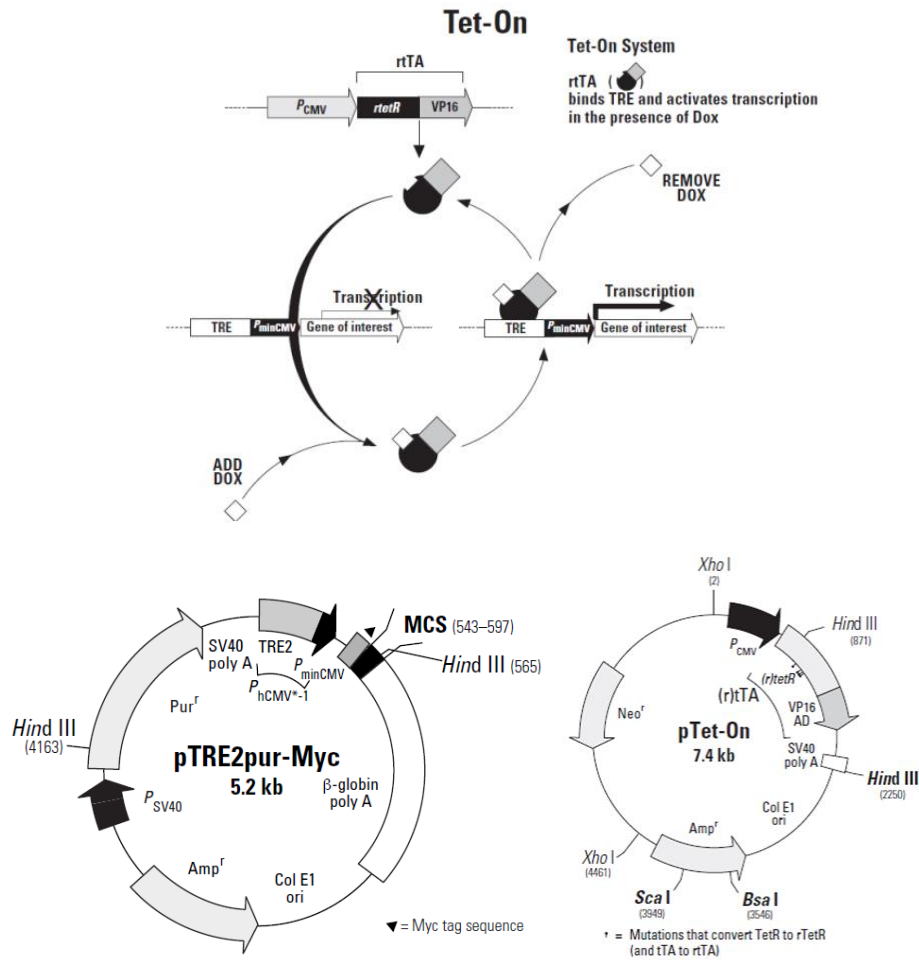


**Figura 7. Vía de señalización de la diferenciación celular inducida por NGF en células PC12.** El NGF es captado por el receptor celular TrkA, que induce la activación de las proteínas Ras, M-Ras y Rap 1 quienes activan una cascada de señalización que producen la diferenciación y adhesión celular (Sun et al., 2006).

## 1.6. Sistema Tet-On

El sistema Tet-On es un sistema inducible de expresión de genes para células de mamífero y es usado para incrementar los niveles de proteínas de interés en la célula. Este sistema ha sido ampliamente usado en el estudio de proteínas con funciones represoras, reguladoras, tirosin fosfatasas, de unión a RNA, etc. (Clontech, 2012). El sistema Tet-On contiene elementos de regulación de *Escherichia coli*, en donde la proteína represora Tet controla negativamente el operón de resistencia a tetraciclina, en el transposón *Tn10*. TetR bloquea la transcripción de estos genes por su unión a la secuencia del operador de tet (*tetO*) en ausencia del agente inductor. Un componente importante de este sistema es la proteína reguladora de tipo reversa del represor Tet (rTetR) la cual tiene 4 cambios de aminoácidos, un carboxilo terminal de 127 aminoácidos del dominio de activación del virus herpes. Lo anterior convierte al represor en un activador transcripcional, produciéndose una proteína híbrida conocida como

transactivador, controlado por tetraciclina (rtTA), que contiene genes de resistencia a neomicina. Un segundo componente es el plásmido de respuesta el cual expresa el gen de interés bajo el control del elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), este consiste en 5 repetidos directos de 42 pares de bases, conteniendo a *tetO* localizado río arriba del promotor de citomegalovirus (PminCMV). Ambos componentes deben estar transfectados en la misma célula para que el sistema funcione, donde rtTA se une a TRE y activa la transcripción en presencia de doxiciclina. La doxiciclina es una tetraciclina sintética que funciona como molécula inductora en este sistema, cuando la doxiciclina se une a la proteína Tet-On produce un cambio conformacional que le permite interaccionar con el operador *tet* localizado en el promotor. Este sistema está finamente regulado y es muy específico, además se ha probado en una gran variedad de células eucarióticas (Clontech, 2012; Urlinger et al., 2000).



**Figura 8. Regulación de genes en el sistema Tet-On, mapa del vector Tet-On y plásmido pTRE2pur-Myc para la expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79.** El represor reverso de Tet (rTetR) fue creado con cuatro cambios de aminoácidos que hacen que la proteína responda a doxiciclina, Como resultado de estos cambios el dominio rTetR de rTA se une a TRE y activa la transcripción en presencia de doxiciclina. El plásmido pTRE2pur-Myc presenta la secuencia TRE, el promotor de citomegalovirus y el sitio de multiclonación donde se inserta la proteína de interés; mientras que el plásmido pTet-On expresa la proteína rTA que en conjunto con la doxiciclina induce la expresión de la proteína de interés. P<sub>CMV</sub>: Promotor de Citomegalovirus, rTA: Transactivador tet reversa (Clontech, 2012).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que la presencia de los exones 63-70 y 72-77 incrementa el crecimiento de neuritas y la proliferación en la clona PC12 C11 mientras que en la clona PC12 Tet-On B10 se observa exclusivamente una tasa de proliferación alta. Por lo anterior, en el presente trabajo se estudió de manera comparativa a las clonas PC12 C11 y PC12 Tet-On B10, que expresan a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79, con el propósito de contribuir al conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en los procesos de diferenciación y proliferación.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Estudiar comparativamente a las líneas celulares PC12 Tet-On clona B10 y PC12 clona C11, que expresan de manera estable a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79.

#### **3.2. Objetivos particulares**

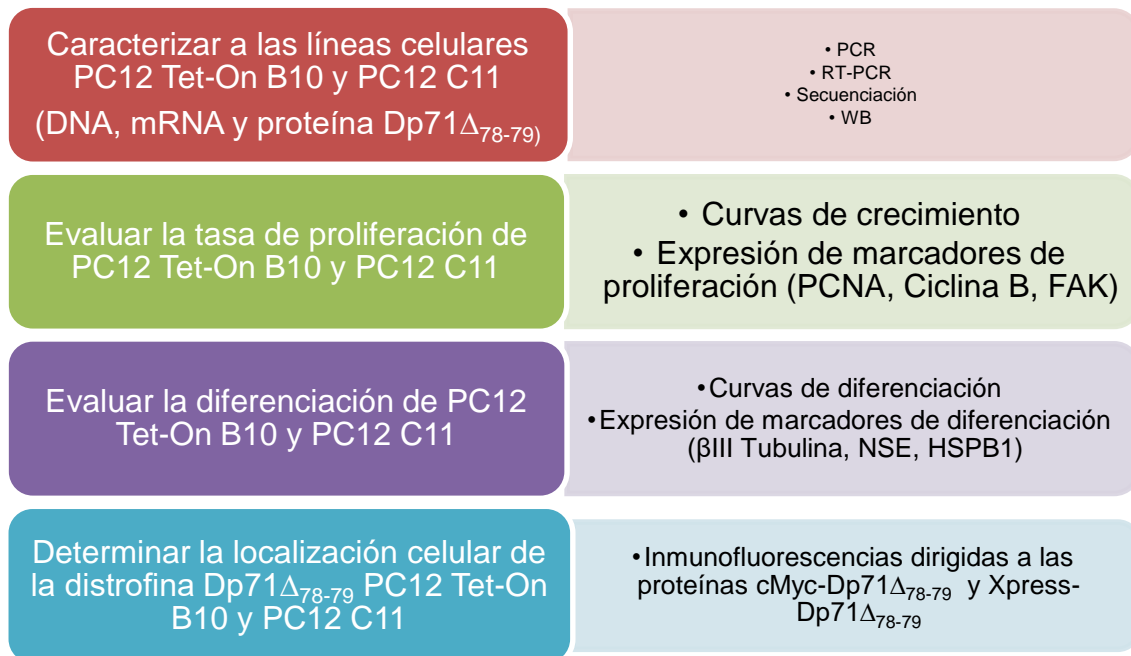
1. Verificar la presencia de DNA, mRNA y proteína Dp71 $\Delta$ 78-79 en las líneas celulares PC12 Tet-On B10 y PC12 C11.

2. Evaluar la tasa de proliferación de las líneas celulares PC12 Tet-On B10 y PC12 C11.

3. Evaluar la tasa de diferenciación de las líneas celulares PC12 Tet-On B10 y PC12 C11.

4. Determinar la localización celular de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las líneas celulares PC12 Tet-On B10 y PC12 C11.

#### 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 9. Diagrama general de trabajo.**

En este proyecto se planteó analizar de manera comparativa a la clona PC12 C11 y a la clona PC12 Tet-On B10, ambas sobreexpresan a la proteína Dp71 $\Delta_{78-79}$ . En ensayos previos se observó que las dos clonas presentan diferentes características fenotípicas. La clona PC12 C11 presenta una alta tasa de diferenciación en comparación con la clona PC12 Tet-On B10 que presenta una alta tasa de proliferación. Como primer paso en la caracterización de ambas clonas se planteó llevar a cabo la verificación de la expresión del DNA, transcrito y proteína Dp71 $\Delta_{78-79}$  en cada una de las clonas por medio de ensayos de Western Blot, extracción de RNA total, RT-PCR, y secuenciación. A continuación, se evaluó la tasa de proliferación y diferenciación de cada clona utilizando curvas de crecimiento y análisis de la morfología celular, evaluando el tamaño y número de neuritas. Finalmente se evaluó la expresión de los marcadores de proliferación PCNA, FAK y Ciclina B y marcadores de diferenciación como  $\beta$  III Tubulina, NSE y HSPB1. Por último, se determinó la localización de la distrofina mutante en cada una de las clonas en estudio.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Cultivos celulares**

Se usaron las células PC12, PC12 Tet-On transfectadas con el vector vacío clona (c3), en adelante “Vector Control (VC)”, PC12 Tet-On clona B10, en adelante B10, PC12 Tet-On, en adelante Tet-On y PC12 clona C11, en adelante C11. La clona B10 (Herrera-Salazar et al., 2016) y C11 (Aragon et al., 2011) se transfectaron con los plásmidos pTRE2pur-Myc y pcDNA4/HisMaxTOPO que expresan a la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79.

Las células PC12 se sembraron en medio DMEM (Gibco), suplementado con 5% de suero fetal bovino (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 1 mg/ml de estreptomycin (Gibco) y 0.25  $\mu$ g/ml de micostatina (Gibco), a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. La clona C11 fue cultivada en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle) suplementado con 10% de suero inactivado de caballo (Gibco), 5% de suero fetal bovino (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 1 mg/ml de estreptomycin (Gibco), 200  $\mu$ g/ml de Zeocina (Invitrogen) y 0.25  $\mu$ g/ml de micostatina (Invitrogen) a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células B10, que fueron transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp71 $\Delta$ 78-79, y la clona c3 transfectada con el vector control VC, se mantuvieron con medio de crecimiento DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero de caballo inactivado (Gibco), 5% de suero fetal bovino libre de tetraciclinas (Clontech), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 1 mg/ml de estreptomycin (Gibco), 150  $\mu$ g/ml de geneticina (Invitrogen) y 350 ng/ml de puromicina (Clontech), a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. La clona Tet-On fue cultivada en el mismo medio sin puromicina. La inducción de la expresión de Dp71 $\Delta$ 78-79 se realizó adicionando 500 ng/ml de doxiciclina al medio de acuerdo a los requerimientos del sistema.

### **5.2. Extracción de DNA genómico**

La extracción del DNA genómico de las clonas antes mencionadas se realizó usando cultivos de células confluentes, las células se removieron



mecánicamente y se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, posteriormente se hicieron dos lavados con 1 ml de PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  15 mM,  $\text{NaCl}$  154 mM a pH7.2).

A continuación, las células se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lisis (Tris-HCl 500 mM a pH8, EDTA 100 mM a pH8, Sarcosyl 0.5%) adicionado con RNAsa A, a una concentración final de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se incubaron a 37°C por 1 h. Al término de la incubación se agregó Proteinasa K a una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y se incubaron las muestras a 65°C por 1 h. Posteriormente se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de fenol saturado con Tris-HCl pH 8 y se incubó la mezcla por 5 min, agitando por inversión ocasionalmente. Al término se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se incubó la mezcla por 5 min, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min y se recuperó la fase acuosa, este paso se realizó 2 veces.

Para la purificación del DNA se precipitó la fase acuosa con 250  $\mu\text{l}$  de Acetato de amonio 7.5 M y 500  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto frío, a 20°C toda la noche. Posteriormente, se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C por 15 min, se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo a 14,000 rpm por 15 min, el sobrenadante se decantó y la pastilla se dejó secar para luego ser resuspendida en agua desionizada. Se mezcló 1  $\mu\text{l}$  de DNA total con 1  $\mu\text{l}$  de buffer de muestra BXG 6x (Azul de bromofenol 0.25%, Xilen cianol 0.25%, Glicerol 30%) y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Gibco), teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 0.5x (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM). El extracto de DNA fue almacenado a 20°C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### **5.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA**

El RNA total se extrajo de cultivos celulares confluentes usando Trizol (Invitrogen) a temperatura ambiente por 5 minutos, después se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo por cada ml de Trizol, se agitó la muestra 15 segundos por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C, terminado el tiempo de centrifugación se extrajo la fase acuosa y se adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de isopropanol al 100% por cada ml de Trizol, dejando reposar

10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm a 4°C y se decantó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de etanol frío al 75% y se centrifugó a 7,500 rpm, después se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en agua. Se mezcló 1 µl de RNA total con 1 µl de buffer de muestra BXG 6x y se verificó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 0.5x y se almacenó a -80°C hasta su uso. El cDNA fue sintetizado con el kit “SuperScript II Reverse Transcriptase” a partir del RNA total obtenido anteriormente se realizó la siguiente mezcla: 10.5 µl RNA total, 4 µl Buffer DNasa 10x y 4 µl DNasa (1 u/µl), esta mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente y después de la incubación se inactivó con 1.5 µl EDTA 25 mM a 70°C por 10 min. Posteriormente se tomaron 7 µl de RNA libre de DNA, 1 µl oligonucleótidos “random primers”, 1 µl dNTP mix (10 mM de cada uno) y 3 µl H<sub>2</sub>O. Esta mezcla se calentó a 70°C por 5 min y terminada la incubación se trasladó a hielo rápidamente. Se adicionaron a la mezcla 4 µl de Buffer First-Strand 5x, 2 µl DTT 0.1M, 1 µl RNasa OUT (40 U/µl) y 1 µl RT SuperScript II, esta mezcla se incubó a 42°C por 60 min, y a 70°C por 15 min. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **5.4. PCR**

Las reacciones de PCR usadas en este trabajo se realizaron usando 25 µl de la siguiente mezcla: 2.5 µl Buffer PCR 10x, 1.75 µl MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0.15 µl Taq DNA Polimerasa (2 U/µl), 0.5 µl dNTP mix (10 mM de cada uno), 0.5 µl oligonucleótido forward, 0.5 µl oligonucleótido reverse, 17.1 µl H<sub>2</sub>O y 2 µl DNA. Los experimentos se realizaron en un termociclador Applied Biosystems. Se verificó la presencia del DNA correspondiente a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 con los oligonucleótidos Xpress Forward y BGH reverse para la clona C11 y su control la clona PC12, mientras que para las clonas B10 y VC se usaron los oligonucleótidos pTRE 2 5' forward y pTRE 2 3' reverse. Se verificó la presencia del RNA correspondiente a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 con los oligonucleótidos Exón 77 forward y BGH reverse para la clona C11 y su clona control PC12, mientras que para las clonas B10 y su vector control se usaron los oligonucleótidos Exón 77 forward y pTRE2 3' reverse. Para la clona B10 se usaron células inducidas y

sin inducir y se cuantifico la expresión relativa del mRNA en el ciclo 28. Se usaron los iniciadores Actina 1 forward y Actina 2 reverse para amplificar la secuencia de  $\beta$ -actina como control de carga. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

En la tabla 2 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos, los productos esperados y las condiciones de reacción.

DNA o mRNA	Primer	Secuencia 5' a 3'	Producto	Condiciones de PCR
<b>DNA B10</b> <b>Dp71<math>\Delta</math>78-79</b>	pTRE2 5' pTRE2 3'	TGGCATCAATGCAGAAGCTG AACAAATCAAGGGTCCCCAACT	2083 pb	94°C/30s, 68°C/3min por 35 ciclos
<b>DNA C11</b> <b>Dp71<math>\Delta</math>78-79</b>	Xpress Forward BGH	TATGGCTAGCATGACTGGT TAGAAGGCACAGTCGAGG	2124 pb	94°C/30s, 65°C/3min por 35 ciclos
<b>mRNA B10</b> <b>Dp71<math>\Delta</math>78-79</b>	Exón 77 pTRE2 3'	CTCCCCAGGACACAAGCACAG AACAAATCAAGGGTCCCCAACT	137 pb	95°C/30s, 55°C/30s, 72°C/30s por 30 ciclos
<b>mRNA C11</b> <b>Dp71<math>\Delta</math>78-79</b>	Exón 77 BGH	CTCCCCAGGACACAAGCACAG TAGAAGGCACAGTCGAGG	189 pb	
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Actina 1 Actina 2	TTGTAACCAACTGGGACGATATGG GATCTTGATCTTCATGGTCTAGG	763 pb	95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s por 28 ciclos

**Tabla 2. Condiciones de la reacción de PCR para Dp71 $\Delta$ 78-79 y  $\beta$  actina (Aragon et al., 2011)**

## 5.5. Secuenciación

Se utilizó el DNA de las clonas B10 y C11 para realizar 2 reacciones de PCR como se indicó anteriormente, el volumen total de las muestras se sometió a electroforesis en geles de agarosa al 1%, se cortaron los fragmentos de DNA del gel y se eluyeron con TBE 0.5x en 150  $\mu$ l de buffer de elución (10 ml CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 7.5 M, 200  $\mu$ l buffer de carga) por 1:30 h a 100 V. Al término de la electroelución se obtuvieron 400  $\mu$ l de solución y se precipitaron con 1 ml de etanol absoluto toda la noche a 20°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min, se retiró el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se volvió a centrifugar a 12,000 rpm por 15 min. Se dejó secar la pastilla y el precipitado se resuspendió en agua desionizada. Se mezcló 1  $\mu$ l de DNA con 1  $\mu$ l de buffer de muestra BXG 6x y se verificó su pureza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en buffer TBE 0.5x y se almacenó a -20°C. Posteriormente las muestras se sometieron a una reacción de secuenciación usando el dye deoxy terminator cycle sequence kit (Applied Biosystems) y el secuenciador ABI Prism sequencing 310 (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación se realizaron con un volumen final

de 20 µl; 2 µl del DNA purificado, 8 µl de la mezcla de reacción del Kit Terminator Ready, 4 µl de oligonucleótidos (pTRE2 3' para la clona B10 y BGH para la clona C11) y 6 µl de agua. Se mezclaron cuidadosamente y se amplificaron con 40 ciclos de reacción a 94°C/30s 55°C/30s y 60°C/4 min.

### **5.6. Curva de inducción con Doxiciclina**

Se cultivaron células de la clona B10 en cajas de 12 pozos, 500,000 células por pozo con 1 ml de medio como se indica en el apartado de cultivos celulares. Las células se trataron con las concentraciones de doxiciclina; 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml. Se cosecharon las células a las 24 h y se realizó el conteo celular, la extracción de proteínas y posteriormente el Western Blot correspondiente. El experimento se realizó por duplicado.

### **5.7. Extracción de proteínas celulares**

Las proteínas fueron obtenidas a partir de las células cultivadas en las diferentes condiciones, las células fueron removidas de la superficie de la caja Petri y se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm para recuperarlas. Las células se lavaron con PBS y se lisaron con buffer de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1% de Tritón 100x y 1x de inhibidores de proteasas). Los extractos proteicos se almacenaron a 20°C para su análisis posterior. Después de la extracción de proteínas se determinó la concentración de proteína total por el método de Bradford. Se utilizó una curva de la proteína BSA (Albumina de suero bovino) con concentraciones conocidas de 0.5 a 5 µg/ml diluida en agua desionizada. Se colocaron por duplicado las muestras de proteínas para cuantificar, se ajustaron a 40 µl con agua desionizada y se agregaron 180 µl del reactivo de Bradford. Se midió la absorbancia de la placa en el lector de microplacas modelo 680 (Bio-Rad) a 595 nm, se promediaron los valores y se calculó la concentración de proteína de cada muestra. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

### **5.8. Western Blot**

El extracto de proteína total fue resuspendido en buffer de electroforesis (250 mM de Tris-HCl, 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS), 10% de β-

mercaptoetanol, 20% de glicerol y 0.5% de azul de bromofenol). 30 µg de proteína fueron separados electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS de 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 23 mA durante 18-20 horas, a una temperatura de 4°C. Al término la membrana fue bloqueada con leche baja en grasa al 5% en agitación, durante 2 horas, y a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos primarios a 4°C. Las diluciones de los anticuerpos y los lavados se realizaron con TBS-T (10 mM Trizma pH8, 0.15 M NaCl y 0.005% de Tween 20). Todas las membranas fueron tratadas con el anticuerpo anti-actina o GRB2 como proteína control.

Para la detección de las proteínas de interés se usó un sistema basado en la peroxidasa de rábano: Western Blot ECL (Amersham Pharmacia Biotech), en donde los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o de conejo están conjugados con peroxidasa para detectar el anticuerpo primario. Para obtener la expresión relativa de cada proteína, la intensidad de la banda fue cuantificada por escáner densitométrico usando el software ImageJ (NIH, USA). Se obtuvo la relación entre el valor de cada proteína y GRB2. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. En la tabla 3 se describen los anticuerpos, las diluciones a las que se usaron y las proteínas que detectaron.

Anticuerpo	Proteína detectada	Dilución del anticuerpo
Anti-Xpress (Invitrogen)	Dp71 $\Delta$ 78-79	WB 1:200 en TBS-T IF: 1:150 en PBS
cMyc (Santa Cruz Biotechnology)	Dp71 $\Delta$ 78-79	WB: 1:250 en TBS-T IF: 1:25 en PBS
HSPB1 (Abcam)	HSPB1	WB: 1:500 en TBS-T
PCNA (Sigma)	PCNA	WB: 1:500 en TBS-T
FAK (Santa Cruz Biotechnology)	FAK	WB: 1:1000 en TBS-T IF: 1:80 en PBS
CycB (Sigma)	Ciclina B	WB: 1:200 en TBS-T
Tuj 1 (Invitrogen)	$\beta$ III Tubulina	WB: 1:500 en TBS-T
LG5 (Sigma)	$\beta$ Distroglicano	IF: 1:100 en PBS
Alexa 594 (Invitrogen)	Anti IgG de conejo	IF: 1:200 en PBS
Alexa 488 (Invitrogen)	Anti IgG de ratón	IF: 1:300 en PBS
Anti IgG de ratón (Invitrogen)	Anti IgG de ratón	WB: 1:5,000 en TBS-T LBG
Anti IgG de conejo (Invitrogen)	Anti IgG de conejo	IF: 1:10,000 en TBS-T LBG
H-300 (Santa Cruz Biotechnology)	NSE ( $\gamma$ -enolasa)	WB: 100 en TBS-T
Anti- $\beta$ actina (Donado por el Dr. Manuel Hernández CINVESTAV, México)	$\beta$ actina	WB: 500 en TBS-T

**Tabla 3. Anticuerpos para los ensayos de Western Blot e inmunofluorescencias;** WB: Condiciones de Western Blot; LBG: Leche baja en grasas; IF: Condiciones de inmunofluorescencias.

### 5.9. Curvas de proliferación y diferenciación

Para las curvas de crecimiento se sembraron 25,000 células de cada una de las clonas en placas de 6 pozos con las siguientes condiciones: con suero de caballo al 1% y al 10%, sin tratamiento, tratamiento con 1000 ng/ml de doxiciclina y tratamiento con 500 ng/ml de doxiciclina. El número de células fue determinado por cuenta directa a los 3, 6 y 9 días de crecimiento, usando azul de tripano y cámara de Neubauer, para realizar la cuenta viable. Cada clona se ensayó por duplicado y se realizó el análisis estadístico de anova de dos vías para cada ensayo.

Para evaluar la diferenciación celular se sembraron 25,000 células de cada una de las clonas en placas p30 con una concentración de NGF 2.5s (Invitrogen) de 50 ng/ml y el medio suplementado con 10% de suero de caballo, el cual fue cambiado cada tres días a todas las clonas. Para las clonas B10, VC y Tet-On se

realizaron ensayos con y sin 500 ng/ml de doxiciclina. Cada clona se ensayó por triplicado y se realizó el análisis estadístico 2way anova para cada una.

#### **5.10. Análisis morfológicos de diferenciación celular**

Las células sembradas en cajas de cultivo pre-tratadas con colágeno fueron expuestas a 50 ng/ml de NGF 2.5s (Invitrogen), el cultivo en crecimiento fue visualizado usando un microscopio Zeiss y se tomaron 10 imágenes al azar del campo claro por caja, en los días 0, 3, 6 y 9 del tratamiento con NGF.

Para cuantificar el índice de diferenciación, las células con producción de neuritas se contaron manualmente. El grado de neuritogénesis se analizó por la medida de la longitud de las neuritas usando el software AxioVision LE Rel. 4.7 (Zeiss). Todas las neuritas fueron medidas y se consideró la neurita más larga cuando se observaron ramificaciones. Para obtener el índice de diferenciación se obtuvo el porcentaje de células diferenciadas con prolongaciones mayores o menores a un cuerpo celular, respecto al número de células en 10 campos. El porcentaje de células con neuritas se calculó y el promedio de longitud de las neuritas se obtuvo a partir de las medidas de todas las neuritas. Se realizaron los experimentos por triplicado.

#### **5.11. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta**

Los análisis de inmunofluorescencia indirecta se realizaron en células diferenciadas y sin diferenciar a los días 1 y 9. Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente cubiertos con poli-Lisina L y tratadas con 500 ng/ml de doxiciclina 24 horas antes del experimento. Al cumplirse los tiempos los cubreobjetos se lavaron con buffer de citoesqueleto (10 mM de ácido 2-(n-morfolino) etanosulfónico (MES), 150 mM de NaCl, 5 mM de EGTA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de glucosa) y posteriormente se realizó la permeabilización celular con 0.4% de Tritón 100x y se fijaron las células con 4% de paraformaldehído en buffer de citoesqueleto, por 5 min. Las células se lavaron 3 veces por 5 minutos con buffer de citoesqueleto y se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer de citoesqueleto por 20 minutos. A continuación, los cubreobjetos se lavaron con PBS, éstos fueron bloqueados con 0.5% de gelatina en PBS por 1 hora, y

posteriormente se lavaron nuevamente con PBS. Los anticuerpos primarios, diluidos en PBS, fueron añadidos a los cubreobjetos e incubados toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron los cubreobjetos para quitar el exceso de anticuerpos primarios con PBS y se incubaron los anticuerpos secundarios Alexa 488 (Invitrogen) o Alexa 594 (Invitrogen) por 1 hora a temperatura ambiente, para detectar la señal del anticuerpo primario. Las muestras se lavaron con PBS y fueron cubiertas con el medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories, Inc.). Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40X usando el microscopio confocal Leica TCS SPE. Para analizar la distribución de cada proteína de interés, se tomaron 10 campos al azar para cada condición. Se realizaron los experimentos por triplicado.

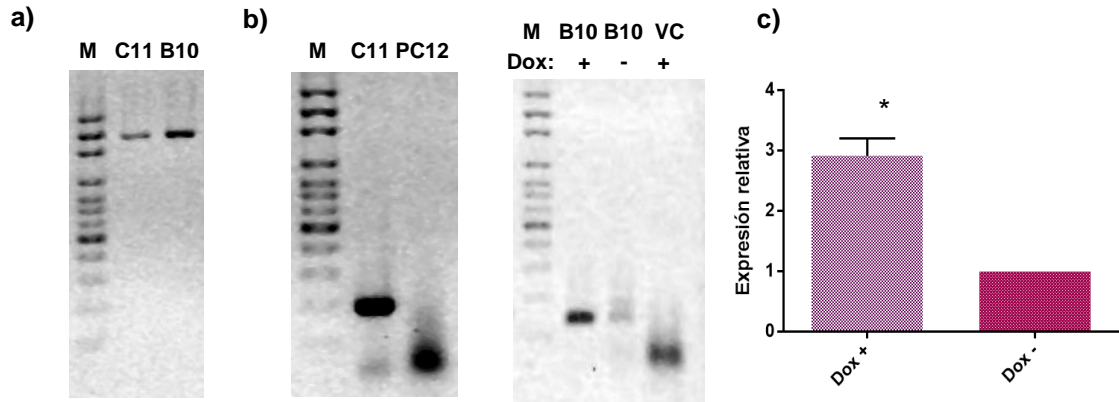


## 6. RESULTADOS

### 6.1. Caracterización de las clonas C11 y B10

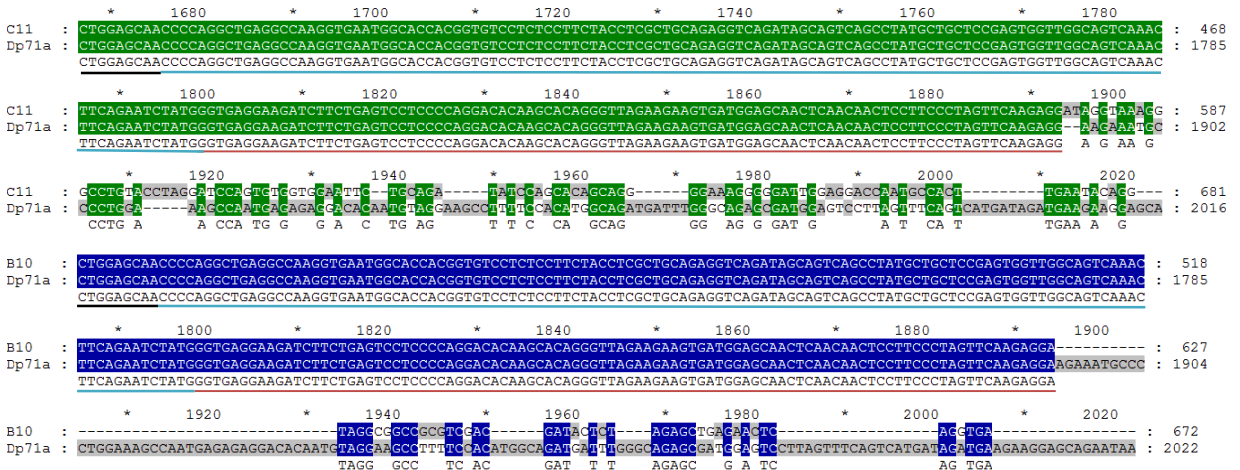
El primer paso en el proyecto fue caracterizar a las clonas C11 y B10 para verificar que tuvieran el fragmento de DNA correspondiente a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 y expresaran a las proteínas recombinantes Xpress-Dp71 $\Delta$ 78-79 y Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79. Se realizó la extracción del DNA genómico y se hicieron reacciones de PCR con los oligonucleótidos pTRE2 5' y pTRE2 3' para la clona B10, y Xpress Forward y BGH para la clona C11, como se describen en la tabla 2, para amplificar los fragmentos de DNA de Dp71 $\Delta$ 78-79, que se encuentran insertados en los respectivos vectores. Se observaron en ambas líneas celulares las bandas de amplificación de los fragmentos de Dp71 con el peso esperado (Figura 10a).

A continuación, se corroboró la expresión del mRNA de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 realizando la extracción del mismo y una reacción de RT-PCR con oligonucleótidos que amplificaron a partir del exón 77 (Tabla 2). En la figura 10b se muestran las bandas de aproximadamente 200 pb amplificadas a partir de ambas clonas, también se cuantificó la expresión relativa de RNA de la clona B10 en células tratadas y sin tratar con doxiciclina. Se observó que la expresión relativa en las condiciones de inducción es significativamente mayor a las células sin tratar con doxiciclina (Figura 10c).



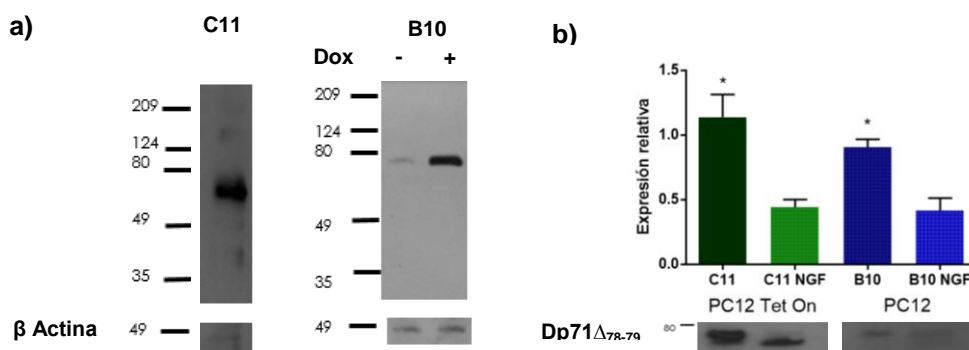
**Figura 10. Presencia de DNA y mRNA de Dp71 $\Delta$ 78-79 en las clonas C11 y B10.** a) PCR del DNA genómico total de las clonas C11 y B10 utilizando los oligonucleótidos Xpress forward y BGH para la clona C11 y pTRE2 5' y pTRE2 3' para la clona B10 b) Amplificación del cDNA de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en la clona C11 usando los oligonucleótidos Exón 77 y BGH; y B10 con y sin doxiciclina con los oligonucleótidos Exón 77 y pTRE2 3' c) Expresión relativa de cDNA en la clona B10 tratada y sin tratar con doxiciclina. M: Marcador de peso molecular. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Posteriormente se realizó la secuenciación de los fragmentos de DNA desde el exón 77 hasta las regiones fusionadas con el vector, para corroborar la ausencia de los exones 78 y 79 en cada clona. Se comprobó que ambas clonas presentan la región correspondiente al exón 77 de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 y carecen de los exones 78 y 79 (Figura 11).



**Figura 11. Secuencia del DNA de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las clonas C11 y B10.** Alineamiento de las secuencias de Dp71 $\Delta$ 78-79 obtenidas en ambas clonas, comparadas con la secuencia reportada de la distrofina Dp71a. Los colores verde y azul corresponden a la región de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 de la clona C11 y B10 respectivamente, y el color gris muestra las bases sin alinear. La línea roja corresponde al exón 77 en rojo, exón 76 está indicado en azul y el exón 75 en negro. Los experimentos se realizaron por duplicado.

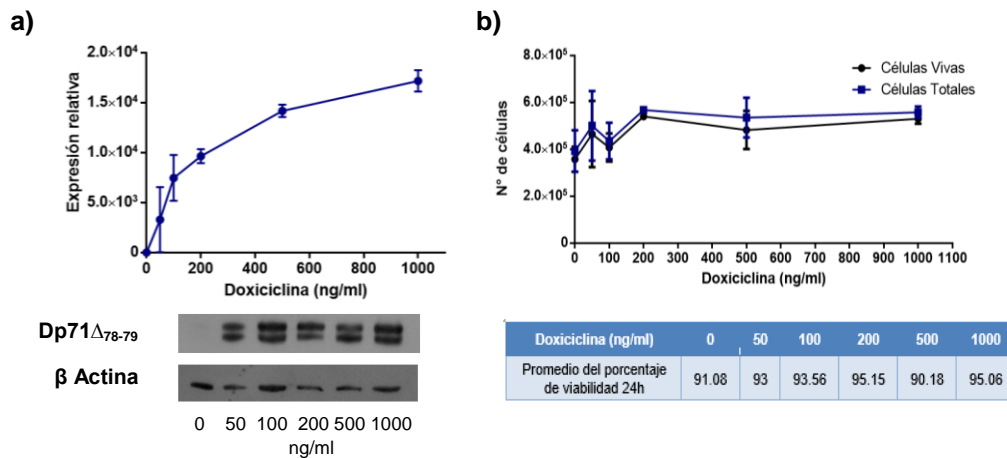
A continuación, se analizó la expresión de las proteínas recombinantes Xpress-Dp71 $\Delta$ 78-79 y Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 en cada clona, utilizando anticuerpos dirigidos en contra de las respectivas etiquetas fusionadas a la distrofina. Se realizaron ensayos de WB a las 24 horas de crecimiento, para detectar a las proteínas recombinantes presentes en las clonas C11 y B10 (Figura 12a). En la figura 12b se observa la expresión de la distrofina en ausencia (día 1) y presencia de NGF (día 9), en ambas clonas hay una reducción significativa de la expresión de la distrofina en los días 9 de cultivo, para la clona B10 hay 226  $\pm$  67 veces mayor expresión relativa de la proteína en células no diferenciadas, mientras que para la clona C11 hay 271  $\pm$  74 veces mayor expresión en células no diferenciadas. Se muestra sólo el análisis de la clona B10 tratada con doxiciclina, ya que en ensayos anteriores por Herrera-Salazar (2016) se observó que en estas condiciones expresan 130  $\pm$  45 veces más Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 que las células sin inducción.



**Figura 12. Expresión de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células B10 y C11.** a) WB de las clonas C11 y B10 a las 24h de cultivo, se presenta a la clona B10 en ausencia y presencia del inductor doxiciclina. b) Expresión relativa de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 al día 1 de cultivo sin NGF y a los 9 días de cultivo con NGF. Los anticuerpos usados fueron el anti-Xpress para la clona C11 y anti-cMyc para la clona B10, descritos en la tabla 3. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para conocer la concentración de doxiciclina más conveniente para inducir la expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79 se utilizaron diferentes concentraciones de doxiciclina (0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml) y se determinó que la concentración adecuada para realizar la inducción de la proteína es 500 ng/ml de doxiciclina, ya que induce la expresión considerable de la distrofina sin tener un efecto importante en la viabilidad (Figura 13a). También se analizó el efecto de

la doxiciclina sobre la viabilidad celular, observándose que a las 24 h de inducción con doxiciclina el porcentaje de viabilidad celular no disminuyó (Figura 13b).

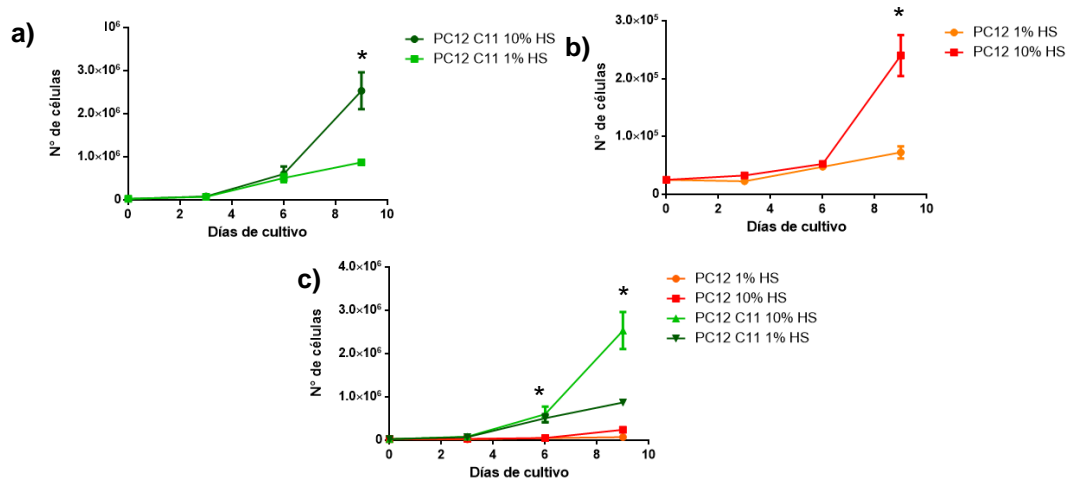


**Figura 13. Curvas de viabilidad y expresión de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células B10.** a) Curva de expresión relativa de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79, utilizando diferentes concentraciones de doxiciclina; 0, 50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml a las 24h de cultivo. El WB se realizó usando el anticuerpo anti-cMyc. b) Viabilidad celular de la clona B10 en presencia del tratamiento con doxiciclina durante 24h de cultivo. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## 6.2. Curvas de proliferación

Se analizó el efecto de la sobreexpresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79 en la proliferación de las clonas C11 y B10, utilizando dos condiciones; 1 y 10% de suero de caballo y 25,000 células para iniciar el cultivo. La concentración de 1% de suero corresponde a la condición usada en trabajos previos en un intento de sincronizar el crecimiento celular de la clona C11 en ensayos de diferenciación. En los experimentos anteriores realizados con la clona C11 se observó la proliferación aumentada en estas células utilizando las condiciones normales de cultivo (10% de suero de caballo) y resultaba difícil conservar a las células más allá del sexto día de cultivo sin realizar un pasaje, por lo que para realizar ensayos de diferenciación se intentó bajar las condiciones nutricionales de las células para prolongar los días de cultivo. Los resultados obtenidos muestran que al utilizar 1% de suero de caballo, la proliferación de la clona llegó casi al millón de células al día 9; sin embargo, en presencia de 10% de suero de caballo se observó que el crecimiento alcanza cerca de 3 millones a 9 días (Figura 14a). Como control de la clona C11 se usaron las células PC12 sin transfectar crecidas en las mismas condiciones que C11 (1 y 10% de suero de caballo). Al utilizar 1% de suero de

caballo el cultivo generó aproximadamente 100,000 células mientras que con 10% alcanzó casi 250,000 células en 9 días (Figura 14b). Se observa que la clona C11 presenta una tasa de proliferación significativamente más alta que el control PC12 a los 6 y 9 días de cultivo (Figura 14c).

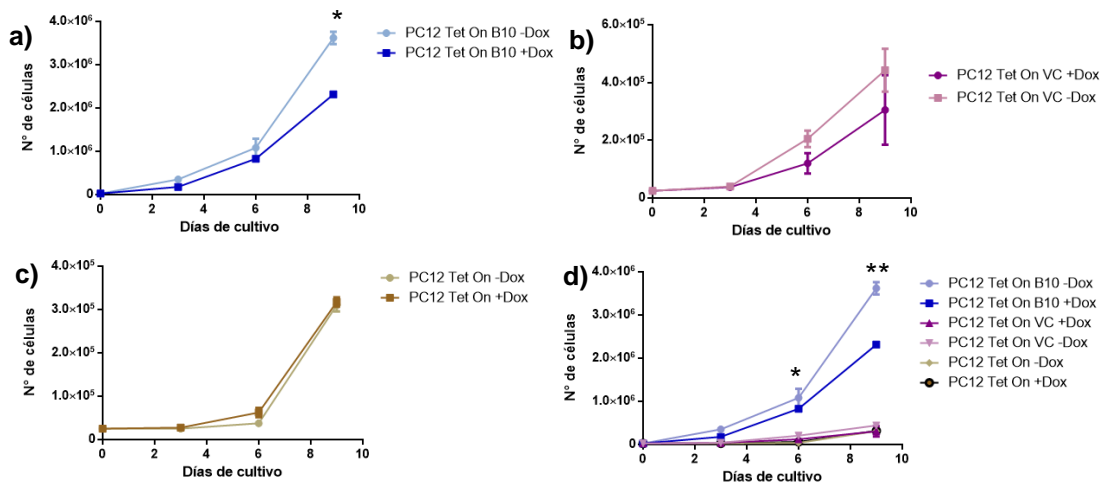


**Figura 14. Curvas de proliferación de las clonas C11 y PC12.** a) Curva de proliferación de la clona C11 b) Curva de proliferación de la clona PC12 c) Curva comparativa de proliferación de la clona C11 y su control PC12. Experimentos realizados con 1 y 10% de suero de caballo (HS) a los 3, 6 y 9 días de cultivo; células iniciales=25,000. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para analizar la proliferación de la clona B10 se usó 10% de suero de caballo y dos tratamientos uno con 1000 ng/ml y el segundo con 500 ng/ml de doxiciclina. En el primer experimento se analizó el comportamiento de la clona B10 y su control la clona VC que corresponde a células PC12 Tet-On transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc sin el inserto de la distrofina mutante. En este caso se utilizaron 1000ng/ml de doxiciclina, con el objetivo de determinar si la doxiciclina presenta algún afecto citotóxico en estas condiciones. Se observó que la clona B10 crece hasta 2 y 3.5 millones de células aproximadamente al día 9, además la clona sin tratamiento presenta mayor propagación que la clona con doxiciclina; a pesar de que presentan un comportamiento similar hasta el día 6 (Figura 15a).

En cuanto a la clona VC se observó que al día 9 alcanza una proliferación entre 300,000 y 400,000 células, y del mismo modo que la clona B10, se encontró que en ausencia de doxiciclina el cultivo presentó una mayor proliferación al día 6 (Figura 15b).

Además, se analizó el crecimiento de la clona Tet-On sin transfectar y se observó que al día 9 proliferó hasta 300,000 células aproximadamente sin presentar diferencias significativas con y sin el tratamiento de doxiciclina (Figura 15c). Comparando las clonas se observó que la clona B10 tuvo una tasa de crecimiento con y sin 1000 g/ml de doxiciclina más alta que su clona control y las células Tet-On, con diferencias significativas desde el día 6 y hasta el día 9 (Figura 15d).



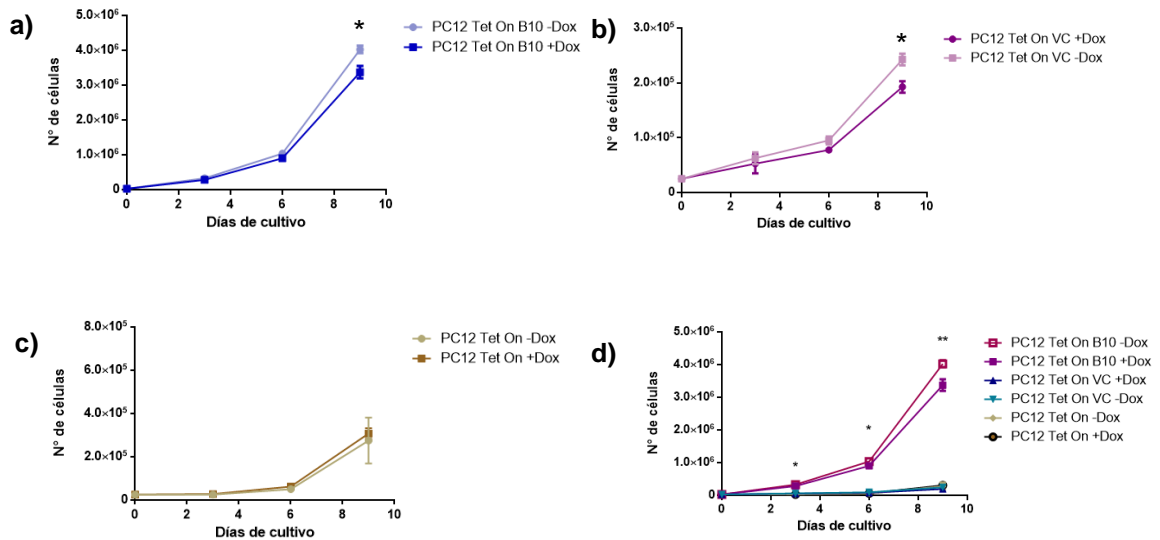
**Figura 15. Curvas de proliferación de las clonas B10, VC y Tet-On.** a) Curva de proliferación de la clona B10. b) Curva de proliferación de la clona VC. c) Curva de proliferación de la clona Tet-On. d) Curva de proliferación comparativa de las clonas PC12 Tet-On. Los experimentos se realizaron con y sin doxiciclina 1000 ng/ml a los 3, 6 y 9 días de cultivo con 10% de suero de caballo; células iniciales=25,000. Los experimentos se realizaron por triplicado.

También se realizaron curvas de proliferación para la clona B10 utilizando 500 ng/ml de doxiciclina y se observó que al día 9 presenta un crecimiento entre 3.5 y 4 millones de células, siendo mayor la proliferación de las células sin doxiciclina (Figura 16a).

En cuanto a la clona VC se observó que al día 9 presentó un crecimiento alrededor de 2 millones de células, siendo mayor la propagación de las células en ausencia de doxiciclina como se observa en la (Figura 16b).

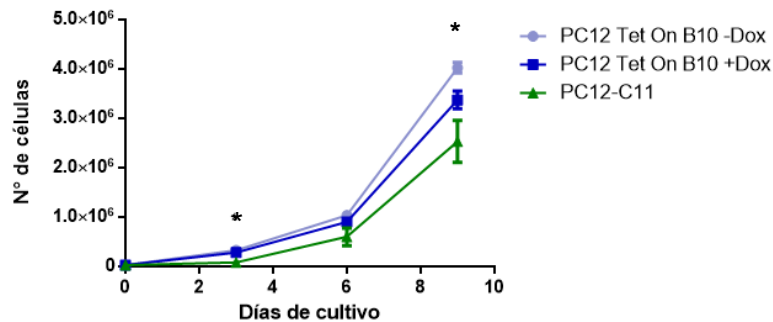
Se analizó también el comportamiento de las células Tet-On y se observó, que al día 9 alcanzan una densidad de 3 millones de células aproximadamente, sin haber diferencia significativa entre las células con y sin 500ng/ml de doxiciclina, en ninguno de los días de cultivo (Figura 16c).

Se observó que la clona B10 con y sin 500ng/ml de doxiciclina presenta mayor crecimiento que la clona VC y las células Tet-On a los 3, 6 y 9 días de cultivo (Figura 16d).



**Figura 16. Curvas de proliferación de las clonas B10, VC y Tet-On.** a) Curva de proliferación de la clona B10 b) Curva de proliferación de la clona VC c) Curva de proliferación de la clona Tet-On d) Curva de proliferación comparativa de las clonas Tet-On. Los experimentos se realizaron sin y con 500ng/ml de doxiciclina a los 3, 6 y 9 días de cultivo con 10% de suero de caballo. Células iniciales=25,000. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Posteriormente se comparó la proliferación con 10% de suero de caballo de las clonas C11 y B10 con y sin 500 ng/ml de doxiciclina y se observó que ambas clonas presentan una alta tasa de crecimiento, sin embargo, la mayor proliferación se observó en la clona B10, sin doxiciclina (Figura 17).



**Figura 17. Curva de proliferación comparativa entre las clonas B10 y C11.** Curva de proliferación comparativa de la clona B10 sin y con 500 ng/ml de doxiciclina y la clona C11 a los 3, 6 y 9 días de cultivo con 10% de suero de caballo; células iniciales=25,000. Los experimentos se realizaron por triplicado.

A partir de lo observado en las gráficas se obtuvo la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación de cada clona que se resumen en la tabla 4.

Clona	Tratamiento	Intervalo de tasa de crecimiento	Tiempo de duplicación promedio (h)	Tiempo de duplicación con intervalo de confianza del 95%
<b>C11</b>	10% HS	0.3657-0.5871	48.672	24.768-52.560
	1% HS	0.1585-0.3957	60.024	42.048-104.976
<b>PC12</b>	10% HS	0.2602-0.6047	50.472	27.504-63.936
	1% HS	0.0950-0.2033	111.552	81.840-175.080
<b>B10 1000ng/ml</b>	+Dox	0.3271-0.4170	44.712	39.888-50.856
	-Dox	0.3502-0.4563	41.256	36.456-47.496
<b>VC 1000ng/ml</b>	+Dox	0.1153-0.5214	52.248	31.896-144.264
	-Dox	0.2038-0.4093	54.264	40.632-81.624
<b>Tet-On 1000ng/ml</b>	+Dox	0.4020-0.7477	54.416	29.448-60.376
	-Dox	0.4357-0.7687	58.104	22.248-68.184
<b>B10 500ng/ml</b>	+Dox	0.4331-0.4787	38.160	34.392-42.888
	-Dox	0.4389-0.4683	37.224	34.512-40.392
<b>VC 500ng/ml</b>	+Dox	0.1881-0.3080	57.080	54.024-88.464
	-Dox	0.2117-0.3149	53.168	52.824-78.576
<b>Tet-On 500ng/ml</b>	+Dox	0.3561-0.4230	55.457	27.548-61.376
	-Dox	0.3472-0.3563	51.074	32.258-58.178

Tabla 4. Tasa de crecimiento y tiempos de duplicación de las clonas estudiadas.

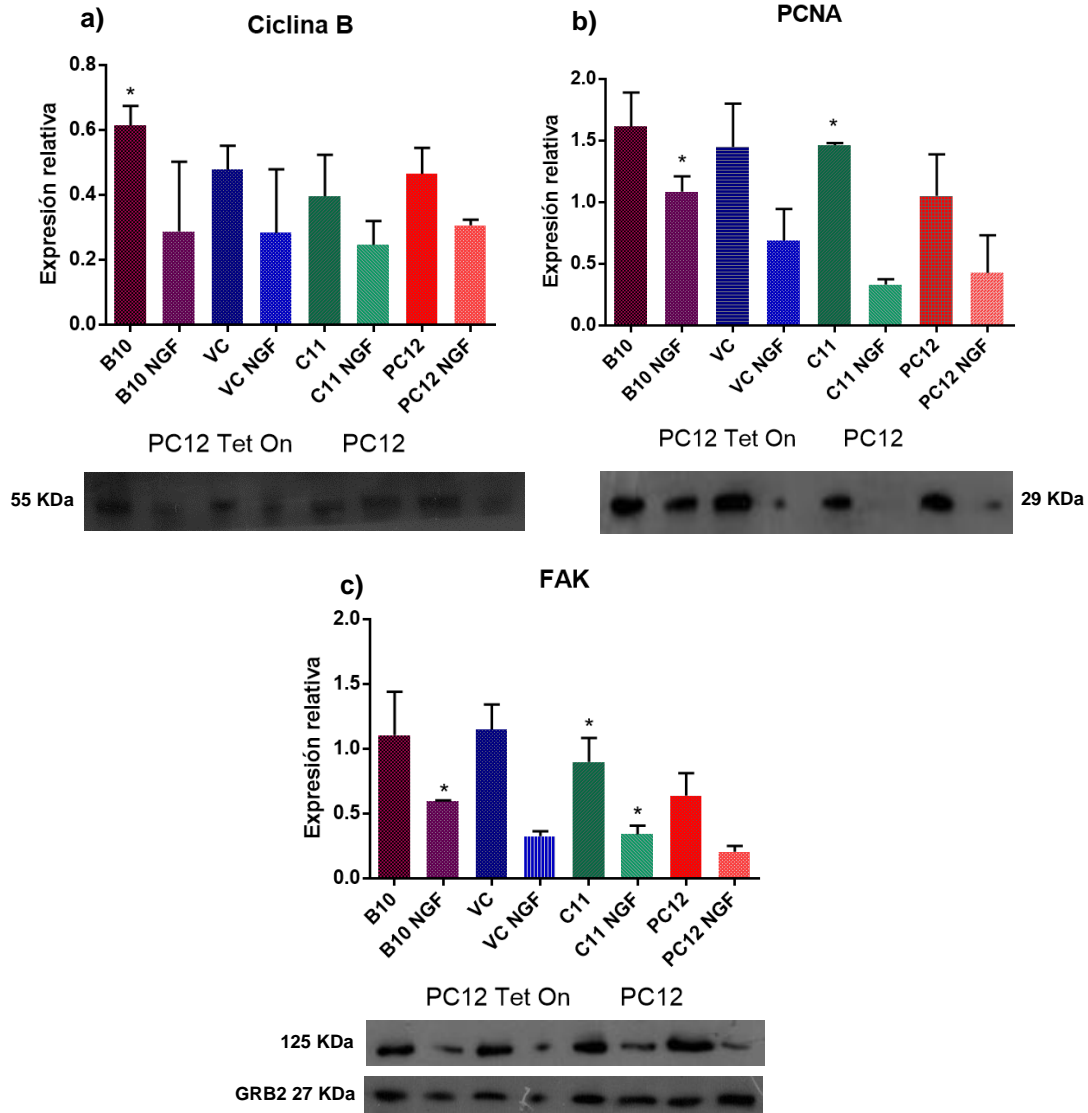


### **6.3. Expresión de marcadores de proliferación**

Se analizó la expresión de diferentes marcadores de proliferación celular en las células B10, VC, C11 y PC12. Se determinó en estas células la expresión de Ciclina B, el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y la cinasa de adhesión focal (FAK), se observaron diferencias significativas en la expresión de la Ciclina B en células B10, comparadas con el control VC, ambos sin diferenciar (Figura 18a). No se observa diferencia entre las células diferenciadas ni en las células C11 y PC12. Además, se observa que la Ciclina B se encuentra en niveles mayores en todas las clonas sin diferenciar, aunque la diferencia no es significativa.

Al analizar la expresión del marcador PCNA se observa que en todas las clonas se expresa en mayor cantidad en células no diferenciadas en comparación con las diferenciadas (Figura 18b), no observándose diferencia significativa entre las diferentes clonas en la misma condición de NGF.

En relación a la expresión de la FAK se observa que en cada clona hay diferencia significativa entre la condición sin diferenciar y la diferenciada (Figura 18c). Adicionalmente, hay diferencias significativas en su expresión en las células B10 diferenciadas, y las células C11 diferenciadas y sin diferenciar. Comparativamente, entre las células B10 sin diferenciar y las células C11 sin diferenciar se observó que la expresión de la Ciclina B, PCNA y FAK presentan diferencias significativas, siendo mayor la expresión en la clona B10 que en la clona C11. En las células diferenciadas solo los marcadores PCNA y FAK presentan una diferencia significativa entre ambas clonas, siendo mayor la expresión en las células B10.

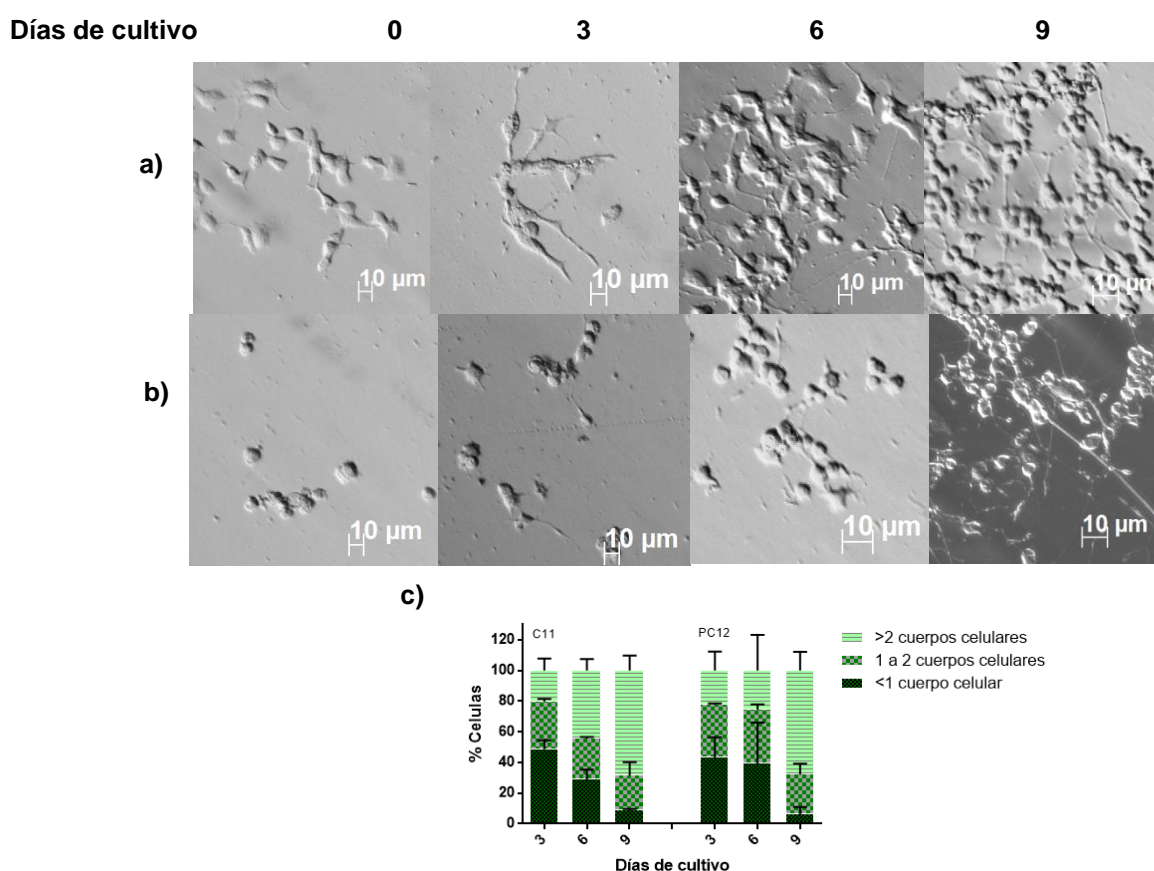


**Figura 18. Expresión de marcadores de proliferación en las clonas B10, VC, C11 y PC12.** a) Expresión de Ciclina B (55 kDa) determinada por western Blot y representada gráficamente b) Expresión del Antígeno nuclear de células en proliferación PCNA (29 KDa) determinada por Western Blot y representada gráficamente c) Expresión de la cinasa de adhesión focal FAK (125 KDa) determinada por Western Blot y representada gráficamente. Se usó la proteína GRB2 como control de carga. Se obtuvo la expresión relativa por análisis densitométrico. Los experimentos se realizaron por duplicado.

#### 6.4. Análisis morfológicos en presencia de NGF

A continuación, se realizaron análisis morfológicos y curvas de diferenciación de las clonas B10, VC, C11 y PC12 en presencia de NGF. Al observar la morfología de las células C11 tratadas con NGF durante 3, 6 y 9 días de cultivo en presencia de NGF, se observó que presentan mayor cantidad de neuritas y de mayor longitud (mayores a 2 cuerpos celulares) en comparación con las

células PC12. Desde el día 3 de tratamiento con NGF se observa mayor cantidad de neuritas por célula en la clona C11 y la longitud de las mismas aumenta a lo largo del tiempo de cultivo observando desde el día 6 que el 50% de la población ya presenta neuritas mayores a dos cuerpos celulares y al día 9 el 70% de la población presenta neuritas muy largas (Figura 19 a y c), comparadas con el control PC12 (Figura 19 b y c). Estas últimas células también desarrollan neuritas desde el día 3 de cultivo con NGF y éstas aumentan su longitud durante el cultivo; sin embargo, es hasta el día 9 donde la mayoría de la población alcanza longitudes mayores a 2 cuerpos celulares.

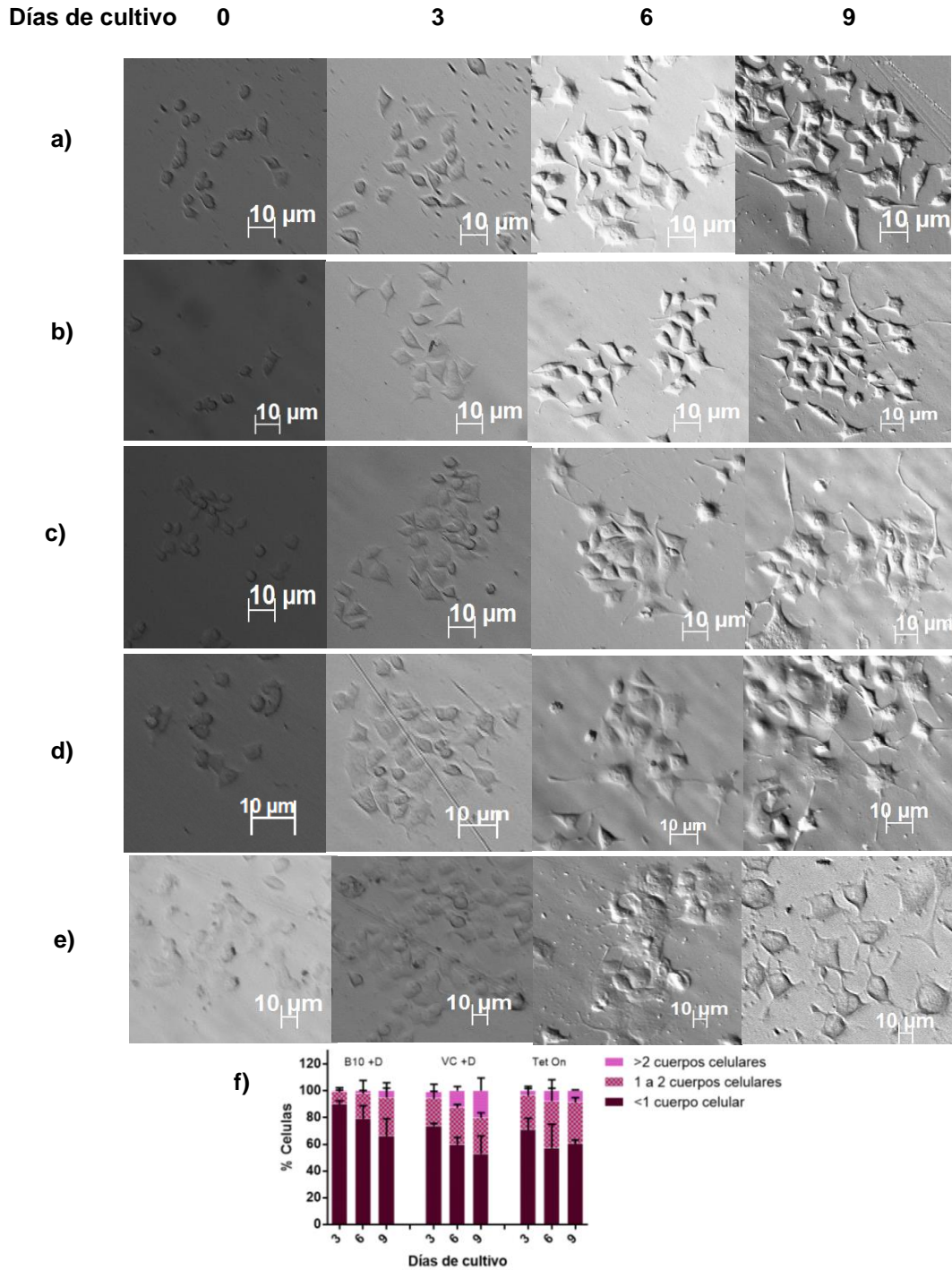


**Figura19. Morfología de las clonas C11 y PC12 diferenciadas en presencia de NGF.** Las clonas C11 y PC12 fueron tratadas con NGF durante 3, 6 y 9 días. a) Microfotografía de la clona C11. b) Microfotografía de la clona PC12. c) Porcentaje de células que presentan neuritas con longitudes menores a un cuerpo celular, entre uno y dos cuerpos celulares y mayores a 2 cuerpos celulares, el porcentaje está calculado como se indica en materiales y métodos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Al realizar el análisis morfológico de las clonas B10, VC y Tet-On en presencia de NGF, se observó que la clona B10 siguió proliferando a lo largo del cultivo, mostrando células redondeadas y agrupadas incluso al día 9 de tratamiento, con pocas neuritas y de longitud corta (Figuras 20a y b); sin embargo, algunas células aisladas presentan proyecciones neuríticas largas. Como se puede observar en la gráfica 20f, al menos un 60% de células presentan neuritas de longitud menor a un cuerpo celular, durante todos los días de cultivo.

En cuanto a la clona VC también presenta una población grande de células redondeadas; sin embargo, a lo largo del tiempo del cultivo la proliferación celular se observó considerablemente menor que en las células B10, además las células del VC presentaron neuritas de pequeñas a medianas, que en su mayoría tienen longitudes menores a 1 cuerpo celular. Al comparar estos resultados con los obtenidos con las células B10 es claro que hay una mayor cantidad de células que presentan neuritas de entre 1 y 2 cuerpos celulares y mayores a dos cuerpos celulares en las células VC, con la diferencia más notoria en el día 9 (Figuras 20c y d).

Con respecto a la clona Tet-On se observó una morfología principalmente redondeada, con bajo crecimiento y con una población mayor de células que presentan neuritas con longitudes menores a un cuerpo celular, pero a diferencia de las células B10 y VC hay una mayor cantidad de células con neuritas de entre 1 y 2 cuerpos celulares desde el día 3 (Figura 20e).

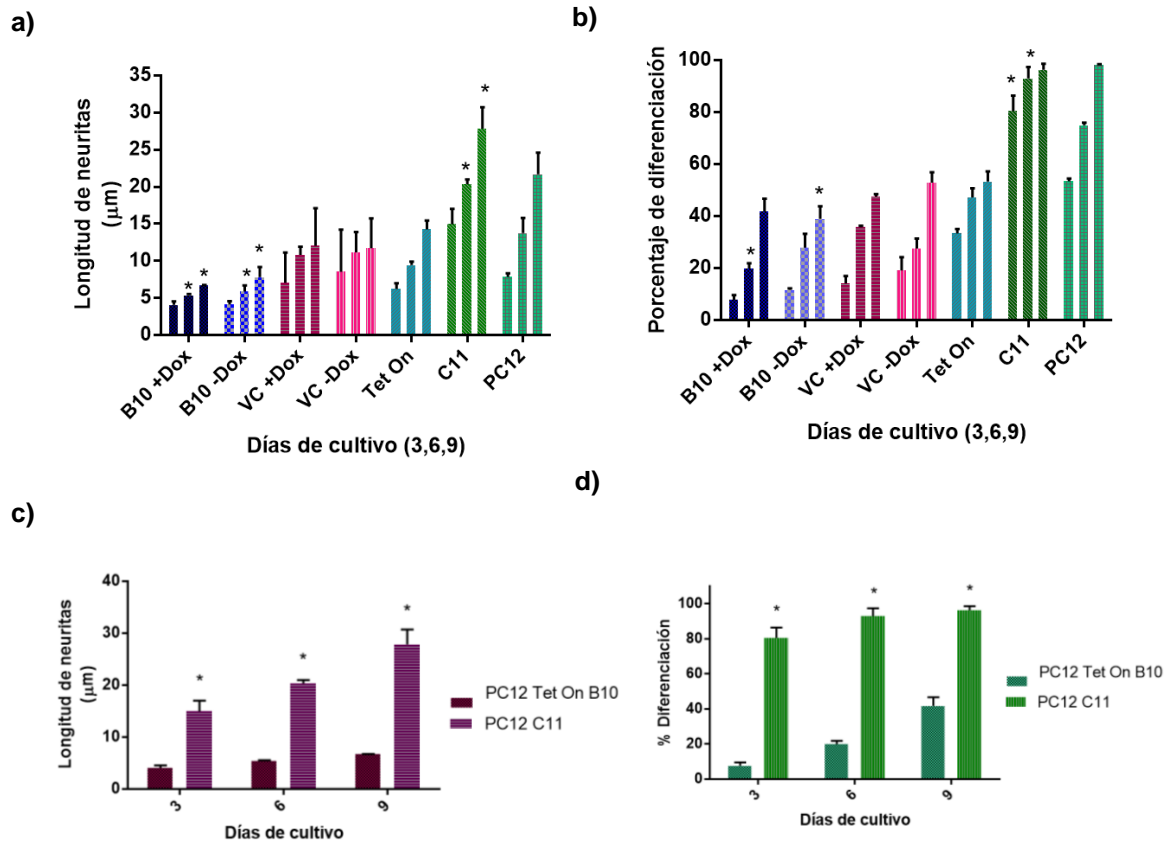


**Figura 20. Morfología de las clonas B10, VC y Tet-On en presencia de NGF.** Las clonas B10, VC y Tet-On fueron tratadas con NGF durante 3, 6 y 9 días de cultivo. a) Clona B10 con 500 ng/ml de doxiciclina. b) Clona B10 sin doxiciclina. c) Clona VC con 500 ng/ml de doxiciclina. d) Clona VC sin doxiciclina e) Clona Tet-On sin doxiciclina. f) Porcentaje de células que presentan neuritas con longitudes menores a un cuerpo celular, entre uno y dos cuerpos celulares y mayores a 2 cuerpos celulares. El porcentaje de células fue calculado como se indica en materiales y métodos. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Se analizó el promedio de la longitud de las neuritas y el porcentaje de diferenciación de las clonas y se observó en la gráfica 21b que la clona C11 presenta, desde el día 3 aproximadamente el 80% de células diferenciadas e incrementa este valor casi al 100% al día 9, con diferencias significativas en los días de cultivo 3 y 6 con relación a la clona PC12, en la que se observa que en el día 3 presenta cerca el 50% de células diferenciadas y sigue incrementando hasta casi el 100% en el día 9 de cultivo (Figura 21b). Los resultados mostraron que las células C11 fueron las que mejor se diferenciaron.

Las clonas PC12 Tet-On presentaron en general, neuritas de longitudes menores con respecto a las células PC12 y C11, siendo la clona B10 la que presentó neuritas de menor longitud, observándose al día 9 neuritas por debajo de 10  $\mu\text{m}$  de largo, con y sin doxiciclina. Las diferencias fueron significativas desde el día 6 de cultivo entre las clonas B10 y VC (Figura 21a). A su vez la clona VC y Tet-On presentaron neuritas de cerca de 15  $\mu\text{m}$  al día 9 de tratamiento con NGF. Al analizar el porcentaje de diferenciación se observó que la clona B10 presenta un 40% de diferenciación al día 9 de tratamiento con NGF, el nivel de diferenciación más bajo del total de las clonas, mientras que las clonas VC y Tet-On presentan cerca del 50% a este día (Figura 20b).

Se analizaron las clonas que expresan a la distrofina  $\text{Dp71}_{\Delta 78-79}$ , en presencia de NGF, B10 y C11, y se observó que la clona C11 presenta neuritas significativamente más largas durante todos los días de cultivo que la clona B10, así como un porcentaje mayor de diferenciación (Figuras 21c y d).



**Figura 21. Promedio de longitud de neuritas y porcentaje de diferenciación de las clonas PC12 Tet-On y PC12.** Longitud de neuritas y porcentajes de diferenciación de cultivos celulares a los 3, 6 y 9 días en presencia de NGF. a) Promedio de longitud de las neuritas de las clonas PC12 Tet-On y PC12. b) Porcentaje de diferenciación de las células PC12 Tet-On y PC12. c) Promedio de la longitud de las neuritas de las clonas B10 y C11. d) Porcentaje de diferenciación entre las clonas B10 y C11. Los experimentos se realizaron por triplicado.

## 6.5. Expresión de marcadores de diferenciación

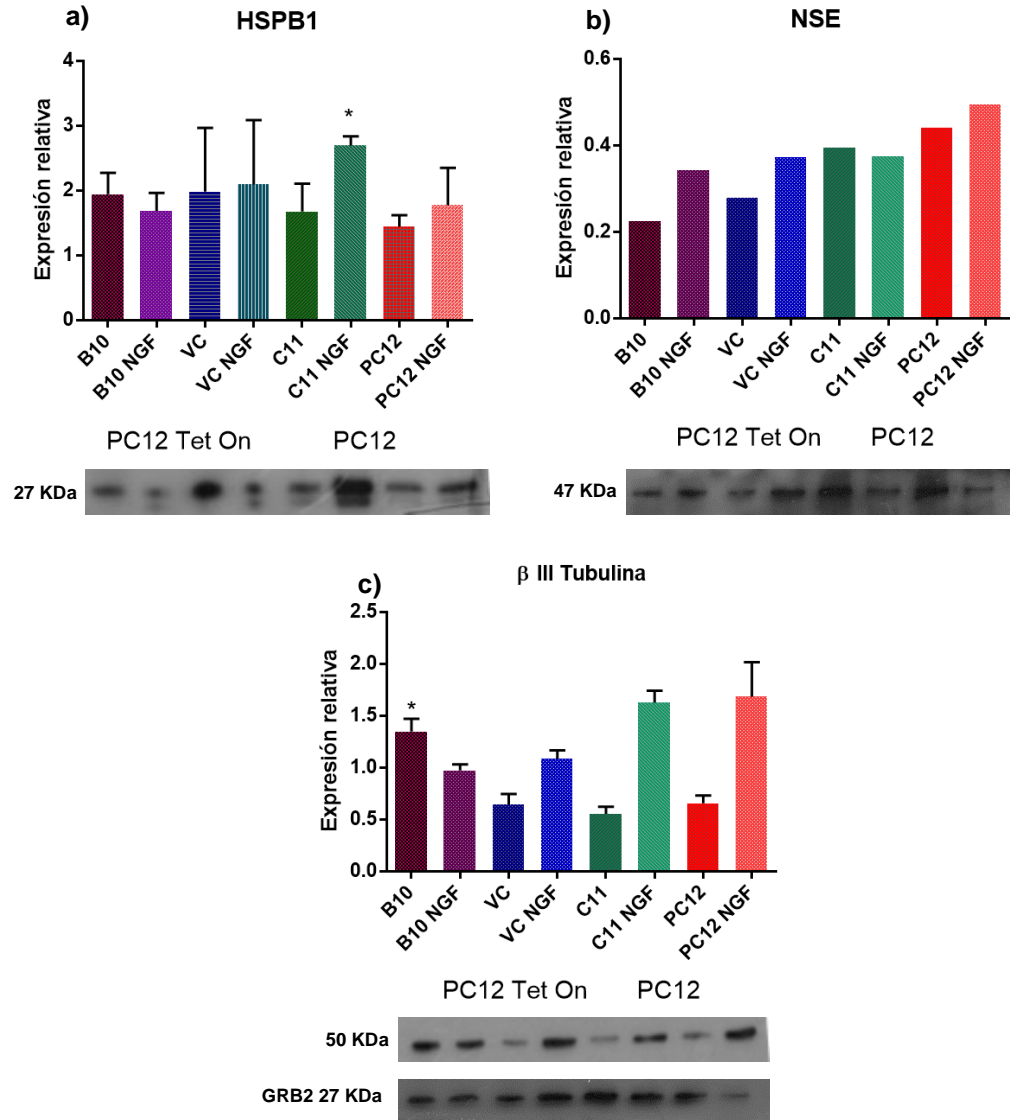
Como parte de la caracterización de las clonas en estudio B10, VC, C11 y PC12, se analizó la expresión de marcadores moleculares de diferenciación, como es el caso de HspB1,  $\beta$ III-tubulina y enolasa específica neuronal (NSE). La proteína de choque térmico perteneciente a la familia B (HspB1) se analizó debido a que en trabajos anteriores realizados por Merino y colaboradores (2016), se observó que en la clona C11 hay una expresión incrementada en las células no diferenciadas con NGF en comparación con las células sin diferenciar. En este estudio se confirmó que la clona C11 presenta una expresión mayor de HspB1 en células diferenciadas con NGF, con respecto a la misma clona en ausencia de NGF, al control PC12, y a la clona B10. Además, se observa que en

las células B10, el nivel de expresión es muy similar entre células sin diferenciar y diferenciadas, el VC presentó una desviación muy grande en los dos experimentos realizados (Figura 22a).

En el caso de la expresión de la proteína  $\beta$  III Tubulina, se observa en primer lugar que las clonas analizadas presentan mayor expresión en presencia de NGF, excepto la clona B10, en donde los niveles de  $\beta$  III Tubulina son menores en células diferenciadas en relación a las células sin tratar con NGF; además, se observó una diferencia significativa entre las células C11 y B10, siendo mayor la expresión en la clona C11 (Figura 22c).

Con respecto a la expresión de la enolasa específica neuronal se cuenta con resultados preliminares ya que el experimento se realizó una vez; sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la expresión es mayor en las células PC12 que en las células PC12 Tet-On. También se observa que en las células PC12 Tet-On diferenciadas con NGF hay mayor expresión de este marcador con respecto a las células no diferenciadas, esto también ocurre en las células PC12 y no en las C11 (Figura 22b).

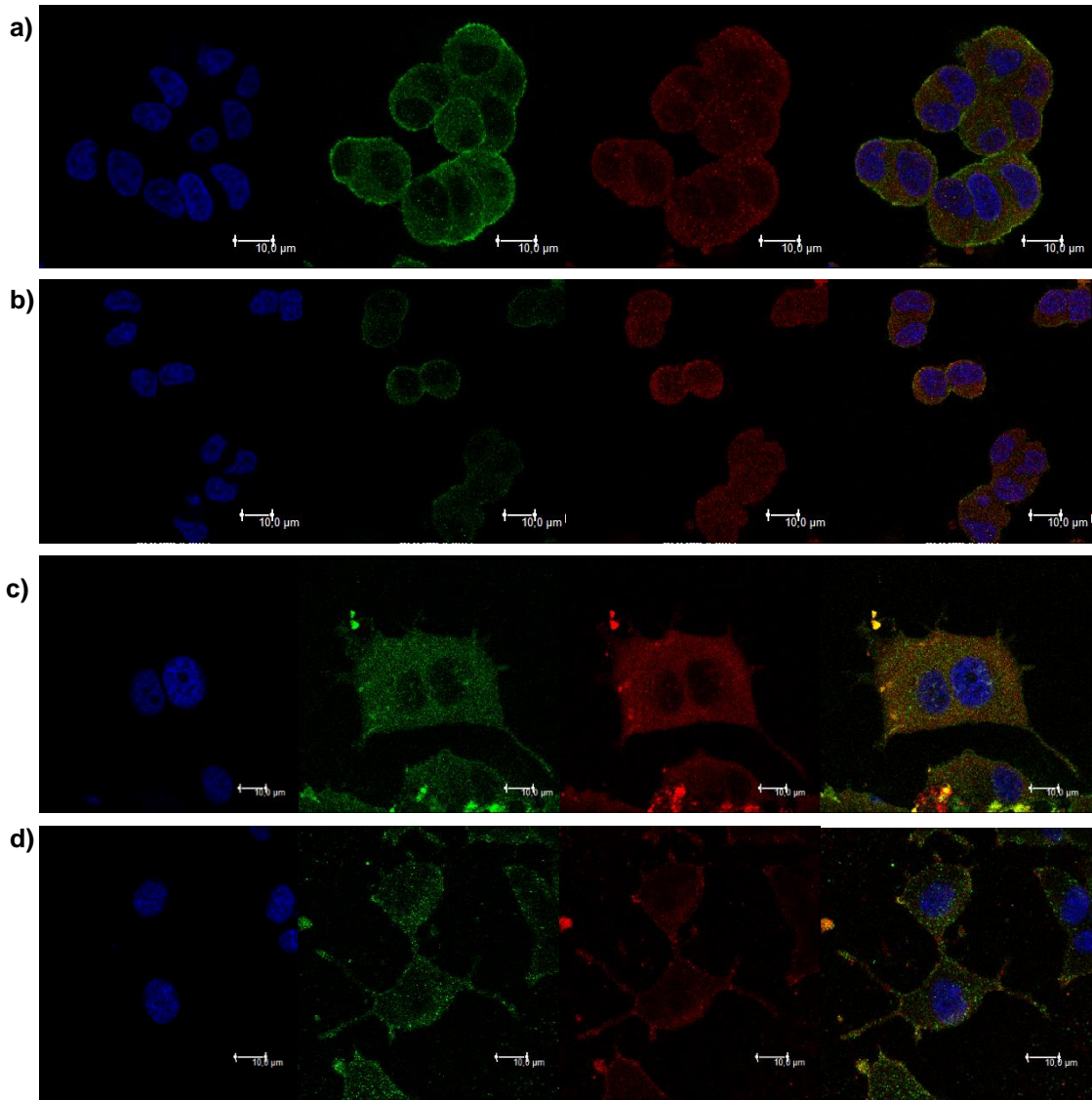




**Figura 22. Expresión de marcadores de diferenciación en las clonas B10, VC, C11 y PC12.** a) Expresión de la proteína HspB1 (27 KDa) determinada por Western Blot, se representa gráficamente el resultado. b) Expresión de la proteína Enolasa Específica Neural NSE (47 KDa) determinada por Western Blot, se representa gráficamente el resultado c) Expresión de la proteína  $\beta$  III Tubulina (50 KDa) determinada por Western Blot y representada gráficamente; experimento realizado por duplicado. Se usó la proteína GRB2 como control de carga, los experimentos con HspB1 y  $\beta$  III Tubulina. se realizaron por duplicado y el experimento Con NSE se realizó una vez. La expresión relativa se determinó como se indica en materiales y métodos.

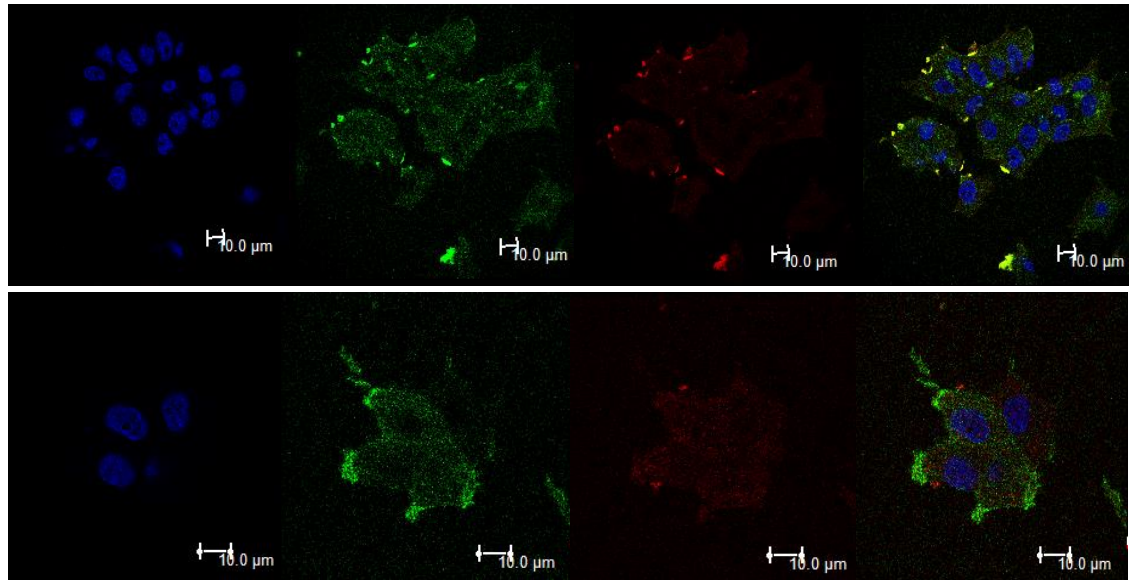
## 6.5. Inmunofluorescencias

Como siguiente paso se determinó la localización de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en las clonas C11 y B10 mediante ensayos de inmunofluorescencia y microscopía confocal. En las clonas B10, tanto tratadas como sin tratar con doxiciclina y en ausencia de NGF (Figura 23a y b), la distrofina se observa en la periferia celular y en el citoplasma, en las células tratadas con doxiciclina se observa la marca con mayor intensidad. En células diferenciadas (Figura 23c y d) se observa que la marca de la distrofina se localiza también en citoplasma y periferia así como en neuritas pero no en el núcleo, y de la misma forma que en las células no diferenciadas se observa mayor intensidad de marca cMyc en las células tratadas con doxiciclina. Se analizó también la distribución de la proteína  $\beta$ -Distroglicano debido a que forma parte del complejo de proteínas que se asocian a distrofina. Se observa que la distribución del  $\beta$ -Distroglicano en las células diferenciadas y no diferenciadas es homogénea dentro de las células a excepción del núcleo y colocaliza con la marca de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79.



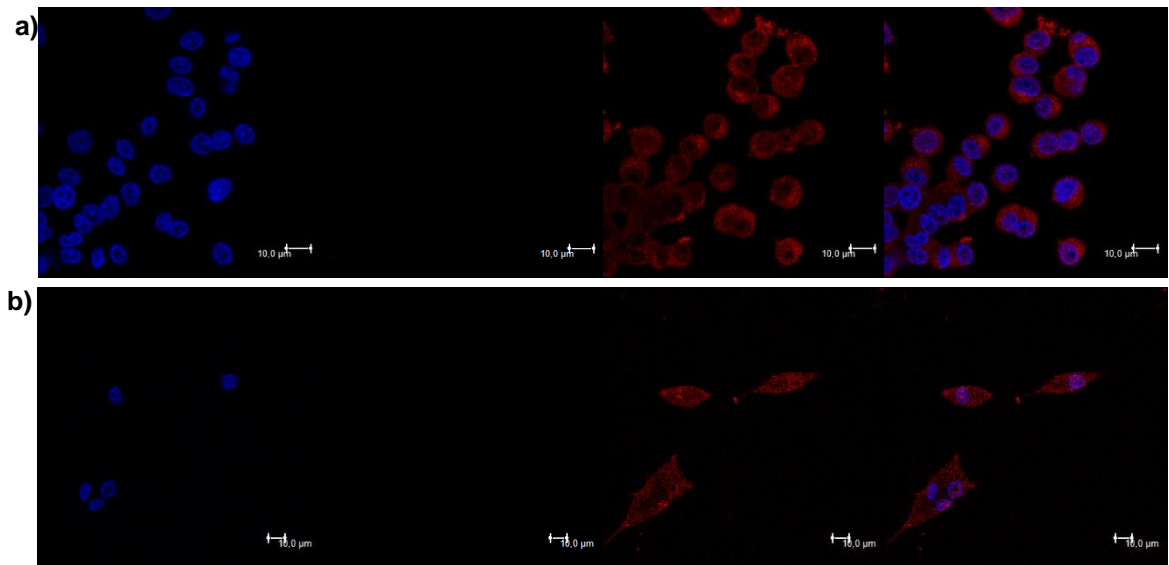
**Figura 23. Distribución de la proteína c-Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células B10.** Inmunofluorescencias de la clona B10 sin diferenciar a las 24h de cultivo y diferenciadas con NFG a 9 días de cultivo; con y sin tratamiento con doxiciclina, observadas al microscopio confocal. a) Inmunofluorescencia de las células B10, sin NGF y con tratamiento con doxiciclina b) Inmunofluorescencias de las células B10 sin NGF y sin doxiciclina c) Inmunofluorescencia de las células B10 diferenciadas con NGF y tratadas con doxiciclina d) Inmunofluorescencia de las células B10 diferenciadas con NGF sin doxiciclina. Azul: DAPI-Núcleo; Verde: cMyc-Dp71 $\Delta$ 78-79; Rojo: LG5- $\beta$ -Distroglicano; Merge. Escala 10  $\mu$ m. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Es relevante mencionar que en una población pequeña de células B10 diferenciadas en presencia de NGF se observó una acumulación de la marca en la superficie de contacto entre las células y el cubreobjetos, en forma de cúmulos o agregados (Figura 24).



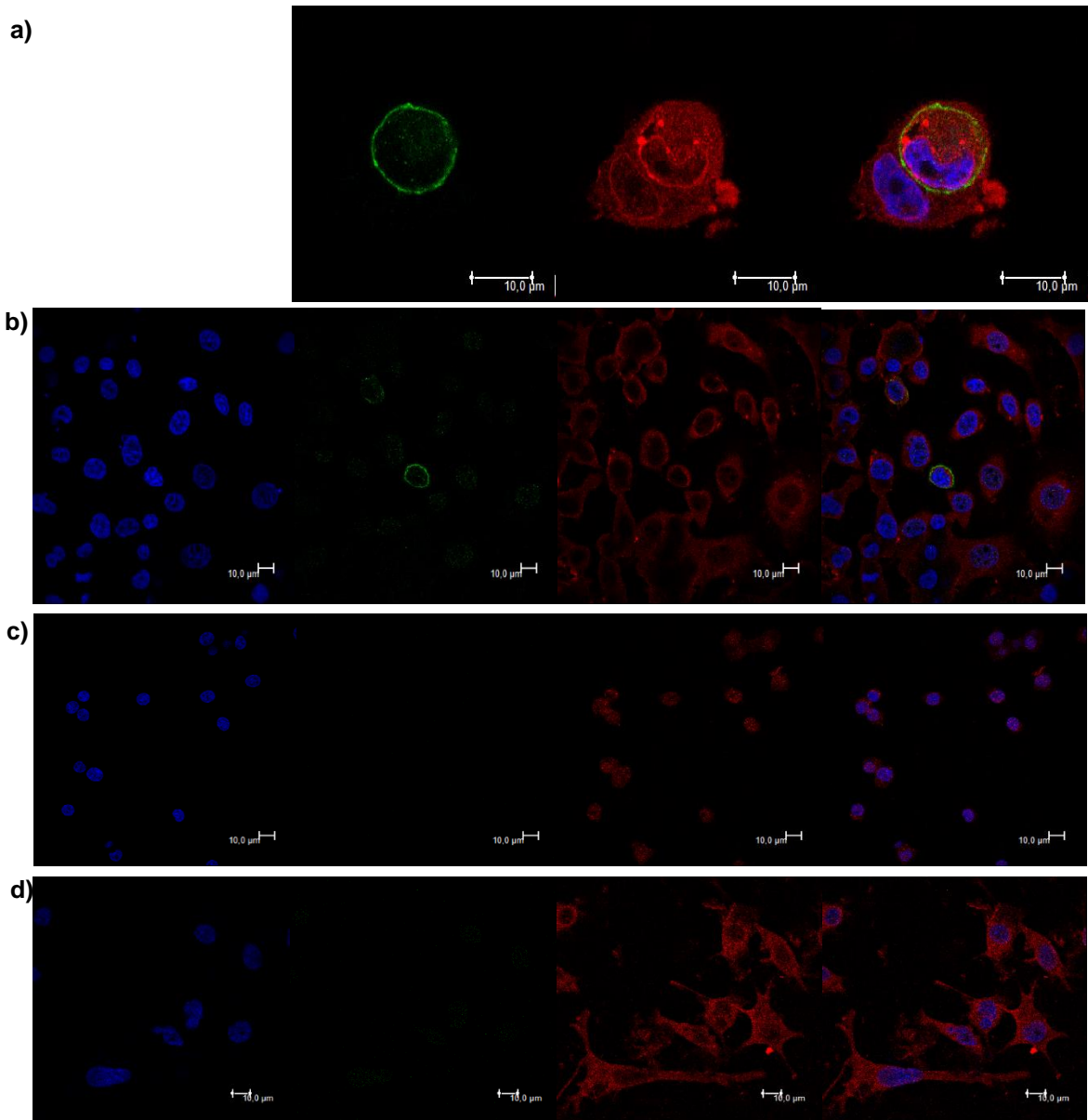
**Figura 24. Distribución de la proteína cMyc-Dp71 $\Delta$ 78-79 en el área de contacto de las células B10 diferenciadas con NGF y el sustrato.** Inmunofluorescencias de la clona B10 a 9 días de cultivo en presencia de NGF y doxiciclina. Se observa la acumulación de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en forma de agregados. Las imágenes fueron observadas por microscopía confocal. Azul: DAPI-Núcleo; Verde: cMyc-Dp71 $\Delta$ 78-79; Rojo: LG5- $\beta$ -Distroglucano; Merge. Escala 10  $\mu$ m. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Como control se realizó el mismo experimento en las células VC, en donde se observó que el anticuerpo no detecta el epítotope de cMyc. La distribución de la proteína  $\beta$  Distroglucano es la misma que la observada en la clona B10, homogénea en todas las células, tanto en presencia como en ausencia de NGF (Figura 25).



**Figura 25. Distribución de la proteína  $\beta$ -Distroglicano en las células VC sin diferenciar y diferenciadas con NGF.** Inmunofluorescencias de la clona VC sin diferenciar a las 24h de cultivo y diferenciadas con NFG a 9 días de cultivo; con tratamiento con doxiciclina y anticuerpos contra cMyc-Dp71 junto con  $\beta$ -Distroglicano. a) Inmunofluorescencia de las células VC no diferenciadas y en presencia de doxiciclina b) Inmunofluorescencia de las células VC diferenciadas con NGF y en presencia de doxiciclina. Tinción con DAPI (azul); c-Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 (verde); LG5- $\beta$ -Distroglicano (rojo); Merge. Escala 10  $\mu$ m. Experimentos realizados por triplicado.

A continuación, se analizó la distribución de la proteína Xpress-Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células C11 y su control PC12. Se observó que en las células sin diferenciar y diferenciadas la marca de la etiqueta Xpress-Dp71 $\Delta$ 78-79 se encuentra principalmente en la periferia celular y con baja intensidad en el citoplasma (Figuras 26a y b). Además, se observó que el  $\beta$ -Distroglicano en la mayoría de las células se encuentra distribuido en el citoplasma y en la periferia del núcleo. Se verificó que las células PC12 no presentaran la marca de la etiqueta Xpress (Figuras 26c y d). Se observó también que el  $\beta$ -Distroglicano presenta una distribución homogénea en la célula, sin observar acumulación en la periferia del núcleo.



**Figura 26. Distribución de la proteína Xpress-Dp71 $\Delta$ 78-79 en las células C11 y PC12 sin diferenciar y diferenciadas con NGF.** Inmunofluorescencias de las clonas C11 y su control PC12 sin diferenciar a las 24h de cultivo y diferenciadas con NFG a 9 días de cultivo con anticuerpos contra la etiqueta Xpress junto con  $\beta$ -Distroglicano. a) Inmunofluorescencias de las células C11 no diferenciadas a las 24h de cultivo b) Inmunofluorescencias de las células C11 diferenciadas a 9 días con NGF c) Inmunofluorescencias de las células PC12 no diferenciadas d) Inmunofluorescencias de las células PC12 diferenciadas con NGF a 9 días de cultivo. Tinción con DAPI (azul); c-Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 (verde); LG5- $\beta$ -Distroglicano (rojo); Merge. Escala 10  $\mu$ m. Experimentos realizados por triplicado.

## 7. DISCUSIÓN

Con el objeto de estudiar la función de los diferentes dominios de la distrofina Dp71, Aragón y colaboradores en 2011, construyeron una proteína mutante que contiene los exones 63 al 77 y carece de los exones 78 y 79. Esta proteína fue sobre-expresada en forma estable en una clona de las células PC12: PC12 C11 encontrando que la proteína mutante estimula la formación de neuritas en estas células. Posteriormente, para ampliar el conocimiento sobre la función de esta distrofina mutante, se transfectó el plásmido que codifica para la proteína mutante en un sistema inducible en células PC12, el sistema Tet-On, y se observó que la inducción de la Dp71 $\Delta$ 78-79 acelera la proliferación celular (Herrera-Salazar et al., 2016). Debido a que en un sistema la proteína mutante Dp71 $\Delta$ 78-79 promovió la diferenciación y en el otro la proliferación, en este estudio se realizó un análisis comparativo entre las clonas C11 y B10, la primera con la expresión constitutiva de la distrofina y la segunda con una expresión inducible (Aragon et al., 2011; Herrera-Salazar et al., 2016).

El primer paso en el proyecto consistió en verificar que en ambas clonas estuviera presente la secuencia del DNA de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79, amplificando por PCR el DNA genómico, como se muestra en la figura 10a, se obtuvieron las bandas con el peso esperado de acuerdo a lo reportado por Aragón et al., 2011 y Herrera-Salazar et al., 2016. Posteriormente se comprobó la expresión del mRNA que codifica para esta distrofina mutante en ambas clonas como se muestra en la figura 10b; además, se demostró que la expresión en el sistema Tet-On era inducible observándose un incremento de  $291 \pm 41$  veces en el nivel de mRNA en comparación con células si tratamiento con doxiciclina, lo que corrobora la eficacia del sistema inducible Tet-On (Figura 10b). Este paso fue necesario debido a que, en los trabajos de Aragón et al., 2011 y Herrera-Salazar et al., 2016 se estudiaron las clonas C11 y B10 respectivamente, sin embargo, para este estudio se planteó realizar el análisis comparativo de ambas clonas y fue indispensable comprobar que las células aún expresaban a la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 y mantenían las características descritas anteriormente. A continuación, se determinó la secuencia del DNA de ambas clonas confirmando

la presencia de los exones 63-77 y la ausencia de los exones 78 y 79 (Figura 11). Se compararon las secuencias de las dos clonas con la distrofina Dp71a reportada en GenBank (NM\_012698.3), y no se encontraron cambios en la secuencia, deleciones o adiciones. Estos resultados confirmaron que se trabajó con las clonas C11 y B10 con las características reportadas previamente (Aragon et al., 2011; Herrera-Salazar et al., 2016). También se confirmó la expresión de la proteína Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 (70 kDa) en ambas clonas, por ensayos de Western Blot (Figura 12). Cabe señalar que de acuerdo a lo reportado, el sistema Tet-On en presencia de doxiciclina, permite la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes hasta 10,000 veces más que la condición sin inducir (Clontech, 2012). En el trabajo reportado sobre la caracterización de las células B10 (Herrera-Salazar et al., 2016) se describe que las células tratadas con doxiciclina incrementaron la expresión de la proteína recombinante Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 de 217 veces con respecto a la expresión sin el tratamiento con doxiciclina a 24 h de tratamiento (Herrera-Salazar et al., 2016). En este trabajo se encontró una expresión  $130 \pm 45$  veces mayor en células tratadas con el inductor que en células sin doxiciclina a las 24 h (Figura 12), considerando las variaciones experimentales, podemos considerar a los dos resultados semejantes.

Al confirmar la presencia del DNA genómico, mRNA y proteína de Dp71 $\Delta$ 78-79, se definió la concentración ideal de inductor que requirieron las células B10, de acuerdo al sistema Tet-On las células requieren entre 0.01–1  $\mu$ g/ml de doxiciclina para inducir la expresión de la proteína clonada en el vector, en este caso la Dp71 $\Delta$ 78-79, dentro de este intervalo no deberían encontrarse niveles de citotoxicidad (Clontech, 2012). Se efectuó la cuenta viable a las 24 h y en efecto, no se encontró disminución en la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones usadas (50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml). Posteriormente se analizó el nivel de la proteína Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 por un WB y se observó que desde 50 ng/ml de doxiciclina se induce la expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79; sin embargo, la concentración de 500 ng/ml presenta una mayor inducción y no se detecta efecto citotóxico en las células.



Además, se realizaron ensayos para determinar el nivel de expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79, de las clonas C11 y B10 tratadas con NGF a los 9 días de cultivo, utilizando WB. Se observó que en la clona B10 hay una reducción significativa de la expresión relativa de la proteína Myc-Dp71 $\Delta$ 78-79 en células diferenciadas, hay  $226 \pm 67$  veces mayor expresión relativa en células no diferenciadas, mientras que para la clona C11 hay  $271 \pm 74$  veces mayor expresión relativa que en células no diferenciadas. Considerando que el promotor de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79 está dentro del vector se sugiere que hay una regulación en este promotor para que la expresión de la proteína disminuya. Sin embargo, se ha observado que las proteínas de Dp71 propias de las células están altamente reguladas. Por ejemplo, Imamura y colaboradores observaron que en astrocitos diferenciados 6 días con dibutilil-cAMP (dBcAMP), la cantidad de Dp71 incrementaba mientras que la expresión de utrofina disminuía. Esto les sugirió que la mayoría del complejo membranal distrofina/utrofina-distroglucano es reemplazado por el complejo Dp71-distroglucano durante el proceso de diferenciación (Imamura & Ozawa, 1998). Además, en otros estudios se observó que las isoformas de la distrofina Dp71 en células PC12 son reguladas al inducir la diferenciación con NGF, la isoforma Dp71f incrementa 9 veces su expresión en extractos totales, mientras que la Dp71d incrementa su distribución 7 veces en extractos nucleares. Además, se observó que la inhibición de Dp71 en células PC12 afecta el desarrollo de crecimiento neurítico al ser inducidas con NGF (Acosta et al., 2004). Aragón y colaboradores al trabajar con células C11 observó la expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79, que depende del promotor del plásmido, durante 6 días de diferenciación con NGF incrementa la expresión de la proteína del día 0 al 3, sin embargo, al día 6 se observa una disminución en la expresión de esta proteína. Por lo que en este estudio se puede observar que al día 9 la expresión de la proteína Dp71 $\Delta$ 78-79 en las clonas C11 y B10 disminuye.

Posteriormente se realizaron las curvas de crecimiento de las clonas en estudio y se observó que tanto la clona B10 como la clona C11 poseen una alta tasa de proliferación, comparadas con sus controles PC12 y VC. En un estudio comparativo entre las clonas C11 y B10 se observó que la clona B10 presenta la

mayor tasa de proliferación (Figura 17). En estudios anteriores Herrera-Salazar y colaboradores (2016), también observaron un incremento en la proliferación de la clona B10, mientras que Aragón y colaboradores (2011), observaron que la clona C11 presenta una alta tasa de diferenciación celular, sin embargo, esto no indica que no posean una alta tasa de proliferación en ausencia de NGF, lo cual sugiere que pese a las variantes propias de cada clona la presencia de los exones 63-77 de la distrofina Dp71 $\Delta$ <sub>78-79</sub> provocan en una alta tasa de proliferación.

En función de lo observado, se analizó la expresión de diferentes marcadores de proliferación celular como la Ciclina B, ya que es un regulador clave en la progresión del ciclo celular. Esta proteína es capaz de unirse a la subunidad catalítica Cdc2 para formar el factor promotor de maduración (MPF), que es un regulador central durante la transición G2-M del ciclo celular, la activación de este complejo permite la fosforilación de proteínas como histonas, condensinas, etc. (Doree & Hunt, 2002; Pines, 1995; Zhu, Chen, Zhang, & Storey, 2016). En este estudio se observó que solo las células B10 tratadas con doxiciclina, pero sin NGF presentaron diferencias significativas, como se espera de la expresión de este marcador, comparada con sus controles. Además, se observa que hay un incremento significativo en la expresión de este marcador en la clona B10 respecto a la clona C11 (Figura 18), esto concuerda con los resultados en donde se observa que en la clona B10 hay mayor proliferación, se espera que Ciclina B se encuentre en niveles elevados en células con división celular activa.

Posteriormente se analizó la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación PCNA, proteína auxiliar de la DNA polimerasa  $\Delta$  que está involucrado en el control de la replicación, al incrementar la procesividad de la misma y tiene un papel crucial en el mantenimiento de la integridad del genoma y la sobrevivencia celular durante condiciones oxidativas (Amoroso et al., 2011; Prelich et al., 1987; C. K. Tan, Castillo, So, & Downey, 1986). En este trabajo se observó que las células B10 tratadas con NGF y las células C11 sin NGF presentan diferencias significativas al compararse con las clonas control, hay un incremento significativo en la expresión de este, lo que concuerda con los resultados descritos anteriormente. En las células C11 se observa el aumento de

un marcador de proliferación celular en células en crecimiento y disminuye al inducirles a diferenciación con NGF. Por otro lado se observa que en la clona B10 tanto en células sin diferenciar como en células diferenciadas hay una expresión incrementada de este marcador, lo que concuerda con los estudios de Herrera-Salazar, en donde se describe que el proceso de diferenciación de esta clona está disminuido comparado con su clona control VC (Figura 18).

Se estudió también la expresión de la cinasa de adhesión focal FAK, proteína que tiene un papel importante en la migración celular, ensamble y desensamble del complejo de adhesión permite la migración celular que es un proceso altamente regulado por factores de crecimiento y vías de señalización de adhesión. FAK se encuentra expresada en niveles altos en el cerebro, en particular en regiones como la corteza e hipocampo; además, participa en el crecimiento neurítico por lo que tiene un papel crucial en el desarrollo neural. A su vez se encuentra involucrado en procesos de proliferación, migración, cambios morfológicos y sobrevivencia o apoptosis (Huang et al., 2010; Mitra, Hanson, & Schlaepfer, 2005). Por lo anterior en este trabajo fue importante analizar la expresión de este marcador en las clonas en estudio y se observó que en las células B10 diferenciadas y en las células C11 con y sin tratamiento con NGF hubo diferencias significativas con respecto a sus controles, aunque se observa disminuida la expresión en el tratamiento con NGF. Se observó una mayor expresión de este marcador en las células B10 que en las células C11 con y sin tratamiento con NGF. En resumen, los resultados discutidos previamente muestran que la proliferación está incrementada en las células B10 con y sin tratamiento con NGF (Figura 18).

Posteriormente se analizó el proceso de diferenciación en las clonas estudiadas y se observó que las células C11 y PC12 presentan mayor cantidad de neuritas de más de 2 cuerpos celulares, desde los primeros días de cultivo (Figura 17). Por otro lado, las clonas PC12 Tet-On tienen en general menor cantidad de neuritas y la longitud de estas es más corta, de tal forma que el porcentaje de diferenciación es más bajo que el de las clonas C11 y PC12 (Figura 18).

En el análisis comparativo entre las clonas B10 y C11 se observó que la clona C11 presenta neuritas más largas y un mayor porcentaje de diferenciación en todos los días analizados (Figura 21). Aragón y colaboradores reportaron en 2011 que la clona C11 presenta una alta tasa de diferenciación mientras que Herrera-Salazar en 2016 reporta que las células B10 presentan alta proliferación aún en presencia de NGF, durante 6 días de cultivo. Los resultados de este trabajo reproducen los obtenidos en estos estudios, confirmando que la clona B10 presenta una alta tasa de proliferación y baja tasa de diferenciación en comparación con la clona C11, mientras que la clona C11 tiene una alta tasa de diferenciación y una alta tasa de proliferación, pero esta es menor a la de la clona B10.

En un estudio realizado en células PC12 Tet-On se compararon las respuestas celulares a la inducción de crecimiento neurítico, mediante la unión del ligando receptor TrkA-NGF y un inductor de la misma familia TrkC-NT3. Se permitió la diferenciación durante 7 días y se observó la expresión de moléculas de señalización que activan la vía de diferenciación como es el caso de Erk. En este sistema se observó mayor crecimiento neurítico por la unión TrkC-NT3 que por la activación de TrkA-NGF, a pesar de que la expresión de Erk fuera menor en el primer ligando (Krawczyk, Twarog, Kurowska, Klopowska, & Matuszyk, 2015). Esto sugiere que las clonas PC12 Tet-On pueden tener una menor respuesta al NGF para inducir el crecimiento neurítico por mecanismos no conocidos.

Además del análisis morfológico, se evaluó la expresión de diferentes marcadores moleculares asociados directa o indirectamente a la diferenciación celular. La  $\beta$  III Tubulina, que es el principal componente de los microtúbulos requeridos para la formación de las neuritas, se ha observado que la formación de polímeros de tubulina en PC12 se incrementa durante el proceso de diferenciación. Existen 4 diferentes isotipos de  $\beta$  Tubulina encontrados en el sistema nervioso, pero solo el tipo III es específico de neuronas (Aletta, 1996; Sarina et al., 2013). Al analizar la expresión de este marcador se observó que la expresión es mayor en células tratadas con NGF (Figura 22), lo que era esperado

ya que la expresión de este marcador aumenta al transcurrir los días de diferenciación.

También se analizó la expresión de la proteína HSPB1 o HSP27, que es una proteína de choque térmico que actúa como chaperona y mantiene la homeóstasis celular, la arquitectura del citoesqueleto, la estabilización del mRNA, está involucrada en la respuesta a antioxidantes y antiapoptosis (Batulan et al., 2016). Merino y colaboradores (2016) han estudiado el proteoma de las células C11 y observaron que la proteína HSPB1 incrementa su expresión en estas células diferenciadas con NGF y su inhibición utilizando anticuerpos afecta el crecimiento neurítico de las células. En el análisis comparativo entre las clonas C11 y B10 se observó que las células C11 tratadas con NGF, y en general todas las clonas presentan niveles mayores de esta proteína en comparación con las células no diferenciadas a excepción de la clona B10, lo que posiblemente conduce a una baja tasa de diferenciación de esta última.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la expresión de los marcadores  $\beta$  III Tubulina y HSPB1 es mayor en la clona C11 que en la clona B10, lo que concuerda con la alta tasa de diferenciación que posee la clona C11 (Figura 22).

Posteriormente se analizó la localización celular de la distrofina Dp71 $\Delta$ 78-79 en ambas líneas celulares y se observó que en la clona C11 se encuentra localizada en la periferia celular tanto en células diferenciadas como en las células no diferenciadas, estando de acuerdo con la localización del complejo de proteínas asociadas a distrofina que se encuentran insertadas en la membrana celular (Ervasti, 2007; Ervasti, Ohlendieck, Kahl, Gaver, & Campbell, 1990), y se confirma la localización reportada por Aragón y colaboradores. También se analizó la localización de la distrofina en la clona B10 y se encontró que en células tratadas con doxiciclina la intensidad de la marca asociada a Dp71 $\Delta$ 78-79 fue mayor que en células sin doxiciclina. En células no diferenciadas se localizó a la distrofina en la periferia y en citoplasma con una señal intensa, lo que concuerda con el estudio de Herrera-Salazar y colaboradores en donde se sugiere que la presencia de la distrofina en el citoplasma puede deberse a la alta expresión de

la misma por la inducción del sistema. Además, se encontró una pequeña población celular que presenta agregados de la marca tanto de la distrofina como del  $\beta$ -dístroglicano en la base de la célula, en contacto directo con el sustrato que puede deber a la sobreexpresión de la distrofina en la célula formando agregados, cabe mencionar que ésta acumulación se presenta en lo que pareciera el inicio del crecimiento de una neurita, en donde se espera encontrar a la distrofina.

La señalización del receptor tirosin cinasa en las células PC12 ha sido ampliamente estudiada por permitir la diferenciación y proliferación celular. El tratamiento con NGF, que se une al receptor TrkA, permite el crecimiento neurítico y cesa la división celular, mientras que el tratamiento con EGF permite activar la señalización para la proliferación celular. Un ejemplo de ello es que la estimulación con NGF, pero no con EGF, estimula la fosforilación de diversas proteínas como SNT; además, la estimulación con NGF resulta en una elevación persistente de las RasGTP, mientras que con EGF se produce una corta activación de la misma RasGTP. A su vez la activación de ERK es sostenida por varias horas en presencia de NGF, pero brevemente activada por la presencia de EGF. También se observó que el EGF se une directamente con el complejo Grb2-Sos, mientras que TrkA estimula la fosforilación de Shc y la formación del complejo Shc-Grb2-Sos sin su unión directa con el complejo Grb2-Sos (Marshall, 1995; Schlessinger & Bar-Sagi, 1994) .

En un experimento interesante, líneas de células PC12 fueron seleccionadas por no responder a la señal de NGF que conduce a la diferenciación celular, en estas células se observó que el número de moléculas TrkA-NGF es reducido y por tanto la activación con Erk permitía la proliferación de las células (Schlessinger & Bar-Sagi, 1994). Considerando los resultados obtenidos en este trabajo sería interesante investigar el número de receptores celulares presentes en las células C11 y B10, para correlacionar la diferenciación y proliferación con la activación de Erk.

## 8. CONCLUSIONES

- Las clonas B10 y C11 presentan mayor proliferación que sus respectivos controles. La clona B10 presenta 13% más proliferación que la clona C11.
- La clona C11 alcanza una diferenciación del 96% en el día 9 de tratamiento con NGF y sus neuritas presentan una longitud promedio de 27  $\mu\text{m}$ , mientras que la clona B10 se diferencia al 40% al día 9 de tratamiento con NGF y sus neuritas alcanzan una longitud promedio de 7  $\mu\text{m}$ . La clona C11 tiene una tasa de diferenciación mayor que la clona B10.
- La expresión de los marcadores de proliferación PCNA y Fak esta incrementada en las clonas C11 y B10 sin tratar con NGF, con respecto a sus controles. La expresión de PCNA es mayor en la clona C11 que en B10, mientras que la expresión de Fak es mayor en la clona B10 que en C11.
- La expresión del marcador de diferenciación  $\beta$  III Tubulina aumenta en las clonas C11, PC12 y VC, en presencia de NGF. Mientras que el marcador HspB1 incrementa en la clona C11 diferenciada con NGF, sin embargo, en la clona B10 se mantiene constante con y sin tratamiento con NGF.
- En la clona C11 no diferenciada la Dp71 $_{\Delta 78-79}$  se localiza en la periferia celular, mientras que en la clona B10 se localiza en la periferia y el citoplasma.
- En la clona C11 diferenciada con NGF, la Dp71 $_{\Delta 78-79}$  se localiza en la periferia celular, mientras que en la clona B10 se encuentra en la periferia, citoplasma y neuritas. En esta clona un número considerable de células presentan acumulación de la distrofina mutante en la zona de contacto con el sustrato.

## 9. PERSPECTIVAS

- Explorar nuevos tratamientos para inducir la diferenciación en las células PC12 Tet-On con mejor rendimiento.
- Identificar la vía de señalización responsable de la proliferación de las células C11 y B10.
- Cuantificar el número de receptores celulares presentes en las células C11 y B10 para correlacionarlos con la activación de Erk.
- Realizar el análisis proteómico de la clona B10 y comparar los resultados con los ya reportados para C11, con el objeto de identificar los factores que participan en la proliferación de ambas clonas y en la diferenciación de la clona C11.
- Estudiar las proteínas que participan en la cascada de señalización de NGF en las clonas C11 y B10, para identificar las diferencias observadas en el proceso de diferenciación entre ambas clonas.
- Estudiar los niveles de proteínas de vías alternas de diferenciación en la clona C11.
- Caracterizar proteínas involucradas en la proliferación celular en las clonas C11 y B10.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R., Montanez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gomez, P., Quintero-Mora, L., . . . Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res*, 296(2), 265-275. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.01.015
- Ahn, A. H., & Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*, 3(4), 283-291. doi: 10.1038/ng0493-283
- Aleman, V., Osorio, B., Chavez, O., Rendon, A., Mornet, D., & Martinez, D. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol*, 115(3), 243-254.
- Aletta, J. M. (1996). Phosphorylation of type III beta-tubulin PC12 cell neurites during NGF-induced process outgrowth. *J Neurobiol*, 31(4), 461-475. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(199612)31:4<461::AID-NEU6>3.0.CO;2-7
- Amoroso, A., Concia, L., Maggio, C., Raynaud, C., Bergounioux, C., Crespan, E., . . . Maga, G. (2011). Oxidative DNA damage bypass in Arabidopsis thaliana requires DNA polymerase lambda and proliferating cell nuclear antigen 2. *Plant Cell*, 23(2), 806-822. doi: 10.1105/tpc.110.081455
- Anderson, J. L., Head, S. I., Rae, C., & Morley, J. W. (2002). Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*, 125(Pt 1), 4-13.
- Aragon, J., Martinez-Herrera, A., Romo-Yanez, J., Ceja, V., Azotla-Vilchis, C., Siqueiros-Marquez, L., . . . Montanez, C. (2016). Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with beta-Dystroglycan and alpha1-Syntrophin. *J Mol Neurosci*, 58(2), 201-209. doi: 10.1007/s12031-015-0657-8
- Aragon, J., Romo-Yanez, J., Martinez-Herrera, A., Ceja, V., Rendon, A., & Montanez, C. (2011). Characterization of Dp71Delta(78-79), a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *J Neurochem*, 119(4), 697-707. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07347.x
- Austin, R. C., Howard, P. L., D'Souza, V. N., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet*, 4(9), 1475-1483.
- Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., & Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J*, 272(2), 557-560.
- Batulan, Z., Pulakazhi Venu, V. K., Li, Y., Koumbadinga, G., Alvarez-Olmedo, D. G., Shi, C., & O'Brien, E. R. (2016). Extracellular Release and Signaling by Heat Shock Protein 27: Role in Modifying Vascular Inflammation. *Front Immunol*, 7, 285. doi: 10.3389/fimmu.2016.00285
- Blake, D. J., & Kroger, S. (2000). The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci*, 23(3), 92-99.
- Blake, D. J., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Gorecki, D. C., & Davies, K. E. (1998). beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(1), 241-246.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*, 82(2), 291-329. doi: 10.1152/physrev.00028.2001
- Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(4), 1276-1280.

- Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., & Brecht, D. S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, *82*(5), 743-752.
- Bresolin, N., Castelli, E., Comi, G. P., Felisari, G., Bardoni, A., Perani, D., . . . et al. (1994). Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, *4*(4), 359-369.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., & Strelkov, S. V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol*, *11*(2), 82-88.
- Byers, T. J., Lidov, H. G., & Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*, *4*(1), 77-81. doi: 10.1038/ng0593-77
- Clontech. (2002). pTRE2pur-Myc Vector Information. In I. Clontech Laboratories (Ed.): Clontech Laboratories, Inc.
- Clontech. (2012). Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual. In I. Clontech Laboratories (Ed.).
- Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M., & Chamberlain, J. S. (1993). New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat Genet*, *4*(1), 87-93. doi: 10.1038/ng0593-87
- Chelly, J., Hamard, G., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., Kahn, A., & Berwald-Netter, Y. (1990). Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature*, *344*(6261), 64-65. doi: 10.1038/344064a0
- D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., & Ray, P. N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet*, *4*(5), 837-842.
- Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., . . . Rendon, A. (2003). Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet*, *12*(13), 1543-1554.
- Daoud, F., Candelario-Martinez, A., Billard, J. M., Avital, A., Khelifaoui, M., Rozenvald, Y., . . . Vaillend, C. (2009). Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One*, *4*(8), e6574. doi: 10.1371/journal.pone.0006574
- Davies, K. E., & Nowak, K. J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(10), 762-773. doi: 10.1038/nrm2024
- Doree, M., & Hunt, T. (2002). From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci*, *115*(Pt 12), 2461-2464.
- Dubowitz, V., & Crome, L. (1969). The central nervous system in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*, *92*(4), 805-808.
- Emery, A. E. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet*, *359*(9307), 687-695. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07815-7
- Enriquez-Aragon, J. A., Cerna-Cortes, J., Bermudez de Leon, M., Garcia-Sierra, F., Gonzalez, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport*, *16*(3), 235-238.
- Ervasti, J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, *1772*(2), 108-117. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.05.010
- Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., & Campbell, K. P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, *345*(6273), 315-319. doi: 10.1038/345315a0

- Gonzalez, E., Montanez, C., Ray, P. N., Howard, P. L., Garcia-Sierra, F., Mornet, D., & Cisneros, B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett*, *482*(3), 209-214.
- Gorecki, D., Geng, Y., Thomas, K., Hunt, S. P., Barnard, E. A., & Barnard, P. J. (1991). Expression of the dystrophin gene in mouse and rat brain. *Neuroreport*, *2*(12), 773-776.
- Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *73*(7), 2424-2428.
- Herrera-Salazar, A., Garcia-Villegas, R., Aragon, J., Sanchez-Trujillo, A., Ceja, V., Martinez-Herrera, A., . . . Montanez, C. (2016). Overexpression of mutant dystrophin Dp71[INCREMENT](7)(8)-(7)(9) stimulates cell proliferation. *Neuroreport*, *27*(1), 6-11. doi: 10.1097/WNR.0000000000000475
- Huang, J., Zheng, D. L., Qin, F. S., Cheng, N., Chen, H., Wan, B. B., . . . Han, Z. G. (2010). Genetic and epigenetic silencing of SCARA5 may contribute to human hepatocellular carcinoma by activating FAK signaling. *J Clin Invest*, *120*(1), 223-241. doi: 10.1172/JCI38012
- Hugnot, J. P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G. E., Monaco, A. P., . . . et al. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(16), 7506-7510.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., & Campbell, K. P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, *355*(6362), 696-702. doi: 10.1038/355696a0
- Imamura, M., & Ozawa, E. (1998). Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(11), 6139-6144.
- Invitrogen. (2012). pcDNA4/HisMax© TOPO® TA Expression Kit. In L. technologies (Ed.), (pp. 44): invitrogen by life technologies.
- Jung, D., Filliol, D., Metz-Boutigue, M. H., & Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul Disord*, *3*(5-6), 515-518.
- Klamut, H. J., Gangopadhyay, S. B., Worton, R. G., & Ray, P. N. (1990). Molecular and functional analysis of the muscle-specific promoter region of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Cell Biol*, *10*(1), 193-205.
- Klesse, L. J., Meyers, K. A., Marshall, C. J., & Parada, L. F. (1999). Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene*, *18*(12), 2055-2068. doi: 10.1038/sj.onc.1202524
- Krawczyk, P., Twarog, E., Kurowska, E., Klopotoska, D., & Matuszyk, J. (2015). Establishment of a cellular model to study TrkC-dependent neuritogenesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, *51*(3), 241-248. doi: 10.1007/s11626-014-9829-z
- Kunkel, L. M., Hejtmancik, J. F., Caskey, C. T., Speer, A., Monaco, A. P., Middlesworth, W., . . . Francke, U. (1986). Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, *322*(6074), 73-77. doi: 10.1038/322073a0
- Lauri, S. E., Taira, T., & Rauvala, H. (2000). High-frequency synaptic stimulation induces association of fyn and c-src to distinct phosphorylated components. *Neuroreport*, *11*(5), 997-1000.
- Le Rumeur, E., Winder, S. J., & Hubert, J. F. (2010). Dystrophin: more than just the sum of its parts. *Biochim Biophys Acta*, *1804*(9), 1713-1722. doi: 10.1016/j.bbapap.2010.05.001

- Lee, J. W., & Juliano, R. (2004). Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells*, *17*(2), 188-202.
- Lidov, H. G., Byers, T. J., Watkins, S. C., & Kunkel, L. M. (1990). Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature*, *348*(6303), 725-728. doi: 10.1038/348725a0
- Lidov, H. G., Selig, S., & Kunkel, L. M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet*, *4*(3), 329-335.
- Lumeng, C. N., Hauser, M., Brown, V., & Chamberlain, J. S. (1999). Expression of the 71 kDa dystrophin isoform (Dp71) evaluated by gene targeting. *Brain Res*, *830*(1), 174-178.
- Macias, M. J., Hyvonen, M., Baraldi, E., Schultz, J., Sudol, M., Saraste, M., & Oschkinat, H. (1996). Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature*, *382*(6592), 646-649. doi: 10.1038/382646a0
- Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velazquez, F., Depardon, F., . . . Montanez, C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, *118*(4), 957-966.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, *80*(2), 179-185.
- Michele, D. E., & Campbell, K. P. (2003). Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem*, *278*(18), 15457-15460. doi: 10.1074/jbc.R200031200
- Mitra, S. K., Hanson, D. A., & Schlaepfer, D. D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(1), 56-68. doi: 10.1038/nrm1549
- Moeller, M. L., Shi, Y., Reichardt, L. F., & Ethell, I. M. (2006). EphB receptors regulate dendritic spine morphogenesis through the recruitment/phosphorylation of focal adhesion kinase and RhoA activation. *J Biol Chem*, *281*(3), 1587-1598. doi: 10.1074/jbc.M511756200
- Moizard, M. P., Toutain, A., Fournier, D., Berret, F., Raynaud, M., Billard, C., . . . Moraine, C. (2000). Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet*, *8*(7), 552-556. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200488
- Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., & Kunkel, L. M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, *2*(1), 90-95.
- Muntoni, F., Torelli, S., & Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*, *2*(12), 731-740.
- Nishida, A., Yasuno, S., Takeuchi, A., Awano, H., Lee, T., Niba, E. T., . . . Matsuo, M. (2016). HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus-specific localization of Dp71ab. *Histochem Cell Biol*, *146*(3), 301-309. doi: 10.1007/s00418-016-1439-2
- Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy, Z., Neuman, S., & Yaffe, D. (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*, *337*(6202), 76-78. doi: 10.1038/337076a0
- Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, *308* ( Pt 3), 697-711.
- Ponting, C. P., Blake, D. J., Davies, K. E., Kendrick-Jones, J., & Winder, S. J. (1996). ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci*, *21*(1), 11-13.
- Prelich, G., Tan, C. K., Kostura, M., Mathews, M. B., So, A. G., Downey, K. M., & Stillman, B. (1987). Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature*, *326*(6112), 517-520. doi: 10.1038/326517a0

- Ricotti, V., Jagle, H., Theodorou, M., Moore, A. T., Muntoni, F., & Thompson, D. A. (2015). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *Eur J Hum Genet*. doi: 10.1038/ejhg.2015.135
- Ricotti, V., Jagle, H., Theodorou, M., Moore, A. T., Muntoni, F., & Thompson, D. A. (2016). Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system. *Eur J Hum Genet*, 24(4), 562-568. doi: 10.1038/ejhg.2015.135
- Robles, E., & Gomez, T. M. (2006). Focal adhesion kinase signaling at sites of integrin-mediated adhesion controls axon pathfinding. *Nat Neurosci*, 9(10), 1274-1283. doi: 10.1038/nn1762
- Romo-Yanez, J., Ceja, V., Illaraza-Lomeli, R., Coral-Vazquez, R., Velazquez, F., Mornet, D., . . . Montanez, C. (2007). Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *J Cell Biochem*, 102(1), 82-97. doi: 10.1002/jcb.21281
- Rosa, G., Ceccarini, M., Cavaldesi, M., Zini, M., & Petrucci, T. C. (1996). Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun*, 223(2), 272-277. doi: 10.1006/bbrc.1996.0883
- Rybakova, I. N., Amann, K. J., & Ervasti, J. M. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol*, 135(3), 661-672.
- Sadoulet-Puccio, H. M., Rajala, M., & Kunkel, L. M. (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(23), 12413-12418.
- Saint Martin, A., Aragon, J., Depardon-Benitez, F., Sanchez-Trujillo, A., Mendoza-Hernandez, G., Ceja, V., & Montanez, C. (2012). Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J*, 279(1), 66-77. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08399.x
- Santos, S. D., Verveer, P. J., & Bastiaens, P. I. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat Cell Biol*, 9(3), 324-330. doi: 10.1038/ncb1543
- Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., & Nudel, U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet*, 8(1), 1-10.
- Sarina, Yagi, Y., Nakano, O., Hashimoto, T., Kimura, K., Asakawa, Y., . . . Gohda, E. (2013). Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by artemisinin through activation of ERK and p38 MAPK signaling pathways. *Brain Res*, 1490, 61-71. doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.059
- Schlessinger, J., & Bar-Sagi, D. (1994). Activation of Ras and other signaling pathways by receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 59, 173-179.
- Sun, P., Watanabe, H., Takano, K., Yokoyama, T., Fujisawa, J., & Endo, T. (2006). Sustained activation of M-Ras induced by nerve growth factor is essential for neuronal differentiation of PC12 cells. *Genes Cells*, 11(9), 1097-1113. doi: 10.1111/j.1365-2443.2006.01002.x
- Tan, C. K., Castillo, C., So, A. G., & Downey, K. M. (1986). An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *J Biol Chem*, 261(26), 12310-12316.
- Tan, J., Tan, S., Zheng, H., Liu, M., Chen, G., Zhang, H., . . . Xiao, X. Z. (2015). HSF1 functions as a transcription regulator for Dp71 expression. *Cell Stress Chaperones*, 20(2), 371-379. doi: 10.1007/s12192-014-0558-8

- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M. T., Bujard, H., & Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(14), 7963-7968. doi: 10.1073/pnas.130192197
- Waite, A., Brown, S. C., & Blake, D. J. (2012). The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease. *Trends Neurosci*, *35*(8), 487-496. doi: 10.1016/j.tins.2012.04.004
- Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G., & Campbell, K. P. (1995). SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*, *270*(20), 11711-11714.
- Zhu, A., Chen, M., Zhang, X., & Storey, K. B. (2016). Gene structure, expression, and DNA methylation characteristics of sea cucumber cyclin B gene during aestivation. *Gene*. doi: 10.1016/j.gene.2016.09.006