

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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Participación de las distrofinas Dp40, Dp40_{L170P} y Dp71e_{Δ71} en el proceso de diferenciación neuronal de las células PC12 y análisis de la expresión de las distrofinas en cerebro y retina por RNA-seq

Tesis que presenta:

M. en C. César Pastor García Cruz

Para obtener el grado de:

Doctor en ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directores de tesis:

Dr. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Dr. Armando Aranda Anzaldo

Ciudad de México

Noviembre 2018

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE PROYECTO EL BIOL. CÉSAR PASTOR GARCÍA CRUZ, FUE BECADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT).

EL PROYECTO FUE APOYADO POR LOS DONATIVOS DE CONACYT CB2013-222054 Y ECOS-ANUIES-CONACYT 276330/M16S01 OTORGADOS A LA DOCTORA SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y por la paciencia y tiempo dedicados a la dirección del proyecto de tesis.

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo por su tiempo y aportaciones para enriquecer el proyecto de tesis. A los asesores: la Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, el Dr. Javier Hernández Sánchez, la Dra. Refugio García Villegas, el Dr. Juan Pablo Reyes Grajeda y el Dr. Cyrille Vaillend por su amable disposición y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

A los auxiliares y técnicos de investigación; Jorge Aragón Medrano, Víctor Ceja Orozco, Alejandra Sánchez Trujillo y Clemencia Salas Guerrero por proporcionar lo necesario para la realización de esta tesis.

A mis amigos: Cande, Gris, Sandra, Mayram, Pablo, Alejandro, Lalo, Mauricio y Rodriguito por acompañarme y ser parte de mi formación académica y personal durante mi estancia en el laboratorio.

DEDICATORIA

A mi padres, Ruth Cruz Santos y Jorge García Rivera por todo su apoyo y cariño incondicional y porque gracias a ellos debo la formación más importante y por la cual logro un paso más en mis metas.

A mis hermanos, Octavio y Ana que sé que siempre tendré su apoyo y cariño incondicional.

A mi novia Isis por acompañarme y animarme a concluir esta meta.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Distrofia muscular de Duchenne y Becker	8
1.2 El gen <i>DMD</i>	9
1.3 Distrofina Dp71.....	11
1.4 Distrofina Dp40.....	15
1.5 Participación del dominio WW en el núcleo	17
1.6 Motifs EF-HAND.....	19
1.7 Dominio ZZ	21
1.8 El complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) en cerebro.....	22
1.9 El complejo SNARE.....	26
2. La línea celular PC12 como modelo de estudio para las distrofinas	29
JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVO GENERAL.....	33
OBJETIVOS PARTICULARES SECCIÓN 1.....	34
MATERIALES Y METODOS SECCIÓN 1	35
I. Cultivo de las células PC12 y diferenciación celular	35
II. Verificación de la integración de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40 _{L170P} en el DNA genómico de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P}	36
2.1 Extracción de DNA genómico	36
2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
III.Preparación de extracto proteico	37
IV. Inmunodetección en fase sólida	38
V. Análisis de la diferenciación celular	38
VI. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta.....	39
VII. Geles en dos dimensiones (2-DE)	41
7.1 Extracción de proteínas	41
7.2 Protocolo para primera dimensión.....	41
7.3 Protocolo para la segunda dimensión	43

7.4 Tinción de geles bidimensionales	43
7.5 Obtención de imágenes	44
VII. Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS).....	44
IX. Mutagénesis sitio dirigida	45
10.1 Reacciones de secuenciación.....	46
XI. Transfecciones transitorias	47
RESULTADOS SECCION 1	49
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES SECCIÓN 1	90
PERSPECTIVAS SECCION 1.....	91
MATERIALES Y METODOS SECCION 2	93
RESULTADOS SECCIÓN 2	93
DISCUSIÓN SECCIÓN 2.....	107
CONCLUSIONES SECCIÓN 2	112
PERSPECTIVAS SECCION 2.....	112
OBJETIVOS PARTICULARES SECCIÓN 3.....	113
MATERIALES Y METODOS SECCION 3	113
I. Análisis <i>in silico</i> de bases de datos de cerebro y retina de ratón	113
II. Amplificación de la inserción nueva localiza en el intrón 51 mediante	114
extracción del RNA mensajero (mRNA).....	114
RESULTADOS SECCIÓN 3	116
DISCUSIÓN SECCIÓN 3.....	128
CONCLUSIONES SECCIÓN 3	130
PERSPECTIVAS SECCION 3.....	130
REFERENCIAS	131
ANEXO I (Carta de aceptación del artículo)	141
ANEXO II (Artículo)	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. El gen <i>DMD</i> y las distrofinas.....	10
Figura 2. Modelos hipotéticos que describen los complejos tipo DAPC en neuronas y glía.....	23
Figura 3. Validación de la integración de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40 _{L170P} en el DNA genómico de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} sin diferenciar.....	50
Figura 4. Expresión de las proteínas Myc-Dp40 y Myc-Dp40 _{L170P} en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} sin diferenciar.....	51
Figura 5. Análisis morfométrico de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} durante la diferenciación neuronal.....	53
Figura 6. Expresión de β 3-Tubulina y NeuN de células PC12-Dp40 durante el proceso de diferenciación neuronal.....	55
Figura 7. Distribución subcelular del epítotope c-Myc y de la proteína NeuN en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días.....	58
Figura 8. Alineamiento de geles 2-DE con el software ImageMaster 2D de células PC12-control y PC12-Dp40 _{L170P} diferenciadas 9 días con NGF. Se obtuvieron extractos de células PC12-control y PC12-Dp40 diferenciadas 9 días con NGF....	60
Figura 9. Geles 2-DE de extractos proteicos de células diferenciadas PC12-control y PC12-Dp40 _{L170P}	62
Figura 10. Validación de la expresión de α -internexina, NF-L y VAMP 1/2 en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} sin diferenciar.....	66
Figura 11. Validación de la expresión de α -internexina, NF-L, HspB1 y VAMP 1/2 en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} diferenciadas con NGF durante 9 días..	67
Figura 12. Distribución subcelular de α -internexina en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} sin diferenciar..	69
Figura 13. Distribución subcelular de α -internexina en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40 _{L170P} diferenciadas con NGF por 9 días.....	72
Figura 14. Localización de las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40 _{L170P} en geles 2-DE.....	74
Figura 15. Construcción del vector pTRE2Pur-Myc/Dp40 Δ L170 y expresión de la proteína Myc-Dp40 Δ L170.....	75
Figura 16. Distribución subcelular de las proteínas Myc-Dp40, Myc-Dp40 _{L170P} y Myc-Dp40 Δ L170 mediante transfecciones transitorias en células PC12 Tet-on sin diferenciar.....	78
Figura 17. Distribución subcelular de la proteínas Myc-Dp40, Myc-Dp40 _{L170P} y Myc-Dp40 Δ L170 mediante transfecciones transitorias en células PC12 Tet-on diferenciadas con NGF durante 3 días.....	79
Figura 18. Estructura terciaria de las proteínas Dp40, Dp40 _{L170P} y Dp40 Δ L170.....	81
Figura 19. Modelo del crecimiento neurítico de células PC12 que sobre-expresan la Dp40.....	89

Figura 20. Expresión de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 en células PC12-Dp71e Δ 71 sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días	94
Figura 21. Análisis morfométrico de las células PC12-Dp71e Δ 71 durante la diferenciación neuronal.....	95
Figura 22. Alineamiento de geles 2-DE de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control	97
Figura 23. Expresión diferencial de células diferenciadas PC12-Dp71e Δ 71	98
Figura 24. Expresión diferencial de HspB1 y el marcador neuronal TH en células PC12-Dp71e Δ 71 diferenciadas con NGF durante 9 días	101
Figura 25. Distribución subcelular de Myc-Dp71e Δ 71 y HspB1 en células PC12-Dp71e Δ 71.	105
Figura 26. Distribución subcelular de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 en las células PC12-Dp71e Δ 71 clona C9.....	106
Figura 27. Modelo del crecimiento neurítico de células PC12 que sobre-expresan la Dp71e Δ 71.	111
Figura 28. Expresión transcripcional del gen <i>DMD</i> en diferentes tipos celulares de cerebro de ratón mediante secuenciación masiva (RNA-seq) tomada de la base de datos pública https://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html de barres y colaboradores	116
Figura 29. Cuantificación de los niveles de expresión transcripcional de los diferentes exones del gen <i>DMD</i> mediante un mapa de calor (heatmap).....	122
Figura 30. Gráfico Shashimi de la inserción localizada en el intrón 51	124
Figura 31. Validación de la inserción nueva localizada en el intrón 51 en retina en cerebro y retina de ratón.....	125
Figura 32. Traducción in-silico de la nueva inserción localizada en el intrón 51 en la distrofina Dp260-1 y Dp140 de <i>Homo sapiens</i>	127

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40 _{L170P}	37
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección en fase sólida e inmunofluorescencia indirecta.....	40
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para generar la delección del residuo 170 en la Dp40.....	46
Tabla 4. Oligonucleótidos para la verificación de la secuencia de la Dp40 _{ΔL170}	47
Tabla 5. Cuantificación de manchas y porcentajes de reproducibilidad de geles 2-DE de células PC12-control y PC12-Dp40 _{L170P}	61
Tabla 6. Identificación por espectrometría de masas (MS) del perfil de expresión de células PC12-Dp40 _{L170P} diferenciadas.....	64
Tabla 7. Cuantificación de manchas y porcentajes de reproducibilidad de geles 2-DE de células PC12-Dp71e _{Δ71} y PC12-control.....	97
Tabla 8. Identificación por espectrometría de masas (MS) del perfil de expresión de células PC12-Dp71e _{Δ71} diferenciadas.....	100
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la inserción nueva localizada en el intrón 51 del gen <i>DMD</i>	115
Tabla 10. Cuantificación de lecturas para exones y UTRs (<i>unstralate region</i>) representativos de las distrofinas en cerebro.....	118
Tabla 11. Conteo de lecturas para exones y UTRs (<i>unstralated regions</i>) representativos de las distrofinas Dp427 (B:brain; M: muscle; P: Purkinje), Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40 de bases de datos públicas y privadas de secuenciación masiva de mRNA (RNA-seq) en retina de ratón.....	120

LISTA DE ABREVIATURAS

%SC: Porcentaje de secuencia cubierta
2-DE: Geles en dos dimensiones
Akt: Proteína cinasa B
AP2: Adaptor protein complex 2
ASD: Desordenes del espectro autista
ATP: Adenosín trifosfato
ChAT: Transferasa de acetilcolina
DAPC: Complejo de proteínas asociado a distrofina
DAPs: Proteínas asociadas a distrofinas
DMD: Distrofia muscular de Duchenne
DOPA: Dihidroxifenilalanina
Ex: Exón
FAK1: Cinasa de adhesión focal
FKPM: Fragmentos por kilobase por millón de lecturas mapeadas
GABA_AR : Receptores gabaérgicos
GIRK1: Canal de potasio 1
GRP78: Proteína precursora reguladora de glucosa 78
GTP: Guanosín trifosfato
HCNP: Péptido colinérgico estimulador hipocampal
HCNP-pp: Proteína precursora de HCNP
HspB1: Heat shock protein B1
ID: Número de identificación.
IEE: Isoelectroenfoque
IGV: Visualizador genómico integral
In: Intrón
kDa : Kilodaltones
MALDI: Desorción/ionización laser asistida por matriz
Match pept: Número de péptidos identificados
MS: Espectrometría de masas
Mz: Mezcla
NES: Señal de exporte nuclear
NeuN: Núcleo neuronal
NF-E2: Hematopoietic transcription factor
NF-L: Neurofilament de cadena ligera
NF-M: Neurofilamento de cadena mediana
NGF: Factor de crecimiento neuronal
NSF: Factor sensible a N-metilmaleamida
ORF: Marco de lectura abierto

Pb: Pares de bases.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PEBP: Proteína de unión a fosfodiletalnolamina
PEBP2: Polyoma enhancer binding 2
PNMT: Feniletanolamida-N-metiltransferasa
PSD: Densidades post-sinápticas
PSD-95: Proteína de densidades post-sinápticas 95
Rbfox3: Homólogo 3 de Fox-1 de unión a RNA
RIM-BPs: Proteínas de unión a RIM
RIMs: Proteínas que interactúan con Rab3
RKIP: Proteína inhibidora de la cinasa Raf
Rpm: Revoluciones por minuto
SDS-PAGE: Geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
SNAP25: Proteína asociada al nervio sinaptosomal
SNAPs: Proteínas de unión a NSF
SNARE: Proteína de fijación de NSF soluble
SNVs: Variaciones de nucleótido simple
SXT1A: Sintaxina 1A
TA: Temperatura ambiente.
TH: Tirosina hidroxilasa
TMR: Región transmembranal
TrkA: Receptor de cinasa A de Tropomiosina
UTR: Regiones no traducidas.
VAMP: Proteína de membrana asociada a vesículas
VGLUT1: Transportador vesicular de glutamato 1
YAP: Proteína asociada a la cinasa YES

RESUMEN

La alteración de la distrofina Dp71 se ha relacionado ampliamente con el déficit cognitivo y visual en pacientes con distrofia muscular de Duchenne y Becker (DMD y BMD). La distrofina Dp40 comparte el mismo promotor que la Dp71 y ambas son de expresión ubicua. El mRNA de la Dp71e Δ 71 y la Dp40 se expresan en el modelo de diferenciación neuronal PC12 y se localizan en la periferia y membrana celular aumentando su concentración en el núcleo durante la diferenciación neuronal. Además, un cambio de leucina a prolina en el residuo 170 de la Dp40 (Dp40_{L170P}) promueve su localización nuclear.

Utilizando las líneas celulares PC12-Dp40, PC12-DP40_{L170P} y PC12-Dp71e Δ 71, que expresan las proteínas recombinantes Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y Myc-Dp71e Δ 71 en el sistema de expresión inducible PC12 Tet-On, en este trabajo se evaluó el efecto de la sobre-expresión de cada una de estas proteínas recombinantes durante el proceso de diferenciación neuronal. La sobreexpresión de la Dp40 y Dp40_{L170P} promueve y disminuyen el crecimiento neurítico respectivamente. El perfil de expresión de células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas mostró la expresión diferencial de 14 proteínas donde S100a6 y α -internexina fueron algunas de las proteínas con la mayor regulación positiva, las cuales están relacionadas con la reorganización del citoesqueleto y neuronas inmaduras respectivamente. También, se mostró que en las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} aumenta y disminuye la expresión de VAMP respectivamente. Además, se mostró que una delección del residuo 170 de la Dp40 promueve una localización nuclear en células PC12 Tet-On. Por otro lado las células PC12-Dp71e Δ 71 promueven el crecimiento neurítico. El perfil de expresión de las células PC12-Dp71e Δ 71 mostró la expresión diferencial de 14 proteínas donde HspB1 fue la que presentó la mayor regulación positiva. Estas células también presentaron un aumento del marcador de diferenciación tirosina hidroxilasa.

El análisis de bases de datos generadas por RNA-seq de cerebro y retina indican una alta expresión tanto de Dp40 como de Dp71 en astrocitos en el cerebro, así como en fotorreceptores de la retina. De manera interesante, se encontró en retina y no en cerebro una inserción localizada en el intrón 51 que posiblemente sea traducida en las distrofinas Dp427, Dp260 y Dp140.

ABSTRACT

Disruption of Dp71 dystrophin is widely related to cognitive and visual deficit in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy (DMD and BMD). The dystrophin Dp40 and Dp71 have the same promoter and both have a ubiquitous expression. The mRNA expression of Dp71e Δ 71 and Dp40 are expressed in the PC12 neuronal differentiation model and are located in the cell periphery and membrane increasing their concentration in the nucleus during neuronal differentiation. In addition, a punctual change from leucine to proline at residue 170 of Dp40 (called Dp40_{L170P}) promotes its nuclear localization.

Using the cell lines PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} and PC12-Dp71e Δ 71 which express the recombinant proteins Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} and Myc-Dp71e Δ 71 in the inducible expression system PC12 Tet-On, in this work we evaluated the over-expression effect of Dp40, Dp40_{L170P}, Dp71e Δ 71 during neuronal differentiation process. Overexpression of Dp40 or Dp40_{L170P} promotes or decreases neurite outgrowth respectively. The expression profile of NGF differentiated PC12-Dp40_{L170P} cells showed the differential expression of 14 proteins where S100a6 and the α -internexin proteins had the highest positive regulation which are related with the reorganization of the cytoskeleton and immature neurons respectively. Also, PC12-Dp40 and PC12-Dp40_{L170P} cells were shown to increase or decrease the expression of VAMP respectively. In addition, it was shown that a deletion of residue 170 of Dp40 promotes nuclear localization in PC12 Tet-On cells. On the other hand, it was observed that PC12-Dp71e Δ 71 cells showed an exacerbated neurite outgrowth. The expression profile of PC12-Dp71e Δ 71 cells showed the differential expression of 14 proteins where HspB1 was the most positively regulated protein. Besides, an increase in the tyrosine hydroxylase differentiation marker was also observed.

The analysis of databases generated by RNA-seq of brain and retina databases indicated high expression of Dp71 in astrocytes, photoreceptors and retina. In the brain, the Dp40 showed relevant expression levels in astrocytes and in photoreceptors of retina. Interestingly, a new insert located in intron 51 was found in the retina but not in brain and likely this new insertion could be translate in Dp427, Dp260 y Dp140.

INTRODUCCIÓN

1. Distrofia muscular de Duchenne y Becker

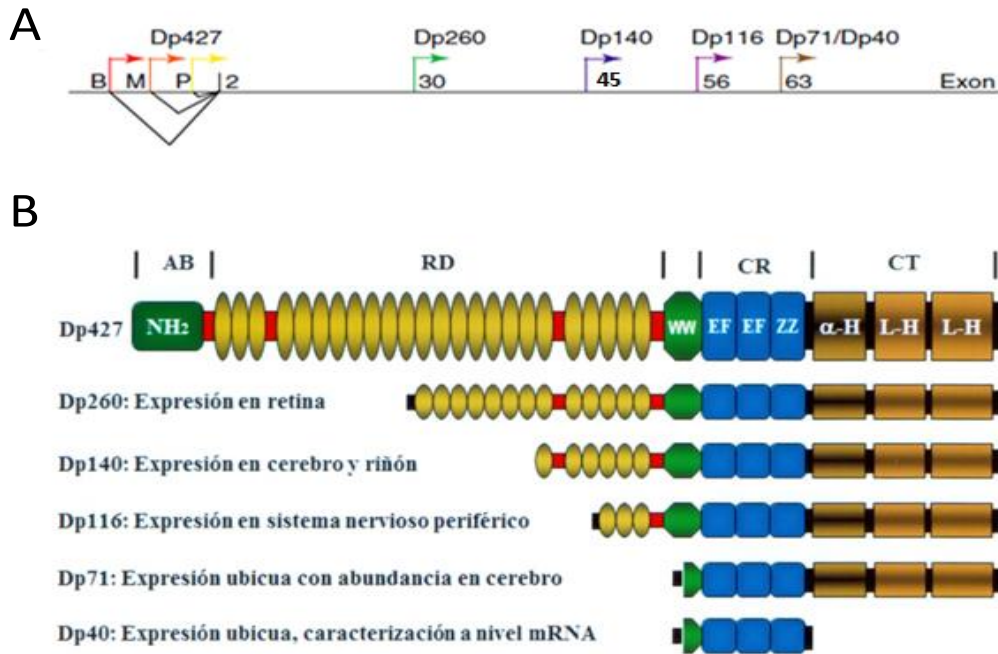
La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más severa de las distrofias musculares las cuales se caracterizan por una degeneración muscular que varía dependiendo de la severidad de la distrofia. El gen *DMD* se localiza en el cromosoma X (Darras, Jones Jr et al. 2014). La DMD tiene una incidencia de 1 entre 3500 nacimientos (Emery 1991). La distrofia muscular de Becker (BMD) también se produce por alteraciones en el gen *DMD* debido a modificaciones en los niveles de expresión de la distrofina (Bieber and Hoffman 1990) pero presenta síntomas menos severos que la DMD y tiene una incidencia entre 1 a 18000 o 1 a 31000 nacimientos de individuos (Moat, Bradley et al. 2013). Las alteraciones en el gen *DMD* pueden provocar la deficiencia o ausencia de la proteína distrofina (Foster, Popplewell et al. 2012). Además del desgaste muscular observado en diferentes distrofias musculares también se ha reportado una disminución en la capacidad cognitiva posiblemente debido a alteraciones en la lámina cortical causadas por un defecto en la migración neuronal (Blake and Kroger 2000) y debido a mutaciones presentes en el extremo 3' prima del gen *DMD* (Daoud, Angeard et al. 2009). Se ha reportado que un tercio de los pacientes con DMD y alrededor de la mitad de los pacientes con BMD presentan déficit cognitivo, desórdenes del espectro autista (ASD por sus siglas en inglés) y déficit de atención por hiperactividad (Wu, Kuban et al. 2005; Hendriksen and Vles 2008).

1.2 El gen *DMD*

El gen *DMD* es el más grande del genoma humano y tiene un tamaño aproximado de 2.5 Mb y está localizado en el brazo corto del cromosoma X, en el locus Xp21.3-p21.2 (Kunkel, Hejtmancik et al. 1986; Monaco, Neve et al. 1986; Darras, Menache-Starobinski et al. 2014). La distrofina de tamaño completo tiene 79 exones que codifican para un transcrito de 14 kb y una proteína de 427 kDa (3,685 residuos) que corresponde a la distrofina Dp427. (Koenig, Hoffman et al. 1987). La mayoría de las mutaciones en el gen *DMD* son deleciones, duplicaciones, inversiones y mutaciones puntuales en la región codificante, que generan la pérdida total de la distrofina o la producción de una proteína no funcional. Sin embargo, las proteínas truncadas que pierden únicamente alguno de los repetidos tipo espectrina, del dominio central de la distrofina, pueden conservar su actividad. Esto se ha asociado al fenotipo BMD, hecho que sugiere que diferentes dominios estructurales en la distrofina tienen diferentes funciones (Muntoni, Torelli et al. 2003).

La distrofina Dp427 se expresa a partir de uno de los siete promotores independientes presentes en el gen *DMD*. Además la Dp427 tiene tres isoformas debido a que se puede transcribir a partir de cada uno de los promotores específicos de tejido como músculo, cerebro y células de Purkinje del cerebelo. Las otras distrofinas (Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40) son transcritas a partir de promotores independientes como se observa en la **figura 1**. Además cada una de las distrofinas puede presentar procesamientos alternativos (Feener, Koenig et al. 1989; Aragón, González-Reyes et al. 2018). La Dp427 contiene un dominio de unión a actina, sin embargo las distrofinas Dp260, Dp140, Dp116 carecen de este tipo de dominio. Las distrofinas Dp260, Dp140 y Dp116 conservan parte de los 24 repetidos tipo espectrina no así las distrofinas más cortas. La Dp71 posee un sitio de unión a actina en su exón 1 (Howard, Klamut et al. 1998). Todas las distrofinas conservan el dominio rico en cisteína compuesto por el motif ZZ,

EF-Hand1 y EF-Hand2 y retienen el dominio de unión para β -dístroglicano, sintrofinas y distrobrevinas (Feener, Koenig et al. 1989; Waite, Brown et al. 2012).



Modificado de Waite et al., 2012 y Blake *et al.* 2002

Figura 1. El gen *DMD* y las distrofinas. **A.** Representación esquemática que muestra la organización del gen *DMD* y las formas encontradas en cerebro. Los tres promotores localizados en el extremo 5' del gen dirigen la expresión de las distrofinas de longitud completa llamadas Dp427, en cerebro, músculo y células de Purkinje del cerebelo. Los otros transcritos son producidos por promotores río arriba de los exones 30, 45, 56 y 63. **B.** Representación de las seis distrofinas encontradas en cerebro adulto: la Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y la Dp40. Las tres últimas carecen del extremo N-terminal que se une a actina, de la mayoría o de todos los repetidos tipo espectrina y regiones ricas en prolina (H1-H4) presentes en la Dp427. Además la Dp40 carece por completo del extremo C-terminal. El extremo C-terminal de la distrofina puede dividirse en dos regiones distintas; la región rica en cisteína (CR, azul) que incluye el sitio de unión a β -dístroglicano, y la región carboxilo terminal (CT, en café) que contiene los sitios de unión para sintrofina y distrobrevinas. Además, se observa el dominio WW que interacciona con proteínas integrales de membrana como betadístroglicano, los motivos EF-hand que actúan como sensores de calcio y el motif ZZ que en conjunto con el dominio WW participan en el correcto plegamiento del dominio WW.

1.3 Distrofina Dp71

Debido a que mutaciones presentes en las regiones que codifican para la Dp71 afectan el desarrollo cognitivo (Daoud, Angeard et al. 2009) y visual de pacientes con DMD y BMD (Sigesmund, Weleber et al. 1994; Ricotti, Jäggle et al. 2016) ha resultado interesante profundizar en el conocimiento de la participación de esta proteína en el proceso de diferenciación neuronal. Adicionalmente se ha observado su participación en diferentes procesos celulares (Tadayoni, Rendon et al. 2012).

La primera vez que se detectó el mRNA de Dp71, un transcrito de 4.8 Kb, se demostró que se expresa en varios tejidos humanos (cerebro, hígado, pulmón, testículos, intestino y riñón) pero de manera abundante en células de Schwann. También se observó mediante inmunohistoquímica la presencia de Dp71 en células nerviosas y no así de la distrofina de longitud completa (Dp427). El transcrito de la Dp71 contiene un exón 1 específico que contiene el codón de inicio de la traducción en el intrón 62 del gen *DMD* y continua hasta el exón 79 con procesamientos alternativos en los exones 71, 78 y del 71 al 74 generando una proteína con un peso aproximado de entre 70 a 75 kDa (Bar, Barnea et al. 1990; Blake, Love et al. 1992; Hugnot, Gilgenkrantz et al. 1992; Lederfein, Levy et al. 1992).

La Dp71 al igual que la Dp427 contiene un motif de unión a actina en su exón 1 localizado en el extremo N-terminal (Howard, Klamut et al. 1998), y carece de la región larga de repetidos tipo espectrina que se encuentra en las isoformas más grandes (Dp427, Dp260, Dp140 y Dp116). Todas las distrofinas contienen el dominio rico en cisteína en el extremo C-terminal el cual es crucial para la unión de proteínas asociadas a distrofina (DAPs) como β -distroglicano (Rapaport, Lederfein et al. 1992). Kramarcy y colaboradores (1994) demostraron la existencia de dos subpoblaciones de Dp71, una población que puede contener 17 aminoácidos hidrofílicos y otra con 31 aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal (secuencia

founder) (Feener, Koenig et al. 1989; Kramarcy, Vidal et al. 1994), que corresponden a la Dp71d y a la Dp71f respectivamente.

También se ha demostrado la localización subcelular y la expresión diferencial de las isoformas de Dp71 en las células PC12. Esta línea celular expresa 3 grupos de Dp71, el grupo de las Dp71d que contienen al exón 78 e incluyen a la Dp71d completa, a la Dp71d $_{\Delta 71}$ (antes Dp71a) que carece del exón 71 y la Dp71d $_{\Delta 71-74}$ (antes Dp71c) que carece del exón 71 al 74 y a las Dp71d $_{\Delta 74}$, Dp71d $_{\Delta 71,74}$, Dp71d $_{\Delta 71,73-74}$ recientemente reportadas. El grupo de las Dp71f que carecen del exón 78 al que pertenece la Dp71f (antes Dp71b), la Dp71f $_{\Delta 71}$ (antes Dp71ab) que carece del exón 71, la Dp71f $_{\Delta 71-74}$ (antes Dp71 Δ 110) que carece del exón 71 al 74 y la Dp71f $_{\Delta 71}$ recientemente reportada. El grupo de las Dp71e presentan 10 aminoácidos diferentes de carácter hidrofóbico en el extremo C-terminal a partir del intrón 77 lo que impide la traducción del exón 78 y 79 y que incluyen a la Dp71e $_{\Delta 71}$ (antes Dp71e) que carece del exón 71 y a la Dp71e $_{\Delta 71-74}$ (antes Dp71ec) que carece del exón 71 al 74 (Saint Martin, Aragon et al. 2012; Aragón, González-Reyes et al. 2018).

La Dp71 se expresa en células troncales embrionarias pluripotenciales (ESC) siendo el primer producto detectado durante el desarrollo (Rapaport, Lederfein et al. 1992). A pesar de la distribución ubicua de la Dp71 los niveles de expresión varían entre los diferentes tejidos y durante la diferenciación. Algunos estudios han demostrado que el nivel del mRNA y de la proteína Dp71 se incrementan durante la diferenciación inducida con dibutilil adenosín monofosfato cíclico en astrocitos de cerebro de rata y en células PC12 cuando se induce la diferenciación con NGF, esto indica que la expresión de Dp71 está modulada principalmente a nivel transcripcional (Imamura and Ozawa 1998). La proteína Dp71 se localiza en la membrana celular de cultivos de astrocitos de cerebro de rata (Imamura and Ozawa 1998). Durante la diferenciación de células PC12 inducida con NGF incrementa la expresión de la Dp71f y Dp71d además se relocaliza la Dp71f

del citoplasma a las varicosidades y conos de crecimiento y la Dp71d del citoplasma al núcleo (Marquez, Cisneros et al. 2003). Igualmente se ha demostrado la presencia de la Dp71f $_{\Delta 71}$ en el núcleo de las células HEK293 (Nishida, Yasuno et al. 2016). Además se ha demostrado que la Dp71d ingresa al núcleo mediante el mecanismo clásico de importe nuclear (importina α/β) y se exporta del núcleo mediante CRM1 (Suarez-Sanchez, Aguilar et al. 2014). Se ha mostrado la distribución de algunas isoformas de Dp71 (grupo d, f y e) en donde se observó que en células PC12 sin diferenciar las isoformas Dp71d $_{\Delta 71}$, Dp71f $_{\Delta 71}$ y Dp71e $_{\Delta 71}$ se localizan en la periferia y citoplasma celular mientras que la Dp71d $_{\Delta 71-74}$ y Dp71e $_{\Delta 71-74}$ se localizan principalmente en la periferia celular. Sin embargo cuando se diferencia con factor de crecimiento neuronal (NGF) la Dp71d $_{\Delta 71}$, Dp71e $_{\Delta 71}$ y Dp71e $_{\Delta 71-74}$ incrementan su distribución subcelular en el núcleo (Aragón, Martínez-Herrera et al. 2016). Incluso se ha reportado una expresión diferencial de las isoformas Dp71d y la Dp71f donde se localizan principalmente en neuronas GABAérgicas bipolares y neuronas multipolares del hipocampo respectivamente. Además, la composición de distrobrevinas de cada uno de los complejos entre Dp71f y Dp71d puede variar ligeramente (Rodríguez-Muñoz, del Carmen Cárdenas-Aguayo et al. 2015).

Blake y colaboradores demostraron por primera vez que la Dp71 es capaz de asociarse para formar un complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) en tejidos no musculares como el cerebro (Claudepierre, Dalloz et al. 2000). También encontraron que la Dp71 interactúa con β -dístroglicano, δ -sarcoglicano y α -1 sintrofina además de que la Dp71d está altamente enriquecida en las densidades post-sinápticas (PSD) del prosencéfalo de rata junto con β -dístrobrevina, α - y β -2 sintrofinas (Fort, Sene et al. 2008). Por otro lado se ha reportado que la Dp71f $_{\Delta 71}$ forma un complejo con β -dístroglicano, α 1-sintrofina y la distrobrevina α 1 y β en células PC12 sin diferenciar (Romo-Yanez, Ceja et al. 2007).

La proteína Dp71 es capaz de restaurar la expresión normal y la localización de componentes DAPC en el sarcolema de ratones *mdx* pero sin eliminar la distrofia muscular (Cox, Sunada et al. 1994; Greenberg, Sunada et al. 1994), esto demuestra que la Dp71 tiene un papel diferente al de la distrofina completa. En el 2006 se reportó un complejo nuevo de proteínas asociadas a la Dp71 en el núcleo de células HeLa mediante microscopia confocal y análisis de fraccionamiento celular, encontrando la presencia de Dp71, β -sarcoglicano, β -dístroglicano, α/β -sintrofina, $\alpha1/\beta$ -dístrobrevina y la sintasa de óxido nítrico nuclear (nNOS) en el núcleo de células HeLa y en células PC12 (Villarreal-Silva, Suarez-Sanchez et al. 2010).

Posiblemente por su expresión ubicua se ha demostrado la participación de la Dp71 en varios procesos celulares a partir de modelos murinos y líneas celulares, que incluyen: la homeostasis del agua, señalización celular, adhesión celular, división del ciclo celular, arquitectura nuclear, migración, invasión, apoptosis, adipogénesis y diferenciación (Cerna, Cerecedo et al. 2006; Romo-Yáñez, Montañez et al. 2011; Tadayoni, Rendon et al. 2012; Herrera-Salazar, García-Villegas et al. 2016; Tan, Zhao et al. 2017). La diferenciación neuronal podría tener una implicación directa en el déficit cognitivo que presentan pacientes con DMD y BMD. Ensayos de silenciamiento contra la Dp71 han mostrado que participa de manera importante en el crecimiento neurítico durante la diferenciación neuronal de células PC12 (Acosta, Montañez et al. 2004). Esto concuerda con la sobreexpresión de la Dp71 $_{\Delta78-79}$ la cual carece del extremo carboxilo terminal y favorece el crecimiento neurítico de células PC12 durante el proceso de diferenciación neuronal mediante el aumento de la expresión y fosforilación de la proteína de choque térmico HspB1 (Merino-Jiménez, Aragón et al. 2016).

1.4 Distrofina Dp40

La Dp40 es la distrofina más pequeña reportada hasta la fecha, su transcrito fue detectado en varios tejidos fetales como músculo, pulmón, hígado, cerebro, músculo adulto y células de Schwann. También es el único transcrito detectado de manera temprana en células troncales embrionarias de murino. La Dp40 se expresa a partir del mismo promotor que la Dp71 por lo que posee la misma región 5'-UTR (*Untranslated region*) y contiene el mismo exón 1 específico presente en las isoformas de Dp71. Sin embargo, su región 3'-UTR se localiza después del exón 70 y posee un sitio de poliadenilación alternativo diferente lo que genera un codón de paro prematuro. La Dp40 es la única isoforma que carece del extremo C-terminal presente en la distrofina Dp427 (Tinsley, Blake et al. 1993). Aunque las mutaciones que afectan a la Dp71 pueden afectar también la expresión de la Dp40 en la secuencia que codifica para esta proteína, se considera que mutaciones en la Dp71 afectan de manera más severa la capacidad de pacientes con DMD y/o BMD. (Daoud, Angeard et al. 2009).

En un estudio realizado por Tozawa y colaboradores (2012) se demostró que la Dp40 interacciona con un grupo de proteínas presinápticas (syntaxin1A, SNAP25 y VAMP-2), por lo tanto, es posible que la Dp40 tenga un papel crucial en el funcionamiento presináptico debido a que syntaxin1a y SNAP25 están involucradas en la regulación de la exocitosis de las vesículas sinápticas en neuronas. También la eliminación de syntaxina 1A en ratones induce un comportamiento anormal por la alteración de los sistemas serotoninérgicos (Fujiwara, Snada et al. 2010). Se ha reportado que VAMP-2 y SNAP25A participan en el crecimiento y la dispersión de neuritas respectivamente durante el proceso de diferenciación neuronal de células PC12 (Shirasu, Kimura et al. 2000). Con el uso de un anticuerpo (denominado N-terminal) que detecta las distrofinas cortas (Dp71 y Dp40) se demostró que hay una mayor expresión de la proteína Dp40 en neuronas de hipocampo en comparación con células no neuronales de hipocampo de

ratón adulto. Además, se encontró que la proteína Dp40 solo se expresa en estadios post-natales en el cerebro de ratón y no en estadios embrionarios. En el mismo trabajo se reportó que la Dp40 se localiza en la post-sinapsis, en la membrana y en el núcleo de cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratón (Fujimoto, Itoh et al. 2014).

Nuestro grupo de trabajo mostró que durante la diferenciación de células PC12 con NGF por tres días, la proteína Dp40 se concentra en el núcleo. Además se encontró que cambios de leucina a prolina en los residuos 93 o 170 favorecen la redistribución celular de la proteína Dp40 hacia el núcleo. Los cambios en estos residuos se localizan en los dominios EF-Hand1 y EF-Hand2 respectivamente, los cuales son capaces de unir calcio intracelular. En células PC12 no diferenciadas y transfectadas transitoriamente con la secuencia de la Dp40_{L170P} esta proteína presentó una localización principalmente nuclear, a diferencia de células PC12 transfectadas con la Dp40 o con la Dp40_{L93P}. Esto demuestra que las variaciones de nucleótido simple (SNVs por sus siglas en inglés) en la Dp40 son importantes para su localización diferencial (Aragon, Martinez-Herrera et al. 2015) y posiblemente para su asociación con otras proteínas como β -dístroglicano debido a que se ha demostrado que es necesaria la presencia de los motivos EF-Hand1 y EF-Hand2 para el correcto plegamiento del dominio WW y su interacción con β -dístroglicano (Rentschler, Linn et al. 1999). La función de otras isoformas de la distrofinas (Dp427 y Dp140) en el cerebro todavía no es clara pero se ha reportado que la pérdida de estas formas están asociadas con discapacidad cognitiva (Koenig, Monaco et al. 1988; Waite, Brown et al. 2012).

1.5 Participación del dominio WW en el núcleo

Muchas proteínas de señalización contienen módulos pequeños llamados dominios los cuales median interacciones proteína-proteína. Los dominios son definidos como unidades semi-independientes formadas desde 35 a 40 aminoácidos los cuales tienden a formar plegamientos. Estos módulos funcionales pueden presentarse duplicados o en repetidos ordenados de manera jerárquica. Frecuentemente las interacciones entre proteínas dependen del reconocimiento realizado por los dominios de péptidos cortos en sus proteínas blanco, en muchos casos las interacciones pueden ser reguladas por modificaciones post-traduccionales. Las interacciones de los dominios pueden regular la localización subcelular, las actividades enzimáticas, la especificidad de sustrato y el ensamble con complejos de proteínas que influyen en las rutas de señalización (Richardson 1981; Orengo, Jones et al. 1994; Pawson 1995; Siddiqui and Barton 1995; Ruegsegger, Beyer et al. 1996).

Los dominios WW son pequeños módulos compuestos por 40 aminoácidos los cuales se caracterizan por tener dos residuos de triptófano que están separados por 20-22 aminoácidos y que juegan un papel importante en su estructura y función. El dominio WW forma parte de una familia de módulos de interacción proteína-proteína presentes en muchos eucariontes y en aproximadamente 50 proteínas de humano. Además es uno de los dominios más pequeños que se pliega como monómero sin necesidad de puentes disulfuro o cofactores. Funcionalmente, el dominio WW es similar al dominio 3 homólogo a Src, un módulo que se identificó originalmente por homología en la región amino-terminal de la proteína Src mostrando afinidad a ligandos ricos en prolina (Bork and Sudol 1994; Chen and Sudol 1995; Sudol, Bork et al. 1995). La estructura del dominio WW se conforma de tres hojas beta plegadas antiparalelas que forman un punto de unión para la unión de motivos de ligandos (Macias, Hyvonen et al. 1996; Huang, Poy et al. 2000)

Las proteínas que contienen dominios WW están involucradas en una variedad de procesos celulares como la transcripción, el procesamiento del RNA, el tráfico de proteínas, la señalización mediada por receptor y el control del citoesqueleto (Sudol, Sliwa et al. 2001; Ilsley, Sudol et al. 2002; Ingham, Gish et al. 2004). El dominio WW es capaz de unirse a una variedad de péptidos que incluyen motivos ricos en prolina y que pueden clasificarse en cuatro grupos en base al tipo de motivo que reconocen (Espanel and Sudol 1999; Bedford, Sarbassova et al. 2000; Sudol and Hunter 2000). El grupo I que se une a polipéptidos que contenga como mínimo la secuencia consenso de PPxY y al cual pertenecen las proteínas distrofinas que contengan completo el dominio WW como las distrofinas Dp427, Dp260, Dp140 y Dp116 (Ilsley, Sudol et al. 2002; Waite, Brown et al. 2012), sin embargo es importante recordar que las Dp71/Dp40 no contienen un dominio WW completo. El grupo II se une al ligando con el motivo PPLP (grupo II). El grupo III del dominio WW se une a motivos con múltiples prolinas (P) que son flanqueadas por arginina (R) o lisina (K) mientras que el grupo IV se une a secuencias cortas de fosfo-S o fosfo T seguidas de P de una forma dependiente de la fosforilación (Sudol and Hunter 2000).

Se han reportado varios ejemplos de la función que tiene el dominio WW en complejos proteicos en el núcleo. Uno de los más documentados corresponde al dominio WW presente en YAP (*Yes kinase associated protein*). En este caso el dominio WW de YAP actúa como un co-activador transcripcional a través del reconocimiento del motivo PPPY en PEBP2 (*Polyoma enhancer binding 2*) (Yagi, Chen et al. 1999). También se han reportado factores transcripcionales que contienen el motivo PPxY como en NF-E2 (*Hematopoietic transcription factor*), AP2 (*Adaptor protein complex 2*) y c-Jun (un factor de transcripción) y que podrían jugar un papel importante en la activación transcripcional. Por ejemplo NF-E2 contiene 2 motivos PPxY los cuales pueden reconocer el dominio WW de la ligasa de ubiquitina E3 (Kay, Williamson et al. 2000).

Aunque las distrofinas más grandes tienen el dominio WW completo, el cual se ha demostrado que es el sitio principal de interacción con β -dístroglicano por medio de su unión al motif PPxY (Rentschler, Linn et al. 1999), las distrofinas más cortas como la distrofina Dp71 y Dp40 tienen el dominio WW truncado. Un trabajo observó mediante co-inmunoprecipitaciones con β -dístroglicano, la asociación con Dp71 usando un anticuerpo que detecta todas las isoformas cortas (Dp71 y Dp40) (Fuentes-Mera, Rodríguez-Munoz et al. 2006), sugiriendo que las isoformas cortas podrían interactuar con β -dístroglicano mediante otras regiones presentes en la proteína. Es importante mencionar que existen variantes de la distrofina Dp71 que durante la diferenciación de células PC12 tratadas con NGF presentan una localización nuclear (Aragón, Martínez-Herrera et al. 2016). Hasta la fecha no se ha reportado si un dominio WW truncado mantiene parte de su afinidad a sus ligandos y por lo tanto su función. No obstante Rentschler y colaboradores (1999) reportan que 2 mutaciones del dominio WW disminuyen la afinidad con β -dístroglicano. Sin embargo, la pérdida de afinidad entre el dominio WW y β -dístroglicano solo es total cuando se elimina el dominio ZZ, indicando que el dominio WW mantiene parte de su interacción con β -dístroglicano aún con mutaciones puntuales (Rentschler, Linn et al. 1999) así que es posible que el dominio WW truncado de las distrofinas cortas sea capaz de mantener sus interacciones con el motif PPxY.

1.6 Motifs EF-HAND

El motif EF-hand es un motif de unión al ion calcio (Ca^{2+}) que juega un papel importante en la señalización celular. Las proteínas que contienen este motif forman parte de una familia funcionalmente diversa. El motif EF-hand se define como una estructura secundaria hélice-giro-hélice y tiene una horquilla capaz de unir el ion Ca^{2+} . La identidad de estos ligandos está

conservada parcialmente en la mayoría de los motif EF-hand. Existen varios motifs EF-hand no canónicos y pueden encontrarse por pares, como es el caso de las proteínas distrofinas (Blake, Weir et al. 2002; Waite, Brown et al. 2012), éstos forman dominios discretos, la mayoría de los miembros de estas familias tienen 2, 4 o 6 motifs EF-hand (Gifford, Walsh et al. 2007). Las proteínas de unión a calcio EF-hand tienen un papel fundamental desde el inicio de la formación de una célula durante la mitosis y al final de la muerte celular programa o apoptosis (Berridge, Bootman et al. 1998; Berridge, Lipp et al. 2000; Carafoli, Santella et al. 2001; Kahl and Means 2003). Funcionalmente las proteínas que contienen motifs EF-hand se dividen en dos clases: las proteínas sensoras de calcio y las proteínas moduladoras de calcio. La versatilidad del motif EF-hand se ve reflejada en el crecimiento de la base de datos de estructuras tridimensional de proteínas que contienen el motif EF-hand demostrando que el motif EF-hand participa en una gran diversidad de conformaciones, de organización de dominios y de respuestas al calcio (Nelson and Chazin 1998; Lewit-Bentley and Rety 2000). Los efectos conformacionales del calcio unido son variados permitiendo en algunos casos la formación de nuevos sitios de interacción con una proteína blanco y repercutiendo en su función. Las proteínas que contienen dominios EF-hand tienen diferente sensibilidad al calcio reflejando la habilidad intrínseca de unión de los motif EF-hand y su grado de cooperatividad con el calcio. También factores adicionales pueden influir en la habilidad del motif EF-hand de unir calcio, como su preferencia por el magnesio (Mg^{2+}), el cual es un catión con propiedades químicas muy similares al calcio y que se encuentra a una concentración mayor que el calcio en el citoplasma (Gifford, Walsh et al. 2007). La interacción con otras proteínas también puede influir en su capacidad de unión. Sin embargo el mecanismo exacto de los motif EF-hand que dan origen a su diversidad y por lo tanto que gobiernan su función son poco conocidos (Grabarek 2006) debido a que existen muy pocas proteínas con motif EF-hand cristalizadas.

En la actualidad hay pocos reportes de la participación de los dominios EF-hand en la función de las distrofinas Dp71 y Dp40 en modelos neurales. Uno de estos artículos demostró que en la línea celular PC12 la distrofina Dp71d es fosforilada en condiciones basales en la serina y treonina por proteínas cinasas endógenas, además de que un incremento en el influjo de calcio producido por despolarización incrementa la fosforilación de la Dp71d y su distribución en el núcleo (Calderilla-Barbosa, Ortega et al. 2006), por lo que parte de este efecto podría deberse a la presencia de los motifs EF-hand. Por otro lado en dos estudios realizados con proteínas truncas que no contienen el dominio WW pero si los motif EF-hand se demostró que estos motifs son suficientes para interactuar con β -distroglicano. Además se ha reportado que la presencia de ambos motif EF-hand son necesarios para la interacción adecuada del dominio WW con β -distroglicano (Chung and Campanelli 1999; Rentschler, Linn et al. 1999). También Aragón y colaboradores demostraron que cambios puntuales (de Leucinas por prolinas) en posibles NES (*Nuclear export signal*) que se encuentran en los motifs EF-hand promueven una distribución predominantemente nuclear en células PC12 (Aragon, Martinez-Herrera et al. 2015).

1.7 Dominio ZZ

El dominio ZZ está compuesto de aproximadamente 45 aminoácidos que inicialmente fue identificado en la proteína distrofina Dp427 kDa (Legge, Martinez-Yamout et al. 2004). Las proteínas que contienen dominios ZZ pueden ser agrupadas en 4 grupos funcionales: (1) Modificadores de la cromatina; (2) andamio del citoesqueleto; (3) con funciones para conjugar o unir ubiquitina; y (4) como proteínas que modifican los canales iónicos o receptores de membrana. En el 2004 se observó que la cisteína 3340 del dominio ZZ de la distrofina completa es necesaria para su unión con β -distroglicano. Además se reportó un caso de DMD con una mutación sin

sentido de C3340Y que podría alterar la interacción de la proteína con la membrana celular por afectar la unión con β -dístroglicano (Ishikawa-Sakurai, Yoshida et al. 2004). Karim y colaboradores demostraron que el zinc tiene un efecto en la conformación del dominio ZZ además de haber identificado dos regiones de unión a zinc, además identificaron que los residuos 3326-3332 del dominio ZZ son cruciales para interactuar con β -dístroglicano (Hnia, Zouiten et al. 2007). La mayoría de los reportes sobre el dominio ZZ de la distrofina lo relacionan con β -dístroglicano y a la fecha no se conoce otra función adicional a participar como andamio del citoesqueleto. Recientemente se ha observado una distribución nuclear para varias isoformas cortas de la distrofina (Dp71 y Dp40), en células PC12 (Aragon, Martinez-Herrera et al. 2015) lo que podría sugerir una función diferente en el núcleo de la que tienen en el citoplasma. También se ha reportado que el dominio ZZ de la distrofina Dp71d participa en el importe nuclear en una línea celular de músculo (Suarez-Sanchez, Aguilar et al. 2014).

1.8 El complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) en cerebro

La función de la Dp427 se ha estudiado ampliamente en células musculares. Aunque su función no se conoce por completo se sabe que es una proteína andamio que sirve para mantener la integridad del músculo esquelético mediante los 4 diferentes dominios que la componen: 1) El extremo N-terminal que contiene un dominio de unión de actina, 2) un dominio tipo bastón que le proporciona flexibilidad a la proteína, 3) un dominio rico en cisteínas conformado de los motifs WW, EF-Hand1 y EF-Hand2 que es capaz de unirse a proteínas integrales de membrana (sarcoglicanos y β -dístroglicanos) que interactúan con proteínas de matriz extracelular y el 4) dominio carboxilo terminal que le ayuda a interaccionar con proteínas del

citosol como sintrofinas y distrobrevinas (Ervasti and Campbell 1991; SUZUKI, YOSHIDA et al. 1994; Durbeej and Campbell 2002)

En el cerebro a diferencia del músculo se han reportado diferentes complejos DAPC lo cual podría deberse a que se expresan un mayor número de isoformas y a la presencia de otras proteínas que forman parte del complejo DAPC en cerebro, como β -distrobrevinas y γ -sintrofinas, que no se han reportado en músculo. (Blake, Nawrotzki et al. 1998; Piluso, Mirabella et al. 2000; Aragón, González-Reyes et al. 2018).

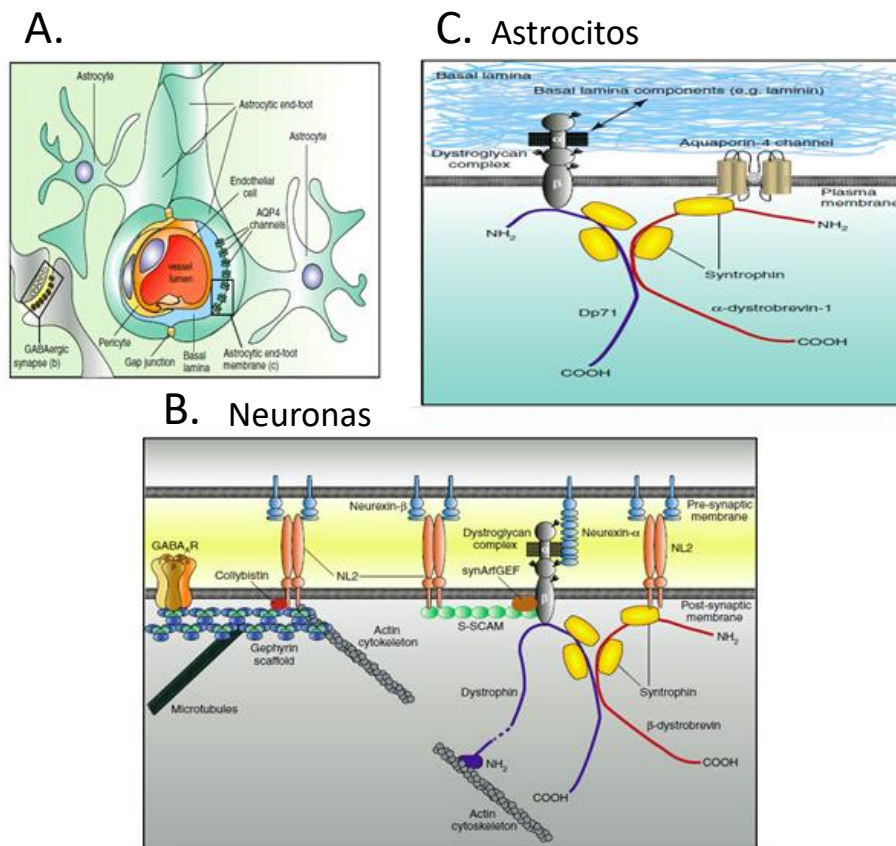


Figura 2. Modelos hipotéticos que describen los complejos tipo DAPC en neuronas y glía. (A) Los complejos tipo DAPC participan en el anclaje de receptores a sitios de membrana especializados y estabilizan receptores gabaérgicos ($GABA_A$ R) en las sinapsis inhibitorias gabaérgicas. (B) Un número de mecanismos moleculares involucran moléculas de adhesión trans-sinápticas y complejos andamio post-sinápticos para determinar la identidad de la sinapsis gabaérgicas a través de la regulación de la acumulación de $GABA_A$ R en la sinapsis. Los complejos de adhesión trans-sinápticos neurexina-neuroligina dirigen el reclutamiento post-sináptico en moléculas andamio sobre los $GABA_A$ R anclados. La proteína de andamio gefirina es esencial para los agregados de $GABA_A$ R. Gefirina es reclutado a las membranas post-sinápticas seguido por la activación del GEF “collybistin” mediada por NL2. (C) Los complejos tipo DAPC comprenden a la Dp71, distroglicanos y sintrofinas que se encuentran en las terminales axónicas de astrocitos perivasculares donde se agrupan y co-purifican con canales AQP4.

Se ha propuesto que en el cerebro la Dp427 es exclusiva de neuronas y que puede estar asociada con diferentes poblaciones de este tipo de células, incluyendo células piramidales del hipocampo, corticales y células de Purkinje del cerebelo (Lidov, Byers et al. 1990). Aunque al principio se pensaba que la distrofina estaba asociada con sinapsis excitatorias, varios estudios independientes han demostrado que la distrofina de longitud completa colocaliza con conjuntos de receptores GABA ($GABA_A$ R) en ciertas áreas del cerebro (Knuesel, Mastrocola et al. 1999; Brunig, Suter et al. 2002; Levi, Grady et al. 2002) (**Figura 2**). Una de las primeras evidencias sugirió una conexión funcional entre las distrofinas y los $GABA_A$ R debido a que se descubrió que $GABA_A$ R- $\alpha 1$ y $-\alpha 2$ se encontraban en menor cantidad en neuronas de hipocampo y de cerebelo de ratones *mdx* (Knuesel, Mastrocola et al. 1999). Además se ha demostrado la presencia de agregados de distrofinas y complejos DAPC en terminales gabaérgicas aun en la ausencia de agregados de $GABA_A$ Rs (Brunig, Suter et al. 2002). Igualmente se ha observado que las isoformas Dp71d y la Dp71f se localizan principalmente en neuronas GABAérgicas bipolares y neuronas multipolares del hipocampo respectivamente, y que la composición de distrobrevinas de cada uno de los complejos entre Dp71f y Dp71d varía ligeramente (Rodríguez-Muñoz, del Carmen Cárdenas-Aguayo et al. 2015).

La proteína de andamio gepirina la cual es un componente de las densidades post-sinápticas (PSD) en sinapsis inhibitorias depende de la presencia de GABA_AR para el reclutamiento de sinapsis gabaérgicas. Lo que resulta interesante es que al expresar a la distrofina en ratones *mdx* mediante un “exón skipping” los agregados de GABA_AR se restablecen, lo que sugiere una conexión directa entre la síntesis de Dp427 y los agregados del receptor (Vaillend, Perronnet et al. 2010). Además se demostró que Dp71 es capaz de interactuar con varias proteínas sinápticas como la subunidad GluR₁₋₃ del receptor de glutamato AMPA, las subunidades NR2A-B del receptor de glutamato del subtipo NMDA, la proteína adaptadora asociada a NMDA_R, PSD95, el canal de potasio 1 (GIRK1) y las cinasas de adhesión focal: FAK y C-Src. Igualmente se ha demostrado que la Dp71d y Dp71f son capaces de interactuar asociadas a receptores de glutamato post-sinápticos en densidades post-sinápticas. Además la ausencia de Dp71 altera la organización de la sinapsis glutamatérgica al deslocalizarse las proteínas PSD-95 (*Post synaptic density protein 95*) y VGLUT1 (*Vesicle glutamate transporter 1*) evitando posiblemente su interacción con componentes de procesos de exocitosis en las densidades post-sinápticas (Daoud, Candelario-Martínez et al. 2009). También se ha demostrado que durante el proceso de diferenciación neuronal de células PC12 el complejo DAPC interacciona con la sintasa de óxido nítrico y pierde la interacción con α -, β - y γ -sarcoglicano (Romo-Yáñez, Ceja et al. 2007).

1.9 El complejo SNARE

La comunicación entre neuronas se lleva a cabo en las sinapsis mediante la liberación de neurotransmisores, los cuales son transportados dentro de organelos uniformes conocidos como vesículas sinápticas. Las vesículas sinápticas al ser liberadas en la hendidura sináptica producen un potencial de acción, lo que conduce a la apertura de los canales de calcio y el incremento de calcio en el citoplasma más de 100,000 veces en la zona activa de la terminal nerviosa presináptica (Sudhof 2004). El calcio interactúa con sinaptotagmina, una proteína localizada en la membrana de las vesículas sinápticas, lo que promueve la exocitosis de vesículas completando la fusión de las vesículas que previamente se han anclado (*docking*) y preparado (*priming*) en la zona activa causando la liberación de los neurotransmisores en la hendidura sináptica y produciendo la unión de los transmisores a receptores asociados con las densidades post-sinápticas. Después de la apertura del poro de fusión (que libera neurotransmisores) las vesículas sinápticas sufren un proceso de endocitosis o reciclamiento mediado por clatrina. Se han propuesto tres rutas alternativas de endocitosis: 1) el relleno local sin desanclar con neurotransmisores, 2) el relleno de neurotransmisores con vesículas sinápticas ancladas y 3) el relleno de las vesículas sinápticas que pasan por un intermediario endosomal (Buckley 1994; Südhof and Rizo 2011). Aunque se ha avanzado en identificar moléculas que participan en la regulación de la exocitosis de vesículas sinápticas como es el caso de las proteínas del complejo SNARE, las proteínas Rab y las proteínas tipo Sec1/Munc18 (proteínas tipo SM) aún no se saben los pasos específicos que se presentan en la ruta de la exocitosis y endocitosis (Südhof and Rizo 2011).

El complejo SNARE está formado por tres proteínas que participan en la fusión de vesículas. La proteína sinaptobrevina (También llamada VAMP; *vesicle associated membrane protein*), syntaxina 1A (STX1A) y SNAP25 (Synaptosome associated protein 25) pertenecen a las familias de las

proteínas SNARE debido a que todas poseen el motif SNARE que consiste en una estructura coiled-coil estrecha y extendida formada de 60 a 70 residuos de ocho hepta-repetidos (Poirier, Xiao et al. 1998; Sutton, Fasshauer et al. 1998). Los motif SNARE están divididos en 4 subtipos. Sintaxina 1A contiene un motif SNARE Qa, SNAP25 tiene el motif SNARE Qb y Qc y VAMP tiene el motif SNARE R (Kloepper, Kienle et al. 2007). Los motif SNARE de STX1A y VAMP interaccionan, mediante un conector corto localizado en el carboxilo terminal, con la región transmembranal (TMR por sus siglas en inglés; *transmembrane region*). Por otro lado, los motif SNARE de SNAP25 aunque carecen de una TMR están conectados mediante un conector palmitoilado. Además, STX1A tiene en el N-terminal un dominio Habc que consiste en tres hélices anti-paralelas separadas por un conector flexible. El dominio Habc contiene en su extremo N-terminal una región estrecha denominada péptido N que recluta proteínas SM que se encargan de promover la nucleación (también llamada zippering) o formación del complejo SNARE. Donde VAMP y sinaptotagmina se localizan en la membrana de las vesículas sinápticas y en la membrana presináptica se localizan STX1A y SNAP25 (Jahn and Fasshauer 2012).

El ciclo SNARE comienza cuando los 4 SNARE motif se fusionan o ensamblan formando una estructura (coiled-coil) de 4 hélices. Dos hélices pertenecen a SNAP25 y una hélice a STX1A y VAMP. El haz de 4 hélices del complejo SNARE está formado principalmente de interacciones hidrofóbicas (Sutton, Fasshauer et al. 1998).

Aunque el proceso de ensamblaje todavía no es claro se sabe qué factores participan en el ciclo de ensamble y desensamble del complejo SNARE. La unión de la proteína tipo SM (por Sec1 y Munc18) como Munc18 a la conformación cerrada de STX1A es esencial para el anclaje (*docking*) en la exocitosis de células cromafines (Gerber, Rah et al. 2008). Posteriormente un proceso dependiente de ATP promueve que las vesículas ancladas en la zona activa se vuelvan responsivas al incremento de calcio causado por la

despolarización de la membrana (Südhof 2004). Otros estudios demostraron que las proteínas tipo SM (por Sec1 y Munc18) interaccionan con proteínas SNARE mediante un mecanismo diverso y variable. Por ejemplo, Munc18 se une a STX1A que también parece prevenir la unión de syntaxin-1 al complejo SNARE de 4 hélices previo al anclaje, lo cual sugiere que Munc18 (Sec1p en levadura) es un inhibidor de la fusión de las vesículas a la membrana (Dulubova, Sugita et al. 1999; Wu, Schulze et al. 2001). Sin embargo, la pérdida de Munc18 no incrementa la fusión de las vesículas a la membrana (Verhage, Maia et al. 2000), y su homólogo en levadura (Sec1) se une al complejo SNARE una vez ensamblado (Carr, Grote et al. 1999), por lo que es posible que sean otras proteínas las que confieran especificidad a la reacción de fusión de las vesículas a la membrana. Por otro lado, la proteína Rab3 la cual pertenece a la familia de GTPasas es el eje central de la formación de un complejo en la zona activa el cual es esencial para la preparación (*priming*) de las vesículas sinápticas mediante el reclutamiento de proteínas en un proceso dependiente de GTP (Izumi, Gomi et al. 2003). En este proceso participa la proteína Munc13 (sin relación con Munc-18), las proteínas que interactúan con Rab3 (RIMs), las proteínas de unión a RIM (RIM-BPs) y las alfas-liprininas (Zhen and Jin 1999). El dominio dedos de zinc del N-terminal de la proteína RIM interacciona con el dominio C2A del N-terminal de Munc13 además de interaccionar con RIM-BP y α -liprininas mediante sus dominios SH3 y C2B RIM respectivamente (Schoch, Castillo et al. 2002; Lu, Machius et al. 2006). Posteriormente este complejo es anclado a las vesículas sinápticas mediante la unión de RIM a Rab3 y a la membrana plasmática mediante la unión de las proteínas RIM y RIM-BP así como a los canales de calcio tipo N y P/Q (Südhof and Rizo 2011).

Por último se ha demostrado que el factor sensible a N-metilmaleamida (NSF) actúa en la disociación de los componentes del complejo SNARE a monómeros mediante su actividad ATPasa en conjunto con las proteínas de unión a NSF (SNAPs) lo que permite que las proteínas SNARE entren a un nuevo ciclo de fusión (Söllner, Bennett et al. 1993; Südhof and Rizo 2011).

2. La línea celular PC12 como modelo de estudio para las distrofinas

La línea celular PC12 se estableció a partir de un feocromocitoma de medula adrenal de embriones de rata el cual responde al factor de crecimiento neuronal (NGF), reduciendo la actividad mitótica y provocando que las células adquieran un fenotipo neuronal (Greene and Tischler 1976). La línea celular PC12 es un sistema modelo para el estudio del crecimiento y diferenciación neural. Entre las enzimas marcadoras que expresan estas células son la tirosina hidrolasa (TH) y feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) la cual convierte el precursor TH a dihidroxifenilalanina (DOPA) y norepinefrina a epinefrina respectivamente (Eaton and Duplan 2004).

Estas células presentan 40 cromosomas y no exhiben cambios discernibles en los primeros 70 pasajes. Además, estas células contienen vesículas tipo cromafines. Cuando las células son expuestas al NGF (*Neuronal growth factor*) las células dejan de dividirse y desarrollan ramificaciones con excitabilidad eléctrica y un aumento de la sensibilidad a acetilcolina, al remover el NGF ocurre la degeneración del proceso y la reanudación de la división celular lo que indica que el efecto del NGF puede ser reversible (Dichter, Tischler et al. 1977). El carácter tipo neurona de las células diferenciadas PC12 fue validado por la demostración de que estas células pueden desarrollar sinapsis colinérgicas funcionales con miotubos con una línea celular de músculo esquelético de rata (Schubert, Heinemann et al. 1977).

Las células PC12 contienen principalmente dopamina a diferencia de la médula adrenal donde la catecolamina principal es la norepinefrina. Estas células incorporan catecolaminas del medio por un sistema similar al de neuronas simpáticas y lo almacenan en forma de gránulos tipo cromafines (Tischler and Greene 1978). La liberación de catecolaminas puede ocurrir en respuesta a la despolarización o estimulación con agonistas colinérgicos nicotínicos (Greene and Rein 1977; Schubert and Klier 1977).

Las células PC12 son sensibles al neurotransmisor acetilcolina por la presencia de receptores acetilcolínicos nicotínicos y muscarínicos. Los receptores parecen ser similares a los presentes en neuronas simpáticas ya que presentan reactividad para anticuerpos monoclonales de receptores nicotínicos de cerebro de pollo (Whiting, Schoepfer et al. 1987) y los receptores muscarínicos parecen ser comparables a los presentes en médula adrenal (Jumblatt and Tischler 1982). Otra de las características que hacen de las células PC12 un modelo neuronal es que responden a la estimulación de receptores muscarínicos causando un influjo de Ca^{2+} y un incremento de la hidrólisis de fosfoinosítidos (Pozzan, Di Virgilio et al. 1986; Vicentini, Ambrosini et al. 1986). Las células PC12 presentan un gran número de receptores para adenosina y cuando son expuestas a NGF presentan un incremento de receptores a encefalina (Van Calker and Heumann 1987).

La habilidad de las células PC12 de conducir señales eléctricas está determinada por la presencia de canales iónicos que se localizan en la membrana plasmática. Estos canales regulan selectivamente el flujo transmembranal de Na^+ , K^+ , y Ca^{+2} y la mayoría de ellos son sensibles al voltaje transmembranal (O'Lague and Huttner 1980; Arner and Stallcup 1981). Además, estos canales están involucrados en la propagación del impulso eléctrico, en la liberación de neurotransmisores, en reacciones enzimáticas y de receptores. Los canales iónicos también se han detectado en los conos de crecimiento de las células PC12 tratadas con NGF (O'Lague, Huttner et al. 1985).

Por otro lado Víctor Hamburger demostró que el sistema nervioso requiere un suplemento adecuado de factores tróficos para sobrevivir y desarrollarse (Hamburger and Hamilton 1951). Estudios subsecuentes demostraron que durante el desarrollo del sistema nervioso central se libera el factor de crecimiento neural (NGF) en el tejido blanco donde desencadena una

cascada de señalización mediada por receptores de alta y baja afinidad (Berry, Bindocci et al. 2012).

La diferenciación de células PC12 requiere de la activación sostenida de la ruta ERK (Qui and Green 1992). El NGF induce el arresto del ciclo celular, previene la apoptosis en células privadas de suero y estimula la diferenciación neuronal de las células PC12, como resultado, ocurre la extensión y el crecimiento de las neuritas inducidas por NGF el cual se une a su receptor TrkA activando una serie de cinasas incluyendo Erk1/2 y Akt, para estimular la diferenciación y promover la sobrevivencia de las células neuronales, respectivamente (Greene and Tischler 1976; Greene 1978; Chao 2003; Sun, Watanabe et al. 2006).

El NGF activa de forma pasajera la ruta clásica de Ras, la cual posteriormente activa transitoriamente la ruta ERK (York, Yao et al. 1998). Se ha reportado que el NGF causa la activación sostenida de Rap1 el cual a su vez es responsable de la activación sostenida de B-Raf y la subsecuente diferenciación neural mediada por la ruta ERK en células PC12 (York, Yao et al. 1998). Otros estudios demostraron que induce de manera rápida y sostenida la activación de M-Ras la cual también fosforila ERK y causa la neuritogénesis (Sun, Watanabe et al. 2006).

Por otro lado Rap1 juega un papel importante en la adhesión célula-sustrato mediada por integrinas y la adhesión célula-célula mediada por cadherina lo cual es necesario para la neuritogénesis (Bos 2003; Caron 2003; Bos 2005). Rap1 regula todas las integrinas que están asociadas al citoesqueleto de actina (integrinas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$). Las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y la cinasa ligada a integrinas que interactúa con estas integrinas se requieren para la neuritogénesis inducida por NGF en células PC12 (Zhang, Tarone et al. 1993; Yip and Siu 2001; Mills, Digicaylioglu et al. 2003).

Se ha reportado la expresión del mRNA de las isoformas Dp71d, Dp71f, Dp71e y Dp40 en células PC12. Igualmente, se ha reportado la expresión de la proteína endógena de los grupos Dp71d, Dp71f y Dp71e (Marquez,

Cisneros et al. 2003; Saint Martin, Aragon et al. 2012; Aragón, Martínez-Herrera et al. 2015). Además la expresión de Dp71 es esencial para el crecimiento neurítico en células PC12 (Acosta, Montañez et al. 2004). Varias de las isoformas de Dp71 son expresadas en células PC12 y al parecer la distribución subcelular de las isoformas de Dp71 depende de sus C-terminales (Aragón, Martínez-Herrera et al. 2016).

JUSTIFICACIÓN

Debido a que alteraciones en las distrofinas Dp71 y Dp40 se han relacionado con el déficit cognitivo severo, en pacientes con DMD, es relevante conocer la participación de estas proteínas en el proceso de diferenciación neuronal.

Además analizar la expresión transcripcional de las distrofinas en diferentes tipos celulares de cerebro y retina ayudará a proponer otras estrategias experimentales para conocer la participación de estas proteínas en el proceso de diferenciación neuronal.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la sobre-expresión de las distrofinas Dp40, Dp40_{L170P} y Dp71_{e Δ 71} en la diferenciación de las células PC12 y determinar los niveles de expresión de los mRNA de las distrofinas en cerebro y retina.

OBJETIVOS PARTICULARES SECCIÓN 1

Participación de las distrofinas Dp40 y Dp40_{L170P} en el proceso de diferenciación neuronal de células PC12

1. Analizar el efecto de las distrofinas Dp40 y Dp40_{L170P} en el crecimiento neurítico de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas nueve días con factor de crecimiento neural (NGF).
2. Evaluar la expresión de marcadores de diferenciación neuronal en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar y diferenciadas con NGF.
3. Analizar en forma comparativa el perfil de expresión proteico de células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF.
4. Identificar a las proteínas con expresión diferencial por espectrometría de masas.
5. Validar la expresión diferencial de proteínas sobre-expresadas por la distrofina Dp40_{L170P}.
6. Estudiar la distribución celular de la proteína Dp40_{ΔL170} en células PC12 Tet-On.
7. Proponer un modelo que explique la función de las proteínas Dp40 y Dp40_{L170P}.

MATERIALES Y METODOS SECCIÓN 1

I. Cultivo de las células PC12 y diferenciación celular

Las líneas celulares PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} y PC12-Dp71e_{Δ71} utilizadas durante este proyecto se han generado durante proyectos de investigación anteriores. Estas líneas celulares que expresan el epítopo c-Myc y las proteínas Dp40, Dp40_{L170P} y Dp71e_{Δ71} están clonadas en el vector de expresión pTRE2pur-Myc el cual agrega el epítopo c-Myc (formado de 14 aminoácidos) en el extremo amino terminal produciendo las proteínas recombinantes Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y Myc-Dp71e_{Δ71}. Además, se incluyó como control el vector vacío circularizado pTRE2pur-Myc como control. Los vectores de expresión que expresan las proteínas recombinantes son el vector pTRE2pur-Myc (usado como control), pTRE2pur-Myc/Dp40, pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} y pTRE2pur-Myc/Dp71e_{Δ71}, los cuales fueron transfectados de forma estable en células PC12 Tet-On (células que contienen el sistema de regulación Tet-On) generando las células PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} y PC12-Dp71e_{Δ71}.

Las células PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P}, PC12-Dp71e_{Δ71} se cultivaron en cajas de plástico P100 con medio de crecimiento DMEM completo (Gibco) complementado con 10% de suero fetal de caballo (Gibco), 5% de suero fetal de bovino (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 1 mg/ml de estreptomina (Gibco), 0.25 µg/ml de micostatina (Gibco), entre 400-500 µg/ml de geneticina y 200-250 ng/ml de puromicina a 37°C, en una atmósfera saturada de agua con 5% de CO₂. Las células se crecieron a una densidad de 60-80% de confluencia en cajas de plástico P60 o P100, tratadas previamente con colágena o sobre cubreobjetos tratados con poli-L-lisina durante 4 horas y posteriormente se trataron con 100 ng/ml de doxiciclina para inducir la expresión de las proteínas recombinantes. Después el medio se reemplazó por medio de diferenciación (medio

completo con 50 ng/ml de NGF 2.5S, Invitrogen) adicionando nuevamente 100 ng/ml de doxiciclina y reemplazando el medio cada tercer día.

II. Verificación de la integración de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} en el DNA genómico de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}

2.1 Extracción de DNA genómico

Se cosecharon cajas P60 al 80-90% confluencia con las líneas celulares PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} y se centrifugaron a 3,000 mil rpm durante 5 minutos. Después se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla celular con PBS 1X. Se dejó secar la pastilla y se agregaron 400 µl de buffer de lisis (500 mM Tris-HCL pH=8, 100 mM EDTA y 0.5% sarcosil). Se adicionó Rnasa A (10 mg/ml) a una concentración final de 0.1 µg/µl y se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se adicionó proteinasa K (stock 20 mg/ml) a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó a 65°C durante 1 hora. Se adicionó un volumen de fenol saturado con Tris-HCl pH=8 y se mezcló por inversión durante 3-5 minutos para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm durante 2 minutos. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo y se volvió a adicionar un volumen de fenol saturado con Tris-HCl y se recuperó la fase acuosa para lavar 2 veces con 1 volumen de cloroformo y centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos. Después de recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo se agregó 1/2 volumen de acetato de amonio (7.5 M) y 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó precipitar a -20°C. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos y se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo para dejar precipitar a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 5 minutos y se dejó secar la pastilla para resuspenderla con agua bidestilada estéril. Las alícuotas se almacenaron a -20°C.

2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se usaron 2 μ l del DNA genómico extraído de las líneas celulares PC12Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} y se utilizó la polimerasa del kit Taq polymerase recombinant de Thermo scientific siguiendo las recomendaciones del proveedor para la amplificación de los fragmentos correspondientes clonados en los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}, utilizando los oligos rATGDp71 y pTRE-3' que se muestran en la **tabla 1**. Estos oligos flanquean el comienzo del exón 1 de la Dp40 y parte de la secuencia del vector pTRE2pur-Myc localizado en el extremo 3'.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
rATGDp71	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG
pTRE-3'	AGTTTGGGGACCCTTGATTGTT

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}.

III. Preparación de extracto proteico

Las células PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} y PC12-Dp71e Δ 71 se removieron de las cajas y se recuperaron por centrifugación. Posteriormente las células se resuspendieron en 160 μ l de buffer de extracción 2 (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% de Tritón X-100) con el inhibidor de proteasas COMPLETE (Roche, Inc). La concentración de la proteína se determinó mediante el método de Bradford. El extracto de proteína total se resuspendió en buffer de electroforesis (Tris-HCl 75 mM, SDS 15 %, β -mercapto-etanol 5%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.001%). Los extractos proteicos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

IV. Inmunodetección en fase sólida

Se prepararon alícuotas de 60-80 μg de proteína total y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12%. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante 18-20 horas a 70 mA y a una temperatura de 4°C. La membrana de nitrocelulosa con las proteínas de interés se bloquearon con leche descremada al 5% en buffer TBS-T 1X (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05%), durante 2 horas en agitación a TA. Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario (**Tabla 2**) correspondiente para cada proteína diluido en buffer TBS-T 1X solo o con leche descremada al 5%. Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa para la detección del anticuerpo primario a una dilución de 1:10000, en buffer de bloqueo. Las bandas inmunoreactivas se detectaron utilizando el sistema Western-Blot ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Como marcador de peso molecular se usaron 3.5 μl de "Prestained SDS-PAGE Standard, Broad Range (Bio-Rad).

V. Análisis de la diferenciación celular

El análisis de la diferenciación de las células PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} y PC12-Dp71e _{Δ 71} se realizó mediante la toma de micrografías con un microscopio invertido en donde se eligieron 10 campos al azar de cada una de las cajas de células, a los 9 días de diferenciación con NGF y tratadas con doxiciclina (100 ng/ml). Se determinó el porcentaje de diferenciación contando todas las células que presentaron neuritas sin importar su tamaño. La longitud de las neuritas se determinó considerando las células que presentaron una neurita con una longitud mayor a dos cuerpos celulares con el programa AxioVision LE Rel. 4.7 (Zeiss) y posteriormente se obtuvo el promedio de la longitud de las neuritas de las células diferenciadas.

VI. Ensayos de inmunofluorescencia indirecta

Las células PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} y PC12-Dp71e_{Δ71} se crecieron sobre cubreobjetos, previamente tratados con poli-L-lisina. Los cubreobjetos se retiraron de la caja de 6 pozos y se lavaron con buffer de citoesqueleto (CB) (MES 10 mM, NaCl 150 mM, EGTA 5 mM, MgCl₂ 5 mM, Glucosa 5 mM). Posteriormente las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.4% y paraformaldehído al 4%, en buffer CB durante 5 minutos y se lavaron tres veces por 5 minutos con buffer CB y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% en buffer CB durante 20 minutos. A continuación las células se lavaron con PBS-A (KCl 2.68 mM, KH₂PO₄ 1.47 mM, NaCl 136.9 mM, Na₂HPO₄ 1.45 mM, pH 7.4), se bloquearon los sitios inespecíficos con 0.5% de gelatina en PBS durante 40 minutos, los cubreobjetos se lavaron con PBS-A y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente (**Tabla 2**) diluido en PBS-A. Al día siguiente los cubreobjetos se lavaron con PBS para quitar el exceso de anticuerpo y la muestra se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente (TA) con el anticuerpo secundario Alexa488 o Alexa594 (Amershamlife Science Products) para los anticuerpos monoclonales o policlonales, respectivamente, diluido en PBS-A. Por último, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Vectashield (Vector laboratorios, Inc.). Las preparaciones se analizaron con el microscopio confocal Leica TCS SP8 utilizando el objetivo 40X o 100X. El porcentaje de inmunoreactividad del epitope c-Myc entre núcleo y citoplasma de todas las líneas celulares se obtuvo cuantificando 5 células por cada una de las tres replicas biológica (un total de 15 células). Para calcular la intensidad de fluorescencia y el porcentaje de colocalización se consideró una imagen de cada una de las 3 réplicas biológicas independientes.

Anticuerpo	Naturaleza	Especificidad	Concentración
c-Myc ¹	Monoclonal de ratón	Epítotope c-Myc	WB: 1:200 IF: 1:20
Actina ¹	Monoclonal de ratón	β-Actina	WB:1:200
NeuN ² (Rbfox3)	Monoclonal de ratón	N/A	WB:1:5000 IF:1:100
NeuN ³ (Rbfox3)	Monoclonal de conejo	N/A	IF: 1:100
Tirosina Hidroxilasa ⁴ (TH)	Policlonal de conejo	N/A	WB: 1:100
α-Internexina ⁴	Monoclonal de conejo	N/A	WB: 1:15000 IF: 1:300
VAMP 1/2 ¹	Monoclonal de ratón	N/A	WB: 1:50
HspB1 ⁴	Policlonal de conejo	N/A	WB: 1:500 IF: 1:100
NF-L ⁴	Monoclonal de ratón	N/A	WB: 1:5000

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la inmunodetección en fase sólida e inmunofluorescencia indirecta. ¹Obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, inc.; ²Obtenido de Merck Millipore®; ³Obtenido de Abcam; WB, dilución para Western Blot; IF, dilución para Inmunofluorescencia.

VII. Geles en dos dimensiones (2-DE)

7.1 Extracción de proteínas

Se recuperaron las células del medio de cultivo y se centrifugarán a 7,000 r.p.m. durante 5 minutos. Después la pastilla se lavó 3 veces con PBS 1X. La pastilla se dejó secar, posteriormente se resuspendió en 200 µl de buffer de lisis 2-DE (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 2% IPG Buffer, 40 mM DTT) y se dejó en agitación a TA por 30 minutos. Las muestras se sonicaron por 2:30 minutos (amplitud 50%, pulso 15 segundos y descanso 30 segundos) y se centrifugaron 15 minutos a 12, 000 r.p.m. para eliminar los restos celulares y colocar la fase acuosa en un tubo nuevo. Se usó el kit 2-D clean-up kit (GE Healthcare) para retirar el exceso de sales y se resuspendió la pastilla en un volumen entre 120-150 µl de buffer de hidratación dependiendo el tamaño de la pastilla.

7.2 Protocolo para primera dimensión

Hidratación

Se colocó una tira de 7 cm en un volumen máximo de 125 µl, el cual debe contener 200 µg de proteína, buffer de hidratación y 2 µl de azul de bromofenol (1% de azul de bromo fenol, tris-base 50 mM). Se retiró el plástico de la tira y se colocó en un carril de la placa de hidratación con el extremo del gel en contacto con los 125 µl del extracto evitando que se formen burbujas. Se dejó incubar durante 30 minutos a TA para que la muestra sea absorbida por el gel. Después se colocó aceite mineral hasta cubrir la tira completamente (1.5 ml por cada carril), se tapó la placa de hidratación y se dejó hidratando toda la noche durante un lapso de 16 a 18 horas.

Primera dimensión por isoelectroenfoque (IEE),

Se retiró el aceite mineral de las tiras hidratadas, pasando cada tira del lado del plástico sobre papel (2 o 3 veces). A continuación se colocó cada tira en la charola de isoelectroenfoque con el gel hacia arriba de acuerdo a lo indicado en la charola considerando la longitud de la tira y el extremo positivo de esta. En cada extremo de la tira se colocaron pequeñas almohadillas de papel previamente humedecidas con 160 μ l de agua milli-Q. Las almohadillas deben cubrir al menos 3 mm del gel. Se cubrió cada carril donde se encuentran las tiras y los carriles externos con aceite mineral (9 ml aproximadamente). Y se inició la corrida con el programa correspondiente a tiras de 7 cm con el equipo Ettan IPGphor3 (GE Healthcare).

Equilibrio de tiras

Una vez finalizada la corrida de isoelectroenfoque, se retiraron las tiras y se eliminó el exceso de aceite mineral utilizando tiras de papel filtro. Colocando las tiras sobre papel absorbente con el gel hacia arriba. Después se colocó la tira en un tubo con 3ml de buffer de equilibrio I (Buffer de equilibrio con 30 mg de DTT). Se incubó en agitación a TA por 15 min. Se retiró el exceso de buffer de equilibrio I de la misma forma como se retira el aceite mineral. Posteriormente se colocó la tira en un tubo con 3 ml de buffer de equilibrio II (Buffer de equilibrio con 75 mg de iodoacetamida) y se incubó en agitación a TA por 15 min. El exceso de buffer de equilibrio II se retiró de la misma forma como se retira el aceite mineral.

7.3 Protocolo para la segunda dimensión

SDS-PAGE

Las tiras se sumergieron en el buffer de corrida por algunos segundos y colocaron encima de un gel de 12% SDS-PAGE realizado una hora antes, el gel de la tira debe estar en contacto con el vidrio y el extremo positivo de esta del lado izquierdo. Se colocó un cuadrado de papel filtro de 5 mm x 5 mm aproximadamente el cual contiene 8 µl de marcador de peso molecular al lado positivo de la tira. Se alinearon la tira y el marcador de peso molecular y se cubrieron ambos con 700 µl de agarosa (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 0.1% de SDS, 0.5% de agarosa, 0.002% de azul de bromo fenol) y se dejó gelificar. Se inició la corrida a 80 volts durante 20 minutos y posteriormente se dejó correr el gel a 100 volts hasta que el azul de bromofenol llegue a la parte final del gel.

7.4 Tinción de geles bidimensionales

Fijación

Una vez finalizada la electroforesis se retiró el gel cuidadosamente y se colocó en un recipiente limpio. Se dieron tres lavados de 5 min cada uno con agua mili-Q. Se retiró el exceso de agua y se adicionó la solución de fijación (30% de etanol y 10% de ácido acético), cubriendo el recipiente y dejando en agitación toda la noche.

Tinción

Los geles se lavaron los geles con agua milli-Q por 5 min y se les adicionó 50 ml de coomassie coloidal a cada gel y se dejaron en agitación durante toda la noche.

Destinción

Se retiró el colorante y se almacenó en un recipiente. Posteriormente se dieron 3 lavados con agua milli-Q de 30 min cada uno, o hasta que los manchas empiecen a aparecer en el gel. Una vez que los manchas empiezan a visualizarse se retiró el agua milli-Q y se colocaron 50 ml de coomassie coloidal nuevo para reteñir estas manchas durante toda la noche. Se retiró el colorante y se almacenó en un recipiente. Por último, se dio un lavado de 15 min con agua milli-Q.

7.5 Obtención de imágenes

Después de lavar los geles con agua milli-Q los geles están listos para adquirir la imagen en el transluminador imageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Las imágenes fueron obtenidas en escala de grises en el formato .gel para su análisis en el software ImageMaster 2D platinum 7.

VII. Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS)

Las manchas que presentan expresión diferencial son escindidas y colocadas en tubo con 50 µl de solución para desteñir (50% v/v metanol y 5% v/v de ácido acético) y ser lavadas con agua milli-Q. Los fragmentos de los geles fueron rehidratados por incubación en 100 µl of ACN (acetonitrilo) por 10 minutos y el sobrenadante fue descartado; este paso se repitió. Después las piezas de geles fueron rehidratados con 200 ng de tripsina (Promega V528A) en 50 mM de NH₄HCO₃ y 5% de ACN. Los fragmentos de geles fueron incubados toda la noche a 37°C. Después los péptidos fueron extraídos con 40 µl de ACN al 50% y ácido fórmico al 5%. El volumen final fue reducido en un concentrador (Eppendorf 5301). A los péptidos de cada muestra se les removió el exceso de sales usando columnas C18 (Zip TipC18). Una mezcla en proporción 1:1 entre la solución del péptido y la

solución de la matriz (5 mg/ml CHCA 50% v/v y ácido trifluoroacético al 0.1%) se analizaron usando el espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Sciex). Solo un corte fue permitido con la tripsina. Las modificaciones biológicas y las sustituciones ácidas fueron consideradas como modificaciones. El límite de la proteína detectada fue de 66% y la tolerancia del precursor de masas fue de 0.5 al 1 DA. Los datos generados fueron comparados con la base de datos de *Rattus norvegicus* usando el software Protein Pilot (versión 2.0.1) y el algoritmo Mascot (Perkins, Pappin et al. 1999).

IX. Mutagénesis sitio dirigida

Para realizar la delección del codón que codifica para la leucina 170 en la Dp40 se usó del kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Agilent-technologies) y como molde el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}. Se usaron los oligonucleótidos indicados en la **tabla 3** para generar una delección del aminoácido antes mencionado. El programa utilizado en el termociclador estaba compuesto por el primer segmento de un ciclo a 95°C por 2 minutos, el segundo segmentos de 18 ciclos a 95C por 20 segundos, 60C por 10 segundos y 68C por 30 segundos. Por último, un segmento de un ciclo a 68C por 5 minutos. Posteriormente de la digestión del DNA parental con la enzima DpnI se realizó la transformación de bacterias ultra-competentes XL10-Gold con el DNA plasmídico que contiene la delección y un gen de resistencia a ampicilina para seleccionar las bacterias que incorporaron el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{ΔL170}.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Dp40170d-5	CGTAGACTGGGTCTTCTTCATGATTCTATTCAAA TCC
Dp40170d-3	GGATTTGAATAGAATCATGAAGAAGACCCAGTC TACG

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para generar la delección del residuo 170 en la Dp40.

10.1 Reacciones de secuenciación

Se seleccionó una colonia y se extrajo DNA plasmídico para verificar mediante secuenciación si se realizó la delección de tres pares de bases del codón 170. Se colocaron en un tubo 8 µl de la mezcla del kit de secuenciación BigDye terminator v3.1 (Applied Biosystems), 14 µl de agua milliQ, 1 µl DNA plasmídico (a una concentración de 400 ng/µl) y 4 µl de cada uno de los siguientes oligonucleótidos (a una concentración de 200 ng/ml) indicados en la **tabla 5**. Después la mezcla se colocó en el termociclador a 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos y 60°C por 4 minutos, seguidos de 5 minutos a 60°C. A la mezcla de 20 µl se le adicionaron 80 µl de isopropanol al 75% y se incubó a TA por 15 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. A la pastilla se le adicionaron 250 µl de isopropanol al 75% y se centrifugó con la misma condición previamente mencionada. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente la pastilla se utilizó para resuspender el DNA y este se secuenció.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
rATGDp71	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG
562 U	CAGTTGGGTGAAGTTGCCTCCTTTG
247 L	TCTGCAGGATATCCATGGGCTGATC
EcoRI pTRE-Myc (pTRE-5')	ATGGCCATGGCTAGTAGAATTCACATGGCATCAATGC AGAAGCTG

Tabla 4. Oligonucleótidos para la verificación de la secuencia de la Dp40_{ΔL170}.

XI. Transfecciones transitorias

Se colocaron células PC12-control, PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} y PC12-Dp71e_{Δ71} al 60% de confluencia con medio DMEM completo (mencionado previamente en la sección de cultivo celular). Se dejó que las células se adhieran al cubreobjeto previamente tratado con poli-L-lisina durante 24 horas aproximadamente. Se colocaron en un tubo 100 μl de optimen (Gibco) adicionado con 2-3 μg de DNA plasmídico del vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{ΔL170}. Igualmente en otro tubo se colocaron 100 μl de optimen adicionado con 5 μl de lipofectamina 2000 (invitrogen). Las mezclas se incubaron a TA durante 10 minutos y posteriormente se combinaron pasando la mezcla que contiene optimen y DNA al tubo que contiene optimen y lipofectamina incubando durante 40 minutos a TA para que se formen los complejos necesarios para la transfección. Posteriormente se agregaron 800 μl a la mezcla para completar la mezcla de transfección. Se colocó la mezcla de transfección al cultivo celular el cual previamente se lavó dos veces con optimen para retirar los restos de suero, el cual podría interferir con la transfección. Se incubaron las células durante 5 horas a 37°C en una atmosfera saturada de agua con 5% de CO₂. Se retiró el medio de transfección y se colocó DMEM completo sin puromicina adicionando 1

$\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina e incubando las células durante 24 horas. Para células diferenciadas durante 3 días se siguió el mismo protocolo pero al retirar la mezcla de transfección posterior a las 5 horas de incubación con los complejos de transfección, se colocó medio completo sin puromicina, con 1 $\mu\text{g/ml}$ y adicionado con NGF.

RESULTADOS SECCION 1

Validación de la inserción de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} en el DNA genómico de células PC12 Tet-On.

Para corroborar que los vectores de expresión pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} se integraron en el DNA genómico y no de forma episomal en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}, se realizaron extracciones del DNA genómico de células PC12 Tet-On sin diferenciar para después mediante PCR amplificar los fragmentos que codifican para las proteínas recombinantes de interés. En la **figura 3A** se muestran las bandas que corresponden a la extracción del DNA genómico realizada con fenol-cloroformo a partir de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar. Posteriormente en los carriles 1 y 2 de la **figura 1B** se amplificó una banda de 1089 pares de bases (pb) usando el DNA genómico extraído de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} respectivamente usando los oligonucleótidos que se muestran en la **tabla 1**. En la **figura 3B** carril 4 se colocó un control negativo que no contiene DNA genómico con el fin de corroborar que no haya amplificaciones inespecíficas y validar los productos amplificados. También se secuenciaron ambos productos de PCR amplificados y se realizó el alineamiento con la secuencia de referencia para confirmar la presencia de cambio puntual de timina a citosina en la base 509 en la Dp40_{L170P} y que la secuencia de la Dp40 permanece sin cambios (**Figura 3C**).

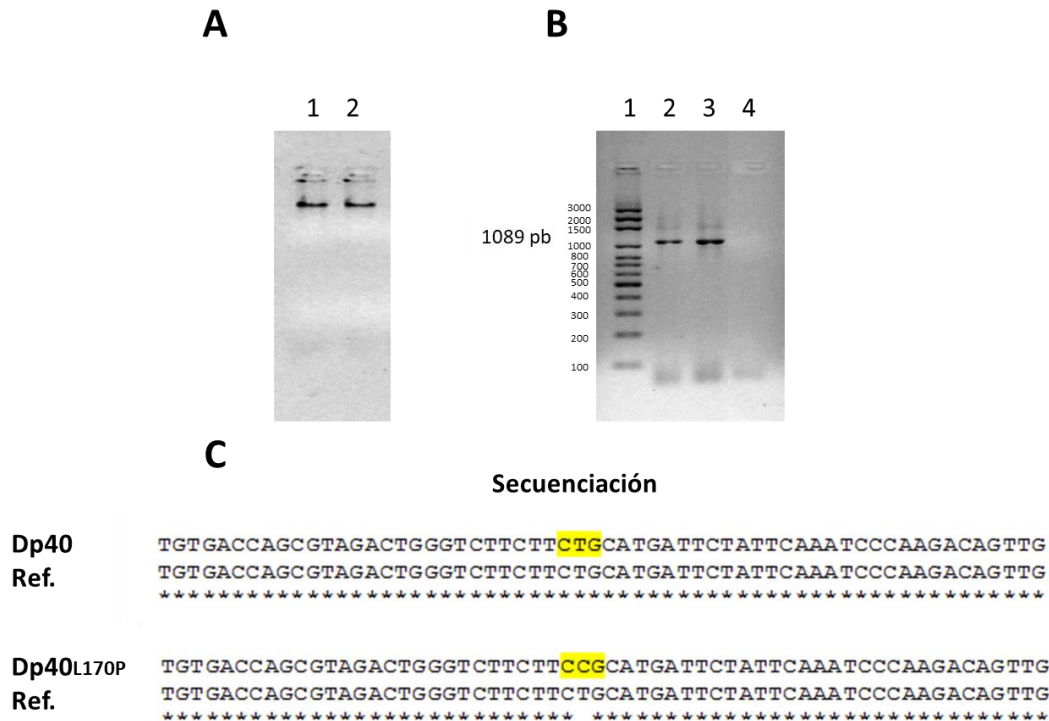


Figura 3. Validación de la integración de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} en el DNA genómico de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar. A. Extracción de DNA genómico de células utilizando la técnica de fenol-cloroformo. Los carriles 1 y 2 corresponden a células PC12 -Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}, respectivamente. **B.** Reacción de PCR a partir de DNA genómico. El carril 4 corresponde al control negativo. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (el número a la izquierda indica el tamaño del fragmento en pares de bases). **C.** Alineamiento de la secuencia de Dp40 y Dp40_{L170P} con la secuencia de referencia (Ref.). En amarillo se muestra el codón con el cambio de base en la Dp40_{L170P}.

Expresión de las proteínas Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}

Con el propósito de establecer la concentración mínima a la cual se sobre-expresan las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en las líneas celulares PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} se realizaron curvas de inducción en células sin diferenciar a concentraciones crecientes de doxiciclina. Las curvas de inducción fueron analizadas mediante

inmunodetección en fase solida (Western blot) con el uso de un anticuerpo monoclonal contra el epítipo c-Myc.

En la **figura 4** se observa una expresión basal sin tratar con doxiciclina en ambas líneas celulares sin diferenciar. A partir de la inducción con 50 ng/ml de doxiciclina se observa la sobre-expresión de las proteínas Dp40 (**Figura 4A**) y Dp40_{L170P} (**Figura 4B**). Sin embargo concentraciones crecientes de doxiciclina no incrementan la sobre-expresión de la proteínas Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P}. Debido a lo anterior y a que se ha reportado que a partir de concentraciones de 200 ng/ml la doxiciclina tiene un efecto tóxico (Ermak, Cancasci et al. 2003), se decidió realizar los siguientes experimentos a una concentración de 100 ng/ml.

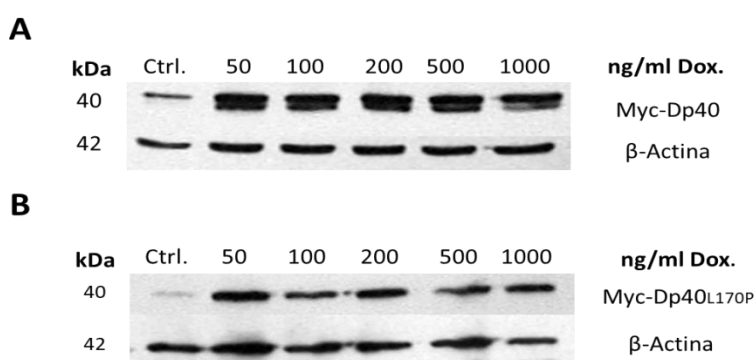


Figura 4. Expresión de las proteínas Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar. A partir de las líneas celulares PC12-Dp40 (clona SC2) y PC12-Dp40_{L170P} (clona C7) sin diferenciar, se obtuvieron extractos proteicos después de 24 horas de tratamiento sin y a diferentes concentraciones de doxiciclina (50, 100, 200, 500 y 1000 ng/ml). Los extractos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). **A.** Expresión de la proteína Myc-Dp40 en las células transfectadas de forma estable sin tratar y tratadas con doxiciclina. **B.** Expresión de la proteína Myc-Dp40_{L170P} en células transfectadas de forma estable tratadas y sin tratar con doxiciclina. Se muestra la imagen representativa de dos experimentos independientes. En la figura se indica el marcador de peso molecular en kilodaltones (kDa). Como control de carga se utilizó β-actina.

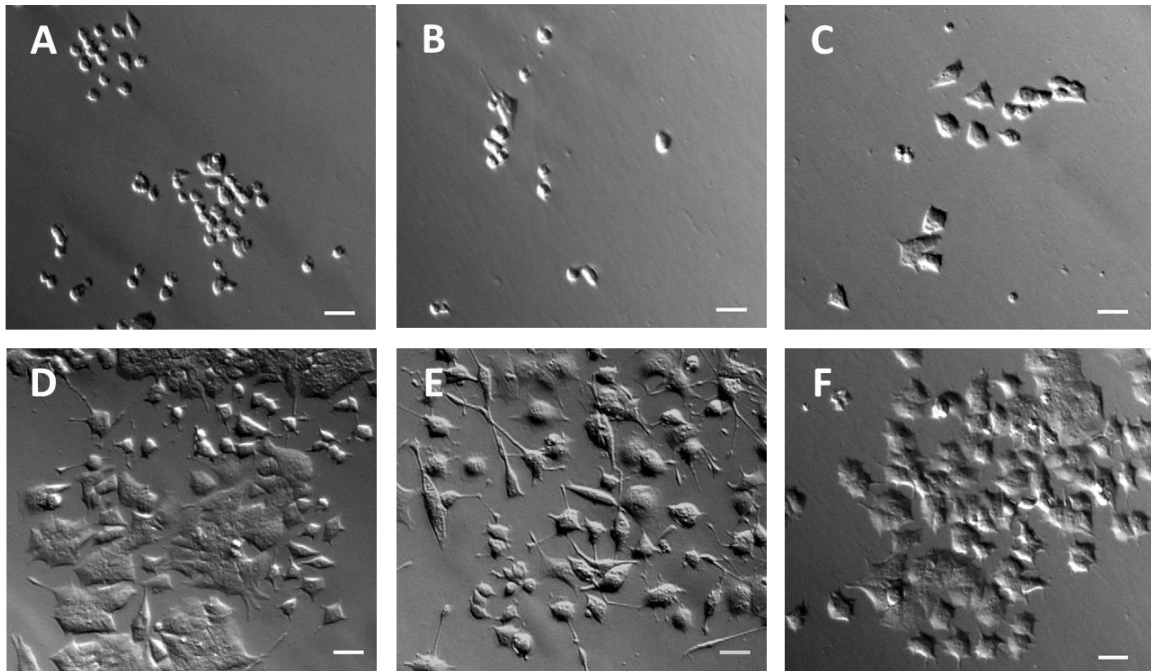
Efecto de la proteína Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en la morfología de células PC12 Tet-On durante el proceso de diferenciación neuronal

Se realizó un análisis morfométrico para determinar si la sobre-expresión de las proteínas Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y c-Myc tienen un efecto en la morfología de células PC12 Tet-On inducidas a diferenciación por 9 días con factor de crecimiento neuronal (NGF). Como referencia de la morfología celular de las células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}, previo a la diferenciación, se tomaron 5 micrografías de campo claro de cada línea celular, tratadas con doxiciclina durante 24 horas.

Antes de la inducción de la diferenciación no se observó una diferencia en la morfología de las células PC12-Dp40, PC12-Dp40_{L170P} como se muestra en la **figura 5A-C**. Después de los 9 días de diferenciación se observó que las células PC12-Dp40 tienen un mayor número de neuritas y más largas. Por otro lado las células PC12-Dp40_{L170P} muestran una morfología similar a las células PC12-control y una menor diferenciación en comparación con células PC12-Dp40 (**Figura 5D-F**). Se cuantificó el número de células que desarrollaron neuritas sin importar su longitud (porcentaje de diferenciación) y la longitud de neuritas de todas aquellas células con neuritas mayores a dos cuerpos celulares.

El análisis del porcentaje de diferenciación (**Figura 5G**) mostró que las células PC12-Dp40 tienen un mayor porcentaje de diferenciación ($49.7\% \pm 2.03$; $P= 0.0001$), en comparación con células PC12-control ($15.0\% \pm 1.15$). Por otro lado, las células PC12-Dp40_{L170P} mostraron un mayor porcentaje de diferenciación ($21.3\% \pm 1.20$; $P= 0.0191$) en comparación con células PC12-control ($15.0\% \pm 1.15$). Por otro lado se observó una disminución del porcentaje de diferenciación de células PC12-Dp40_{L170P} ($21.3\% \pm 1.20$) comparado con células PC12-Dp40 ($49.7\% \pm 2.03$; $P= 0.0003$). La cuantificación de la longitud de neuritas (**Figura 5H**) indicó que las células PC12-Dp40 presentan un incremento significativo en la longitud de neuritas ($41.80 \mu\text{m} \pm 1.90$; $P= 0.0011$) en comparación con células PC12-control

($17.7 \mu\text{m} \pm 2.14$) y PC12-Dp40_{L170P} ($5.84 \mu\text{m} \pm 0.306$; $P = < 0.0001$). Contrariamente, las células PC12-Dp40_{L170P} (5.84 ± 0.30) presentaron una disminución significativa en la longitud de neuritas con respecto a células PC12-control (17.7 ± 2.14 ; $P = 0.0053$). Por lo tanto la expresión de la Dp40 promueve el crecimiento neurítico y la expresión de la Dp40_{L170P} afecta el crecimiento neurítico durante la diferenciación neuronal de células PC12 Tet-On.



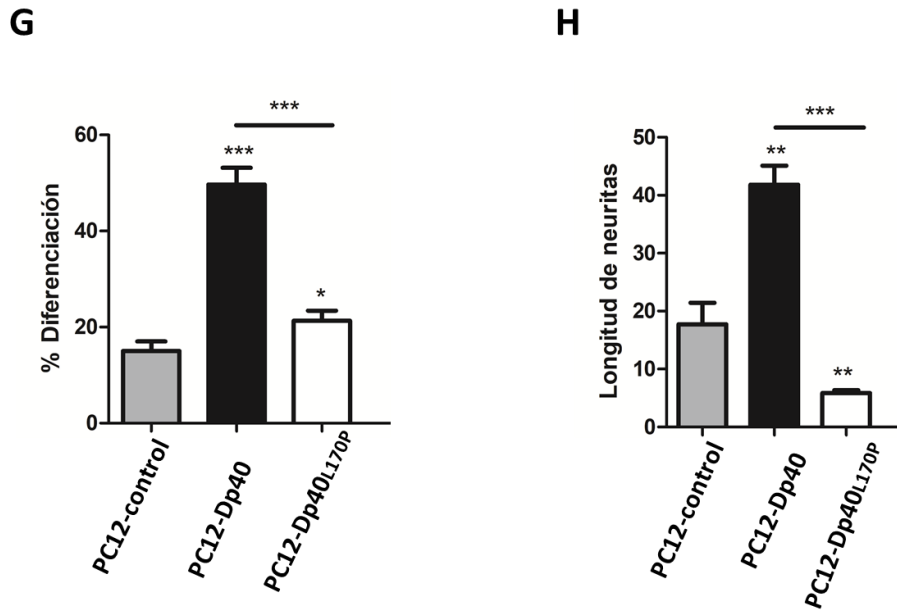


Figura 5. Análisis morfométrico de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} durante la diferenciación neuronal. Las células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} se diferenciaron durante 9 días con NGF. El análisis morfométrico se realizó mediante micrografías de campo claro de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar (**A**, **B** y **C**) respectivamente y diferenciadas (**D**, **E** y **F**) respectivamente. La cuantificación del porcentaje de diferenciación (**G**) y longitud de neuritas (**H**) de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas es representada como la desviación estándar de tres experimentos independientes. Escala equivalente a 10 micrómetros.

Análisis de la diferenciación de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}

Se evaluó la diferenciación de las células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} para saber si las diferencias observadas en el análisis morfométrico están relacionadas con la expresión de marcadores de diferenciación neuronal. Primero se analizó la expresión de marcadores de diferenciación como es el caso de β 3-tubulina y NeuN (también conocida como Rbfox3) en células PC12-control y PC12-Dp40 diferenciadas durante 9 días con NGF mediante inmunoprecipitación en fase sólida. Los resultados preliminares se muestran en la **Figura 6**. Como podemos observar en la **figura 6A** en células PC12-control y PC12-Dp40 sin diferenciar ya expresa la proteína β III-Tubulina y permanece sin cambios importantes durante el

proceso de diferenciación inducido por NGF durante nueve días. Un resultado similar fue observado en el marcador de diferenciación neuronal tardío NeuN. Como podemos observar en la **figura 6B**, en células PC12-control y PC12-Dp40 sin diferenciar ya se expresan la proteína NeuN sin tratar con NGF y su expresión se mantiene sin cambios evidentes durante el proceso de diferenciación neuronal.

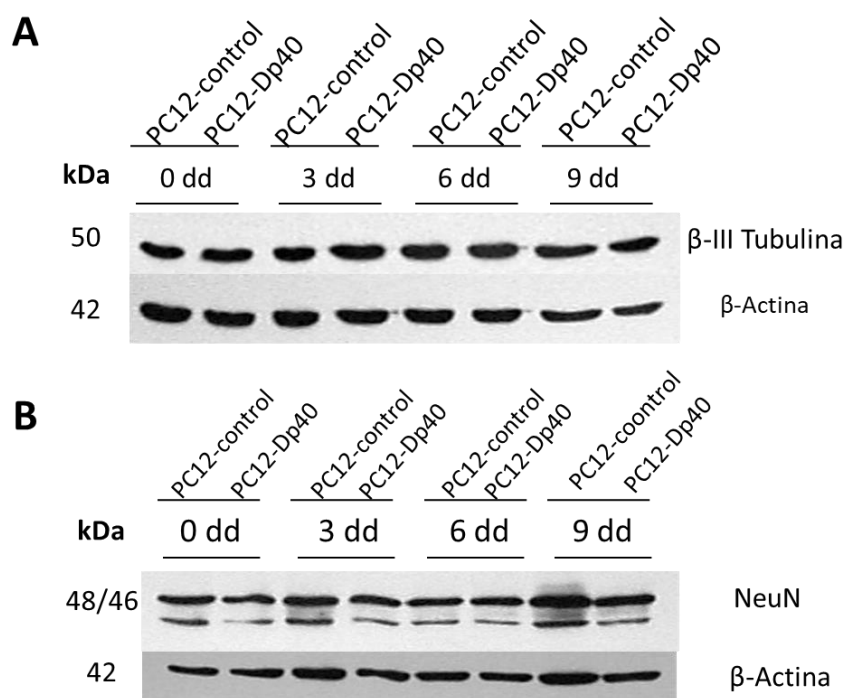


Figura 6. Expresión de β3-Tubulina y NeuN de células PC12-Dp40 durante el proceso de diferenciación neuronal. Se obtuvieron extractos proteicos de células PC12-control y PC12-Dp40 después de 24 horas de inducción con doxiciclina a los 0, 3, 6 y 9 días de diferenciación (dd) con NGF. Los extractos fueron sometidos a un SDS-PAGE. **A.** Expresión de la proteína β3-Tubulina en células PC12-control y PC12-Dp40. **B.** Expresión de la proteína NeuN en células PC12-control y PC12-Dp40. El peso molecular de las proteínas está indicado en kilodaltones (kDa). Se utilizó β-actina como control de carga.

Debido a que se ha reportado que durante la diferenciación de neuronas pos-mitóticas la proteína NeuN se concentra en el núcleo, se evaluó la distribución subcelular de la proteína NeuN mediante inmunofluorescencia indirecta en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar y diferenciadas 9 días con NGF. Las inmunofluorescencias son imágenes representativas de tres experimentos biológicos independientes. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón indicado en materiales y métodos para detectar el epítipo c-Myc de las células PC12-control y para detectar las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} respectivamente. Para detectar la proteína NeuN se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo indicado en la **tabla 2** y para teñir los núcleos celulares se utilizó el colorante DAPI.

El epítipo c-Myc presentó una distribución homogénea en todas las líneas celulares sin diferenciar (**Figura 7A-I**). Sin embargo en células diferenciadas (**Figura 7J-R**) con NGF se observó una disminución de su distribución nuclear y un aumento de su distribución subcelular en el citoplasma de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}. Myc-Dp40 presentó una distribución en el núcleo, citoplasma y en la periferia celular de todas las líneas celulares sin diferenciar (**Figura 7D**). En células diferenciadas Myc-Dp40 (**Figura 7M**) mostró una disminución en la distribución en el núcleo y se localizó principalmente en el citoplasma de células PC12-Dp40. La proteína Myc-Dp40_{L170P} de células PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar presentó una distribución subcelular homogénea (**Figura 7G**) y en células diferenciadas se observó una distribución predominantemente en el citoplasma y una menor distribución en el núcleo. Lo cual es diferente a la distribución predominante nuclear observada en transfecciones transitorias con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} en células PC12 Tet-On. Células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas por 9 días con NGF presentaron una disminución de Myc-Dp40_{L170P} de esta proteína en el núcleo (**Figura 7P**), lo cual contrasta con la localización predominantemente nuclear reportada previamente mediante transfecciones de células PC12 diferenciadas.

También, resultados obtenidos en la tesis de maestría “Caracterización de la distrofina mutante Dp40c-L170P en células PC12” (2014) habían mostrado que Myc-Dp40_{L170P} tenía una distribución subcelular predominantemente nuclear en células PC12. En la **figura 7** podemos observar que NeuN se encuentra presente en el núcleo de todas las líneas sin diferenciar (**Figura7B, E y H**) y diferenciadas durante 9 días con NGF (**Figura 7K, N y Q**). Sin embargo NeuN incrementa su presencia en el citoplasma en las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas. Por lo que la sobreexpresión de las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} durante el proceso de diferenciación neuronal altera la distribución subcelular de la proteína NeuN.

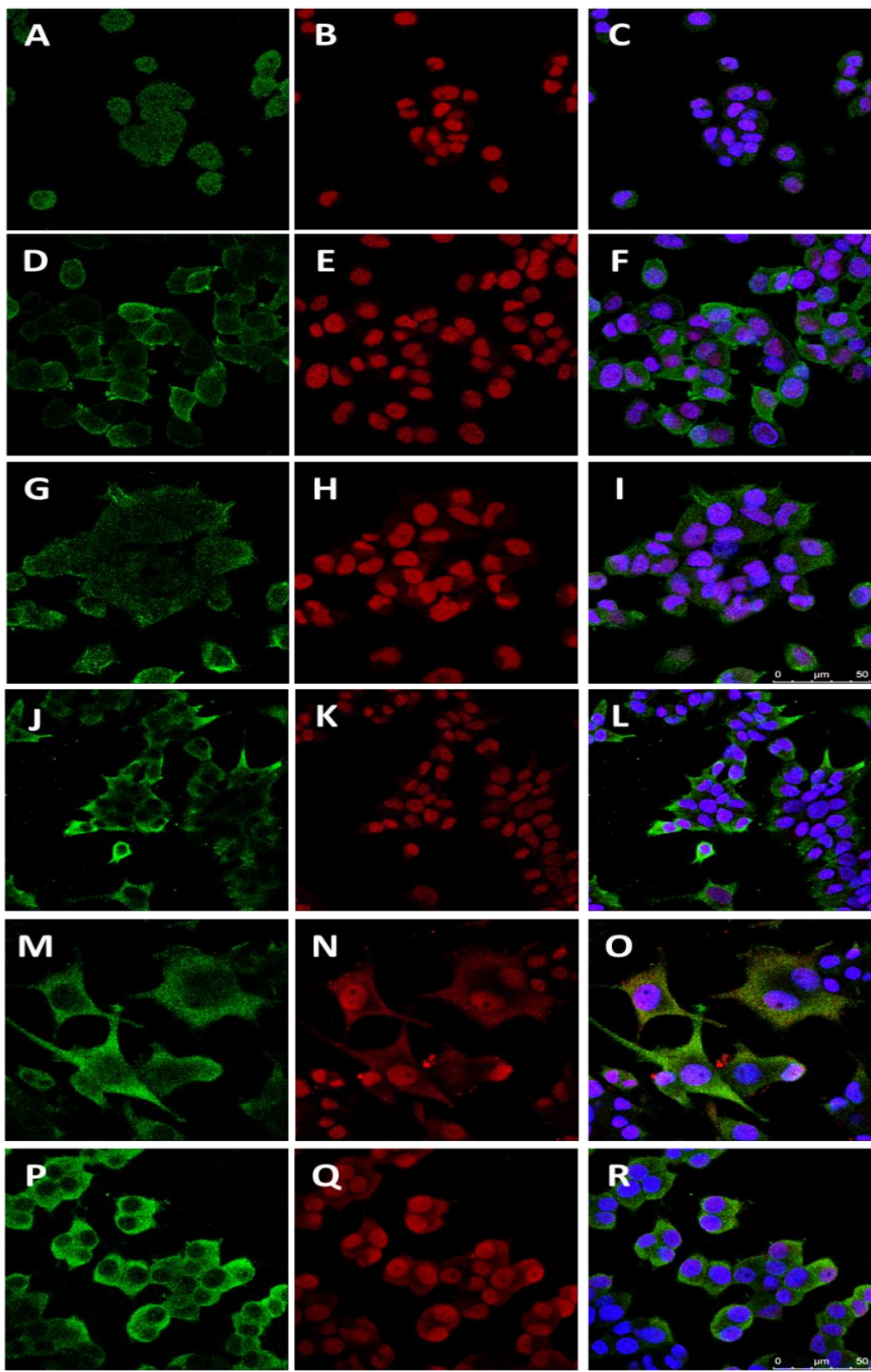


Figura 7. Distribución subcelular del epítotope c-Myc y de la proteína NeuN en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días. Se obtuvieron micrografías de cortes de microscopia confocal de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo anti-c-Myc monoclonal (verde), anti-NeuN monoclonal (rojo) y el colorante DAPI que tiñe núcleos celulares. **A-I.** Corresponden a células PC12-control (**A-C**), PC12-Dp40 (**D-F**) y PC12-Dp40_{L170P} (**G-I**) no diferenciadas con NGF. Y después indicar que todas están en el mismo orden. **J-R.** Corresponden a células PC12-control (**J-L**), PC12-Dp40 (**M-O**) y PC12-Dp40_{L170P} (**P-R**) diferenciadas con NGF durante 9 días. **A, D, G.** Localización del epítotope c-Myc en células PC12 sin diferenciar. **B, E, H.** Localización de la proteína NeuN en células PC12 sin diferenciar. **J, N, P.** Localización del epítotope c-Myc en células PC12 Tet-On diferenciadas. **K, O, Q.** Localización de la proteína NeuN en células PC12 diferenciadas. **C, F, I, L, O, R.** Sobreposición de la localización subcelular del epítotope c-Myc y NeuN. Escala equivalente a 50 micrómetros.

Perfil de expresión proteica de células PC12-Dp40_{L170P}

Para conocer que proteínas están involucradas en disminuir el crecimiento neurítico por la sobre-expresión de la proteína Myc-Dp40_{L170P} en células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF durante 9 días. se realizaron geles en dos dimensiones (2-DE). Los geles se obtuvieron por triplicado biológico independiente para obtener el perfil de expresión proteico de las células PC12-control y células PC12-Dp40_{L170P}.

Después de la obtención de los geles 2-DE el perfil se analizó con el software ImageMaster 2D platinum 7. Las manchas fueron examinadas manualmente para eliminar artefactos y posteriormente se calculó el porcentaje-volumen de cada mancha y se determinó si hay expresión diferencial. El alineamiento de los triplicados de los geles 2-DE de las células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P} (**Figura 8**) indicó un promedio total de manchas de 338 y de 350 respectivamente (**Tabla 5**). El porcentaje de reproducibilidad (*percent matches*) entre los geles 2-DE de las células PC12-control fue de 98% y de 96.33% para los geles 2-DE de las células PC12-Dp40_{L170P}. Lo que indicó un porcentaje de reproducibilidad total de 97,16 % de todos los geles (**Tabla 5**).

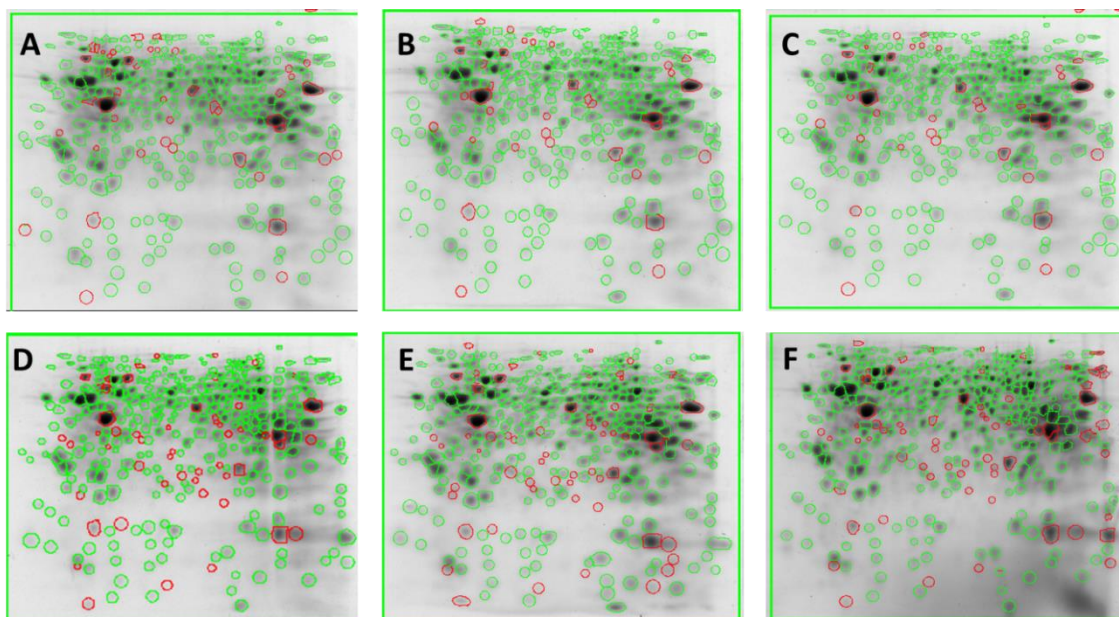


Figura 8. Alineamiento de geles 2-DE con el software ImageMaster 2D de células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas 9 días con NGF. Se obtuvieron extractos de células PC12-control y PC12-Dp40 diferenciadas 9 días con NGF. Los extractos fueron sometidos a una primera dimensión por isoelectroenfoque mediante tiras de pH inmovilizado. Después, la segunda dimensión se realizó mediante geles SDS-PAGE. **A, B y C.** Corresponden a los 3 geles 2-DE de células PC12-control. **D, E y F.** Corresponden a los 3 geles 2-DE de células PC12-Dp40_{L170P}. Las imágenes fueron obtenidas con el scanner image Quant 4000 en escala de grises. Los círculos verdes indican que las manchas coinciden con el gel maestro (**A**) y los círculos rojos indican que las manchas no coinciden con gel maestro.

Muestras	Conteo de manchas	Promedio de conteo de manchas	Porcentaje de reproducibilidad	Promedio del porcentaje de reproducibilidad	Total del porcentaje de reproducibilidad
PC12-control 1	333	338	96%	98%	97.16%
PC12-control 2	342		99%		
PC12-control 3	341		99%		
PC12-Dp40 _{L170P} 1	358	350	99%	96.33%	
PC12-Dp40 _{L170P} 2	348		96%		
PC12-Dp40 _{L170P} 3	344		94%		

Tabla 5. Cuantificación de manchas y porcentajes de reproducibilidad de geles 2-DE de células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P}. Se obtuvo el porcentaje de reproducibilidad seleccionando un gel maestro para cada línea celular (PC12-control 2 y PC12-Dp40_{L170P} 1) el cual presenta la mayoría de las manchas. El software imageMaster 2D platinum 7 compara cada uno de los geles con el gel maestro indicando el porcentaje de alineamiento.

Esto demostró una calidad, reproducibilidad y resolución adecuada para continuar con el análisis de expresión diferencial. Después del alineamiento de los geles 2-DE se le indicó al software imageMaster 2D platinum 7 que indicara las manchas con expresión diferencial con una razón de cambio mayor 1.1 debido a que fueron pocas las manchas detectadas con una razón de cambio mayor a 1.5. Se detectaron un total de 378, de los cuales 14 manchas presentaron expresión diferencial que corresponde al 3.7% de las manchas detectadas. De las manchas con expresión diferencias 13 tuvieron regulación positiva y solo una mancha presentó regulación negativa. La **figura 9** muestra el número de identificación (ID) de cada mancha en el gel 2-DE seleccionado para su escisión del gel 2-DE y su identificación por espectrometría de masas (MS) como se indica en materiales y métodos.

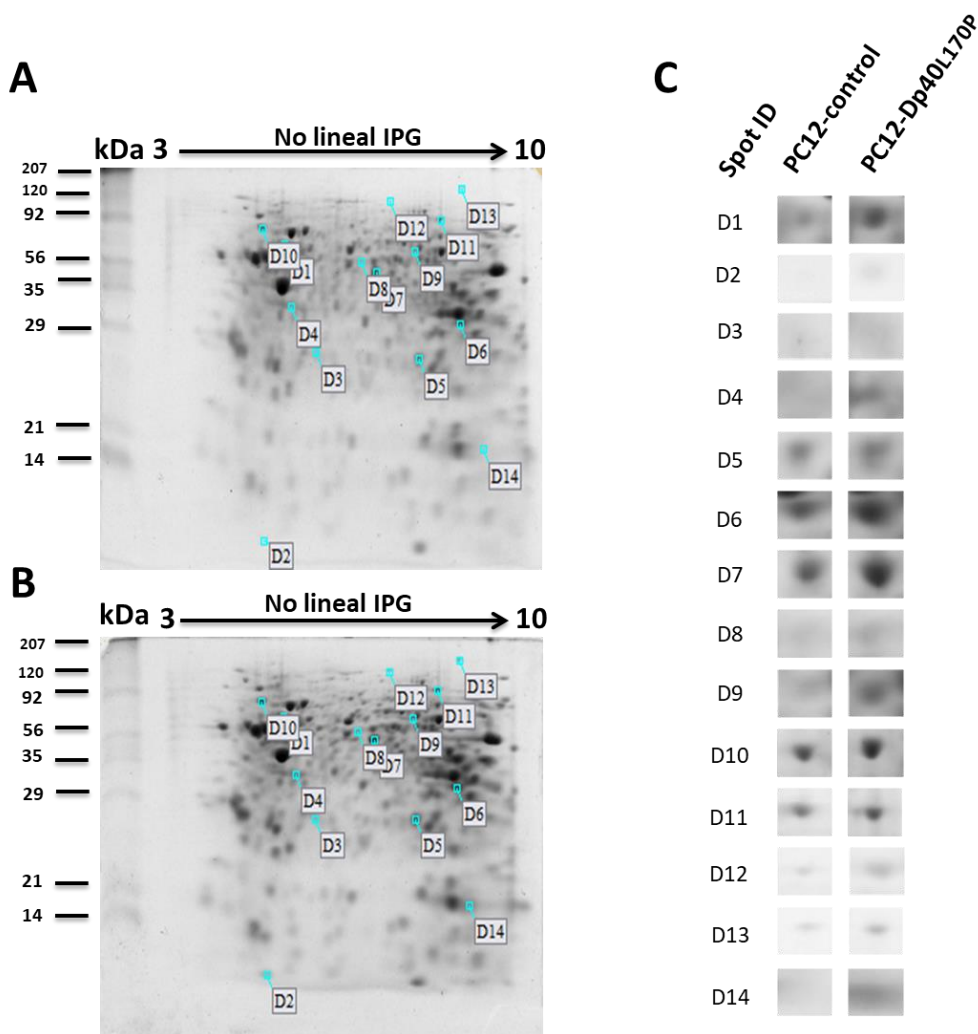


Figura 9. Geles 2-DE de extractos proteicos de células diferenciadas PC12-control y PC12-Dp40_{L170P}. Se colectaron extractos proteicos de células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P} durante 9 días y se separaron por isoelectroenfoque mediante tiras no-lineales de pH inmobilizado (7 cm), seguido de un SDS-PAGE. **A.** Geles 2-DE con extractos de células PC12-control. **B.** Gel 2-DE con extractos de células PC12-Dp40_{L170P}. En ambos geles se observa la localización de las manchas. En los geles 2-DE se observa la posición de las manchas que presentaron expresión diferencial. **C.** Ampliación de las manchas que presentaron expresión diferencial.

Todas las manchas que presentaron expresión diferencial fueron identificadas por espectrometría de masas (MS) mediante la técnica de ionización MALDI, como se indica en la sección de materiales y métodos para determinar a qué proteína pertenecen. En la **tabla 6** se indican las proteínas a las que pertenecen los péptidos identificados para cada mancha. De las 14 manchas seleccionadas para su identificación por espectrometría de masas solo 8 de ellas fueron identificadas correctamente. La mayoría de las proteínas identificadas están relacionadas con metabolismo (Fosfoglicerato mutasa 1; L-lactato deshidrogenasa, cadena A; Alfa-enolasa; Ectonucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa; Complejo T, proteína 1 subunidad zeta; y proteína precursora reguladora de glucosa, GRP78), con estrés celular (proteína precursora reguladora de glucosa, GRP78), comunicación celular (Ectonucleotido pirofosfatasa/fosfodiesterasa) y proteínas estructurales (α -internexina y la proteína S100a6 isoforma X1).

Mancha ID	Variación	Razón de cambio	MS	No. Acceso	Nombre de la Proteína	Gen	PM (kDa)	pI	Match pept	SC (%) ^{b)}
D1	+	2.0	MALDI	P23565	Alfa-internexina	Ina	56.11	5.20	14	29.8
D2	+	2.1	MALDI	P05964	Proteína PREDICHA: S100-a6 isoforma X1	S100a6	10.03	5.30	1	58.4
D5	+	1.15	MALDI	Q9DBJ1	Fosfoglicerato mutasa 1	Pgam1	28.83	6.67	4	29.1
D6	+	1.47	MALDI	P04642	L-lactato deshidrogenasa cadena A	Ldha	36.45	8.45	2	21.4
D7	+	1.41	MALDI	P04764	Alfa-enolasa	Eno 1	47,12	6.16	12	45.3
D8	-	1.52	MALDI	Q9EQG7	Ectonucleotido pirofosfoataasa/fosfodiesterasa	Enpp5	54.38	5.52	1	16.4
D9	+	1.56	MALDI	O77622	Complejo T proteína 1, subunidad zeta	CCT6	58.02	6.46	2	10.5
D10	+	1.20	MALDI	P06761	Proteína precursora reguladora de glucosa 78 (GRP 78)	GRP78	72.34	5.07	5	17.6

Tabla 6. Identificación por espectrometría de masas (MS) del perfil de expresión de células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas. Mancha ID: número de identificación de la mancha. Variación: (-) = regulación negativa; (+) regulación positiva. Razón de cambio: número de veces del incremento o decremento. Base de datos: No acceso: Número de acceso de acuerdo a la base de datos Swiss Prot de *Rattus norvegicus*. PM: peso molecular en kilodaltones (kDa). pI: punto isoeléctrico teórico. Match pept: Número de péptidos identificados. %SC: porcentaje de secuencia cubierta.

Evaluación de la expresión de las proteínas con expresión diferencial

Posteriormente a la identificación de las manchas mediante MS se decidió validar la proteína α -internexina debido a que fue la segunda proteína con el mayor número de péptidos identificados (Match pept.) como se observa en la **tabla 6**. Además, pertenece a la familia de neurofilamentos tipo 4 lo cual tiene relevancia para el presente estudio. También se evaluó la expresión de proteínas involucradas en diferentes procesos celulares como diferenciación neuronal (*Neurofilament light chain*; NF-L), remodelación del citoesqueleto (*Heat shock protein B1*; HspB1) y secreción de vesículas sinápticas (*Vesicle-associated membrane protein*; VAMP).

En la **figura 10** se observa la expresión de α -internexina en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar. α -internexina mostró un incremento de 4 veces en células PC12-Dp40_{L170P} en comparación con células PC12-control pero no se observó una diferencia significativa de la expresión de α -internexina en células PC12-Dp40 con respecto a células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P}. Por otro lado la expresión de NF-L esta incrementada 3.5 veces en células PC12-Dp40_{L170P} en comparación con células PC12-control pero no se observó una diferencia significativa en la expresión NF-L en células PC12-Dp40 en comparación con células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P} (**Figura 10**). Para VAMP 1/2 aunque en la inmunoprecipitación en fase sólida se observó una mayor expresión de esta proteína en células PC12-Dp40 (**Figura 10A**) no se presentó una diferencia significativa entre las diferentes líneas celulares (**Figura 10B**).

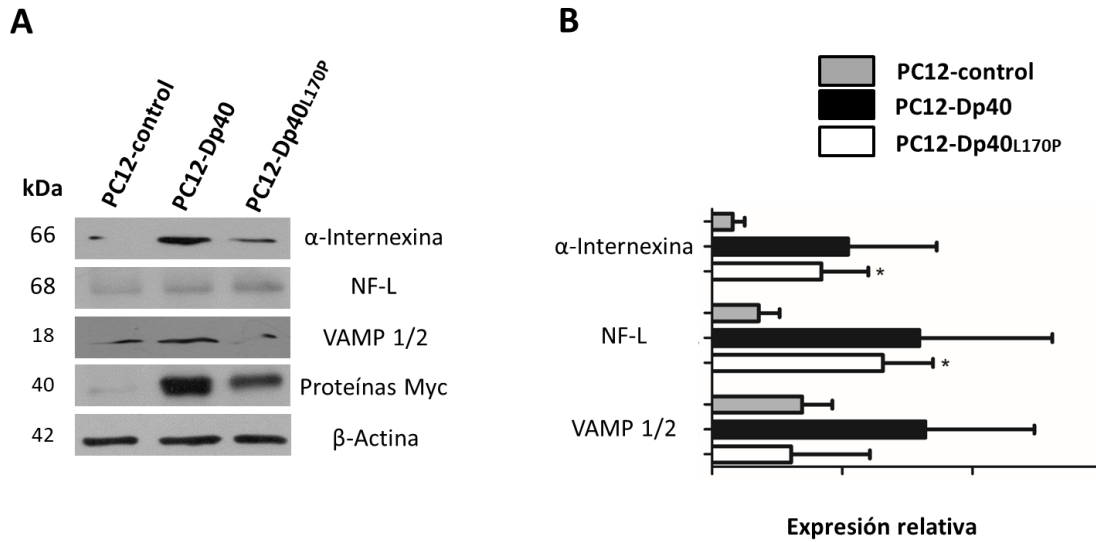


Figura 10. Validación de la expresión de α -internexina, NF-L y VAMP 1/2 en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar. Se obtuvieron extractos proteicos de las células PC12-control, PC12-Dp40 y Dp40_{L170P} sin diferenciar. Los extractos fueron sometidos a un SDS PAGE. **A.** Expresión de la proteína α -internexina, NF-L, HspB1, VAMP 1/2, Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P}. **B.** La gráfica representa el promedio de desviación estándar de tres experimentos independientes. NF-L: marcador de diferenciación neuronal, VAMP 1/2: marcador de secreción de vesículas sinápticas, proteínas Myc: detección de las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} respectivamente. β -actina se utilizó como control de carga. El peso molecular de las proteínas se indica en kilodaltones (kDa).

En la **figura 11A** se observa la expresión de α -internexina en las PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF durante 9 días. El análisis estadístico indica que no hay diferencia significativa en la expresión de α -internexina en células PC12-control y células PC12-Dp40. Por otro lado, células PC12-Dp40_{L170P} presentaron un incremento de 13 y 3.25 veces comparado con células PC12-control y células PC12-Dp40 (**Figura 11B**) respectivamente. En células PC12-control se observó un incremento de 1.85 veces de la expresión de NF-L comparado con células PC12-Dp40_{L170P} pero no se observó una diferencia significativa con células PC12-Dp40 (**Figura 11B**). HspB1 mostró una expresión baja y no mostro una diferencia significativa entre las líneas celulares analizadas (**Figura 11A y B**). La expresión de VAMP 1/2 fue incrementada en células PC12-Dp40 (5

veces) y PC12-Dp40_{L170P} (1.8 veces) comparado con células PC12-control. Además se observó una disminución en la expresión de VAMP 1/2 en células PC12-Dp40_{L170P} cuando se comparan con células PC12-Dp40 (**Figura 11B**). Se observa que en la **figura 11A** una mayor expresión de la proteína Myc-Dp40 con respecto a la proteína Myc-Dp40_{L170P} en células diferenciadas.

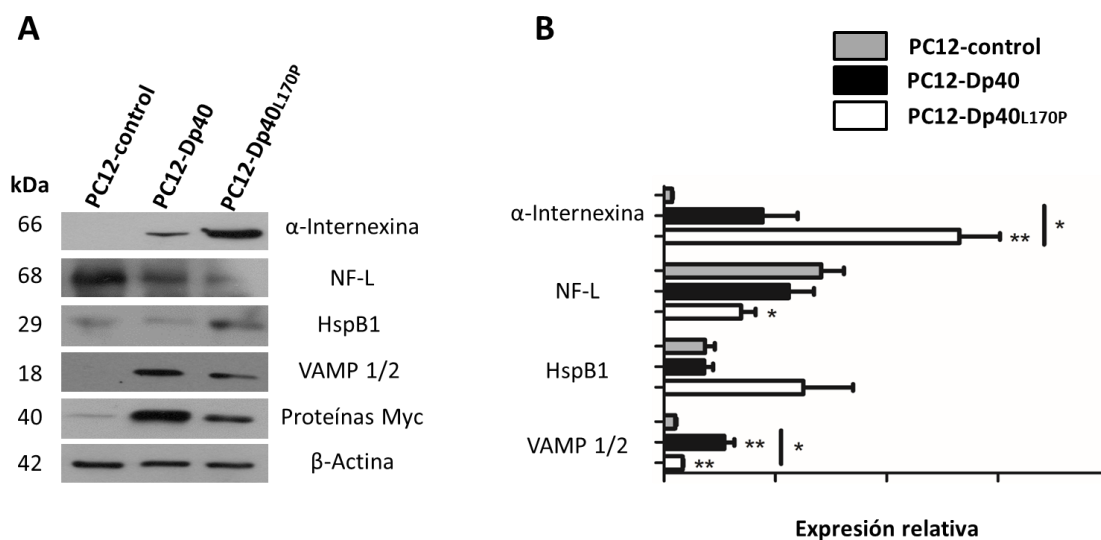


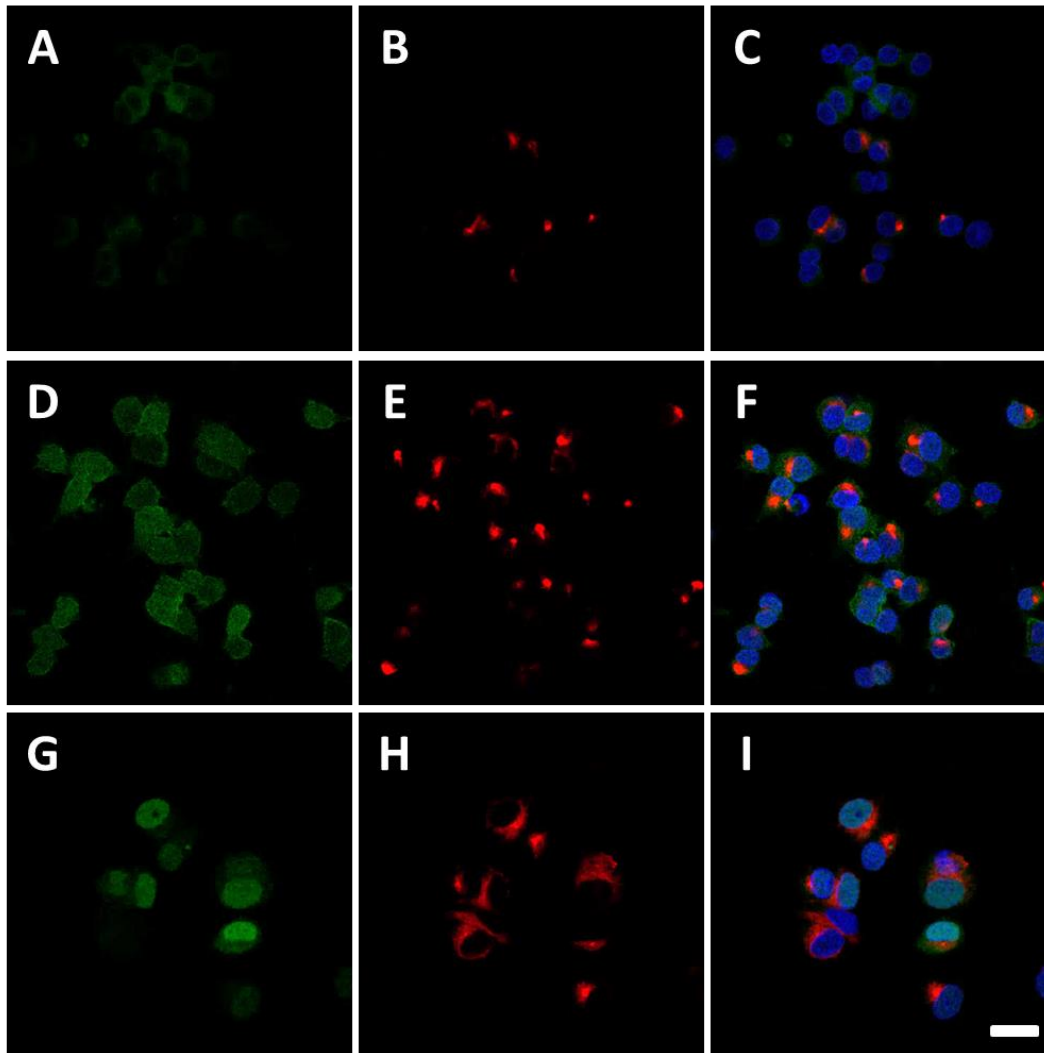
Figura 11. Validación de la expresión de α -internexina, NF-L, HspB1 y VAMP 1/2 en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF durante 9 días. Se obtuvieron extractos proteicos de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}. Los extractos fueron sometidos a electroforesis a un SDS-PAGE como se indica en Materiales y Métodos. **A.** Expresión de la proteína α -internexina, NF-L, HspB1, VAMP 1/2, Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P}. **B.** La gráfica representa el promedio de la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican el nivel de significancia. NF-L: marcador de diferenciación neuronal, HspB1: marcador de remodelación de citoesqueleto, VAMP 1/2: marcador de secreción de vesículas sinápticas, proteínas Myc: detección de las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en células PC12-Dp40 y células PC12-Dp40_{L170P} respectivamente. β -actina se utilizó como control de carga. El peso molecular de las proteínas se indica en kilodaltones (kDa).

Distribución subcelular de la proteína α -internexina

La distribución subcelular de la proteína Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y α -internexina se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar y diferenciadas con NGF por 9 días. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de conejo para detectar la proteína α -internexina y un anticuerpo monoclonal de ratón para la detección de las proteínas Myc-Dp40, Myc Dp40_{L170P} y el epítipo c-Myc.

Primero se evaluó la localización del epítipo c-Myc y α -internexina en las células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar (**Figura 12**). En células PC12-control el epítipo c-Myc se localizó en el citoplasma y núcleo de células PC12 Tet-On. Además, la cuantificación de la inmunoreactividad (intensidad de fluorescencia) del epítipo c-Myc en células PC12-control indicó un mayor porcentaje de localización en el citoplasma ($66.53\% \pm 1.58$) que en núcleo ($33.47\% \pm 1.58$; $P = < 0.0001$). La cuantificación del porcentaje de inmunoreactividad no mostró una diferencia significativa de la presencia de Myc-Dp40 en el núcleo ($50.92\% \pm 2.20$) o citoplasma ($49.08\% \pm 2.20$; $P=0.5580$) en células PC12-Dp40. Sin embargo esta diferencia. La proteína Myc-Dp40_{L170P} se localizó mayormente en el núcleo ($75.06\% \pm 1.69$) con respecto al citoplasma ($24.94\% \pm 1.69$; $P=< 0.0001$) de células PC12-Dp40_{L170P}. α -Internexina mostró una localización citoplasmática concentrada en una región específica en células control y PC12-Dp40 y una distribución homogénea en el citoplasma en células PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar (**Figura 12B, E, H**). La cuantificación del porcentaje de inmunoreactividad de α -internexina (**Figura 12J**) no mostró una diferencia significativa entre las células de las líneas celulares sin diferenciar. Por otro lado, debido a que se observó colocalización entre α -internexina y el epítipo c-Myc en células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas también se cuantificó el porcentaje de colocalización entre α -internexina y el epítipo c-Myc en células sin diferenciar. Se observó un mayor porcentaje de colocalización entre el epítipo c-Myc y α -internexina en células PC12-control

sin diferenciar ($63.89\% \pm 3.76$) comparado con células PC12-Dp40 ($12.35\% \pm 10.68$; $P= 0,0104$) y PC12-Dp40_{L170P} ($12.15\% \pm 3.80$; $P= 0,0006$) (**Figura 12K**). Esto posiblemente por la baja expresión de las proteínas recombinantes. Por lo que tampoco se observó una diferencia significativa en el porcentaje de colocalización entre células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar.



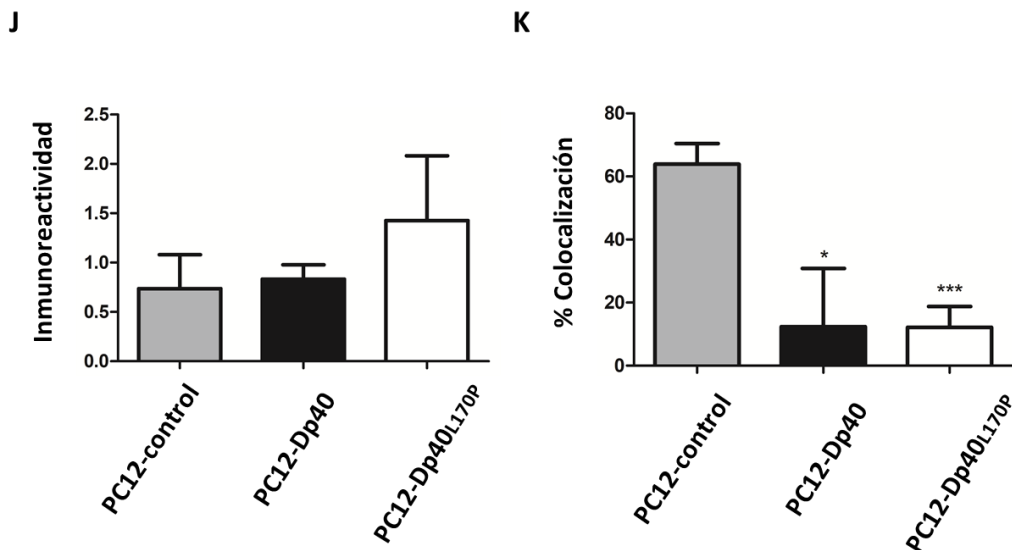


Figura 12. Distribución subcelular de α -internexina en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar. Se obtuvieron micrografías de cortes del microscopio confocal de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando los anticuerpos monoclonales anti-c-Myc (verde) y anti- α -internexina (rojo) y el colorante DAPI que tiñe los núcleos celulares. **A, D, G.** Localización del epítipo c-Myc en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} respectivamente. **B, E, H.** Localización de la proteína α -internexina en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} respectivamente. Sobre-posición de la localización subcelular del epítipo c-Myc y α -internexina en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} (**C, F, I**). La inmunoreactividad de α -internexina (**J**) y el porcentaje de colocalización (**K**) entre α -internexina y el epítipo c-Myc es representada como la desviación estándar de tres experimentos independientes Escala equivalente a 20 micrómetros.

Posteriormente se evaluó la localización subcelular del epítipo c-Myc y α -internexina en las células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF por 9 días (**Figura 13**). La localización subcelular del epítipo c-Myc se observó en el citoplasma y el núcleo de células PC12-control (**Figura 13A**), la diferencia en el porcentaje de inmunoreactividad entre núcleo ($52.68\% \pm 2.989$) y citoplasma ($47.32\% \pm 2.98$; $P= 0.2146$) no presentó una diferencia significativa. La proteína Myc-Dp40 se observó en el citoplasma, núcleo y a lo largo de las neuritas de las células PC12-Dp40 diferenciadas (**Figura 13D**). Sin embargo, no se observaron diferencias en el porcentaje de inmunoreactividad entre el núcleo ($38.42\% \pm 3.00$) y el

citoplasma ($61.58\% \pm 3.00$; $P = < 0.0001$). Por otro lado, la proteína Myc-Dp40_{L170P} se observó en el citoplasma y en el núcleo de las células PC12 Tet-On (**Figura 13G**). La cuantificación del porcentaje de inmunoreactividad mostró un mayor porcentaje de localización de la proteína Myc-Dp40_{L170P} en el núcleo ($62.2\% \pm 2.19$) con respecto al citoplasma ($37.80\% \pm 2.19$; $P = < 0.0001$) de células diferenciadas.

La localización subcelular de α -internexina fue citoplásmica en todas las líneas celulares, en células PC12-Dp40 se observa en el extremo de las neuritas (**Figura 13B, E, H**). La cuantificación del porcentaje de inmunoreactividad de α -internexina (**Figura 13J**) indicó que no hay diferencia significativa entre células PC12-control y células PC12-Dp40. Sin embargo, las células PC12-Dp40_{L170P} presentan un mayor porcentaje de inmunoreactividad para α -internexina comparadas con células PC12-control (2 veces más) y células PC12-Dp40 (1.8 veces) diferenciadas. Se observó la sobre-posición entre los canales para α -internexina y c-Myc por lo que se cuantificó el porcentaje de colocalización (Figura 13 K). En células diferenciadas con NGF durante 9 días se observa que las células PC12-Dp40 ($46.51\% \pm 8.13$; $P = 0,0009$) y PC12-Dp40_{L170P} ($64.10\% \pm 4.23$; $P = 0,1274$) presentan un mayor porcentaje de colocalización entre α -internexina y Myc-Dp40 comparado con células PC12-control ($6.480\% \pm 4.90$; $P = 0,0135$). No se observó una diferencia significativa en el porcentaje de colocalización entre células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}.

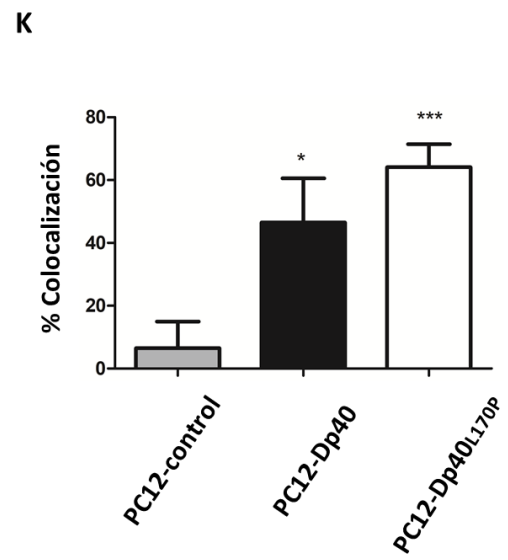
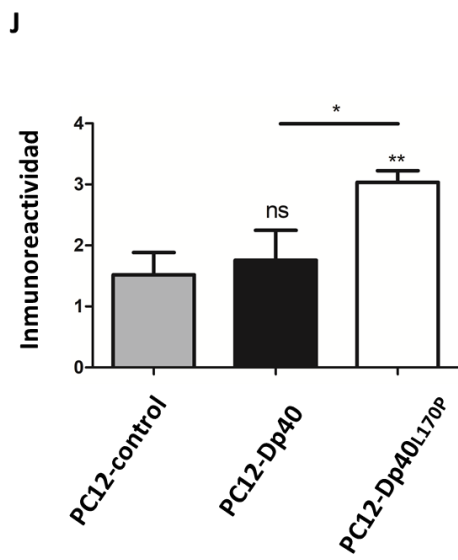
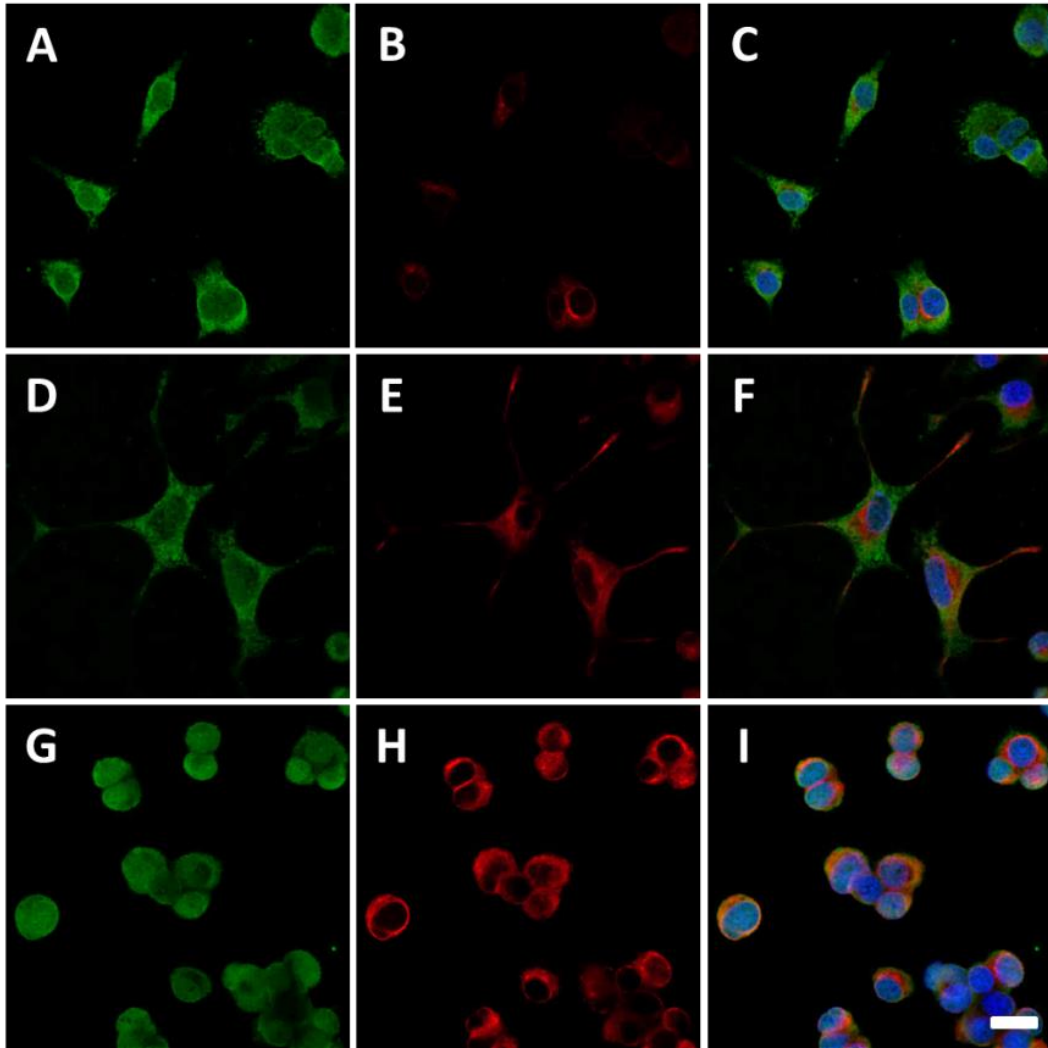


Figura 13. Distribución subcelular de α -internexina en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF por 9 días. Se obtuvieron micrografías de cortes células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} por microscopia confocal mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal anti- α -internexina (rojo), anti-c-Myc monoclonal (verde) y el colorante DAPI que tiñe núcleos celulares. **A, D, G.** Localización del epítipo c-Myc en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}. **B, E, H.** Localización de α -internexina en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} respectivamente. Sobre-posición de la localización subcelular de α -internexina y c-Myc en células diferenciadas (**C, F, I**). La inmunoreactividad de α -internexina (**J**) y el porcentaje de colocalización (**K**) entre α -internexina y el epítipo c-Myc es representada como la desviación estándar de tres experimentos independientes. Escala equivalente a 20 micrómetros.

Verificación de la presencia de las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} mediante geles 2-DE

Debido a que no se observó el incremento de manchas correspondientes a las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en los geles 2-DE se verificó la presencia de estas mediante geles 2-DE e inmunodetección en fase sólida en células PC12-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} diferenciadas con NGF por 9 días. Se utilizó un anticuerpo anti-c-Myc monoclonal de ratón para detectar a las proteínas Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P}.

En la **figura 14** se observa el patrón de distribución detectado que corresponde a tres grupos de manchas con un peso molecular aproximado entre 30 y 70 kDa. Además, las diferentes manchas presentaron un punto isoeléctrico amplio. En las células PC12-Dp40 se observó una señal baja para la mancha que tiene un punto isoeléctrico (pI) aproximado de 5-6, con respecto a los otros dos grupos de manchas para la señal del epítipo c-Myc (**Figura 14A**). Contrariamente la misma mancha que presentó disminución en las células PC12-Dp40 presentó un incremento en su señal para el epítipo c-Myc en células PC12-Dp40_{L170} diferenciadas con respecto a los otros dos grupos de manchas. Esto podría indicar posibles modificaciones post-traduccionales en la Dp40 dependiendo de su distribución subcelular promovida por cambios puntuales de la proteína.

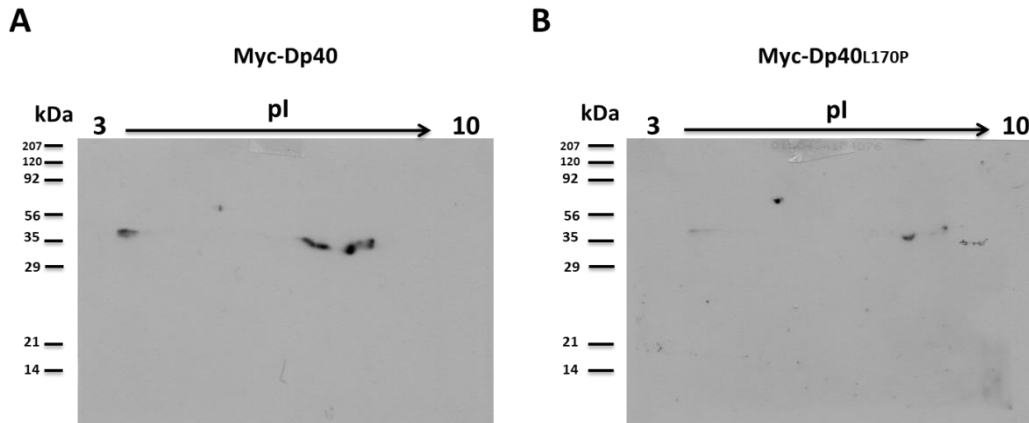


Figura 14. Localización de las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} en geles 2-DE. Se obtuvieron extractos de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas 9 días con NGF. Los extractos fueron sometidos a electroforesis en dos dimensiones y transferidos a membranas de nitrocelulosa para detectar las proteínas recombinantes utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-Myc. **A.** Detección de la señal del epítopo c-Myc de la proteína Myc-Dp40. **B.** Detección de la señal del epítopo c-Myc de la proteína Myc-Dp40_{L170P}. Se colocó la imagen representativa de dos experimentos independientes. En la parte superior de los geles se indica el rango de punto isoeléctrico (pI). El peso molecular está indicando en kilodaltons (kDa).

Construcción y caracterización de la proteína recombinante Myc-Dp40_{ΔL170}.

En el 2014 se reportó que 6 pacientes varones presentaban déficit cognitivo y no discapacidad motora por una deleción de tres pares de bases en la posición 9711 a 9714 del gen *DMD* (De Brouwer, Nabuurs et al. 2014). Debido a que este cambio puede afectar el aminoácido 170 de la Dp40, mismo aminoácido que tiene el cambio de leucina por prolina en las células PC12-Dp40_{L170P} usadas en este trabajo. Por lo que resultó de interés evaluar si una deleción en la posición 170 de la Dp40 promueve una distribución mayormente nuclear en células PC12 Tet-On.

Primero se realizó la mutagénesis sitio dirigida para eliminar el codón que codifica para el aminoácido leucina en la posición 170 de la Dp40 del vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}. Se verificó que la mutagénesis sitio dirigida correspondiera a la deleción del codón 170 de la Dp40 mediante el

alineamiento entre la secuencia de referencia de la Dp40 y la secuencia del vector que se mutagenizó llamado pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}. Con el fin de evaluar la expresión del vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{ΔL170} se realizaron transfecciones transitorias en células PC12 Tet-On y se verificó la expresión de la proteína recombinante utilizando un anticuerpo monoclonal anti-c-Myc (Figura 15).

A



B

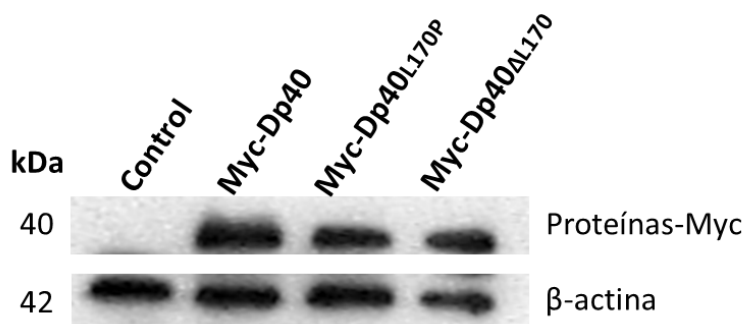


Figura 15. Construcción del vector pTRE2Pur-Myc/Dp40_{ΔL170} y expresión de la proteína Myc-Dp40_{ΔL170}. **A.** Alineamiento de la secuencia de Dp40_{ΔL170} con la secuencia de Dp40. Se muestra la deleción de los tres pares bases en la posición 509 a la 511 del gen de la Dp40, que genera la deleción del aminoácido leucina en la posición 170 de la proteína Dp40. **B.** Inmunodetección en fase solida con extractos proteicos obtenidos 24 horas después de la transfección transitoria e inducción con doxiciclina de células PC12 Tet-On. Los carriles 1, 2, 3 y 4 corresponden a células PC12 Tet-On transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc circularizado (vector vacío), pTRE2Pur-Myc/Dp40, pTRE2pur/Dp40_{L170P} y pTRE2pur-Myc/Dp40_{ΔL170}, respectivamente. El peso molecular se indica en kilodaltones (kDa). Se utilizó como control de carga β-actina.

Después de verificar la expresión de la proteína Myc-Dp40 Δ L170 mediante inmunodetección en fase sólida se procedió a evaluar su distribución subcelular mediante transfecciones transitorias e inmunofluorescencias indirectas en células PC12 Tet-On con el propósito de conocer si la proteína Myc-Dp40 Δ L170 presenta una distribución subcelular similar a la proteína Myc-Dp40_{L170P} anteriormente reportada. Se utilizó un anticuerpo anti-c-Myc monoclonal para detectar la señal de los vectores usados.

En la **figura 16** se muestra que la proteína Myc-Dp40 Δ L170 está presente principalmente en el núcleo de células PC12 Tet-On sin diferenciar. La proteína Myc-Dp40 se localiza principalmente en la periferia celular y un poco en el citoplasma. La proteína Myc-Dp40_{L170P} presentó una localización principalmente nuclear como se había reportado previamente por nuestro grupo de trabajo. También, se cuantificó el porcentaje de intensidad de fluorescencia entre citoplasma y núcleo de dos experimentos independientes. El epítopo c-Myc presentó una mayor distribución subcelular en el núcleo (68.97% \pm 4.92) comparado con el citoplasma (31.03% \pm 4.92; P= < 0.0001) a diferencia de lo observado con la proteína Myc-Dp40 que presentó una distribución subcelular principalmente en el citoplasma (71.00% \pm 2.49) que en núcleo (29.00% \pm 2.49; P= < 0.0001). La proteína Myc-Dp40_{L170P} se localizó principalmente en el núcleo (68.97% \pm 4.92) y en menor cantidad en el citoplasma (31.03% \pm 4.92; P= < 0.0001) al igual que la proteína Dp40 Δ L170 (Citoplasma: 24.51% \pm 2.169, núcleo:75.49% \pm 2.16; P= < 0.0001). Además, en las células PC12 Tet-On diferenciadas (**figura 17**) se observó la misma distribución subcelular que en células PC12 Tet-On sin diferenciar. Sin embargo es importante destacar que se observó la presencia de señal para Myc-Dp40 en las neuritas de células diferenciadas transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40. Además, se cuantificó el porcentaje de intensidad de fluorescencia entre el citoplasma y núcleo de 2 experimentos biológicamente independientes. El epítopo c-Myc presentó una distribución subcelular principalmente en el núcleo (63.88% \pm 4.500) comparado con el citoplasma (36.12% \pm 4.500; P= 0.0004). El epítopo Myc-

Dp40 se observó principalmente en citoplasma ($68.95\% \pm 2.78$) y en menor cantidad en el núcleo ($31.05\% \pm 2.78$; $P = < 0.0001$) de células a diferencia de las proteínas Myc-Dp40_{L170P} (Núcleo: $63.88\% \pm 4.50$, citoplasma: $36.12\% \pm 4.50$; $P = 0.0004$) y Myc Dp40 _{Δ L170} (Núcleo: $65.61\% \pm 2.20$, citoplasma: $34.39\% \pm 2.20$; $P = < 0.0001$) que se presentaron mayormente en el núcleo que en el citoplasma de célula PC12 Tet-On diferenciadas.

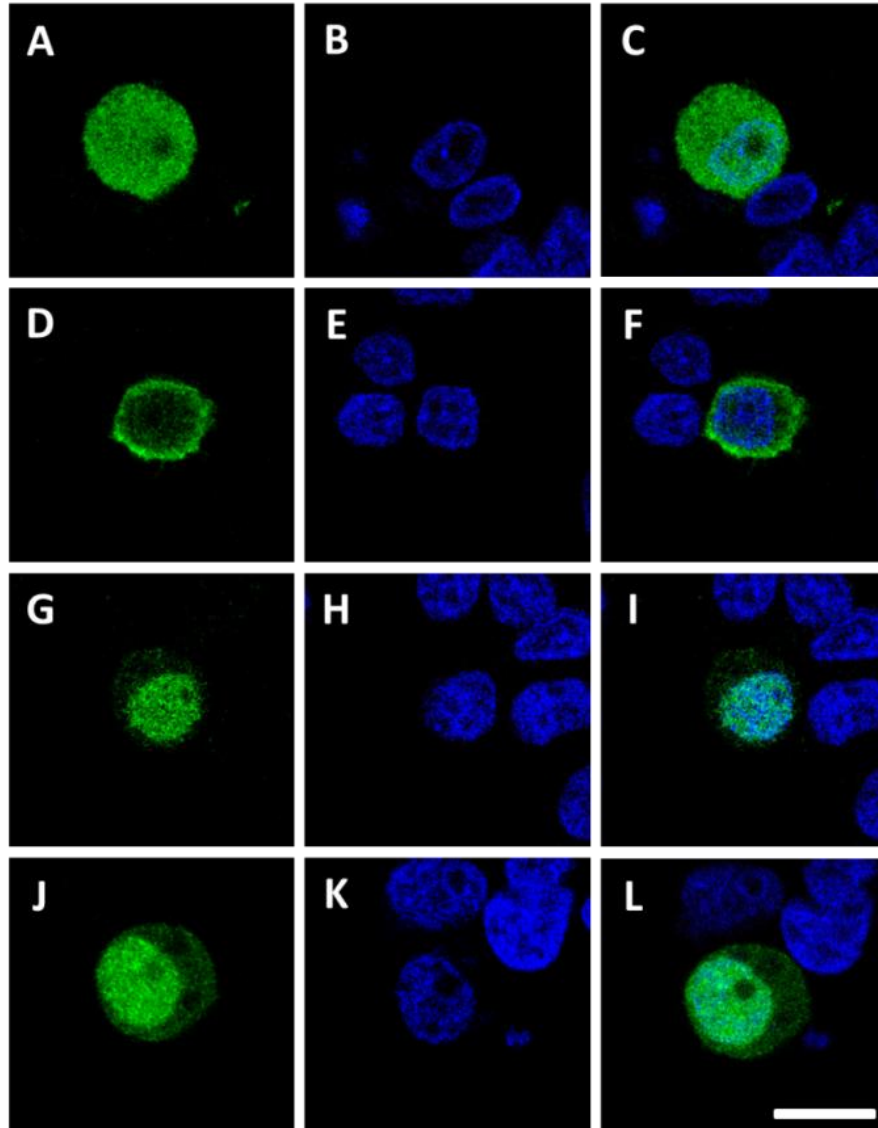


Figura 16. Distribución subcelular de las proteínas Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y Myc-Dp40_{ΔL170} mediante transfecciones transitorias en células PC12 Tet-on sin diferenciar. Se tomaron micrografías de cortes de microscopia confocal utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón para detectar el epítopo c-Myc (verde) y el colorante DAPI para marcar el DNA nuclear. **A-C.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc (vector vacío). **D-F.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40. **G-I.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}. **J-L.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{ΔL170}. **H.** La barra de escala representa 20 μm.

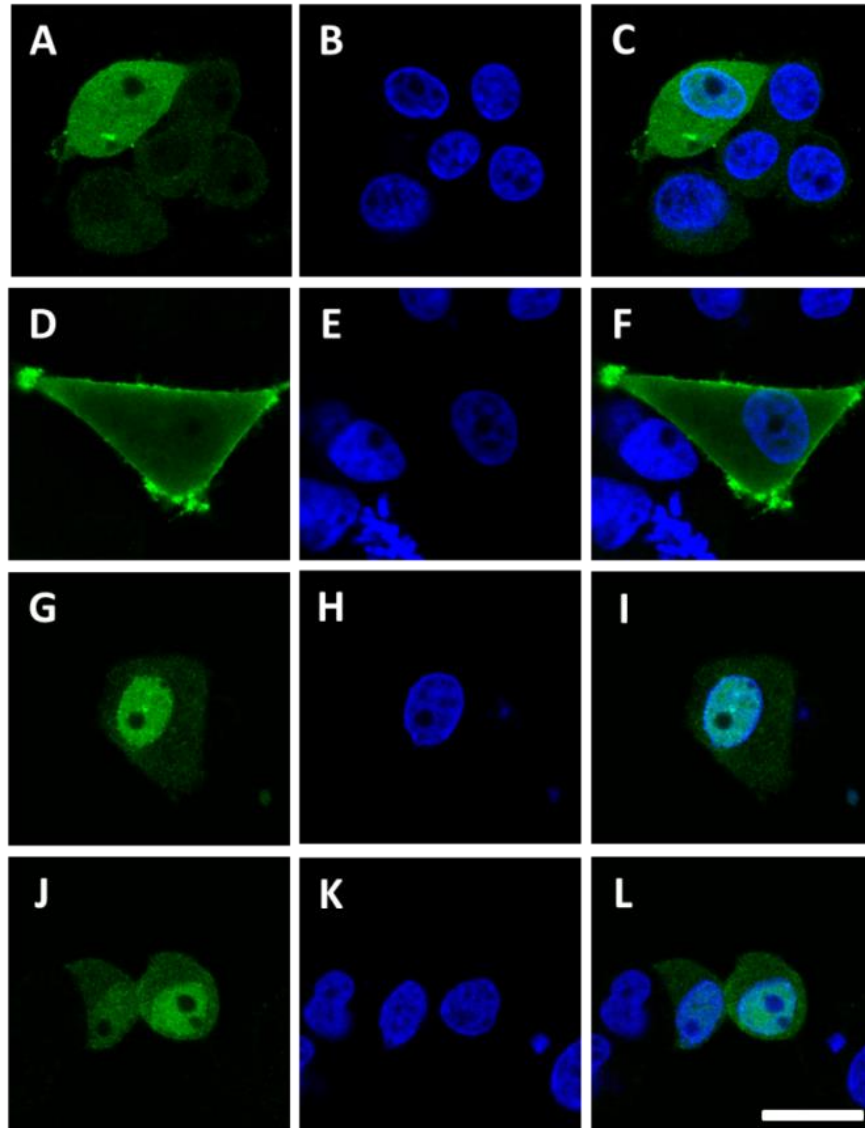


Figura 17. Distribución subcelular de la proteínas Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y Myc-Dp40_{ΔL170} mediante transfecciones transitorias en células PC12 Tet-on diferenciadas con NGF durante 3 días. Se tomaron micrografías de cortes de microscopia confocal utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón para detectar el epítopo c-Myc (verde) y el colorante DAPI para marcar el DNA nuclear. **A-C.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc (vector vacío). **D-F.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40. **G-I.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P}. **J-L.** Corresponde a células transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc/Dp40_{ΔL170}. **H.** Las micrografías son imágenes representativas tomadas de dos experimentos independientes. La barra de escala representa 20 μm .

Modelado de la estructura de las proteínas Dp40, Dp40_{L170P} y Dp40_{ΔL170}

Con el propósito de conocer si la delección del codón 170 que codifica para una leucina, afecta de forma relevante la estructura terciaria de la Dp40 se modeló la estructura terciaria de las proteínas Dp40, Dp40_{L170P} y Dp40_{ΔL170}, mediante el programa Swiss Model, con base a un fragmento cristalizado del dominio WW de la distrofina en complejo con un péptido de β-distroglicano (ID de identificación del cristal: leg3.1).

En la **figura 18** se observa que la sustitución del aminoácido leucina por prolina en el modelo de proteína Dp40_{L170P} altera la organización estructural de las zonas cercanas al aminoácido 170 cuando se compara con la proteína Dp40. Sin embargo, cuando se elimina el codón que codifica para la leucina 170 de la proteína Dp40 se observa una desorganización estructural en mayor grado, lo cual es representado por las barras de color gris que indican poca organización.

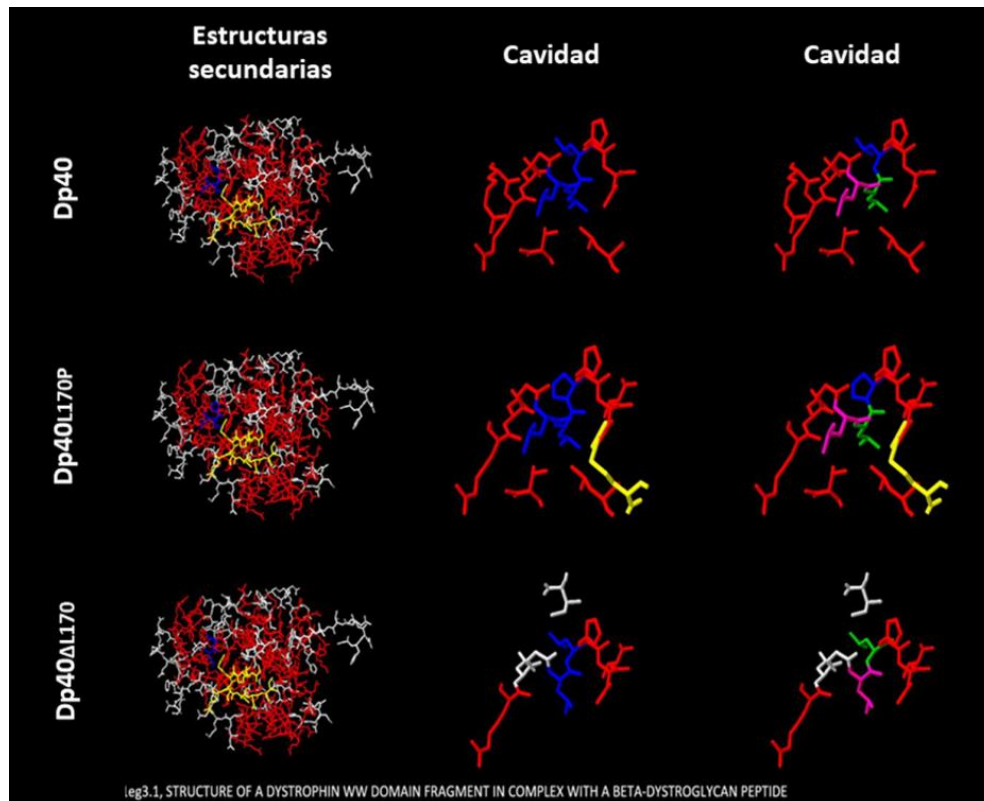


Figura 18. Estructura terciaria de las proteínas Dp40, Dp40_{L170P} y Dp40_{ΔL170}. Las proteínas se modelaron con base al fragmento cristalizado (leg3.1) del dominio WW de la distrofina en complejo con un péptido de β-distroglicano. La primera fila corresponde al modelo de la Dp40, la segunda fila corresponde al modelo tridimensional de la Dp40_{L170P} y la última fila corresponde al modelo de la Dp40_{ΔL170}. Las zonas en azul muestran las leucinas en las posiciones 168, 169 y 170. La columna 1 corresponde a las estructuras terciarias. Se muestran las estructuras α-hélice (rojo), β-plegada (amarillo) y zonas de poca organización (gris). La columna 2 corresponde a una amplificación de la zona donde se encuentra los residuos de leucinas 169, 170 y 171. La columna 3 muestra la posición de la leucina 168 (violeta), 169 (verde) y 170 (azul) de las proteínas.

DISCUSIÓN

Aunque se ha reportado que las mutaciones presentes en la distrofina Dp71 afectan el desarrollo cognitivo de pacientes con DMD y BMD (Daoud, Angeard et al. 2009), se desconoce la participación de las distrofinas cortas en el proceso de diferenciación neuronal. Tampoco se conoce el proceso de regulación de la expresión de las distrofinas en diferentes tipos celulares tanto en cerebro como en retina. Por lo anterior el uso de la línea celular PC12 como modelo de diferenciación neuronal ha sido clave para conocer la expresión y función de las distrofinas cortas durante el proceso de diferenciación neuronal. Se ha reportado que estas células expresan varias distrofinas cortas incluidas la Dp40 y la Dp71e Δ 71 (Marquez, Cisneros et al. 2003; Saint Martin, Aragon et al. 2012; Aragón, Martínez-Herrera et al. 2016).

Para facilitar la discusión de los datos obtenidos durante este proyecto para Dp40, Dp40_{L170P}, Dp71e Δ 71 se dividió la discusión en tres secciones.

DISCUSIÓN SECCIÓN 1

Participación de las distrofinas Dp40 y Dp40_{L170P} en el proceso de diferenciación neuronal de células PC12

Se estableció la concentración necesaria del inductor (doxiciclina) para sobre-expresar las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} debido a que se ha reportado que concentraciones a partir de 200 ng/ml son tóxicas para las células PC12 (Ermak, Cancasci et al. 2003). Por lo anterior se fijó la concentración de inducción para las proteínas recombinantes Myc-Dp40, Myc-Dp40_{L170P} y el epítipo c-Myc en 100 ng/ml de doxiciclina asegurando la expresión adecuada y evitando la toxicidad. Bajo estas condiciones de inducción se realizaron análisis morfométricos de las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}. Análisis morfométricos (**Figura 5**) mostraron que la sobreexpresión de la Dp40 favorece la diferenciación y crecimiento

neurítico en las células PC12, por el contrario la sobreexpresión de la Dp40_{L170P} disminuye el crecimiento neurítico de células PC12 Tet-On durante el proceso de diferenciación neuronal, en comparación con las células que expresan la isoforma Dp40 silvestre. Este efecto podría estar relacionado con la distribución subcelular de las proteínas recombinantes debido a que la Dp40 presenta una localización principalmente citoplasmática y la Dp40_{L170P} se localiza principalmente en el núcleo (Aragón, Martínez-Herrera et al. 2015). Después decidimos evaluar la expresión de los marcadores de diferenciación β 3-Tubulina, NeuN (*Neuronal nuclei*) y NF-L (*Neurofilament light chain*) para determinar si la expresión de estos marcadores tienen relación con el proceso de diferenciación, sin embargo, no se observaron cambios relevantes en la expresión de β III-tubulina y NeuN durante la diferenciación (**Figura 6**). Esto podría deberse a que las células PC12 ya poseen un fenotipo neuronal debido a que se originan de la cresta neural (Weston 1970; Burnstock and Costa 1975). A pesar de que no se observó diferencia en los niveles de NeuN, se evaluó su distribución subcelular debido a que está reportado que durante el proceso de diferenciación se transloca al núcleo de neuronas post-mitóticas (Mullen, Buck et al. 1992; Van Nassauw, Wu et al. 2005). Sin embargo, NeuN se localizó en el núcleo de células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar y diferenciadas (**Figura 7**), apoyando la posibilidad de que las células PC12 tienen características de neuronas post-mitóticas.

En relación a la expresión incrementada de NF-L en células PC12-control comparado con células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas, podría sugerir que la sobreexpresión de Dp40_{L170P} disminuye o afecta el nivel de diferenciación de células PC12 Tet-On causando una reducción en el NF-L (**Figura 11**). Además, se observa que en las células PC12-Dp40 diferenciadas disminuye la expresión de NF-L en comparación con lo observado en células PC12-control diferenciadas. Pero el análisis estadístico indicó que la diferencia no es significativa. Esto indicaría que el incremento en el crecimiento neurítico

observado en células PC12-Dp40 no está relacionado con el incremento del neurofilamento NF-L, aunque el nivel de esta proteína si es afectado por la sobre-expresión de la Dp40_{L170P}.

De las 14 proteínas que presentaron expresión diferencial (**Figura 9**) en el análisis proteómico comparativo entre células PC12-control y PC12-Dp40_{L170P}, solo 8 proteínas fueron identificadas correctamente mediante MS (**Tabla 8**), de acuerdo a la base de datos Swiss Prot. Estas proteínas están relacionadas con; 1) Cambios en la reorganización del citoesqueleto en neuronas (α -internexina y S100a6); 2) metabolismo (Fosfoglicerato mutasa 1, L-lactato deshidrogenasa cadena A, Alfa enolasa y precursor de la proteína reguladora de glucosa), 3) comunicación celular (Ectonucleótido pirofosfatasa) y 4) estrés celular (subunidad zeta de la proteína 1 del complejo T). Aunque varias de las proteínas diferencialmente expresadas son de metabolismo, se ha reportado que las enzimas relacionadas con metabolismo son identificadas frecuentemente hasta en un 40% en los análisis proteómicos. El incremento de estas proteínas puede estar relacionado con el tratamiento de los tejidos o células previo a la obtención del extracto proteico originando estrés celular (Petрак, Ivanek et al. 2008).

Es interesante y relevante para este trabajo que dos de las proteínas identificadas están involucradas con reorganización del citoesqueleto ya que las células que sobre-expresan a las distrofinas cortas PC12-Dp40 y Dp40_{L170P} presentan cambios morfológicos durante la diferenciación. Una de las proteínas identificadas por espectrometría de masas fue la proteína S100a6 que presentó la mayor regulación positiva, con una razón de cambio de 2.1. S100a6 pertenece a la familia de proteínas de unión de calcio y es expresada de manera específica en subpoblaciones de neuronas y astrocitos (Leœniak, Swart et al. 2000). Además, debido a su capacidad de unirse a proteínas como tropomiosinas, anexinas, caldesmonina y calponina se ha sugerido que participa en la reorganización del citoesqueleto (Donato 2003; Leœniak, Słomnicki et al. 2009). Por otro lado α -internexina fue la

proteína con la segunda mayor regulación positiva con una razón de cambio de 2.0, la cual pertenece a la familia de filamentos intermedios de tipo IV y se expresa de forma temprana en neuronas durante el desarrollo del cerebro (Kaplan, Chin et al. 1990).

α -internexina presentó una menor expresión en células PC12-control y PC12-Dp40 diferenciadas con respecto a células sin diferenciar (**Figura 10 y 11**), lo que concuerda con la disminución de este neurofilamento durante el desarrollo de neuronas mesentéricas de ratón (Faussonne-Pellegrini, Matini et al. 1999). Por otro lado, α -internexina se sobre-expresa en células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas con respecto a células PC12-control y PC12-Dp40 (**Figura 11**), lo que resulta interesante debido a que se ha reportado que α -internexina se expresa en neuronas inmaduras, disminuyendo su expresión durante la adultez (Faussonne-Pellegrini, Matini et al. 1999). Esto pudiera relacionarse con la disminución en el crecimiento neurítico de las células PC12-Dp40_{L170P} debido a la sobreexpresión y localización nuclear de la Dp40_{L170P} y que podría interferir con la función de la Dp40. α -internexina es el único neurofilamento intermedio expresado durante el desarrollo de neuronas granulares del cerebelo por lo que podría estar relacionado con el crecimiento neurítico (Chien, Mason et al. 1996) debido a que se ha mostrado que el co-ensamble de α -internexina con el NF-M (*Neurofilament medium chain*) incrementa el espacio entre los filamentos (Kornreich, Malka-Gibor et al. 2015).

El cúmulo de neurofilamentos es una característica de enfermedades neurodegenerativas como esclerosis lateral amiotrófica, demencia tipo cuerpos de Lewy y Parkinson (Munoz, Greene et al. 1988; Sasaki, Maruyama et al. 1989; Trojanowski and LEE 1994). También, se ha reportado que ratones transgénicos que sobre-expresan α -internexina presentan un cúmulo de α -internexina en el cerebelo formando estructuras conocidas como torpedos que resultan por un hinchamiento anormal de los axones de células de Purkinje (Ching, Chien et al. 1999).

Por otro lado la menor expresión del NF-L en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas (**Figura 11**) podría estar indicando que la sobreexpresión de la Dp40 y Dp40_{L170P} disminuye el estado de diferenciación de células PC12, ya que NF-L es un marcador de neuronas maduras (Lariviere and Julien 2004). En las inmunofluorescencias se observa la distribución subcelular de α -internexina principalmente en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar y diferenciadas (**Figuras 12 y 13**). Al llevar a cabo la detección de VAMP se encontró que tiene una baja expresión en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar en comparación con células PC12-Dp40 diferenciadas en donde se observó una mayor expresión con respecto a células PC12-Dp40_{L170P}, esta diferencia es más amplia cuando se compara con células PC12-control (**Figura 11**). Esto correlaciona con el mayor crecimiento neurítico observado en las células PC12-Dp40. En el 2012 se demostró que la Dp40 es capaz de interactuar con las proteínas de vesículas sinápticas VAMP-2, STX1A y SNAP25 (Tozawa, Itoh et al. 2012) y que la transfección transitoria de VAMP-2 en células PC12 promueve el crecimiento neurítico (Shirasu, Kimura et al. 2000).

La disminución del crecimiento neurítico observado en células PC12-Dp40_{L170P} pudiera estar relacionado con la capacidad α -internexina de interaccionar con el complejo AP3 el cual regula la distribución de proteínas de vesículas sinápticas (Styers, Salazar et al. 2004). Lo anterior sugiere que la Dp40 promueve el crecimiento neurítico posiblemente mediante la interacción directa con VAMP a través de una regulación positiva durante la diferenciación. Es importante hacer la observación de que, aunque el aumento en la expresión de VAMP en células PC12-Dp40 podría estar relacionado con la mayor expresión de Myc-Dp40, las células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas las cuales presentan un incremento de α -internexina presentan una menor expresión de la proteína recombinante Myc-Dp40_{L170P} con respecto a Myc-Dp40, lo cual sugiere que la sobreexpresión de VAMP o α -internexina observada en células PC12-Dp40 o PC12-Dp40_{L170P}

respectivamente podría estar relacionado de manera importante con la distribución subcelular de las proteínas recombinantes y no con sus niveles de expresión.

Por otro lado, en células PC12-control, PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} sin diferenciar no se detectó la expresión de HspB1 y en células PC12 diferenciadas se detectaron niveles de expresión bajos de HspB1. Esto contrasta con los reportes previos donde se ha demostrado que la sobreexpresión de las distrofinas Dp71 Δ 78-79 y Dp71e Δ 71 promueven el crecimiento neurítico mediante la regulación positiva de HspB1 en células PC12 diferenciadas (Aragón, Romo-Yáñez et al. 2011; Merino-Jiménez, Aragón et al. 2016; García-Cruz, Merino-Jiménez et al. 2018). Esto sugiere que el crecimiento neurítico favorecido por la sobreexpresión de la Dp40 pudiera llevarse a cabo mediante un proceso diferente al promovido por la sobreexpresión de isoformas de Dp71, uno de los cuales podría ser la exocitosis de vesículas sinápticas debido a la relación de la Dp40 con proteínas del complejo SNARE (VAMP-2, STX1A y SNAP25) y a la especulación de que este proceso participa de forma relevante en el crecimiento neurítico (Bloom and Morgan 2011).

Las proteínas recombinantes Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} presentaron el mismo patrón en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} pero con diferente intensidad en geles 2-DE (**Figura 14**). Esto sugiere que pueden existir que las proteínas Myc-Dp40 y Myc-Dp40_{L170P} pueden sufrir el mismo tipo de modificaciones post-traduccionales que alteren el peso de las proteínas. También, se observaron cambios en la intensidad de la señal de las manchas lo que podría indicar que la distribución subcelular diferencial de la Dp40 (mayormente citoplasmática) o de la Dp40_{L170P} (mayormente nuclear) podría promover el incremento de alguna modificación post-traduccionales.

En el 2014 se reportó el caso de 6 pacientes varones de una misma familia que tenían una delección de tres pares de bases en la posición 9711 a 9713 del gen *DMD*, estos pacientes presentan diferentes grados de déficit

cognitivo pero sin presentar un desgaste muscular progresivo (De Brouwer, Nabuurs et al. 2014). Interesantemente, la posición del amino ácido afectado en estos pacientes corresponde a la leucina 170 que cambió de leucina a prolina en la mutante Dp40_{L170P}. Aunque la delección de la leucina podría afectar a todas las distrofinas fue de especial interés conocer si una delección en lugar de un cambio puntual de aminoácidos produce el mismo efecto en la distribución subcelular de la Dp40 promoviendo una localización nuclear.

Se observó que la proteína recombinante Myc-Dp40_{ΔL170} se localiza predominantemente en el núcleo de células PC12 Tet-On en células sin diferenciar y diferenciadas (**Figura 16 y 17**), lo cual es similar a lo reportado previamente para la Dp40_{L170P} (Aragón, Martínez-Herrera et al. 2015). Con estos experimentos se podría sugerir que la alteración del residuo 170 en la distrofina Dp40 podría estar asociada con el déficit cognitivo reportado en pacientes con DMD (De Brouwer, Nabuurs et al. 2014). Interesantemente, el cambio de leucina a prolina en el residuo 170 de la Dp40 es una zona rica en leucina y es una posible señal de exporte nuclear (NES) que al ser modificada podría alterar el exporte nuclear de la Dp40. Se ha reportado que es necesaria la presencia de los motifs EF-Hand para que el dominio WW interactúe eficientemente con β -dístroglicano (Rentschler, Linn et al. 1999) por lo que la alteración del motif EF-Hand2 de la Dp40 podría alterar la interacción con otras proteínas como β -dístroglicano y por consiguiente su correcta distribución subcelular.

El modelado de la estructura tridimensional de la Dp40_{L170P} mostró que la zona alrededor del residuo 170 presenta desorganización estructural debido a la formación de estructuras β -plegadas que no se presentan en el modelo para la Dp40 silvestre (**Figura 18**). También, se observó la desorganización alrededor del codón que codifica para la leucina 170 la cual se encuentra ausente en la Dp40_{ΔL170} debido a que se observan estructuras con poca organización las cuales son representadas con las barras en color gris (**Figura 18**).

Con todos los resultados obtenidos durante esta sección se propone un modelo (**Figura 19**) para entender la regulación entre la Dp40, los componentes de vesículas sinápticas, filamentos intermedios y el proceso de crecimiento neurítico.

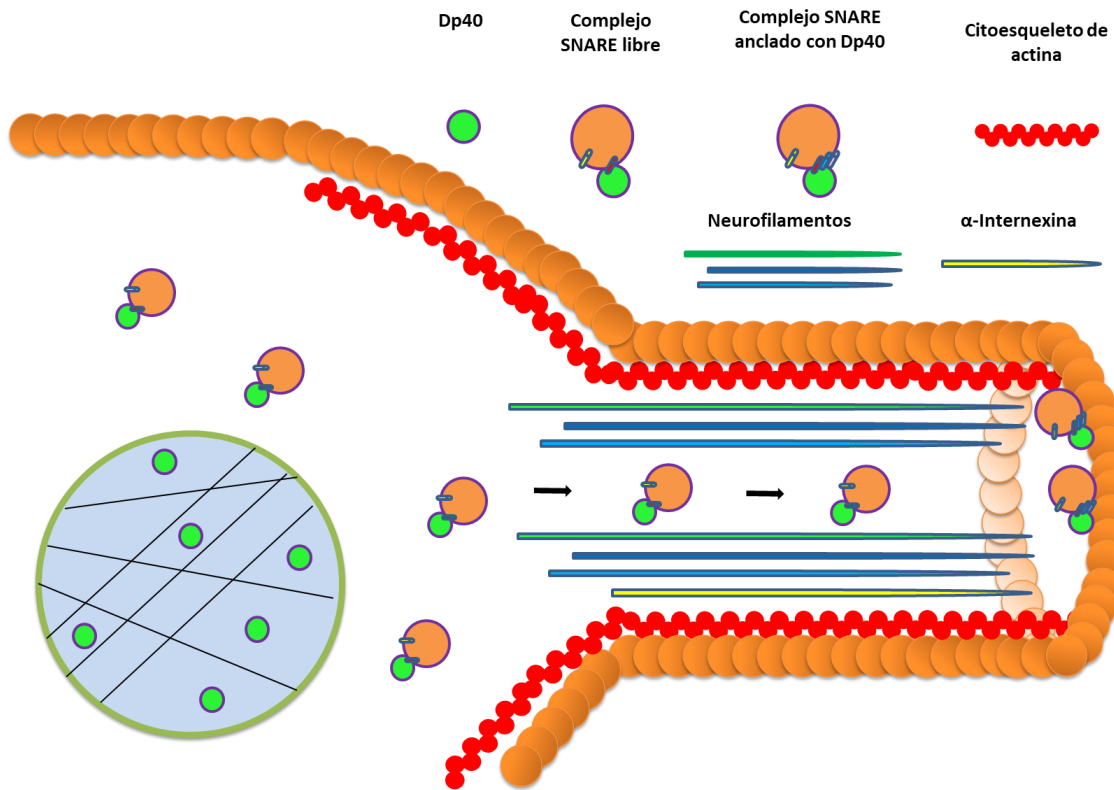


Figura 19. Modelo del crecimiento neurítico de células PC12 que sobre-expresan la Dp40.

Modelo de crecimiento neurítico basado en los resultados obtenidos. Se observa el complejo SNARE libre (en café la vesícula sináptica, en amarillo la sinaptotagmina, en rojo VAMP y en verde la Dp40) previo a su anclaje a la zona activa y el complejo SNARE anclado que incluye su interacción con SNAP25 (Azul) y syntaxina 1A (violeta). La sobre-expresión de la Dp40 promueve su unión con VAMP al complejo SNARE libre siendo capaz de interactuar con syntaxina 1A y SNAP25 una vez ancladas para así promover el crecimiento neurítico mediante ciclos de excitación. La presencia de la Dp40 en el núcleo debido a mutaciones podría disminuir el crecimiento neurítico por la disminución de VAMP y podría propiciar la sobre-expresión del neurofilamento intermedio α -internexina como mecanismo compensatorio para promover el crecimiento neurítico.

CONCLUSIONES SECCIÓN 1

Participación de la distrofina Dp40 y Dp40_{L170P} durante el proceso de diferenciación neuronal de células PC12

- La sobreexpresión de la Dp40 promueve el crecimiento neurítico de las células PC12 a diferencia de la Dp40_{L170P} que disminuye el crecimiento neurítico en estas células.
- El perfil de expresión proteico de las células PC12-Dp40_{L170P} diferenciadas mostró 13 manchas con regulación positiva y 1 una con una regulación negativa.
- Las proteínas identificadas con expresión diferencial por espectrometría de masas están relacionadas con reorganización del citoesqueleto, metabolismo, comunicación y estrés celular.
- La sobreexpresión de la Dp40_{L170P} incrementa los niveles de expresión de α -internexina durante la diferenciación de células PC12.
- La sobreexpresión de la Dp40 incrementa los niveles de expresión de VAMP y la sobreexpresión de Dp40_{L170P} disminuye su expresión.
- HspB1 mostró niveles de expresión bajos en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}.
- Las células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P} presentaron una disminución en los niveles de expresión de NF-L durante el proceso de diferenciación neuronal de células PC12.

PERSPECTIVAS SECCION 1

- Validar un mayor número de proteínas con expresión diferencial.
- Realizar ensayos de interacción entre la Dp40 y α -internexina.
- Realizar un análisis proteómico de fracciones de vesículas sinápticas de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}.
- Evaluar la expresión de diferentes neurofilamentos y proteínas de vesículas sinápticas de células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}.
- Evaluar la expresión de los grupos de distrofinas cortas (Dp71f, D71d y Dp71e) en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}.

OBJETIVOS PARTICULARES SECCIÓN 2

Participación de la distrofina Dp71e_{Δ71} en el proceso de diferenciación neuronal de células PC12

1. Analizar el crecimiento neurítico de las células PC12-Dp71e_{Δ71} diferenciadas nueve días con NGF.
2. Analizar el perfil de expresión proteica de células PC12-Dp71e_{Δ71} diferenciadas con NGF.
3. Identificar a las proteínas de interés por espectrometría de masas.
4. Validar la expresión diferencial de proteínas sobre-expresadas por la distrofina Dp71e_{Δ71}.
5. Proponer un modelo que explique la función de las proteínas Dp71 y Dp71e_{Δ71}.

MATERIALES Y METODOS SECCION 2

Los materiales y métodos empleados en esta sección son los mismos que se muestran en materiales y métodos de la sección 1, excluyendo las metodologías usadas en el apartado II y IX que corresponden a la “verificación de la integración de los vectores pTRE2pur-Myc/Dp40 y pTRE2pur-Myc/Dp40_{L170P} en células PC12-Dp40 y PC12-Dp40_{L170P}” y a la “mutagénesis sitio dirigida”, respectivamente. Además, el apartado de “Cultivo de células PC12 y diferenciación celular” de materiales y métodos de la sección 1 indica el manejo de las líneas celulares PC12-control y PC12-Dp71e_{Δ71} usadas en esta sección.

RESULTADOS SECCIÓN 2

Efecto de la proteína Myc-Dp71e_{Δ71} en la morfología de células PC12 Tet-On durante el proceso de diferenciación neuronal

Antes de estudiar el efecto de la Dp71e_{Δ71}, la cual es una proteína endógena presente en diferentes tejidos humanos se analizó la expresión de la proteína recombinante Myc-Dp71e_{Δ71} en células PC12-Dp71e_{Δ71} y PC12-control en células sin diferenciar y diferenciadas durante 9 días con NGF. Se obtuvieron extractos proteicos de tres experimentos independientes los cuales se analizaron mediante inmunodetección en fase sólida. En la **figura 20** se observa que la proteína Myc-Dp71e_{Δ71} solo está presente en las células PC12-Dp71e_{Δ71} sin diferenciar (**Figura 20A**) y diferenciadas (**Figura 20B**) no así en células PC12-control.

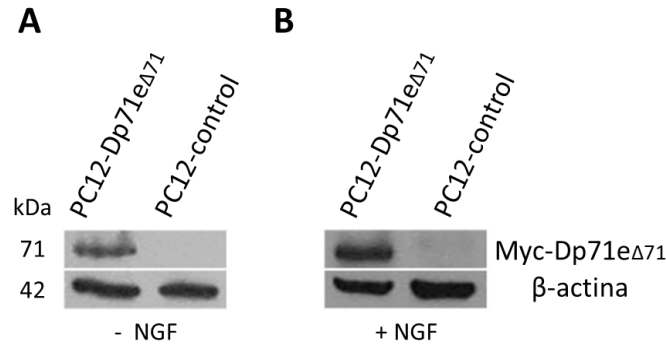


Figura 20. Expresión de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 en células PC12-Dp71e Δ 71 sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días. Se obtuvieron extractos proteicos de células PC12-Dp71e Δ 71 y células PC12-control. Los extractos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida con un SDS-PAGE. Expresión de Myc-Dp71e Δ 71 en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar (**A**) y diferenciadas (**B**). kDa: representa el peso molecular de las proteínas en kilodaltones (kDa) marcador de peso molecular. Myc: epítipo para la detección de las proteínas recombinantes y β -actina como control de carga.

Se evaluó mediante análisis morfométrico si la sobreexpresión de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 altera la morfología de las células PC12 Tet-On durante el proceso de diferenciación neuronal estimulado por NGF durante 9 días. Como referencia previa a la diferenciación se tomaron micrografías de campo claro de las células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar tratadas con doxiciclina durante 24 horas.

Previo a la inducción de la diferenciación se observó que células PC12-Dp71e Δ 71 presentaban cuerpo celular más grande y tendían a agruparse en comparación con las células PC12-control. Después de los 9 días de diferenciación se observó que las células PC12-Dp71e Δ 71 presentan neuritas más largas en comparación con células PC12-control (**Figura 21**). Se cuantificó el porcentaje de diferenciación que corresponde al número de células que desarrollaron neuritas sin importar su longitud, como se describe en Materiales y Métodos. Además, se cuantificó la longitud de neuritas que corresponden a todas aquellas células con neuritas mayores a dos cuerpos celulares.

El análisis del porcentaje de diferenciación (**Figura 21E**) mostró que las células PC12-Dp71e Δ 71 tienen un mayor porcentaje de diferenciación ($20.53\% \pm 0.63$) que las células PC12-control ($3.12\% \pm 0.86$). La cuantificación de la longitud de neuritas (**Figura 21F**) indicó que las células PC12-Dp71e Δ 71 presentan un incremento significativo en la longitud de las neuritas ($114.69 \mu\text{m} \pm 1.80 \mu\text{m}$) en comparación con células PC12-control ($82.37 \mu\text{m} \pm 1.22$).

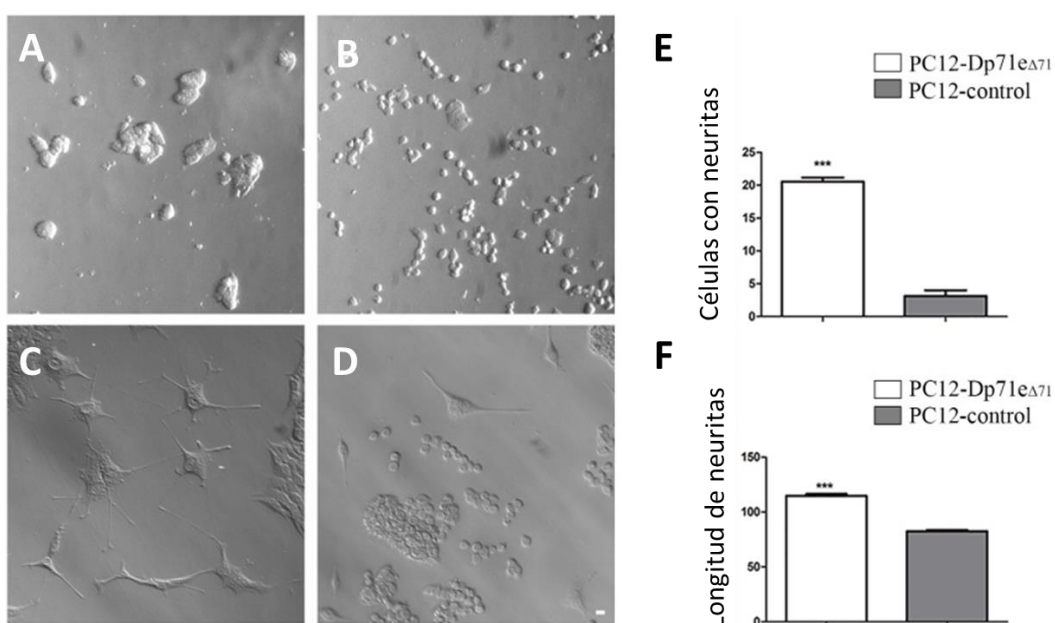


Figura 21. Análisis morfométrico de las células PC12-Dp71e Δ 71 durante la diferenciación neuronal. Las líneas celulares se diferenciaron durante 9 días con NGF como se indica en Materiales y Métodos. El análisis morfométrico se realizó mediante micrografías de campo claro de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar (**A** y **B**) y diferenciadas (**C** y **D**). Cuantificación del porcentaje de neuritas (**E**) y longitud de neuritas (**F**) de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control diferenciadas con NGF. Escala equivalente a 10 micrómetros.

Expresión diferencial de proteínas de células PC12-Dp71e Δ 71

Para determinar las proteínas que están involucradas en promover el incremento de la diferenciación de células PC12-Dp71e Δ 71 se realizó electroforesis en dos dimensiones (2-DE). Para esto se obtuvieron por triplicado extractos proteicos independientes de células diferenciadas durante 9 días con NGF de células PC12-Dp71e Δ 71 y células PC12-control.

Posterior a la obtención de los geles 2-DE, éstos se analizaron con el software imageMaster 2D platinum 7 para calcular el porcentaje/volumen de cada mancha para determinar si hay expresión diferencial. El alineamiento entre los geles 2-DE de las células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control (**Figura 22**) a partir de la selección un gel maestro para cada línea celular, el cual representa la mayoría de las manchas, indicó un promedio de 334.33 manchas para las células PC12-control y de 267.66 para las células PC12-Dp71e Δ 71, de los cuales el porcentaje de alineamiento (o “match”) entre los geles 2-DE de cada línea celular y entre ambas líneas celulares fue de 98.16% (**Tabla 7**). Esto demostró una calidad y resolución adecuada para continuar con el análisis de expresión diferencial. En este análisis se consideraron las manchas con una razón de cambio a partir de 1.5 veces. Se detectaron un total de 14 manchas con expresión diferencial positiva que corresponde al 4.65% del promedio total de 301 manchas. No se encontró ninguna mancha con una regulación negativa. Las **figuras 23A y B** muestran el número de identificación (ID) de cada mancha establecido para su escisión del gel 2-DE de células, para su identificación por masas.

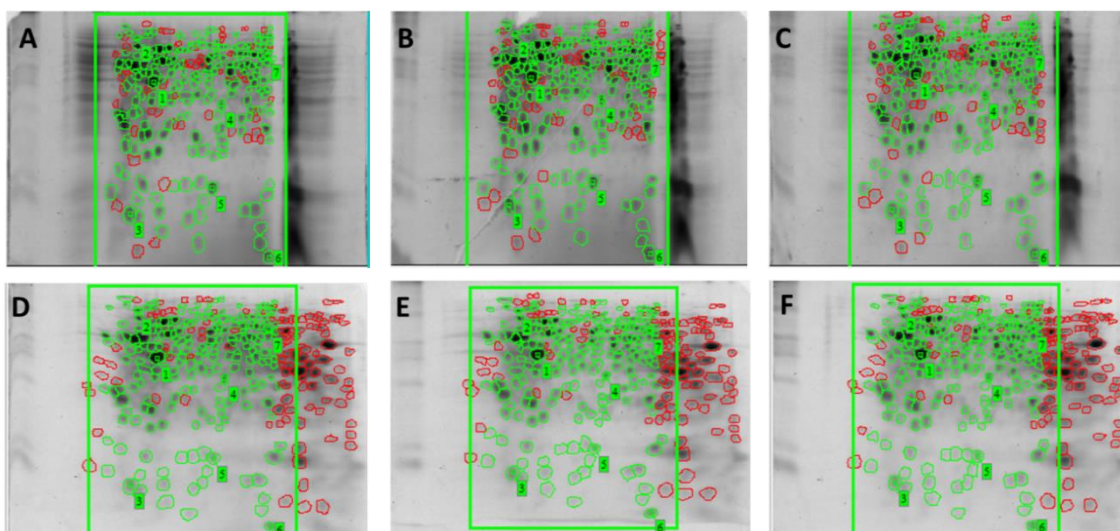


Figura 22. Alineamiento de geles 2-DE de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control. Se llevó a cabo el Alineamiento de geles 2-DE con el software ImageMaster 2D de células PC12-Dp71e Δ 71 y células PC12-control diferenciadas 9 días con NGF. Se obtuvieron los extractos celulares 9 días de diferenciación con NGF. Los extractos fueron sometidos a una primera dimensión mediante tiras de pH inmovilizado. Después, la segunda dimensión se realizó mediante geles de poliacrilamida con un SDS-PAGE. **A, B y C.** Corresponden a los geles 2-DE de células PC12-Dp71e Δ 71. **D, E y F.** Corresponden a los geles 2-DE de células PC12-control. Las imágenes fueron obtenidas con el escáner imageQuant 4000 en escala de grises. Los círculos verdes indican que las manchas coinciden con el gel maestro (**A**) y los círculos rojos indican que las manchas no coinciden con gel maestro.

Muestra	Conteo de manchas	Promedio de conteo de manchas	Porcentaje de reproducibilidad	Promedio del porcentaje de reproducibilidad	Total del porcentaje de reproducibilidad
PC12-control 1	336	334.33	100%	99,33%	98.16%
PC12-control 2	333		99%		
PC12-control 3	334		99%		
PC12-Dp71e Δ 71 1	268	267.66	99%	97%	
PC12-Dp71e Δ 71 2	267		96%		
PC12-Dp71e Δ 71 3	268		96%		

Tabla 7. Cuantificación de manchas y porcentajes de reproducibilidad de geles 2-DE de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control. Se obtuvo el porcentaje de reproducibilidad seleccionando un gel maestro para cada línea celular (PC12-Dp71e Δ 71 1 y PC12-control 1) los cuales contienen representados la mayoría de las manchas. El software imageMaster 2D platinum 7 compara cada uno de los geles con el gel maestro indicando el porcentaje de alineamiento.

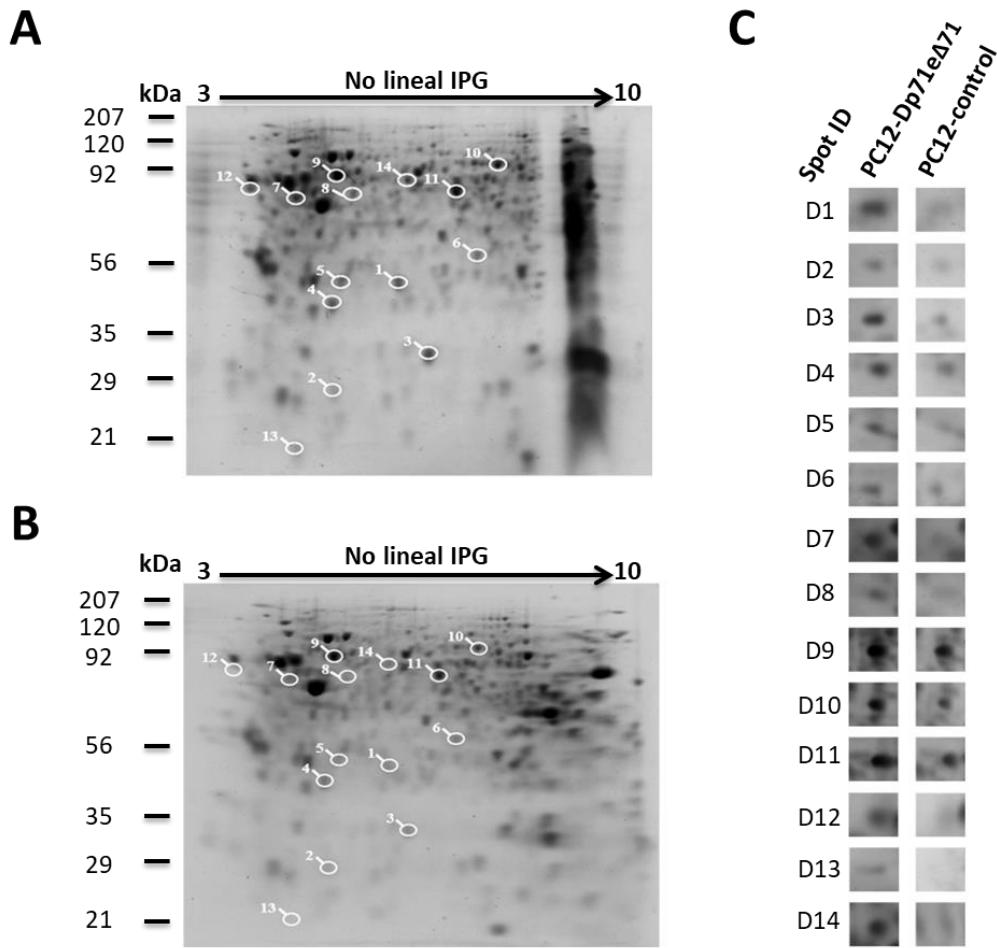


Figura 23. Expresión diferencial de células diferenciadas PC12-Dp71e Δ 71. Se colectaron extractos proteicos de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control diferenciadas durante 9 días y se separaron mediante tiras no-lineales de pH inmobilizado (7 cm), seguido de una electroforesis en gel de poliacrilamida con un SDS-PAGE. **A.** Geles 2-DE correspondiente de células PC12-Dp71e Δ 71. En la parte superior de los geles se indica el rango (3-10) del punto isoeléctrico (pI). **B.** Gel 2-DE correspondiente de células PC12-control. En los geles 2-DE se observa la posición de las manchas en los geles 2-DE que presentaron expresión diferencial. **C.** Número de identificación y ampliación de las manchas que presentaron expresión diferencial.

Después de identificar las proteínas con expresión diferencial se identificaron mediante espectrometría de masas (MALDI).

Todas las manchas que presentaron expresión diferencial fueron identificadas por espectrometría de masas (MS) mediante la técnica de ionización MALDI como se indica en la sección de materiales y métodos para determinar a qué proteína pertenecen. En la **tabla 8** se indican las proteínas a las que pertenecen los péptidos identificados para cada mancha. Las 14 manchas identificadas con expresión diferencial fueron identificadas correctamente. La mayoría de las proteínas identificadas están relacionadas con metabolismo (Alfa enolasa, gama enolasa, la proteína de choque térmico mitocondrial de 60 kDa, la glutatión S transferasa omega 1, la creatina cinasa tipo B y la proteína de unión a ácido retinoico), respuesta a estrés celular (la proteína de choque térmico β 1 y la superóxido dismutasa), proteínas estructurales (queratina tipo 2 citoesqueleto 8) y de unión a calcio (Calumenina y S100a6).

Spot ID	Variación	Razón de cambio	MS	No. Acceso	Proteína	Gen	PM [kDa]	pI	Péptidos	SC (%) ^{b)}
1	+	5.4	MS/MS	P14602	Proteína de choque térmico beta-1	Hspb1	23.0	6.1	3	53.6
2	+	1.9	MS/MS	P62965	Proteína de unión a ácido retinoico I	Crabp1	15.6	5.2	1	34.6
3	+	3	MS/MS	P07632	Superóxido dismutasa	Sod1	15.9	5.8	3	32.7
4	+	2.4	MS/MS	P31044	Proteína de unión a fosfatidiletanolamina 1	Pebp1	20.8	5.4	9	82.8
5	+	2.9	MS/MS	P42930	Proteína de choque térmico beta-1	Hspb1	22.9	6.1	3	20.9
6	+	1.7	MS/MS	P18420	Subunidad alfa tipo -1 del proteasoma	Psm1	29.5	6.1	3	49
				O09131	Glutación S-transferasa omega- 1	Gsto1	27.5	6.9	1	37.5
7	+	2.6	MS/MS	P07323	Gamma enolasa	Eno2	47.1	5.0	11	72.3
8	+	1.9	MS/MS	P07335	Creatina cinasa tipo-B	Ckb	42.7	5.4	2	25.5
9	+	1.8	MS/MS	P63039	60 kDa Proteína de choque térmico, mitocondrial	Hspd1	60.9	5.9	14	47.5
10	+	2.2	MS/MS	O35814	Fosfoproteína inducida por estrés 1	Stip1	62.6	6.4	11	49.4
11	+	3	MS/MS	P04764	Alfa enolasa	Eno1	47.1	6.1	4	29.1
12	+	1.9	MS/MS	O35887	Calumenina	Calu	37.0	4.5	4	39.7
13	+	4	MS/MS	P05964	Proteína S100a6	S100a6	10	5.3	1	28.1
14	+	2.6	MS/MS	Q10758	Queratina tipo 2, citoesqueleto 8	Krt8	54.0	5.8	5	28.4

Tabla 8. Identificación por espectrometría de masas (MS) del perfil de expresión de células PC12-Dp71e_{Δ71} diferenciadas. Las proteínas se identificaron por espectrometría de masas (MS) a partir del perfil de expresión. Mancha ID: número de identificación de la mancha. Variación: (-) =regulación negativa; (+) regulación positiva. Razón de cambio: número de veces del incremento o decremento. Base de datos: No. acceso: Número de acceso de acuerdo a la base de datos Swiss Prot de *Rattus norvegicus*. PM: peso molecular en kilodaltones (kDa). pI: punto isoelectrico teórico. Match pept: Número de péptidos identificados. %SC: porcentaje de secuencia cubierta.

Evaluación de la expresión de HspB1 y TH

Posterior a la identificación por espectrometría de masas de las manchas con expresión diferencial, se procedió a validar la proteína con mayor expresión diferencial en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control diferenciadas durante 9 días con NGF. La proteína con la mayor expresión diferencial positiva fue la proteína HspB1 (*Heat shock protein B1*) la cual obtuvo una razón de cambio de 5.4 en células PC12-Dp71e Δ 71. Para conocer el estado de la diferenciación neuronal se evaluó la expresión de la proteína tirosina hidroxilasa (TH), como marcador de diferenciación, involucrada en la síntesis del precursor de dopamina (L-DOPA).

En la **figura 24** se observó un incremento significativo de 2.3 veces de la expresión de HspB1 en células PC12-Dp71e Δ 71 comparado con células PC12-control con lo cual se valida la expresión diferencial observada en los geles 2-DE. Por otro lado, la expresión de TH mostró un incremento significativo de 9.0 veces con respecto a células PC12-control (**Figura 24B**).

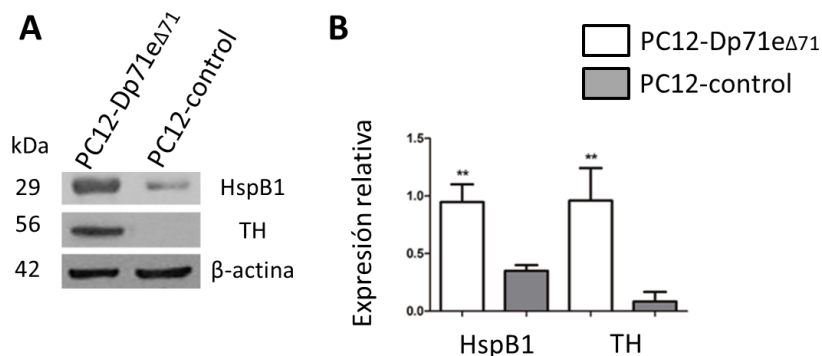


Figura 24. Expresión diferencial de HspB1 y el marcador neuronal TH en células PC12-Dp71e Δ 71 diferenciadas con NGF durante 9 días. Se utilizaron extractos proteicos de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control. Los extractos fueron sometidos a un SDS-PAGE. **A.** Expresión de las proteínas HspB1 y TH. **B.** La expresión relativa de HspB1 y TH fue determinada como se indica en materiales y métodos. Las gráficas representan el promedio de desviación estándar de tres experimentos independientes. El peso molecular de cada proteína se indica en la columna de kilodaltones (kDa). Se utilizó β -actina como control de carga.

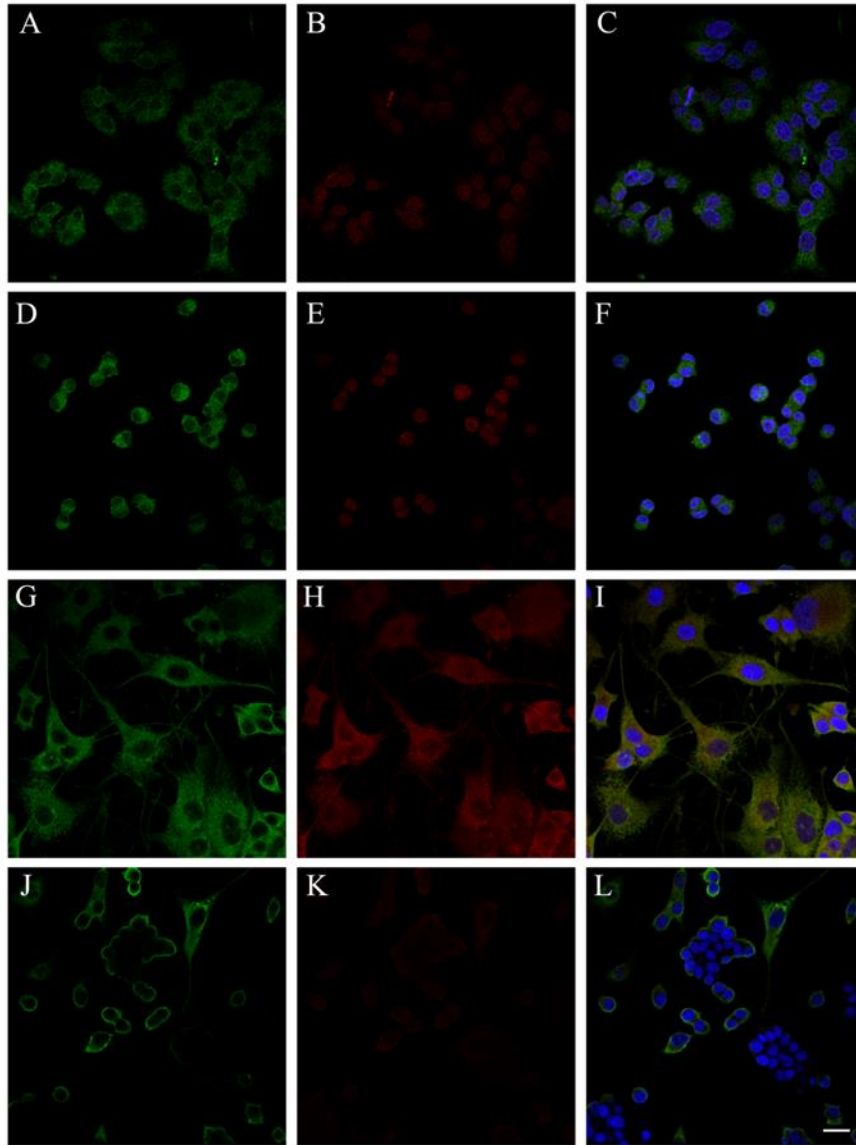
Distribución subcelular de Myc-Dp71e Δ 71 y HspB1

La distribución subcelular de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 y HspB1 se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días. Se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón para detectar el epítopo c-Myc de la proteína recombinante Myc-Dp71e Δ 71.

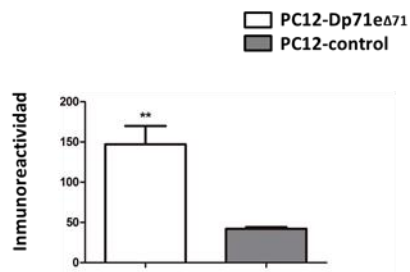
Primero se evaluó la distribución subcelular del epítopo c-Myc en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar (**Figura 25 A-F**) y diferenciadas (**Figura 25 G-L**) con NGF durante 9 días. La distribución subcelular del epítopo c-Myc se observó en citoplasma y en el núcleo de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control en células sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días respectivamente. En células PC12-Dp71e Δ 71 sin diferenciar (**Figura 25A**) el porcentaje de inmunoreactividad entre citoplasma ($53.33\% \pm 1.09$) y núcleo ($46.67\% \pm 1.09$; $P=0.012$) es similar. Para células PC12-control (**Figura 25D**) sin diferenciar se observó un resultado similar ya que el porcentaje de inmunoreactividad para citoplasma fue de $53.22\% \pm 0.52$ y para el núcleo de $46.78\% \pm 0.52$ ($P=0.001$). Para células PC12-Dp71e Δ 71 diferenciadas (**Figura 25G**) se observó un mayor porcentaje de inmunoreactividad en el citoplasma ($60.91\% \pm 1.40$) con respecto al núcleo ($39.09\% \pm 1.40$; $P=0.0004$). Igualmente, para células PC12-control diferenciadas (**Figura 25J**) donde se observó un mayor porcentaje de inmunoreactividad entre citoplasma ($62.74\% \pm 6.48$) y núcleo ($37.26\% \pm 6.48$; $P=0.049$).

HspB1 presentó una distribución subcelular en el citoplasma y núcleo en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar (**Figura 25B y E**) y diferenciadas (**Figura 25H y K**) con NGF durante 9 días. La distribución subcelular de HspB1 se observó en el citoplasma y núcleo de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días. HspB1 presentó un mayor porcentaje de inmunoreactividad en el

núcleo ($62.44\% \pm 2.56$) con respecto al citoplasma ($37.56\% \pm 2.56$; $P=0.002$) de células PC12-Dp71e $_{\Delta 71}$ sin diferenciar (**Figura 25B**). También las células PC12-control sin diferenciar mostraron un mayor porcentaje de inmunoreactividad en el núcleo ($59.03\% \pm 0.42$) con respecto al citoplasma ($40.79\% \pm 0.41$; $P=0.0001$). En células PC12-Dp71e $_{\Delta 71}$ diferenciadas (**Figura 25H**) HspB1 presentó un porcentaje de inmunoreactividad similar entre citoplasma ($48.14\% \pm 1.23$) y núcleo ($51.86\% \pm 1.23$; $P=0.10$). Además, el porcentaje de inmunoreactividad entre citoplasma ($48.14\% \pm 1.23$) y núcleo ($51.86\% \pm 1.23$; $P=0.10$) de células PC12-control diferenciadas (**Figura 25K**) fue similar. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de HspB1 fue 3 veces mayor en células PC12-Dp71e $_{\Delta 71}$ diferenciadas con respecto a células PC12-control (**Figura 25**). Se cuantificó el porcentaje de colocalización entre el epítopo c-Myc y HspB1 donde se observó un porcentaje de colocalización de 25.60% y 1.70% en células diferenciadas PC12-Dp71e $_{\Delta 71}$ y PC12-control respectivamente (**Figura 25N**).



M



N

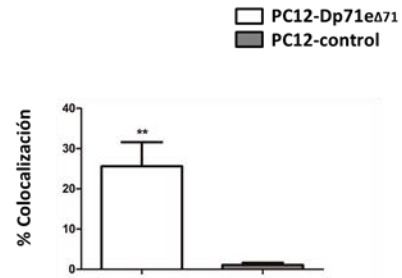


Figura 25. Distribución subcelular de Myc-Dp71e Δ 71 y HspB1 en células PC12-Dp71e Δ 71. Se analizaron células sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días. Se obtuvieron micrografías de cortes por microscopia confocal de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal anti-c-Myc, un anticuerpo policlonal anti-HspB1 y el colorante DAPI que tiñe núcleos celulares. **A, D, G, J.** Localización del epítipo c-Myc en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control en células sin diferenciar y diferenciadas respectivamente. **B, E, H, K.** Localización de HspB1 en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar y diferenciadas respectivamente. **C, F, I, L.** Sobre-posición de la señal para el epítipo c-Myc y HspB1 en células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control en células sin diferenciar y diferenciadas respectivamente. El porcentaje de inmunoreactividad de HspB1 (**M**) y el porcentaje de colocalización (**N**) entre el epítipo c-Myc y HspB1 de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control es representada como la desviación estándar de tres experimentos independientes. Escala equivalente a 20 micrómetros.

Para verificar el efecto de la sobre-expresión de Dp71e Δ 71 en el crecimiento neurítico y su distribución celular en células PC12 Tet-On diferenciadas, se seleccionó otra clona que sobre-expresa a la Dp71e Δ 71 denominada PC12-Dp71e Δ 71/C9.

Primero se evaluó la morfología de las células PC12-Dp71e Δ 71/C9 mediante campo claro sin diferenciar (**Figuras 26A-C**) y diferenciadas (**Figura 26D-F**) con NGF durante 9 días. Se observó que en células PC12-Dp71e Δ 71/C9 aún sin diferenciar se aprecian algunas células con neuritas cortas (**Figura 26A**). Una vez que se agregó NGF durante 9 días la mayoría de células PC12 Tet-On presentaron neuritas varias veces más largas que su cuerpo celular (**Figura 26D**). Posteriormente se observa que en células PC12-Dp71e Δ 71/C9 sin diferenciar la proteína Myc-Dp71e Δ 71 presenta una distribución subcelular principalmente en el citoplasma comparado con núcleo (**Figura 26B**). En células PC12-Dp71e Δ 71/C9 diferenciadas se observó un mayor nivel de expresión de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 con respecto a las células sin diferenciar (**Figura 26E**). Además, la proteína Myc-Dp71e Δ 71 se localizó en el citoplasma, neuritas y en menor medida en el núcleo en células diferenciadas. Las **figuras 26C** y **F** se muestran las sobre-posición de la señal para la proteína Myc-Dp71e Δ 71 y el colorante DAPI.

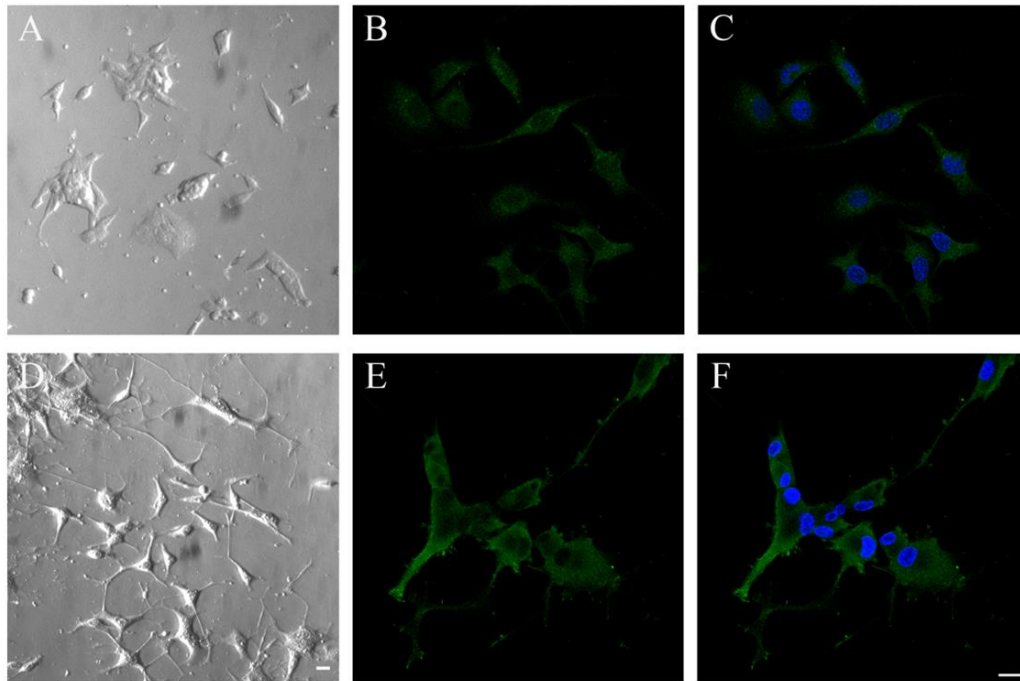


Figura 26. Distribución subcelular de la proteína Myc-Dp71e Δ 71 en las células PC12-Dp71e Δ 71 clona C9. Se obtuvieron micrografías de campo claro e inmunofluorescencia indirecta de células PC12-Dp71e Δ 71 y PC12-control sin diferenciar y diferenciadas con NGF durante 9 días. Se utilizó un anticuerpo monoclonal para detectar la proteína recombinante Myc-Dp71e Δ 71 y el colorante DAPI que tiñe núcleos celulares. **A.** Morfología de células PC12-Dp71e Δ 71 sin diferenciar. **D.** Morfología de células PC12-Dp71e Δ 71 diferenciadas. **B.** Localización de Myc-Dp71e Δ 71 en células sin diferenciar. **E.** Localización de Myc-Dp71e Δ 71 en células diferenciadas. **C y F.** Sobre-posición de la señal para el epítopo c-Myc y el colorante DAPI. Escala equivalente a 20 micrómetros.

DISCUSIÓN SECCIÓN 2

Participación de la distrofina Dp71e Δ 71 en el proceso de diferenciación neuronal de células PC12

Como se mencionó previamente, el déficit cognitivo se ha asociado con mutaciones presentes en Dp71 en pacientes con DMD (Daoud, Angeard et al. 2009). Esto posiblemente por la función relevante de Dp71 en el sistema nervioso central (SNC). Se ha demostrado que la pérdida de Dp71 puede alterar la organización de la sinapsis glutamatérgica en ratones KO Dp71 al deslocalizarse la proteína de densidades post-sinápticas 95 (PSD-95) y el transportador vesicular de glutamato (Daoud, Candelario-Martínez et al. 2009). Además, el silenciamiento de la Dp71 retrasa el ciclo celular y disminuye el crecimiento neurítico en células PC12 diferenciadas indicando su participación relevante en este proceso de diferenciación neuronal (Villarreal-Silva, Suarez-Sanchez et al. 2010). Sin embargo son pocos los estudios que abordan la participación de cada una de las isoformas de Dp71 (Aragón, González-Reyes et al. 2018) en el proceso de diferenciación neuronal.

Nuestro grupo de trabajo reportó el aumento de la expresión del transcrito de la Dp71e Δ 71 en células PC12 durante la diferenciación, además de estar presente en diferentes tejidos de rata adulta como músculo, corazón, hígado y cerebro. También se detectó la expresión de la proteína endógena Dp71e Δ 71 en células PC12 y en pulmón y corazón de rata (Saint Martin, Aragon et al. 2012). Por otro lado mediante transfecciones transitorias de células PC12 sin diferenciar se reportó que la Dp71e Δ 71 se distribuye en la membrana, citoplasma y núcleo pero incrementa su concentración en el núcleo de células PC12 diferenciadas (Aragón, Martínez-Herrera et al. 2016). Además, se ha reportado que la sobre-expresión de una mutante de Dp71 que carece de los dos últimos exones y el exón 71 denominada como

Dp71 $_{\Delta 78-79}$ incrementa el crecimiento neurítico de células PC12 diferenciadas con el incremento de expresión y fosforilación de la proteína HspB1 (Merino-Jiménez, Aragón et al. 2016) sugiriendo que la presencia de los dos últimos exones no están involucrados en el crecimiento neurítico.

Las células PC12-Dp71e $_{\Delta 71}$ sobre-expresan la proteína recombinante a partir del sistema de inducción inducible Tet-On. Se fijó la concentración del inductor (doxiciclina) en 100 ng/ml debido a que concentraciones de 200 ng/ml son tóxicas para células PC12 (Ermak, Cancasci et al. 2003). Una vez demostrada la sobre-expresión de Dp71e $_{\Delta 71}$ en células PC12 Tet-On sin diferenciar y diferenciadas se realizó el análisis morfométrico que demostró el efecto de la sobre-expresión de la proteína Myc-Dp71e $_{\Delta 71}$ en células PC12 Tet-On el cual promueve un mayor número de células con neuritas de mayor longitud (**Figura 20**). Igualmente se observó este efecto en el crecimiento neurítico cuando se sobre-expresa la mutante Dp71 $_{\Delta 78-79}$ en células PC12 que sugiere que los últimos dos exones que pertenecen al carboxilo terminal no participan en promover el crecimiento neurítico debido a que el carboxilo terminal de la Dp71e $_{\Delta 71}$ es parte del intrón 77 que traduce 10 aminoácidos de carácter hidrofóbico (Saint Martin, Aragon et al. 2012).

El análisis proteómico entre células PC12-Dp71e $_{\Delta 71}$ y células PC12-control diferenciadas con NGF durante 9 días identificó 14 proteínas con expresión diferencial todas ellas reguladas positivamente. Las proteínas que fueron identificadas mediante espectrometría de masas (**Tabla 8**) están relacionadas con metabolismo (alfa y gama enolasa, Hspd1, glutatión S-transferasa omega 1 y creatinina cinasa tipo B), respuesta a estrés (HspB1 y la superóxido dismutasa), y con la reorganización del citoesqueleto (queratina tipo 2 citoesqueleto 8 y la proteína S100a6). Es posible que las proteínas relacionadas con metabolismo se incrementan debido al estrés celular y se encuentran frecuentemente reguladas positivamente en estudios de proteómica (Pettrak, Ivanek et al. 2008). Llama la atención que HspB1 fue la proteína con la mayor regulación positiva al igual que observado con la

mutante Dp71 Δ_{78-79} en células PC12 diferenciadas (Merino-Jiménez, Aragón et al. 2016). La sobre-expresión de HspB1 fue corroborada mediante inmunodetección en fase sólida (**Figura 24**). Se ha reportado que HspB1 está involucrada en la extensión de neuritas de neuronas del ganglio basal de rata (Williams, Rahimtula et al. 2006) y en regular la dinámica del citoesqueleto de actina por medio de la fosforilación mediada por la MAP cinasa p38 (Guay, Lambert et al. 1997). Además HspB1 se ha localizado en los axones, neuritas y componentes sinápticos en cultivos de neuronas de hipocampo de rata (Schmidt, Bartelt-Kirbach et al. 2012). Por otro lado también se ha reportado que la isoforma Dp71f colocaliza con la sinaptofisina un componente de vesículas presinápticas presente en varicosidades y conos de crecimientos de células PC12 diferenciadas (Marquez, Cisneros et al. 2003). Posiblemente esto indica que las estrategias de crecimiento neurítico son similares cuando se sobre-expresan la Dp71 Δ_{78-79} y Dp71e Δ_{71} , sin embargo podrían promover cambios en algunos procesos como la secreción de neurotransmisores debido a la sobre-expresión de TH en células PC12-Dp71e Δ_{71} diferenciadas, como se observa en la **figura 24** (Donato 2003; Gupton and Gertler 2010; Bloom and Morgan 2011).

La segunda proteína con la mayor expresión diferencial positiva fue la proteína S100a6 (**Tabla 8**) que pertenece a la familia de proteínas de unión a calcio relacionado con la dinámica del citoesqueleto, proliferación celular, diferenciación, homeostasis del Ca²⁺ y adhesión celular (Donato 2003). S100a6 se une a tropomiosinas, anexinas, caldesmina y calponina sugiriendo que esta proteína puede regular el citoesqueleto de actina (Leśniak, Słomnicki et al. 2009). Además, se ha detectado en fluidos fisiológicos y en medios de cultivo, lo que sugiere su posible participación en procesos de secreción (Celis, Crüger et al. 1990; THORDARSON, SOUTHARD et al. 1991). También, la expresión de la proteína S100a6 induce el crecimiento neurítico en ausencia de NGF (Masiakowski and Shooter 1990).

Otra de las proteínas reguladas positivamente fue el péptido colinérgico neuroestimulador hipocampal (HCNP) que aumenta el fenotipo colinérgico y estimula la síntesis de acetilcolina induciendo la actividad de la transferasa de acetilcolina (ChAT) en neuronas colinérgicas del núcleo septal medio (Ojika, Mitake et al. 2000). HCNP es derivado de la proteína precursora de HCNP (HCNP-pp), también conocida como proteína de unión a fosfotidiletanolamina (PEBP) y proteína inhibidora de la cinasa Raf (RKIP) (Yeung, Seitz et al. 1999). Interesantemente una de las proteínas que mostraron incremento en el perfil de expresión proteico fue HCNP-pp sugiriendo un incremento de los niveles de expresión de ChAT y por lo tanto influenciando el fenotipo colinérgico (Higgins, Iacovitti et al. 1981; Ernsberger, Patzke et al. 1997). Sin embargo los niveles de TH, el cual es un marcador de neuronas noradrenérgicas que también fue incrementado en células PC12-Dp71e Δ 71 diferenciadas (**Figura 24**). Esto indica que las células PC12-Dp71e Δ 71 son capaces de liberar catecolaminas al mismo tiempo que adquieren un fenotipo colinérgico lo que se ha reportado en estudios que presentan la co-expresión de ambos sistemas de neurotransmisores (Hoard, Hoover et al. 2008).

La citoqueratina 2 tipo 8 (K8) fue otra de las proteínas reguladas positivamente, la cual pertenece a la familia de filamentos intermedios (Fuchs and Cleveland 1998). La función principal de estas proteínas es dar soporte a las células pero también se ha relacionado con señalización y apoptosis (Kirfel, Magin et al. 2003). Se ha reportado que la citoqueratinas K8 y K19 interaccionan con la distrofina completa de músculo estriado de rata (Ursitti, Lee et al. 2004). Considerando lo anterior podemos especular que el incremento de la Dp71e Δ 71 probablemente promueva el aumento de K8 para estimular el crecimiento neurítico de células PC12 Tet-On. Adicionalmente evaluamos una clona diferente que sobre-expresa la Dp71e Δ 71, denominada C9, la cual también estimula el crecimiento neurítico comparado con células PC12-control. Esto reafirma la observación que la sobreexpresión de Dp71e Δ 71 promueve el crecimiento neurítico en células

PC12 Tet-On posiblemente mediante el incremento y la fosforilación de HspB1.

Con los resultados obtenidos correspondientes a la sección 1 y 2 se generó un modelo de crecimiento neurítico (**Figura 27**) favorecido por la sobre-expresión de la distrofina Dp71e Δ 71 en células PC12.

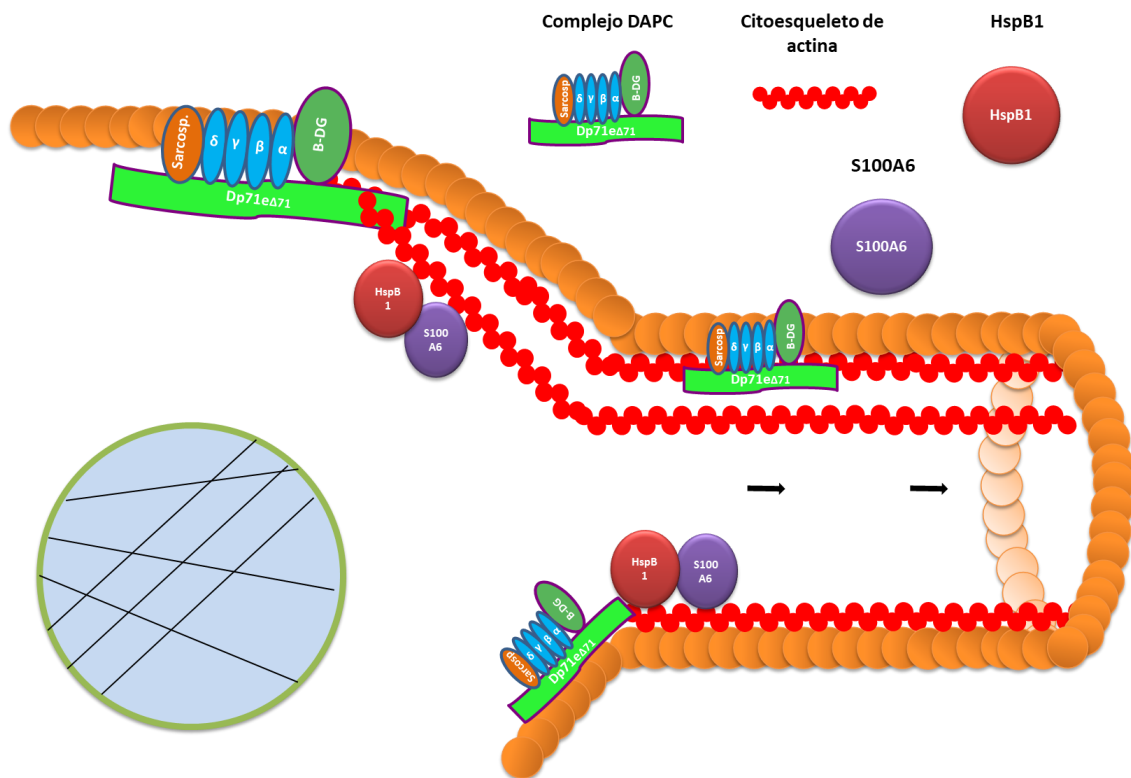


Figura 27. Modelo del crecimiento neurítico de células PC12 que sobre-expresan la Dp71e Δ 71. Se observa el complejo DAPC (complejo de proteínas asociado a distrofinas) con β -distroglicano (β -DG: en Verde oscuro), sarcoglicanos (azul) y Sarcospan (café). La sobre-expresión de la Dp71e Δ 71 incrementa la expresión de HspB1 y S100a6, lo que promueve la reorganización del crecimiento neurítico mediante la reorganización del citoesqueleto de actina. Ambas estrategias de crecimiento neurítico, la promovida por la sobre-expresión de la Dp40 (**Figura 19**) y la Dp71e Δ 71 durante la diferenciación neuronal podrían ocurrir en diferentes regiones del cerebro o retina en momentos diferentes o simultáneamente de la diferenciación neuronal.

CONCLUSIONES SECCIÓN 2

Participación de la distrofina Dp71e_{Δ71} durante el proceso diferenciación neuronal de células PC12

- La sobreexpresión de la Dp71e_{Δ71} incrementa el crecimiento neurítico durante la diferenciación neuronal de células PC12.
- El perfil de expresión proteico de células diferenciadas que sobre-expresan Dp71e_{Δ71} mostró 14 manchas con expresión diferencial positiva en relación a las células control.
- Las proteínas sobre-expresadas identificadas por espectrometría de masas mostraron proteínas relacionadas con reorganización del citoesqueleto, metabolismo y estrés celular.
- Las células PC12-Dp71e_{Δ71} diferenciadas presentan un incremento en la expresión de HspB1.
- Las células PC12-Dp71e_{Δ71} diferenciadas presentan un incremento en la expresión de TH.

PERSPECTIVAS SECCION 2

- Validar un mayor número de proteínas con expresión diferencial.
- Realizar ensayos de interacción entre HspB1 y Dp71e_{Δ71}.
- Evaluar la expresión de los grupos de distrofinas cortas (Dp71f, Dp71d y Dp71e) en células PC12-Dp71e_{Δ71}.

OBJETIVOS PARTICULARES SECCIÓN 3

Análisis de la expresión de las distrofinas en cerebro y retina de ratón por RNA-seq

1. Cuantificar el nivel de expresión de las distrofinas en diferentes tipos celulares de cerebro y retina.
2. Identificar procesamientos alternativos nuevos en el gen *DMD*.
3. Validar los procesamientos alternativos nuevos en el gen *DMD*.

MATERIALES Y METODOS SECCION 3

I. Análisis *in silico* de bases de datos de cerebro y retina de ratón

Se utilizaron bases de datos de secuenciación masiva públicas (https://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html) y privadas de diferentes tipos celulares de cerebro y retina las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Cyrille Vaillend y el Dr. Jérôme Roger ambos del Instituto de Neurociencias de la Universidad de Paris-sud (Francia) y por el Dr. Martine Cohen-Salmon del Centro para la Investigación Interdisciplinaria en Biología (Francia). Los archivos en formato Bam fueron proporcionados por el Dr. Jérôme Roger. Posteriormente fueron revisados con el programa IGV (*Integrative Genomics Viewers*) utilizando la base de datos del genoma de ratón mm10. Se utilizó la opción del gráfico Shashimi para obtener y graficar el número de lecturas de cada exón del gen *DMD*. Las lecturas son un conjunto de secuencias de un fragmento único expresado en número de copias o lecturas. Igualmente se utilizó el gráfico Sashimi para visualizar los procesamientos alternativos ya reportados o nuevos. Las lecturas para cada exón y procesamiento alternativo nuevo fueron normalizadas y organizadas en un mapa de calor.

II. Amplificación de la inserción nueva localiza en el intrón 51 mediante **extracción del RNA mensajero (mRNA)**

Se realizó una disección del hipocampo, cerebelo, corteza y retina de ratones adultos de la cepa C57BL/6J (JANVIER, Francia) y retina de ratones adultos *mdx52* manejados de acuerdo a la declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión. Se homogenizaron las muestras de hipocampo, cerebelo, corteza y retina de ratones. También se extrajo retina de ratón *mdx52* como un control negativo debido a que no expresa las distrofinas Dp427, Dp260 y Dp140.

Se homogenizaron las muestras con 1 ml de Trizol por cada 50-100 mg de tejido usando un sonicador. Después para retirar el contenido de grasas las muestras fueron centrifugadas a 12000 g a 4°C durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a TA para posteriormente añadir 200 µl por 1 ml de Trizol y agitar vigorosamente. Se incubaron de 2-3 minutos a TA y se centrifugaron a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo para agregar 500 µl de isopropanol por cada mililitro de Trizol. Las muestras se incubaron por 10 minutos TA y se centrifugaron a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Después, se decantó por inversión el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante por inversión y se dejó secar la pastilla por 5 a 10 minutos. La pastilla de mRNA se disolvió en 50 µl de agua libre de RNAsa. Por último, las muestras se incubaron en una parrilla térmica a 55-60°C de 10 a 15 minutos y se cuantificaron mediante Nano-drop para determinar la concentración de RNA y posteriormente se almacenaron a -80°C. A continuación, las muestras de mRNA fueron precalentadas 5 minutos a 65°C y posteriormente colocadas en hielo. Posteriormente para obtener el cDNA se utilizó la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se usaron hexa-primers (o hexa-oligonucleótidos) para amplificar la cadena de

RNA a DNA. Las muestras fueron calentadas durante 10 minutos a 25°C, posteriormente durante 50 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C para finalizar a una temperatura de 4°C. Se realizó una PCR usando la Taq. polimerasa de Thermo Fischer siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se utilizaron diferentes pares de oligonucleótidos para validar la amplificación de la nueva inserción. En la **tabla 9** se muestran los pares de oligonucleótidos utilizados para este fin.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
Intrón 51 F	CTAGTGG AATCCATGATGAATTCTC
Exón 52 R	GCAGCAGTAATGAGTTCTTCC
Exón 50 F	AAGATCTGAGGTCTGAGTGGG
Intrón 51 R	GAGAATTCATCATGGATTCCACTAG
Exón 53 R	GCTTCTTCCTTAGCTTCCAGC

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de la inserción nueva localizada en el intrón 51 del gen *DMD*.

RESULTADOS SECCIÓN 3

Análisis de la expresión de distrofinas en cerebro y retina de ratón mediante RNA-seq

Para conocer la expresión de las distrofinas en diferentes regiones y tipos celulares de cerebro y retina se utilizaron bases de datos públicas y privadas generadas por secuenciación masiva de mRNA las cuales fueron analizadas. La **figura 28** se obtuvo analizando la base de datos de Barres disponible en el sitio https://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html que muestra la expresión del gen *DMD* en FPKM (*Fragments per kilobase per millón of reads mapped* por sus siglas en inglés) de diferentes tipos celulares de cerebro. En la **Figura 28** podemos observar que el gen *DMD* se expresa en niveles altos en astrocitos comparado con otros tipos celulares. Sin embargo, en esta gráfica no podemos observar los niveles de expresión de cada grupo de distrofina (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40).

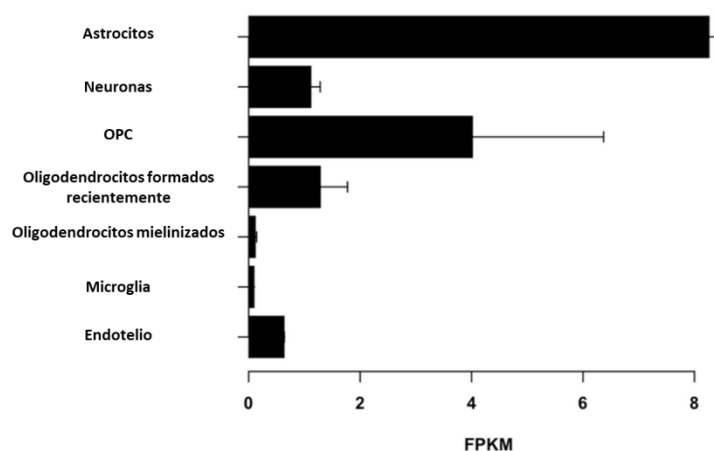


Figura 28. Expresión transcripcional del gen *DMD* en diferentes tipos celulares de cerebro de ratón mediante secuenciación masiva (RNA-seq) tomada de la base de datos pública https://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_rnaseq.html de Barres y colaboradores. OPC: células progenitoras de oligodendrocitos.

En este trabajo se usaron archivos Bam y el software IGV (*Intergrative Genomics Viewer*) para revisar todo el gen *DMD* y verificar la expresión de las diferentes distrofinas así como la presencia de procesamientos alternativos ya reportados o nuevos. En la **tabla 10** podemos observar los exones 1 específicos para cada distrofina. Debido a que algunas distrofinas no contienen un exón 1 específico, se utilizaron secuencias como regiones no traducidas (UTR: *unstralated regions* por sus siglas en inglés) para realizar el análisis de cada transcrito. Para contabilizar las lecturas para la Dp427 de cerebro, músculo y células de Purkinje se usaron lecturas presentes sus respectivas UTRs. Para la expresión del mRNA de la Dp140 se usó la UTR localizada en el intrón 44. Se midió la expresión de la Dp260 cuantificando las lecturas de su exón 1 específico localizado en el intrón 29. Para cuantificar la expresión de la Dp71 se utilizó su exón 1 específico localizado en el intrón 62 y para cuantificar la expresión de la Dp40, debido a que toda su secuencia codificante es igual a la Dp71 se usó la UTR localizada en el intrón 70.

Se puede observar en la **tabla 10** que no se detectaron lecturas para la Dp427 de músculo, lo cual está de acuerdo con la baja expresión que se ha reportado para esta distrofina en cerebro. Sin embargo, no se detectaron lecturas para la Dp260 en casi todos los tipos celulares. Para la Dp140 si se detectaron lecturas para la mayoría de los tipos celulares. Por otro lado, a partir del intrón 62, que corresponde al exón 1 de Dp71 o Dp40, se observó una tendencia en el incremento de lecturas con respecto a los exones previos. Además, se observa un mayor número de lecturas para los grupos de la Dp71d y Dp71f en astrocitos en la base de datos de Martine y Barres. No se observaron los procesamientos alternativos para los exones del 71 al 74 reportados anteriormente para cerebro (Aragón, González-Reyes et al. 2018).

CONTEO DE EXONES Y PROCESAMIENTOS ALTERNATIVOS																
Dps.	Dp427 B	Dp427 M	Dp427 P	Dp260	Dp140	Inserción nueva	Dp116	Dp71/Dp40							Dp71f	Dp71d
Exones	ex. 0-2	ex. 1	in. 1	in. 23	in. 44	ex. 51-in51	in. 51-exor in. 55	in. 82	ex. 69	ex. 70	Δ71	Δ 71-74	Δ 72-74	Δ 74	Δ78	ex. 78
Muestras																
Base de datos de Martine																
Astro 35								4	8	3	3				46	60
Astro 36					1			2	9		6				47	45
Astro 37								12	16	6	3				40	40
P. Astro 19								1							9	9
P. Astro 20									1						15	9
P. Astro 21									4		1				17	14
P. Astro 38									6	1					7	8
P. Astro 39								1	2						29	20
P. Astro 40									4							
Muestras																
Base de datos de Barres																
Córtex 1					10			55	50	39	9				35	90
Córtex 2					14			59	51	33	4				26	77
Córtex 3					15			59	31	37	7				23	67
Neuro 1		4			9			11	12	4	8				2	24
Neuro 2		2			12			6	11	4	1				11	25
Endo 1								20	26	15	1				12	13
Endo 2								26	22	18	1				25	15
Astro 1		6			12			172	102	92	4				43	254
Astro 2		13			2	18		158	93	78	7				43	210
MO1						16										1
MO2						1		4	2	1	1					1
NFO1						32		4	15	12	3				7	32
NFO2		2				8		2	13	12	1				6	37
OPC1		18				50		21	76	59	5				14	137
OPC2		4				30		21	18	16					5	10
Microglia 1																
Microglia 2																
Muestras																
Base de datos de Cyrille																
Cereb S7				1		1		15	22	15	13				7	64
Cereb S8				2		3		16	19	14	13				6	39
Cereb S9				1		3		9	39	12	5				3	34
Hipoc S1		6						12	29	15	16				11	32
Hipoc S2		6				1		14	27	15	10				11	44
Hipoc S3		3				2		8	19	6	14				5	20

Tabla 10. Cuantificación de lecturas para exones y UTRs (unstralate region) representativos de las distrofinas en cerebro. Se determinaron las lecturas de los transcritos de Dp427 (B:brain; M: muscle; P: Purkinje), Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40 de bases de datos públicas y privadas generadas por secuenciación masiva de mRNA (RNA-seq) de diferentes tipos celulares de cerebro de ratón. Mediante el software IGV (Integrative Genome Viewer) se revisó el gen DMD para realizar la cuantificación de lecturas para cada exón y cada procesamiento alternativo ya reportado o nuevo. La columna denominada exón nuevo corresponde a las lecturas de una presunta inserción nueva localizada en el intrón 51 de los transcritos de retina pero que está ausente en cerebro. Ex: exón, In: intrón, Astro: astrocitos, P. astro: pies de astrocitos, Neuro: neuronas; Endo: células endoteliales, MO: oligodendrocitos mielinizados, NFO: oligodendrocitos de reciente formación, OPC: células progenitoras de oligodendrocitos, Cereb: cerebelo y Hipoc: hipocampo.

Por otro lado, el conteo de lecturas de muestras de retina en diferentes condiciones mostró un mayor número de lecturas para la mayoría de los exones o regiones UTR específicas para cada distrofina (Dp427, Dp260, Dp140 y Dp71). En la **tabla 10** se observa que las lecturas para el exón 1 de la Dp260 (intrón 29) se encuentran exclusivamente en retina. Se registraron un menor número de lecturas del intrón 44, que corresponden a la UTR de la Dp140, comparado con retina (**Tabla 12**). También se localizó una inserción nueva en el intrón 51 solo en muestras de retina y no en cerebro (**Tablas 10 y 11**). Es importante destacar que también se contabilizó un menor número de lecturas para la inserción nueva en la condición de degeneración de retina (Rd10) con respecto a muestras de retina silvestre y P28. Por otro lado a diferencia de lo que se observó en cerebro (**Tabla 10**) se contabilizaron algunas lecturas para algunos procesamientos alternativos ya reportados para la Dp71 (Aragón, González-Reyes et al. 2018) en muestras de retina.

PRESENCE OF SPLICE JUNCTION AND INTRON RETENTION																		
Dps.	Dp427 B	Dp427 M	Dp427 P	Dp260	Insertion		Dp140	Insertion		Dp116	Dp71/Dp40		Dp71f			Dp71d		
Exones	ex. 0-2	ex. 1	in. 1	in. 23	Ex.40-in. 41	In.40-Ex.41	in. 44	ex. 51-in.51	in. 51-exon5	in. 55	ex. 69	ex. 70	Δ71	Δ71-74	Δ74	Δ77	ex. 78	
Muestras																		
Jérome database																		
Retina 1	8	8	26	6			16	16		4	37	17	3				17	17
Retina 4	5	32	13				3	22		4	25	26		1			3	30
Retina 23	13	42	22				8	18		39	22	3		4	2		6	48
R. Rd10_5		4	16	4			1	12		5	7	8	4				14	10
R. Rd10_3		4	10	6				1		1	13	9	2				5	10
R. Rd10_4		5	4	8				1		2	4	12	3				5	9
F. P2-1		14	86	12				19		2	42	35	36				72	46
F. P2-2		22	40	31			1	35		4	45	35	46				85	51
F. P28-1		19	84	24			2	50			39	39					23	63
F. P28-2		4	53	12			2	4		3	19	24	1		2		17	36
F. P28-3		3	41	13			1	3		3	28	31			1		18	33
F. P28-4		2	50	12			1	27		3	35	22					18	25
F. NP2-1		7	37	17				24		4	81	65	30				125	21
F. NP2-2		7	11	11				3		1	3	7	23				31	13
F. NP28-1		1	24	6			2	19			39	39	44				27	83
F. NP28-2		2	59	16			4	83			111	79	110				55	227
R. WT P2-1		6	14	8			4	4		3	15	19					15	40
R. WT P2-2		2	19	3			2	7		6	22	24	1				3	37
R. Het P2-1		1	21	6			3	6		5	27	17	2				35	50
R. Het P2-2		3	14	10			1	4		3	29	16	1				3	47
R. Hom P2-1		6	26	4			1	5		4	23	23	3				17	53
R. Hom P2-2		5	21	10				5		12	22	21	4				2	79
R. Crx P2-1		3	25	10			1	7		3	15	10	4				20	46
R. Crx P2-2		4	39	3			1	4		3	18	12					28	44
R. Nrl P2-1		1	11	7			2	13		6	26	10					1	42
R. Nrl P2-2		5	30	11			1	5		3	19	11	3				45	19
R. WT P21		3	26				3	32		5	44	36	4		3		44	87
R. WT P21		6	22				5	35		3	43	34	3				43	112
R. Het P21		2	4	1			1	37			41	17					36	33
R. Het P21			10	1			4	33		4	46	34					37	38
R. Hom P21			4	1			2	31		1	36	37	3				47	110
R. Hom P21		1	1	5			1	22		2	35	31	2				33	61
R. Crx P21		1	33	5			3	38			36	37	3				35	114
R. Crx P21		2	36	4			6	31		1	40	37	2				34	109
R. Nrl P21		2	3	18			3	5		3	23	28	4				30	106
R. Nrl P21		2	6	21			3	26		4	33	28	1		1		33	137

Tabla 11. Conteo de lecturas para exones y UTRs (*unstrated regions*) representativos de las distrofinas Dp427 (B:brain; M: muscle; P: Purkinje), Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40 de bases de datos públicas y privadas de secuenciación masiva de mRNA (RNA-seq) en retina de ratón. Se determinaron las lecturas de los transcritos de las distrofinas mediante el software IGV (Integrative Genomic Viewer) se escaneó el gen DMD para realizar el conteo de lecturas para cada exón, para cada procesamiento alternativo y localizar procesamientos alternativos nuevos. FSPR corresponde a foto-receptores clasificados por flujo de ratones del estadio postnatal P28. Rd10 corresponde a retinas con degeneración. La columna denominada exón nuevo corresponde a las lecturas de una presunta inserción nueva localizada en el intrón 51 de los transcritos de retina que conecta el exón 51 y con el exón 52. Las abreviaturas Ex y In corresponden a exón e intrón. A continuación se especifica a que corresponde cada condición celular. Retina: células de retina de ratón en el estadio P30 (Retina), R. Rd10: células retina de ratón en el estadio P30 con 80%, de fotoreceptores muertos y genes Müller sobre-regulados, F-P2: fotoreceptores clasificados por flujo en el estadio P2, F. P28: fotoreceptores clasificados por citometría flujo en el estadio P28, F-NP2: fotoreceptores purificados clasificados por citometría de flujo de retina de ratón KO (Knockdown) para el factor de transcripción NRL en estadio P2, R. WT: células de retina en el estadio P2, R. Het P2: cono de retina con una mutación dominante homocigota con fotoreceptores inmaduros tipo cono en el estadio P2, R. Hom P2: cono de retina para una mutación dominante homocigota con fotoreceptores inmaduros tipo cono en el estadio P2, R. Crx P2: cono de retina KO para el gen Crx en el estadio P2, R. Nrl P2: fotoreceptores clasificados por citometría de flujo en el estadio P2 de ratones KO para el factor de transcripción NRL permitiendo el desarrollo de células tipo cono y no tipo bastón, R. WT P21: células de en el estadio P21. R. Het P21: cono de retina con una mutación dominante heterocigota con fotoreceptores inmaduros en el estadio P21, R. Hom P21: cono de retina con una mutación dominante homocigota con fotoreceptores inmaduros en el estadio P21, R. Crx P21: cono de retina KO para el gen Crx en el estadio P21, R. Nrl P21: fotoreceptores clasificados por citometría de flujo en el estadio P21 de ratones KO para el factor de transcripción NTR permitiendo el desarrollo de células tipo cono y no tipo bastón.

La cuantificación y la normalización de los niveles de expresión de cada exón del gen *DMD* se basó en el número de lecturas en FKPM, en la longitud del gen y el número total de lecturas alineadas. Los información se organizó mediante un mapa de calor (heatmap) donde se indican los niveles de expresión de cada exón del gen *DMD* (**Figura 29**), incluyendo los exones 1 específicos para cada distrofina (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 y Dp40) o sus UTRs para el caso de la Dp140 y la Dp40 (**Figura 29**). En este mapa de calor se observó que en astrocitos ocurre una mayor expresión a partir del exón 1 específico para la Dp71 y Dp40. También el exón 78 (que correspondería al grupo Dp71d) se encontró expresado en niveles altos con respecto al exón 79 (que correspondería al grupo Dp71f). Esto coincide con la literatura donde los transcritos y la proteína del grupo de las Dp71d son mayormente abundantes con respecto al grupo Dp71f en cerebro (Aragón, González-Reyes et al. 2018) comparado con retina. Además a partir del exón 30, que correspondería al exón 2 de la Dp260 (una distrofina que se expresa en niveles altos en retina) se observó un incremento en los niveles de expresión de todos los exones en el gen *DMD* (datos no mostrados) en muestras de retina y no así en cerebro. Por otro lado se cuantificó la expresión de la Dp40 mediante el uso de la UTR-3' localizada en el intrón 70 donde se observó que se expresa principalmente en retina y cerebro. En cerebro solo se observó su expresión en astrocitos y en células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) (**Figura 29**).

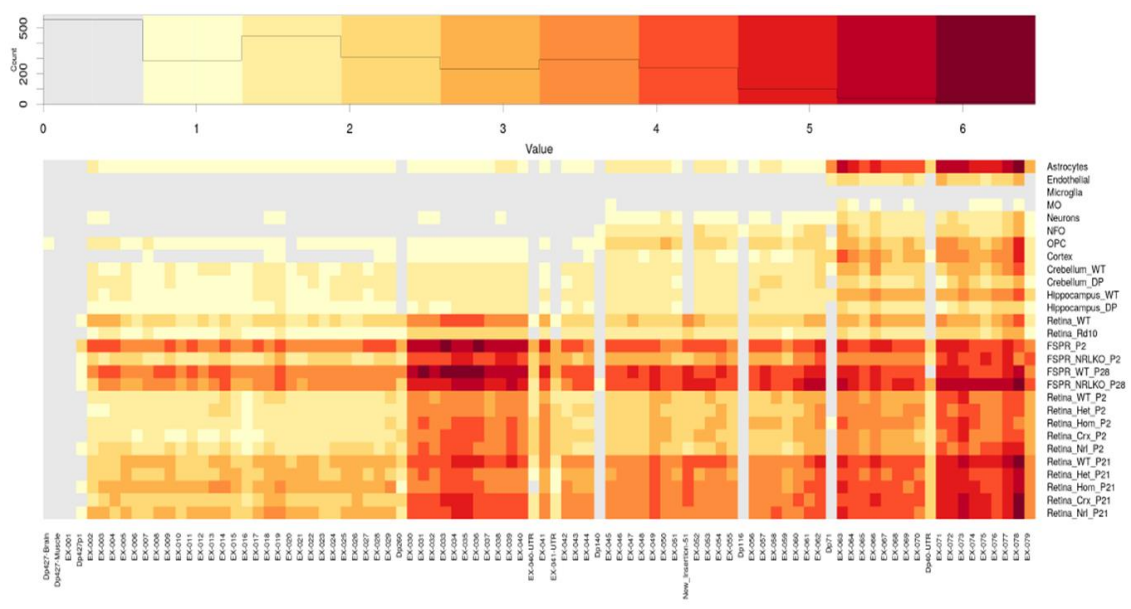


Figura 29. Cuantificación de los niveles de expresión transcripcional de los diferentes exones del gen *DMD* mediante un mapa de calor (heatmap). Se normalizaron los niveles de expresión dependiendo del número de lecturas para cada exón y el tamaño del gen. MO: oligodendrocitos mielinizados, NFO: oligodendrocitos formados recientemente, OPC: células progenitoras de oligodendrocitos, FSPR: foto-receptor clasificado por flujo. En la parte inferior de la figura se indica el nombre de cada exón del gen *DMD* y se nombró la columna que se utilizó para cuantificar cada grupo de distrofina (Dp427, Dp260, Dp140-UTR, Dp116, Dp71 y Dp40-UTR) con los nombres específicos para cada distrofina incluyendo los procesamientos alternativos (New insertion y ex041-UTR). En la cuantificación de la expresión se incluyen células de tipo neuronal y de retina como: Astrocytes (astrocitos), Endothelial (células endoteliales), Microglia, MO (oligodendrocitos mielinizados) neurons (neuronas), NFO (oligodendrocitos de reciente formación), OPC (células progenitoras de oligodendrocitos), Cortex (corteza), Cerebellum_DP (cerebelo de ratón *mdx*), Hippocampus_WT (hipocampo silvestre), Hippocampus_DP (hipocampo de ratón *mdx*). Retina_WT (células de retina de ratón en el estadio P30), Retina_Rd10 (células retina de ratón en el estadio P30 con 80% de fotoreceptores muertos y genes Müller sobre-regulados), FSPR_P2 (fotoreceptores clasificados por citometría de flujo en el estadio P2), FSPR_WT_P28 (fotoreceptores clasificados por citometría de flujo en el estadio P28), Retina_Nrl_P2 (fotoreceptores purificados clasificados por citometría de flujo de retina de ratón KO para el factor de transcripción NRL en estadio P2), Retina_WT_P2: células de retina en el estadio P2, R. Het P2: cono de retina con una mutación dominante homocigota con fotoreceptores inmaduros tipo cono en el estadio P2, Retina_Hom_P2: cono de retina para una mutación dominante homocigota con fotoreceptores inmaduros tipo cono en el estadio P2, Retina_Crx_P2: cono de retina KO para el gen Crx en el estadio P2, Retina_Nrl_P2: fotoreceptores clasificados por citometría de flujo en el estadio P2 de ratones KO para el factor de transcripción NRL permitiendo el desarrollo de células tipo cono y no tipo bastón, Retina_WT_P21: células de en el estadio P21. Retina_Het_P21: cono de retina con una mutación dominante heterocigota con fotoreceptores inmaduros en el estadio P21, Retina_Hom_P21: cono de retina con una mutación dominante homocigota con fotoreceptores inmaduros en el estadio P21, Retina_Crx_P21: cono de retina KO para el gen Crx en el estadio P21, Retina_Nrl_P21: fotoreceptores clasificados por citometría de flujo en el estadio P21 de ratones KO para el factor de transcripción NRL permitiendo el desarrollo de células tipo cono y no tipo bastón.

En la **figura 30B** se observa una ampliación de la lectura de la nueva inserción localizada en el intrón 51 con ayuda del gráfico denominado shashimi que permite visualizar los procesamientos alternativos debido a que se puede apreciar la conexión entre cada exón y el número de lecturas para exones o UTR. Las lecturas para la nueva inserción son menores en muestras con degeneración de retina (Rd10) comparado con muestras de retina silvestre y P28 (estadio post-natal P28). Además, el gráfico shashimi nos indica que la inserción nueva conecta con el exón 51 y el exón 52 (**Figura 30A**).

Para validar la expresión de la inserción nueva se realizó un experimento preliminar donde se obtuvo cDNA mediante la extracción de mRNA de hipocampo, corteza, cerebelo y retina de ratón adulto y además se utilizó retina de ratón mdx52 el cual no expresa las distrofinas Dp260 y Dp140 como control negativo. En la figura **31A** se muestran las mezclas (mz) de oligonucleótidos utilizadas para amplificar los diferentes fragmentos, su longitud en pares de bases (pb) y los exones que abarcan.

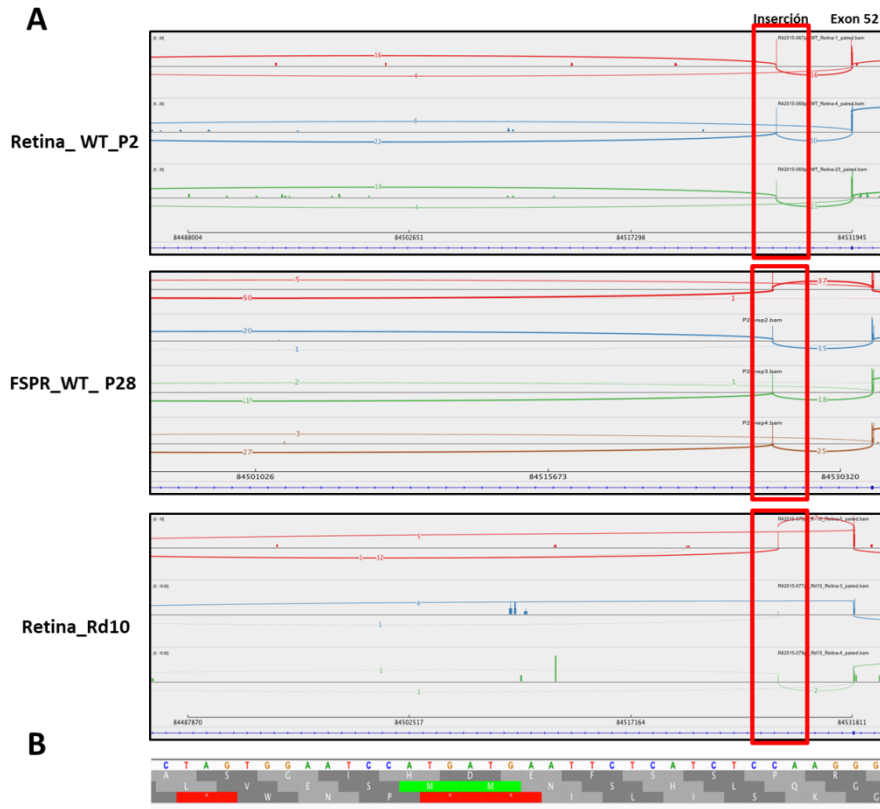


Figura 30. Gráfico Shashimi de la inserción localizada en el intrón 51. A. Se usaron secuencias de retina en el estadio P2 (Retina_WT_P2), P28 (FSPR_WT_P28) y de retina con degeneración (Retina_Rd10) Se utilizó el gráfico shashimi plot del software Integrative Genomic Viewer (IGV) para identificar la presunta inserción nueva en el intrón 51. El recuadro rojo muestra el sitio de la inserción localizado antes del exón 52. **B.** Ampliación de los ORFs (Open Reading Frame) correspondiente a la lectura localizada en el intrón 51 del gen *DMD*.

En la figura **31A** se indica que regiones amplifican cada mezcla (mz) de oligonucleótidos y el tamaño en pares de bases (pb). Se puede observar que todas las mezclas que se usaron en las diferentes regiones del cerebro presentaron una expresión baja o productos de amplificación inespecíficos. La mezcla 1 (mz1) no generó ningún producto de amplificación específico, sin embargo, la mezcla 2 (mz2) permitió la amplificación del fragmento de 258 pb que mostró una mayor expresión en retina de ratón adulto con respecto a la retina de ratón *mdx52*. Se descartó el uso de la mezcla 3 (mz3) debido a que genera un fragmento muy corto que difícilmente puede

visualizarse en geles de agarosa. También se logró observar un producto de amplificación con un peso aproximado de 357 pb en retina de ratón y no en ratón *mdx52* o en cerebro de ratón adulto con la mezcla 4 (Mz4) de oligonucleótidos (**Figura 31**).

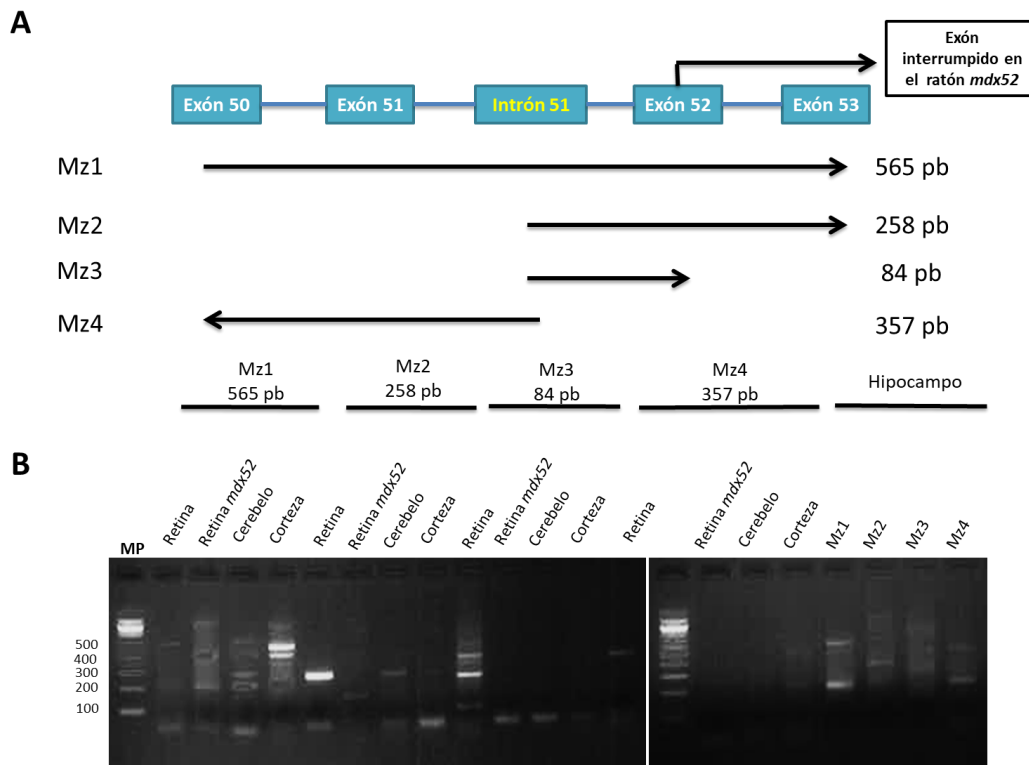


Figura 31. Validación de la inserción nueva localizada en el intrón 51 en retina en cerebro y retina de ratón. Se obtuvieron extractos de mRNA de cerebelo, corteza, hipocampo y retina de ratón adulto de ratón C57BL/6J y retina de ratón *mdx52*. **A.** Representación esquemática de la longitud en pares de bases (pb) y que exones abarcan las mezclas (mz) de oligonucleótidos utilizados. En la parte superior se muestra el exón interrumpido en el ratón *mdx52*. **B.** PCR de diferentes regiones del cerebro y retina. MP: marcador de peso molecular.

Posteriormente, se realizó un análisis *in-silico* para saber si los 36 nucleótidos que forman parte de la inserción nueva, localizada en el intrón 51, son capaces de traducirse en una proteína. Para lo cual se colocaron los 36 nucleótidos después del exón 51 del gen de la distrofina Dp427, Dp260 y Dp140 para *Homo sapiens* y se utilizó la herramienta de traducción de la plataforma “Expasy translate tool” para observar los tres marcos de lectura abiertos. En la **figura 32** se observa la traducción *in-silico* para la distrofina Dp260 y Dp140 donde vemos que se genera un ORF (*Open Reading Frame*) en dirección 5´a 3´ en donde se traduce completa la inserción de 36 nucleótidos, generando 12 aminoácidos sin modificación del marco de lectura abierto de las distrofinas. Es importante mencionar que la nueva inserción del intrón 51 también traduce la Dp427c de “*Homo sapiens*” sin alterar el marco de lectura (Datos no mostrados).

A

Secuencia de la inserción nueva
CTAGTGGGAATCCATGATGAATTCTCATCTCCAAGGG

Dp260-1, *Homo sapiens*

ORF 5'3'

MetTEMetILLIFFPAYFLNAVRRQKLEEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVDAAQMetPQEAQKIQSDLTSHEISLEE Met
KKNHQQGEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMetKFRFLFQKPANFEQRLQESKMetILDEVKMetHLPALLETKSVQEVEVQSQNLNHCVNLYK
SLSEVKSEVEMetVIKTGRQIVQKKQNTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQLEKCKLRSRKMetRKEMetNVLTEWLAATD MetE
LTKRSAVEGEMetPSNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKTLEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQK
HMetETFDQNVDDHITKWIJQADTLDESEKPKKQKEDVLKRLKAEIENDIRPKVDSTRDQAANL MetANRGDHRKRLVEPQISELNRHF
AAISHRIKTGKASIPLEKELEQFNSDIQKLLPEAEIQGGVNLKEEDFNKDMetNEDNEGTVKELLQRGDNLQRITDERKREEIKKQ
LLQTKHNALKDLRSQRKKALEISHQWYQYKRAADDLLKCLDDIEKCLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGLSED
GAAAMetAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREEMetMetVMetTEDMetPLEISYVPSYLTLEITHVSQLLEVEQLLNAPD
LCAKDFEDLQKQESLKNIKDLSLQSSGRDIIHSSKKTAAALQSATPVERVKLQEALESQDLFQWEKVNKMetYKDRQGRFDRSVEKWR
FHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTIQIPENWEHAKYKWLKELQDGGIGRQRTVVRTLNATGEEIIQSSKTDASILQEKLGSLNLRWQEV
CKQLSDRKRLEEFQKNILSEFORDLNEFFLWLEADNIAASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPRLQGLKQLNETGGPVLVSAPI
SPEEQDKLENKLLKQTNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQKDLGQLEKKEDELEFQNLHLLWLSPIRNQLIEYQPNQEGPFDVQETETA
VQAQKPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPKRKLDELSSEWKAVNRLLQELRAKQPDLPGLTTLIGASPTOTVLTQPVVTKETAISKI
EMetPSSLMetLEVPALADFNRAWTELTDLWSLLDQVIKSQRVMetVGDLEDINEMetIHKQLVESMetMetNSHLQCATMetQDLEQRRPQL
EELITAAQNLKKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHQNRRLQNE MetLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTV
DAIQKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLAKLLRDYSADDTKRVHMetITENINASWRSIHKRVSERAALAEETHRLQQFPDLLEK
FLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDKSGVKELMetKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMetNE
KWSLRRKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQKDDLSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKPEVIMetSTLETIV
IFLLEQPLEGLEKLYQEPRELPPPEERAQNVTRLLRQKAEVNTWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEAATDELDKLRQAEVIK
GSWQPVGDLLDLSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRD
FGPASQHFLLSTSVQGPWERAIKSPNKVPYYINHETQTTCDWHPKMetTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMetKLRRRLQKALCLDLSLAA
CDALDQHNKQNDQPMetDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNPLCVDMetCLNWLNNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHLEDKY
RYLQKQVASSTGFCQDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGSNIEPSVRSFCQFANNKPEIEAALFLDWMetRLEPQSMetVWLPVKRY
VAAAEAKHQAKCNICKECPITGFRYRSLKHFNYDQCSCFFSGRVAKGHKMetHYPMetVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKKNKFRTKRY
FAKHPRMetGYLPVQTVLEGDNMetETPVTLINFWPVDSPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMetENSGSYLNDISPNESIDDEH
LLIQHYCQSLNQDPSLQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSLPSPPEMetMetPTSPQSPR
DAELIAEAKLRHQGRLEARMetQILEDHKNQLESQHLRLQLLEQPAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMetLLRVVGSQTSDS
MetGEEDLLSPQDSTGLLEEVMetEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMetREDTMetStop

B

Dp140, *Homo sapiens*

ORF 5'3'

MetPSSLMetLEVPALADFNRAWTELTDLWSLLDQVIKSQRVMetVGDLEDINEMetIHKQLVESMetMetNSHLQCATMetQDLEQRRPQL
EELITAAQNLKKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQEHQNRRLQNE MetLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTV
DAIQKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLAKLLRDYSADDTKRVHMetITENINASWRSIHKRVSERAALAEETHRLQQFPDLLEK
FLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDKSGVKELMetKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMetNE
KWSLRRKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQKDDLSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKPEVIMetSTLETIV
IFLLEQPLEGLEKLYQEPRELPPPEERAQNVTRLLRQKAEVNTWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEAATDELDKLRQAEVIK
GSWQPVGDLLDLSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRD
FGPASQHFLLSTSVQGPWERAIKSPNKVPYYINHETQTTCDWHPKMetTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMetKLRRRLQKALCLDLSLAA
CDALDQHNKQNDQPMetDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNPLCVDMetCLNWLNNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHLEDKY
RYLQKQVASSTGFCQDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGSNIEPSVRSFCQFANNKPEIEAALFLDWMetRLEPQSMetVWLPVKRY
VAAAEAKHQAKCNICKECPITGFRYRSLKHFNYDQCSCFFSGRVAKGHKMetHYPMetVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKKNKFRTKRY
FAKHPRMetGYLPVQTVLEGDNMetETPVTLINFWPVDSPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMetENSGSYLNDISPNESIDDEH
LLIQHYCQSLNQDPSLQPRSPAQILISLESEERGELERILADLEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSLPSPPEMetMetPTSPQSPR
DAELIAEAKLRHQGRLEARMetQILEDHKNQLESQHLRLQLLEQPAEAKVNGTTVSSPSTSLQRSDSSQPMetLLRVVGSQTSDS
MetGEEDLLSPQDSTGLLEEVMetEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMetREDTMetStop

Figura 32. Traducción in-silico de la nueva inserción localizada en el intrón 51 en la distrofina Dp260-1 y Dp140 de *Homo sapiens*. Se colocaron los 36 nucleótidos (que codifican para 12 aminoácidos) que corresponden a la lectura de la inserción nueva después de la secuencia nucleotídica del exón 51 del gen *DMD* de la distrofina Dp260-1 y Dp140 con ayuda de la herramienta de traducción de la plataforma Expaty translate tool. **A** y **B**. Se muestra el ORF (*Open Reading Frame*) en dirección 5'a 3' de la secuencia nucleotídica. El recuadro azul corresponde a la secuencia nucleotídica de la inserción nueva localizada en el intrón 51. El recuadro rojo corresponde a la traducción "in silico" de la inserción nueva. **A**. Corresponde a la traducción "in silico" de la Dp260-1 (Secuencia de referencia de NCBI: NM_004011.3) con la inserción nueva. **B**. Corresponde a la traducción "in silico" de la Dp140 (Secuencia de referencia de NCBI: NM_004013.2) con la inserción nueva.

DISCUSIÓN SECCIÓN 3

Análisis de la expresión de distrofinas en cerebro y retina por RNA-seq

Actualmente mediante el uso de secuenciación masiva de mRNA (RNA-seq) es posible conocer la expresión de un gran número de genes de una muestra, que puede ser una célula, un tejido, un órgano, etc. lo cual genera una gran cantidad de datos almacenados en bases de datos públicas y privadas. El uso de RNA-seq representa una estrategia novedosa para conocer la expresión de las distrofinas en diferentes regiones y tipos celulares de retina y cerebro adulto de ratón y su participación en las afecciones cognitivas y visuales presentes en pacientes con DMD o BMD (Daoud, Angeard et al. 2009; Ricotti, Jäggle et al. 2016).

Adicional a la regulación transcripcional que ocurre en los diferentes promotores que expresan a las distrofinas, se ha reportado que la sobreexpresión de la distrofina Dp71 Δ 78-79 regula negativamente la expresión de la Dp71d Δ 71 (antes Dp71a) (Aragón, Romo-Yáñez et al. 2011), sugiriendo que podría haber una regulación diferencial entre las distrofinas en diferentes regiones y tipos celulares de cerebro y retina. Los niveles de los transcritos de las distrofinas Dp427 de cerebro, músculo y células de Purkinje son bajos en cerebro y retina de ratón posiblemente debido a la dificultad de detectar una señal en el extremo N-terminal de transcritos de gran longitud. Es relevante mencionar que no se detectó ninguna lectura par la Dp427 muscular, como se esperaba (**Tabla 10 y 11**).

El mapa de calor (**Figura 29**) para la Dp260 mostró que se expresa únicamente en retina y células FSPR (Células fotorreceptoras clasificadas por citometría de flujo). Se ha reportado que la expresión del mRNA y la proteína de la distrofina Dp260 incrementa durante el desarrollo de la retina con respecto a otras distrofinas y que se expresa en terminales de células fotorreceptoras (Rodius, Claudepierre et al. 1997). Se registraron varias lecturas para la Dp140 en cerebro (**Tabla 10**) con respecto a retina (**Figura**

11). La distrofina Dp140 también se ha asociado a problemas cognitivos en DMD y BMD (Felisari, Boneschi et al. 2000; Chamova, Guergueltcheva et al. 2013) y con problemas visuales debido su localización en células gliales y neuronas de la capa interna de la retina (Lidov, Selig et al. 1995; Wersinger, Bordais et al. 2011). Por otro lado, la expresión de la distrofina Dp116 solo fue detectada en una muestra de oligodendrocitos de reciente formación (NFO) no así en todos los demás tipos celulares evaluados (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos de reciente formación y mielinizados, células endoteliales, microglia, etc). Se observó que la Dp71 se expresa de manera importante en astrocitos con respecto a otros tipos celulares de cerebro. Sin embargo, también se observó una expresión considerable de la Dp71 en tipos celulares de retina lo que la hace una distrofina clave en el desarrollo cognitivo y visual (**Figura 29**) (Daoud, Angeard et al. 2009; El Mathari, Sene et al. 2015; Ricotti, Jäggle et al. 2016). Para la Dp40 se observó que se encuentra expresada mayormente en astrocitos, en retina y FSPR de ratón adulto lo cual resulta interesante porque se ha enfocado el estudio de la Dp40 en modelos neuronales (Tozawa, Itoh et al. 2012; Fujimoto, Itoh et al. 2014; Aragón, Martínez-Herrera et al. 2015) y no en modelos relacionados con retina o astrocitos.

El transcrito de la inserción nueva localizada en el intrón 51 (**Figura 30**) se expresa de manera abundante en retina con respecto a cerebro como se indica en el mapa de calor (**Figura 29**). La validación de la expresión de esta inserción (**Figura 31**) mostró que no se expresa en ratones *mdx52* los cuales no expresan la Dp260 y Dp140, distrofinas que se han asociado con componentes de la retina (Rodius, Claudepierre et al. 1997; Wersinger, Bordais et al. 2011). La traducción in-silico de la inserción nueva (**Figura 32**) colocada después del exón 51 de la Dp427 (datos no mostrados), Dp260 y Dp140 mostró que se traducen los 12 aminoácidos presentes que corresponden a los 36 nucleótidos de la inserción nueva. Estos resultados agregan mayor relevancia a la participación de las distrofinas en los problemas cognitivos y visuales presentes en pacientes con DMD y BMD

debido a la presencia de nuevas inserciones que posiblemente son tejido específicas y que pueden ver afectada su expresión en condiciones de degeneración.

CONCLUSIONES SECCIÓN 3

Análisis de la expresión de distrofinas en cerebro y retina por RNA-seq

- Dp71 tiene una expresión alta en astrocitos y menor en retina y células FSPR.
- La inserción nueva localizada en el intrón 51 se expresa solo en retina y células FSPR y no en cerebro.
- La Dp40 se expresa principalmente en astrocitos, corteza y retina.
- *In-silico* observamos que esta inserción nueva es traducida en las distrofinas Dp427, Dp260 y Dp140 sin alterar el marco de lectura.

PERSPECTIVAS SECCION 3

- Completar los duplicados de la presencia de la inserción localizada en el intrón 51 en cerebro y retina de ratón.
- Evaluar si la inserción localizada en el intrón 51 está presente en el mRNA de la Dp427, Dp260 o Dp140.
- Evaluar la presencia de la inserción localizada en el intrón 51 en diferentes estadios de retina de ratón.

REFERENCIAS

- Acosta, R., C. Montañez, et al. (2004). "Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells." Exp Cell Res **296**(2): 265-275.
- Aragón, J., M. González-Reyes, et al. (2018). "Dystrophin Dp71 isoforms are differentially expressed in the mouse brain and retina: report of new alternative splicing and a novel nomenclature for Dp71 isoforms." Mol Neurobiol **55**(2): 1376-1386.
- Aragon, J., A. Martínez-Herrera, et al. (2015). "EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40." Neurosci Lett **600**: 115-120.
- Aragón, J., A. Martínez-Herrera, et al. (2015). "EF-hand domains are involved in the differential cellular distribution of dystrophin Dp40." Neuroscience letters **600**: 115-120.
- Aragón, J., A. Martínez-Herrera, et al. (2016). "Identification of Dp71 isoforms expressed in PC12 cells: subcellular localization and colocalization with β -dystroglycan and α 1-syntrophin." Journal of Molecular Neuroscience **58**(2): 201-209.
- Aragón, J., J. Romo-Yáñez, et al. (2011). "Characterization of Dp71 Δ 78-79, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation." J Neurochem **119**(4): 697-707.
- Arner, L. S. and W. B. Stallcup (1981). "Two types of potassium channels in the PC12 cell line." Brain Res **215**(1-2): 419-425.
- Bar, S., E. Barnea, et al. (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.
- Bedford, M. T., D. Sarbassova, et al. (2000). "A novel pro-Arg motif recognized by WW domains." J Biol Chem **275**(14): 10359-10369.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature **395**(6703): 645-648.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Berry, A., E. Bindocci, et al. (2012). "NGF, brain and behavioral plasticity." Neural Plast **2012**: 784040.
- Bieber, F. R. and E. P. Hoffman (1990). "Duchenne and Becker muscular dystrophies: genetics, prenatal diagnosis, and future prospects." Clin Perinatol **17**(4): 845-865.
- Blake, D. J. and S. Kroger (2000). "The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?" Trends Neurosci **23**(3): 92-99.
- Blake, D. J., D. R. Love, et al. (1992). "Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells." Hum Mol Genet **1**(2): 103-109.
- Blake, D. J., R. Nawrotzki, et al. (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., A. Weir, et al. (2002). "Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle." Physiol Rev **82**(2): 291-329.
- Bloom, O. E. and J. R. Morgan (2011). "Membrane trafficking events underlying axon repair, growth, and regeneration." Molecular and Cellular Neuroscience **48**(4): 339-348.
- Bork, P. and M. Sudol (1994). "The WW domain: a signalling site in dystrophin?" Trends Biochem Sci **19**(12): 531-533.
- Bos, J. L. (2003). "Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 733-738.
- Bos, J. L. (2005). "Linking Rap to cell adhesion." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 123-128.

- Brunig, I., A. Suter, et al. (2002). "GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin." J Neurosci **22**(12): 4805-4813.
- Buckley, K. (1994). "Molecular analysis of a secretory organelle: structure and function of synaptic vesicle-specific proteins." The Journal of membrane biology **139**(2): 75-80.
- Burnstock, G. and M. Costa (1975). Structure of adrenergic neurons and related cells. Adrenergic Neurons, Springer: 19-38.
- Calderilla-Barbosa, L., A. Ortega, et al. (2006). "Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells." J Neurochem **98**(3): 713-722.
- Carafoli, E., L. Santella, et al. (2001). "Generation, control, and processing of cellular calcium signals." Crit Rev Biochem Mol Biol **36**(2): 107-260.
- Caron, E. (2003). "Cellular functions of the Rap1 GTP-binding protein: a pattern emerges." J Cell Sci **116**(Pt 3): 435-440.
- Carr, C. M., E. Grote, et al. (1999). "Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion." J Cell Biol **146**(2): 333-344.
- Celis, J. E., D. Crüger, et al. (1990). "A two-dimensional gel protein database of noncultured total normal human epidermal keratinocytes: Identification of proteins strongly up-regulated in psoriatic epidermis." Electrophoresis **11**(3): 242-254.
- Cerna, J., D. Cerecedo, et al. (2006). "Dystrophin Dp71f associates with the beta1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion." J Mol Biol **362**(5): 954-965.
- Claudepierre, T., C. Dalloz, et al. (2000). "Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3409-3417.
- Cox, G. A., Y. Sunada, et al. (1994). "Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy." Nat Genet **8**(4): 333-339.
- Chamova, T., V. Guergueltcheva, et al. (2013). "Association between loss of Dp140 and cognitive impairment in Duchenne and Becker dystrophies." Balkan Journal of Medical Genetics **16**(1): 21-29.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.
- Chen, H. I. and M. Sudol (1995). "The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7819-7823.
- Chien, C. L., C. Mason, et al. (1996). "α-internexin is the only neuronal intermediate filament expressed in developing cerebellar granule neurons." Journal of neurobiology **29**(3): 304-318.
- Ching, G. Y., C.-L. Chien, et al. (1999). "Overexpression of α-internexin causes abnormal neurofilamentous accumulations and motor coordination deficits in transgenic mice." Journal of Neuroscience **19**(8): 2974-2986.
- Chung, W. and J. T. Campanelli (1999). "WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding." Mol Cell Biol Res Commun **2**(3): 162-171.
- Daoud, F., N. Angeard, et al. (2009). "Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression." Hum Mol Genet **18**(20): 3779-3794.
- Daoud, F., A. Candelario-Martínez, et al. (2009). "Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions." PLoS One **4**(8): e6574.

- Darras, B. T., H. R. Jones Jr, et al. (2014). Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence: a clinician's approach, Elsevier.
- Darras, B. T., C. C. Menache-Starobinski, et al. (2014). Dystrophinopathies. Neuromuscular Disorders of Infancy, Childhood, and Adolescence (Second Edition), Elsevier: 551-592.
- De Brouwer, A. P., S. B. Nabuurs, et al. (2014). "A 3-base pair deletion, c. 9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy." European Journal of Human Genetics **22**(4): 480.
- Dichter, M. A., A. S. Tischler, et al. (1977). "Nerve growth factor-induced increase in electrical excitability and acetylcholine sensitivity of a rat pheochromocytoma cell line." Nature **268**(5620): 501-504.
- Donato, R. (2003). "Intracellular and extracellular roles of S100 proteins." Microscopy research and technique **60**(6): 540-551.
- Dulubova, I., S. Sugita, et al. (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." EMBO J **18**(16): 4372-4382.
- Durbeej, M. and K. P. Campbell (2002). "Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models." Curr Opin Genet Dev **12**(3): 349-361.
- Eaton, M. J. and H. Duplan (2004). "Useful cell lines derived from the adrenal medulla." Mol Cell Endocrinol **228**(1-2): 39-52.
- El Mathari, B., A. Sene, et al. (2015). "Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration." Hum Mol Genet **24**(14): 3939-3947.
- Emery, A. E. (1991). "Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey." Neuromuscul Disord **1**(1): 19-29.
- Ermak, G., V. J. Cancasci, et al. (2003). "Cytotoxic effect of doxycycline and its implications for tet-on gene expression systems." Analytical biochemistry **1**(318): 152-154.
- Ernsberger, U., H. Patzke, et al. (1997). "The developmental expression of choline acetyltransferase (ChAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation." Mechanisms of development **68**(1-2): 115-126.
- Ervasti, J. M. and K. P. Campbell (1991). "Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex." Cell **66**(6): 1121-1131.
- Espanel, X. and M. Sudol (1999). "A single point mutation in a group I WW domain shifts its specificity to that of group II WW domains." J Biol Chem **274**(24): 17284-17289.
- Faussone-Pellegrini, M.-S., P. Matini, et al. (1999). "The cytoskeleton of the myenteric neurons during murine embryonic life." Anat Embryol (Berl) **199**(5): 459-469.
- Feener, C. A., M. Koenig, et al. (1989). "Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus." Nature **338**(6215): 509-511.
- Felisari, G., F. M. Boneschi, et al. (2000). "Loss of Dp140 dystrophin isoform and intellectual impairment in Duchenne dystrophy." Neurology **55**(4): 559-564.
- Fort, P. E., A. Sene, et al. (2008). "Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane." Glia **56**(6): 597-610.
- Foster, H., L. Popplewell, et al. (2012). "Genetic therapeutic approaches for Duchenne muscular dystrophy." Hum Gene Ther **23**(7): 676-687.
- Fuchs, E. and D. W. Cleveland (1998). "A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease." Science **279**(5350): 514-519.
- Fuentes-Mera, L., R. Rodriguez-Munoz, et al. (2006). "Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix." Exp Cell Res **312**(16): 3023-3035.

- Fujimoto, T., K. Itoh, et al. (2014). "Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons." Biochem Biophys Res Commun **452**(1): 79-84.
- Fujiwara, T., M. Snada, et al. (2010). "HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems." Eur J Neurosci **32**(1): 99-107.
- García-Cruz, C., C. Merino-Jiménez, et al. (2018). "The dystrophin isoform Dp71e Δ 71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells." J Proteomics.
- Gerber, S. H., J.-C. Rah, et al. (2008). "Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion." Science **321**(5895): 1507-1510.
- Gifford, J. L., M. P. Walsh, et al. (2007). "Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs." Biochem J **405**(2): 199-221.
- Grabarek, Z. (2006). "Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins." J Mol Biol **359**(3): 509-525.
- Greenberg, D. S., Y. Sunada, et al. (1994). "Exogenous Dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in mdx mice." Nat Genet **8**(4): 340-344.
- Greene, L. A. (1978). "Nerve growth factor prevents the death and stimulates the neuronal differentiation of clonal PC12 pheochromocytoma cells in serum-free medium." J Cell Biol **78**(3): 747-755.
- Greene, L. A. and G. Rein (1977). "Release of (3H)norepinephrine from a clonal line of pheochromocytoma cells (PC12) by nicotinic cholinergic stimulation." Brain Res **138**(3): 521-528.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (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.
- Guay, J., H. Lambert, et al. (1997). "Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27." J Cell Sci **110**(3): 357-368.
- Gupton, S. L. and F. B. Gertler (2010). "Integrin signaling switches the cytoskeletal and exocytic machinery that drives neuritogenesis." Developmental cell **18**(5): 725-736.
- Hamburger, V. and H. L. Hamilton (1951). "A series of normal stages in the development of the chick embryo." Journal of morphology **88**(1): 49-92.
- Hendriksen, J. G. and J. S. Vles (2008). "Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder." J Child Neurol **23**(5): 477-481.
- Herrera-Salazar, A., R. García-Villegas, et al. (2016). "Overexpression of mutant dystrophin Dp71 [INCREMENT] 78-79 stimulates cell proliferation." Neuroreport **27**(1): 6-11.
- Higgins, D., L. Iacovitti, et al. (1981). "The immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase within rat sympathetic neurons that release acetylcholine in culture." Journal of Neuroscience **1**(2): 126-131.
- Hnia, K., D. Zouiten, et al. (2007). "ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a beta-dystroglycan interaction site." Biochem J **401**(3): 667-677.
- Hoard, J. L., D. B. Hoover, et al. (2008). "Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, norepinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75." Neuroscience **156**(1): 129-142.
- Howard, P. L., H. J. Klamut, et al. (1998). "Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform." FEBS Lett **441**(2): 337-341.

- Huang, X., F. Poy, et al. (2000). "Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan." Nat Struct Biol **7**(8): 634-638.
- Hugnot, J. P., H. Gilgenkrantz, 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.
- Illesley, J. L., M. Sudol, et al. (2002). "The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton." Cell Signal **14**(3): 183-189.
- Imamura, M. and E. Ozawa (1998). "Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyl-AMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6139-6144.
- Ingham, R. J., G. Gish, et al. (2004). "The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity within a common modular architecture." Oncogene **23**(11): 1972-1984.
- Ishikawa-Sakurai, M., M. Yoshida, et al. (2004). "ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan." Hum Mol Genet **13**(7): 693-702.
- Izumi, T., H. Gomi, et al. (2003). "The roles of Rab27 and its effectors in the regulated secretory pathways." Cell structure and function **28**(5): 465-474.
- Jahn, R. and D. Fasshauer (2012). "Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles." Nature **490**(7419): 201.
- Jumblatt, J. E. and A. S. Tischler (1982). "Regulation of muscarinic ligand binding sites by nerve growth factor in PC12 pheochromocytoma cells." Nature **297**(5862): 152-154.
- Kahl, C. R. and A. R. Means (2003). "Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways." Endocr Rev **24**(6): 719-736.
- Kaplan, M. P., S. Chin, et al. (1990). "Alpha-internexin, a novel neuronal intermediate filament protein, precedes the low molecular weight neurofilament protein (NF-L) in the developing rat brain." Journal of Neuroscience **10**(8): 2735-2748.
- Kay, B. K., M. P. Williamson, et al. (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." FASEB J **14**(2): 231-241.
- Kirfel, J., T. Magin, et al. (2003). "Keratins: a structural scaffold with emerging functions." Cellular and Molecular Life Sciences CMLS **60**(1): 56-71.
- Kloepper, T. H., C. N. Kienle, et al. (2007). "An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system." Mol Biol Cell **18**(9): 3463-3471.
- Knuesel, I., M. Mastrocola, et al. (1999). "Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice)." Eur J Neurosci **11**(12): 4457-4462.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, et al. (1987). "Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals." Cell **50**(3): 509-517.
- Koenig, M., A. P. Monaco, et al. (1988). "The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein." Cell **53**(2): 219-228.
- Kornreich, M., E. Malka-Gibor, et al. (2015). "Composite bottlebrush mechanics: α -internexin fine-tunes neurofilament network properties." Soft Matter **11**(29): 5839-5849.
- Kramarcy, N. R., A. Vidal, et al. (1994). "Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin)." J Biol Chem **269**(4): 2870-2876.
- Kunkel, L. M., J. F. Hejtmanick, et al. (1986). "Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy." Nature **322**(6074): 73-77.

- Lariviere, R. C. and J. P. Julien (2004). "Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease." Journal of neurobiology **58**(1): 131-148.
- Lederfein, D., Z. Levy, et al. (1992). "A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5346-5350.
- Legge, G. B., M. A. Martinez-Yamout, et al. (2004). "ZZ domain of CBP: an unusual zinc finger fold in a protein interaction module." J Mol Biol **343**(4): 1081-1093.
- Leœniak, W. a., G. W. Swart, et al. (2000). "Regulation of cell specific expression of calcyclin (S100A6) in nerve cells and other tissues." Acta Neurobiol. Exp **60**: 569-575.
- Leœniak, W., Ł. P. Słomnicki, et al. (2009). "S100A6—new facts and features." Biochem Biophys Res Commun **390**(4): 1087-1092.
- Levi, S., R. M. Grady, et al. (2002). "Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation." J Neurosci **22**(11): 4274-4285.
- Lewit-Bentley, A. and S. Rety (2000). "EF-hand calcium-binding proteins." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 637-643.
- Lidov, H. G., T. J. Byers, et al. (1990). "Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons." Nature **348**(6303): 725-728.
- Lidov, H. G., S. Selig, et al. (1995). "Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus." Hum Mol Genet **4**(3): 329-335.
- Lu, J., M. Machiusi, et al. (2006). "Structural basis for a Munc13–1 homodimer to Munc13–1/RIM heterodimer switch." PLoS biology **4**(7): e192.
- Macias, M. J., M. Hyvonen, et al. (1996). "Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide." Nature **382**(6592): 646-649.
- Marquez, F. G., B. Cisneros, et al. (2003). "Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process." Neuroscience **118**(4): 957-966.
- Masiakowski, P. and E. Shooter (1990). "Changes in PC12 cell morphology induced by transfection with 42C cDNA, coding for a member of the S-100 protein family." J Neurosci Res **27**(3): 264-269.
- Merino-Jiménez, C., J. Aragón, et al. (2016). "Dp71Δ78-79 dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1." Proteomics **16**(9): 1331-1340.
- Mills, J., M. Digicaylioglu, et al. (2003). "Role of integrin-linked kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth." J Neurosci **23**(5): 1638-1648.
- Moat, S. J., D. M. Bradley, et al. (2013). "Newborn bloodspot screening for Duchenne muscular dystrophy: 21 years experience in Wales (UK)." European Journal of Human Genetics **21**(10): 1049.
- Monaco, A. P., R. L. Neve, et al. (1986). "Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene." Nature **323**(6089): 646-650.
- Mullen, R. J., C. R. Buck, et al. (1992). "NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates." Development **116**(1): 201-211.
- Munoz, D., C. Greene, et al. (1988). "Accumulation of phosphorylated neurofilaments in anterior horn motoneurons of amyotrophic lateral sclerosis patients." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **47**(1): 9-18.
- Muntoni, F., S. Torelli, et al. (2003). "Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes." Lancet Neurol **2**(12): 731-740.
- Nelson, M. R. and W. J. Chazin (1998). "Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca2+ binding." Biomaterials **11**(4): 297-318.

- Nishida, A., S. Yasuno, et al. (2016). "HEK293 cells express dystrophin Dp71 with nucleus-specific localization of Dp71ab." Histochemistry and cell biology **146**(3): 301-309.
- O'Lague, P. H. and S. L. Huttner (1980). "Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(3): 1701-1705.
- O'Lague, P. H., S. L. Huttner, et al. (1985). "Morphological properties and membrane channels of the growth cones induced in PC12 cells by nerve growth factor." J Neurosci Res **13**(1-2): 301-321.
- Ojika, K., S. Mitake, et al. (2000). "Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP)." Progress in neurobiology **60**(1): 37-83.
- Orengo, C. A., D. T. Jones, et al. (1994). "Protein superfamilies and domain superfolds." Nature **372**(6507): 631-634.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." Nature **373**(6515): 573-580.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, et al. (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." ELECTROPHORESIS: An International Journal **20**(18): 3551-3567.
- Petrak, J., R. Ivanek, et al. (2008). "Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins." Proteomics **8**(9): 1744-1749.
- Piluso, G., M. Mirabella, et al. (2000). "Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells." J Biol Chem **275**(21): 15851-15860.
- Poirier, M. A., W. Xiao, et al. (1998). "The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle." Nature Structural and Molecular Biology **5**(9): 765.
- Pozzan, T., F. Di Virgilio, et al. (1986). "Activation of muscarinic receptors in PC12 cells. Stimulation of Ca²⁺ influx and redistribution." Biochem J **234**(3): 547-553.
- Qui, M. S. and S. H. Green (1992). "PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity." Neuron **9**(4): 705-717.
- Rapaport, D., D. Lederfein, et al. (1992). "Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene." Differentiation **49**(3): 187-193.
- Rentschler, S., H. Linn, et al. (1999). "The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan." Biol Chem **380**(4): 431-442.
- Rentschler, S., H. Linn, et al. (1999). "The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with β -dystroglycan." Biological chemistry **380**(4): 431-442.
- Ricotti, V., H. Jäggle, et al. (2016). "Ocular and neurodevelopmental features of Duchenne muscular dystrophy: a signature of dystrophin function in the central nervous system." European Journal of Human Genetics **24**(4): 562.
- Richardson, J. S. (1981). "The anatomy and taxonomy of protein structure." Adv Protein Chem **34**: 167-339.
- Rodius, F., T. Claudepierre, et al. (1997). "Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation." Neuroreport **8**(9): 2383-2387.
- Rodríguez-Muñoz, R., M. del Carmen Cárdenas-Aguayo, et al. (2015). "Novel nuclear protein complexes of dystrophin 71 isoforms in rat cultured hippocampal GABAergic and glutamatergic neurons." PLoS One **10**(9): e0137328.
- Romo-Yanez, J., V. Ceja, et al. (2007). "Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells." J Cell Biochem **102**(1): 82-97.
- Romo-Yáñez, J., C. Montañez, et al. (2011). "Dystrophins and DAPs are expressed in adipose tissue and are regulated by adipogenesis and extracellular matrix." Biochem Biophys Res Commun **404**(2): 717-722.

- Romo-Yáñez, J., V. Ceja, et al. (2007). "Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells." Journal of cellular biochemistry **102**(1): 82-97.
- Ruegsegger, U., K. Beyer, et al. (1996). "Purification and characterization of human cleavage factor Im involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors." J Biol Chem **271**(11): 6107-6113.
- Saint Martin, A., J. Aragon, et al. (2012). "Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end." FEBS J **279**(1): 66-77.
- Sasaki, S., S. Maruyama, et al. (1989). "Swellings of proximal axons in a case of motor neuron disease." Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society **25**(5): 520-522.
- Schmidt, T., B. Bartelt-Kirbach, et al. (2012). "Phosphorylation-dependent subcellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/ α B-crystallin in cultured hippocampal neurons." Histochemistry and cell biology **138**(3): 407-418.
- Schoch, S., P. E. Castillo, et al. (2002). "RIM1 α forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone." Nature **415**(6869): 321.
- Schubert, D., S. Heinemann, et al. (1977). "Cholinergic metabolism and synapse formation by a rat nerve cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(6): 2579-2583.
- Schubert, D. and F. G. Klier (1977). "Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(11): 5184-5188.
- Shirasu, M., K. Kimura, et al. (2000). "VAMP-2 promotes neurite elongation and SNAP-25A increases neurite sprouting in PC12 cells." Neuroscience research **37**(4): 265-275.
- Siddiqui, A. S. and G. J. Barton (1995). "Continuous and discontinuous domains: an algorithm for the automatic generation of reliable protein domain definitions." Protein Sci **4**(5): 872-884.
- Sigesmund, D. A., R. G. Weleber, et al. (1994). "Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy." Ophthalmology **101**(5): 856-865.
- Söllner, T., M. K. Bennett, et al. (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." Cell **75**(3): 409-418.
- Styers, M. L., G. Salazar, et al. (2004). "The endo-lysosomal sorting machinery interacts with the intermediate filament cytoskeleton." Mol Biol Cell **15**(12): 5369-5382.
- Suarez-Sanchez, R., A. Aguilar, et al. (2014). "Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin alpha/beta and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein." Biochim Biophys Acta **1843**(5): 985-1001.
- Südhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." Annu. Rev. Neurosci. **27**: 509-547.
- Südhof, T. C. and J. Rizo (2011). "Synaptic vesicle exocytosis." Cold Spring Harbor perspectives in biology: a005637.
- Sudol, M., P. Bork, et al. (1995). "Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain." J Biol Chem **270**(24): 14733-14741.
- Sudol, M. and T. Hunter (2000). "NeW wrinkles for an old domain." Cell **103**(7): 1001-1004.
- Sudol, M., K. Sliwa, et al. (2001). "Functions of WW domains in the nucleus." FEBS Lett **490**(3): 190-195.
- Sun, P., H. Watanabe, et al. (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.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, et al. (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature **395**(6700): 347.

- SUZUKI, A., M. YOSHIDA, et al. (1994). "Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin: three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin." European Journal of Biochemistry **220**(2): 283-292.
- Tadayoni, R., A. Rendon, et al. (2012). "Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene." Mol Neurobiol **45**(1): 43-60.
- Tan, S., S. Zhao, et al. (2017). "Altered Biological Properties in Dp71 Over-Expressing HBE Cells." Cellular Physiology and Biochemistry **43**(5): 2022-2036.
- THORDARSON, G., J. N. SOUTHARD, et al. (1991). "Purification and characterization of mouse decidual calcyclin: a novel stimulator of mouse placental lactogen-II secretion." Endocrinology **129**(3): 1257-1265.
- Tinsley, J. M., D. J. Blake, et al. (1993). "Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site." Hum Mol Genet **2**(5): 521-524.
- Tischler, A. S. and L. A. Greene (1978). "Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Lab Invest **39**(2): 77-89.
- Tozawa, T., K. Itoh, et al. (2012). "The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain." Mol Neurobiol **45**(2): 287-297.
- Trojanowski, J. Q. and V. M. Y. LEE (1994). "Phosphorylation of Neuronal Cytoskeletal Proteins in Alzheimer's Disease and Lewy Body Dementias a." Annals of the New York Academy of Sciences **747**(1): 92-109.
- Ursitti, J. A., P. C. Lee, et al. (2004). "Cloning and Characterization of Cytokeratins 8 and 19 in Adult Rat Striated Muscle INTERACTION WITH THE DYSTROPHIN GLYCOPROTEIN COMPLEX." Journal of Biological Chemistry **279**(40): 41830-41838.
- Vaillend, C., C. Perronnet, et al. (2010). "Rescue of a dystrophin-like protein by exon skipping in vivo restores GABAA-receptor clustering in the hippocampus of the mdx mouse." Mol Ther **18**(9): 1683-1688.
- Van Calker, D. and R. Heumann (1987). "Nerve growth factor potentiates the agonist-stimulated accumulation of inositol phosphates in PC-12 pheochromocytoma cells." Eur J Pharmacol **135**(2): 259-260.
- Van Nassauw, L., M. Wu, et al. (2005). "Cytoplasmic, but not nuclear, expression of the neuronal nuclei (NeuN) antibody is an exclusive feature of Dogiel type II neurons in the guinea-pig gastrointestinal tract." Histochemistry and cell biology **124**(5): 369-377.
- Verhage, M., A. S. Maia, et al. (2000). "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion." Science **287**(5454): 864-869.
- Vicentini, L. M., A. Ambrosini, et al. (1986). "Activation of muscarinic receptors in PC12 cells. Correlation between cytosolic Ca²⁺ rise and phosphoinositide hydrolysis." Biochem J **234**(3): 555-562.
- Villarreal-Silva, M., R. Suarez-Sanchez, et al. (2010). "Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells." Neurochem Res **35**(3): 366-373.
- Waite, A., S. C. Brown, et al. (2012). "The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease." Trends Neurosci **35**(8): 487-496.
- Wersinger, E., A. Bordais, et al. (2011). "Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina." Investigative ophthalmology & visual science **52**(11): 7901-7908.
- Weston, J. A. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. Advances in morphogenesis, Elsevier. **8**: 41-114.
- Whiting, P. J., R. Schoepfer, et al. (1987). "Functional acetylcholine receptor in PC12 cells reacts with a monoclonal antibody to brain nicotinic receptors." Nature **327**(6122): 515-518.

- Williams, K. L., M. Rahimtula, et al. (2006). "Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons in vitro." J Neurosci Res **84**(4): 716-723.
- Wu, J. Y., K. C. Kuban, et al. (2005). "Association of Duchenne muscular dystrophy with autism spectrum disorder." J Child Neurol **20**(10): 790-795.
- Wu, M. N., K. L. Schulze, et al. (2001). "The ROP-syntaxin interaction inhibits neurotransmitter release." European journal of cell biology **2**(80): 196-199.
- Yagi, R., L. F. Chen, et al. (1999). "A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator." EMBO J **18**(9): 2551-2562.
- Yeung, K., T. Seitz, et al. (1999). "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP." Nature **401**(6749): 173.
- Yip, P. M. and C. H. Siu (2001). "PC12 cells utilize the homophilic binding site of L1 for cell-cell adhesion but L1-alpha v beta 3 interaction for neurite outgrowth." J Neurochem **76**(5): 1552-1564.
- York, R. D., H. Yao, et al. (1998). "Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor." Nature **392**(6676): 622-626.
- Zhang, Z., G. Tarone, et al. (1993). "Expression of integrin alpha 1 beta 1 is regulated by nerve growth factor and dexamethasone in PC12 cells. Functional consequences for adhesion and neurite outgrowth." J Biol Chem **268**(8): 5557-5565.
- Zhen, M. and Y. Jin (1999). "The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*." Nature **401**(6751): 371.

ANEXO I (Carta de aceptación del artículo)

De: eesserver@eesmail.elsevier.com <eesserver@eesmail.elsevier.com> en nombre de Journal of Proteomics <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Enviado: lunes, 26 de marzo de 2018 10:17
Para: Dra. Cecilia Montanez Ojeda
Cc: jlcapelom@gmail.com; jlcm@fct.unl.pt
Asunto: Your Submission

Ms. Ref. No.: JPROT-D-17-00652R1
Title: The dystrophin isoform Dp71e<DELTA>71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells
Journal of Proteomics

Dear Dr. Cecilia Montanez,

I am pleased to inform you that your paper "The dystrophin isoform Dp71e<DELTA>71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells" has been accepted for publication in J Proteomics.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Below are comments from the editor and reviewers.
When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to Journal of Proteomics.

Yours sincerely,
Juan J. J. Calvete, PhD
Editor-in-Chief
Journal of Proteomics

Comments from the editors and reviewers:

Dear Cecilia,

Congratulations on your accepted paper.

Thank you very much for choosing Journal of proteomics as your publishing Journal.

I take this opportunity to thank you for participating in ICAP2017. I look forward to seeing you in the 2019 edition.

Yours very truly,

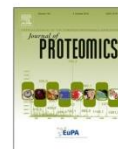
J. L. Capelo

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jprot

The dystrophin isoform Dp71e_{Δ71} is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells

César García-Cruz^{a,1}, Candelaria Merino-Jiménez^{a,1}, Víctor Ceja^a, Jorge Aragón^a,
Lourdes Siqueiros-Márquez^a, Juan Pablo Reyes-Grajeda^b, Cecilia Montañez^{a,*}

^a Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, Mexico
^b Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Dystrophin
Dp71e_{Δ71}
HspB1
Neuronal differentiation
PC12 cells

ABSTRACT

The Dp71 protein is the most abundant dystrophin in the central nervous system (CNS). Several dystrophin Dp71 isoforms have been described and are classified into three groups, each with a different C-terminal end. However, the functions of Dp71 isoforms remain unknown. In the present study, we analysed the effect of Dp71e_{Δ71} overexpression on neuronal differentiation of PC12 Tet-On cells. Overexpression of dystrophin Dp71e_{Δ71} stimulates neuronal differentiation, increasing the percentage of cells with neurites and neurite length. According to 2-DE analysis, Dp71e_{Δ71} overexpression modified the protein expression profile of rat pheochromocytoma PC12 Tet-On cells that had been treated with neuronal growth factor (NGF) for nine days. Interestingly, all differentially expressed proteins were up-regulated compared to the control. The proteomic analysis showed that Dp71e_{Δ71} increases the expression of proteins with important roles in the differentiation process, such as HspB1, S100A6, and K8 proteins involved in the cytoskeletal structure and HCNP protein involved in neurotransmitter synthesis. The expression of neuronal marker TH was also up-regulated. Mass spectrometry data are available via ProteomeXchange with identifier PXD009114.

Significance: This study is the first to explore the role of the specific isoform Dp71e_{Δ71}. The results obtained here support the hypothesis that the dystrophin Dp71e_{Δ71} isoform has an important role in the neurite outgrowth by regulating the levels of proteins involved in the cytoskeletal structure, such as HspB1, S100A6, and K8, and in neurotransmitter synthesis, such as HCNP and TH, biological processes required to stimulate neuronal differentiation.

1. Introduction

In addition to progressive muscular degeneration, patients with Duchenne and Becker Muscular dystrophy (DMD and DMB) present variable degrees of cognitive impairment, which have been correlated with Dp71 dystrophin deficit [1]. The Dp71 protein is the main product of the DMD gene expressed in brain; it is transcribed from intron 62 to exon 79 and generates several isoforms through alternative splicing of internal exons [2] that contain different C-terminal ends [3,4]. Although the Dp71 protein belongs to the dystrophin-associated protein complex (DAPC), the roles of each Dp71 dystrophin isoform in brain development remain unknown [5–7].

Several studies on Dp71 have been performed using PC12 cells, a cell line that acquires sympathetic-neuron-like phenotype upon

stimulation with neuronal growth factor (NGF) [8]. These cells express several Dp71 isoforms: Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71–74}, Dp71f_{Δ71}, Dp71e_{Δ71} (previously named Dp71e) and Dp71e_{Δ71–74} [9–11].

Recently, the differential expression of Dp71 in the brain and retina of mice has been reported and a novel nomenclature was proposed to name each isoform depending on the alternative splicing of internal exons (exons 71 to 74, 78 and intron 77) as well as their C-terminal ends (groups Dp71d, Dp71f, and Dp71e) [12]. Dp71 isoforms show a nuclear, cytoplasmic and peripheral subcellular distribution; however, Dp71 isoforms that contain exons 78 and 79 display a nuclear distribution and Dp71 isoforms lacking exon 78 but containing exon 79 present a cytoplasmic distribution during the differentiation process in PC12 cells [10,13]. Moreover, low levels of protein generated using antisense technology have been shown to interfere with the outgrowth

Abbreviations: DMD, Duchenne muscular dystrophy; NGF, Neuronal growth factor; WB, Western blotting

* Corresponding author at: Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. IPN 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Ciudad de México 07360, Mexico.

E-mail address: cecim@cinvestav.mx (C. Montañez).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.027>

Received 7 December 2017; Received in revised form 19 March 2018; Accepted 25 March 2018
1874-3919/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

Please cite this article as: García-Cruz, C., Journal of Proteomics (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.027>

of neurites in PC12 cells [14]. In addition, the Dp71 protein has been reported to participate in cellular proliferation, the organization of the nuclear architecture, cellular division, migration, invasion, apoptosis, adhesion, and differentiation [15–19]. Nevertheless, the specific role of each Dp71 isoform remains unclear.

Dp71_{e Δ 71} is one of the isoforms expressed in PC12 cells and several rat and mouse organs, such as the brain, eye, lung and heart. This isoform retains 34 bp from intron 77 that prevent the translation of the exons 78 and 79, producing a specific C-terminal end composed of 10 amino acids and alternative splicing in exon 71. The levels of the Dp71_{e Δ 71} transcript and protein increase during differentiation of PC12 cells [11]. Furthermore, following transient transfection in NGF-differentiated PC12 Tet-On cells, Dp71_{e Δ 71} concentrates in the cytoplasm and nucleus compared to undifferentiated PC12 Tet-On cells [10].

Previously, it was shown that the mutant Dp71 _{Δ 78–79} lacking exons 78 and 79 stimulates NGF-induced differentiation by promoting the outgrowth of long neurites [20]. The overexpression of this mutant stimulates the expression of proteins involved in the cytoskeletal architecture and promotes neurite outgrowth through the up-regulation and phosphorylation of HspB1 [21].

In this work, we investigated the effect of Myc-Dp71_{e Δ 71} overexpression during the neuronal differentiation process through a morphometric analysis of cell differentiation and 2-DE analysis of PC12 Tet-On cells. Based on the results obtained it can be suggested that overexpression of the Myc-Dp71_{e Δ 71} dystrophin isoform stimulates neurite outgrowth and increases the levels of proteins such as HspB1, S100A6, K8 and HCNP, which are related to the reorganization of the cytoskeleton and the production of neurotransmitters.

2. Materials and methods

2.1. Vector construction

The pTRE2pur-Myc/Dp71_{e Δ 71} vector, which was previously described [10], was stably transfected into PC12 Tet-On cells. Two clones named PC12 Tet-On-Dp71_{e Δ 71}/C4 and PC12 Tet-On-Dp71_{e Δ 71}/C9 that overexpress the Myc-Dp71_{e Δ 71} protein were isolated. An empty vector (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, California, USA) was used to transfect PC12 Tet-On cells to generate PC12-control cells, as previously described [19].

2.2. Cell culture and differentiation

Rat pheochromocytoma PC12 cells were first described in 1976 [8,22]. In this study, PC12 Tet-On cells were used to generate stable and inducible expression of Dp71_{e Δ 71} by adding doxycycline. PC12 Tet-On cells were cultured in supplemented DMEM (Gibco) and differentiated with NGF as previously described [10]. Doxycycline (100 ng) was added to the culture medium and incubated with the cells for 24 h to induce Myc-Dp71_{e Δ 71} overexpression. After induction, fresh medium supplemented with doxycycline and NGF was added for nine days.

2.3. Protein extraction

Total protein samples were harvested from NGF-differentiated PC12 Tet-On cells using previously described methods [21]. Protein concentrations were determined by the Bradford method. For each group, three protein samples were obtained from three independent experiments.

2.4. 2-DE

The first dimension of separation was conducted on an Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing System (GE Healthcare); IPG strips (pH 3.0–10.0 NL, 7 cm) were rehydrated for 16 h with 200 μ g of proteins. IEF was performed using the following parameters: step-and-hold

at 300 V (200 Vh), gradient to 1000 V (300 Vh), gradient to 5000 V (4500 Vh) and finally step-and-hold at 5000 V (2000 Vh). After IEF, the strips were immersed in equilibration buffer (6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 0.002% w/v bromophenol blue and 1% w/v DTT) for 15 min and then incubated with the same solution in which DTT was replaced with 2.5% w/v iodoacetamide for another 15 min. For separation in the second dimension, the strips were loaded on 12% SDS-PAGE gels using a Mini-Protean Tetra system (Bio-Rad) and electrophoresed at 100 V/gel until the bromophenol blue had reached the bottom of the gel. The 2-DE gels were stained using Bio-Safe Coomassie Stain (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions.

2.5. Image analysis

The stained 2-DE gels were scanned with an Image Quant 4000 instrument (GE Healthcare). Protein spots were quantified automatically using ImageMaster 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare). Spots were manually examined to eliminate artefacts. The percent volume (% volume) of each spot was calculated. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare data from each group and detect spots with different expression levels. Spots with P-values < .05 and changes of 1.5-fold or more were considered statistically significant. Spots of interest were excised from the 2-DE gels for identification using MS.

2.6. In-gel trypsin digestion and protein identification by MS

The selected protein spots were excised and placed in Eppendorf tubes with 50 μ l of destaining solution (50% v/v methanol and 5% v/v acetic acid), followed by washes with MilliQ H₂O. Gel fragments were dehydrated by an incubation in 100 μ l of ACN for 10 min, and the supernatant was then removed; this step was repeated once. Dry gel pieces were rehydrated with 200 ng of trypsin (Promega V528A) in 50 mM NH₄HCO₃ and 5% ACN. Gel pieces were incubated overnight at 37 °C. The resulting peptides were extracted with 40 μ l of 50% ACN and 5% formic acid. The volume of the resulting peptides was reduced in a concentrator (Eppendorf 5301). Peptides from each sample were desalted on C18 columns (ZipTipC18). A mixture in a proportion 1:1 between peptide solution and matrix solution (5 mg/ml CHCA 50% v/v and TFA 0.1% v/v) were analysed using a 4800 Plus MALDI TOF/TOF mass spectrometer (Sciex). The search was performed with the enzyme specificity of trypsin and one missed cleavage was allowed. Biological modifications and amino acid substitutions were used as modifications. The detected protein threshold used was 66%, and the precursor mass tolerance was 0.5 to 1 Da. The MS data were compared with the *Rattus norvegicus* database (download in September 2016) using the Protein Pilot™ software (version 2.0.1) and the Mascot algorithm [23]. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [24] partner repository with the dataset identifier PXD009114 and 10.6019/PXD009114.

2.7. Western blotting

WB was performed as previously described [10]. The same protein extracts obtained for 2-DE gels were used for WB. The mouse monoclonal anti- β -Actin antibody (1:500) and mouse monoclonal anti-c-Myc antibody (1:200) were purchased from Santa Cruz Biotechnology while the rabbit polyclonal anti-HspB1 antibody (1:500) and rabbit polyclonal anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1:200) were purchased from Abcam.

2.8. Indirect immunofluorescence microscopy

Conditions used for the indirect immunofluorescence (Immf) staining of PC12 Tet-On cells have been described in a previous study

[20]. Alexa Fluor 488- and Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were used to detect the primary antibody signal. Images were captured using a Leica confocal microscope (Leica TCS SP8) with a 40× objective. The fluorescence intensity and colocalization ratio were quantified from equatorial Z-sections obtained from three independent experiments.

2.9. Morphometric analysis of cell differentiation

PC12-Dp71e_{Δ71} and PC12-control cells were plated at a low confluence on collagen-coated plastic dishes and cultured with supplemented DMEM. One hundred nanograms of doxycycline were added to the supplemented DMEM and cultured for 24 h to induce the overexpression of the Myc-Dp71e_{Δ71} protein. After induction, the medium was replaced with DMEM supplemented with NGF and cultured for nine days. Micrographs were taken with an inverted microscope (Axiovert. A1 Zeiss) with 20× objective. Thirty micrographs were captured from three independent experiments to quantify the differentiation ratio (any cell that produced a neurite, regardless of length) and the neurite length. Measurements were performed with Axiovision 4.8 software.

2.10. Statistical analysis

Data are shown as the means ± SD of three independent experiments. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test with GraphPad Prism 5 software. *P*-values < .05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Myc-Dp71e_{Δ71} overexpression increases the neuronal differentiation of PC12 Tet-On cells

Firstly, PC12 Tet-On cells were stably transfected with the pTRE2pur-Myc/Dp71e_{Δ71} vector, and two clones that overexpressed the dystrophin Myc-Dp71e_{Δ71} were isolated (PC12-Dp71e_{Δ71}/C4 and C9). Subsequently, in both clones the expression of Myc-Dp71e_{Δ71} dystrophin was tested by WB using an anti-c-Myc antibody. Myc-Dp71e_{Δ71} expression was detected in both clones in undifferentiated and differentiated PC12-Dp71e_{Δ71} cells. However, the expression of Myc-Dp71e_{Δ71} was higher in undifferentiated PC12-Dp71e_{Δ71}/C4 (data not shown). Thus, we chose the clone PC12-Dp71e_{Δ71}/C4 to assess the role of the Dp71e_{Δ71} overexpression in the neuronal differentiation process. Myc-Dp71e_{Δ71} is expressed in undifferentiated and differentiated PC12-Dp71e_{Δ71}/C4 cells but not the PC12-control cells (Fig. 1B).

Undifferentiated and differentiated PC12 Tet-On cells were analysed to explore the morphological effect of Myc-Dp71e_{Δ71} overexpression on the neuronal differentiation process. Myc-Dp71e_{Δ71} overexpression did not affect the morphology of the undifferentiated PC12-Dp71e_{Δ71} cells (round cells, Fig. 1C) compared with PC12-control cells (Fig. 1D). Conversely, Myc-Dp71e_{Δ71} dystrophin overexpression increased the differentiation rate of PC12-Dp71e_{Δ71} cells (Fig. 1E) compared to the PC12-control cells following the induction of neuronal differentiation with NGF (Fig. 1F). Morphometric measurements were collected to evaluate the differences between PC12-Tet-On cell lines. The differentiation ratio and neurite length were monitored nine days after NGF-induced differentiation. Approximately 20.53 ± 0.63% of PC12-Dp71e_{Δ71} cells had differentiated, whereas the percentage of differentiated control cells was 3.12 ± 0.86% (Fig. 1G). PC12-Dp71e_{Δ71} cells showed an average neurite length of 114.69 ± 1.80 μm (Fig. 1H), whereas the average length of the neurites in the few PC12-control differentiated cells was 82.37 ± 1.22 μm. Based on these results, Myc-Dp71e_{Δ71} expression stimulates neurite outgrowth in PC12 Tet-On cells.

3.2. Myc-Dp71e_{Δ71} overexpression changes the protein expression profile of differentiated PC12 Tet-On cells

We compared the protein expression profiles of NGF-differentiated PC12-Dp71e_{Δ71} and PC12-control cells to examine the role of Dp71e_{Δ71} overexpression in stimulating the neuronal differentiation process of PC12 Tet-On cells (Fig. 2A and B). Three 2-DE gels were obtained from independent biological replicates of NGF-differentiated PC12-Dp71e_{Δ71} and PC12-control cells after nine days of stimulation. The percent volume of each spot was quantified and compared between the two cells using the ImageMaster 2D Platinum 7.0 software to determine protein abundance. Protein spots with an at least 1.5-fold change were considered differentially expressed. Among the 386 protein spots detected, only 14 (spot ID: 1-14) showed differential expression (Fig. 2C). Interestingly, all the differentially expressed spots were up-regulated; magnified views of the differentially expressed protein spots are presented in Fig. 2C. Thus, Dp71e_{Δ71} dystrophin overexpression increases the expression of several proteins in PC12 cells.

The selected spots were excised from 2-DE gels and analysed by MS to determine the identities of the differentially expressed proteins. Fifteen proteins were identified, and their characteristics are summarized in Table 1. Spots 1 (5.4-fold, *p*f 6.3) and 5 (2.9-fold, *p*f 5.8) correspond to HspB1, presumably representing post-translation modifications consisting of the addition or removal of a small charged moiety. Two proteins were identified in spot 6: proteasome subunit alpha type-1 and glutathione S-transferase omega-1. Among the 14 identified proteins that were up-regulated by Myc-Dp71e_{Δ71}, some are involved in cytoskeletal structure, such as HspB1, S100A6 and keratin, type II cytoskeletal 8 (K8), and others are involved in neurotransmitter synthesis, such as phosphatidylethanolamine-binding protein 1, also known as HCNP.

3.3. Myc-Dp71e_{Δ71} overexpression up-regulates the expression of the HspB1 and TH proteins

We analysed the expression of HspB1, the protein whose expression was up-regulated to the greatest extent, by WB to validate the differentially expressed proteins. Protein extracts from PC12-Dp71e_{Δ71} and PC12-control cells that had been treated with NGF for nine days to induce differentiation were compared. PC12-Dp71e_{Δ71} cells expressed higher levels of HspB1 than PC12-control cells (Fig. 3A); the relative expression was increased 2.3-fold (Fig. 3B). In addition, we monitored the expression level of TH (Fig. 3A), an important protein involved in neuronal differentiation of PC12 cells, specifically in the biosynthesis of catecholamines. TH expression was up-regulated 9.0-fold in PC12-Dp71e_{Δ71} cells compared to PC12-control cells (Fig. 3B).

An ImmF assay monitored subcellular distribution of HspB1 in undifferentiated and NGF-differentiated PC12 Tet-On cells. The Myc-Dp71e_{Δ71} protein immunoreactivity observed in cytoplasm (53.33 ± 1.09%) and nucleus (46.67 ± 1.09%; *P* = 0.012) in undifferentiated PC12-Dp71e_{Δ71} (Fig. 4A) was similar to the subcellular distribution of c-Myc epitope in PC12-control cells (cytoplasm 53.22 ± 0.52% and nucleus 46.78 ± 0.52%; *P* = 0.001) (Fig. 4D). On the other hand, the immunoreactivity in NGF-differentiated PC12-Dp71e_{Δ71} cells was higher in cytoplasmic (60.91 ± 1.40%) than in nucleus (39.09 ± 1.40%; *P* = .0004), and was also observed in neurites (Fig. 4G). A similar distribution of c-Myc was presented in PC12-control cells (cytoplasm 62.74 ± 6.48% and nucleus 37.26 ± 6.48%; *P* = 0.049) (Fig. 4J). HspB1 immunoreactivity was higher in nucleus (62.44 ± 2.56%) than in cytoplasm (37.56 ± 2.56%; *P* = 0.002) in undifferentiated PC12-Dp71e_{Δ71} (Fig. 4B) and PC12-control cells (nucleus 59.03 ± 0.42% and cytoplasm 40.79 ± 0.41%; *P* = 0.0001) (Fig. 4E). However, the immunoreactivity of HspB1 in NGF-differentiated PC12-Dp71e_{Δ71} cells was observed in cytoplasm (48.14 ± 1.23%) and nucleus (51.86 ± 1.23%; *P* = 0.10) is similar to that detected in PC12-control cells (cytoplasm 49.99 ± 3.62% and

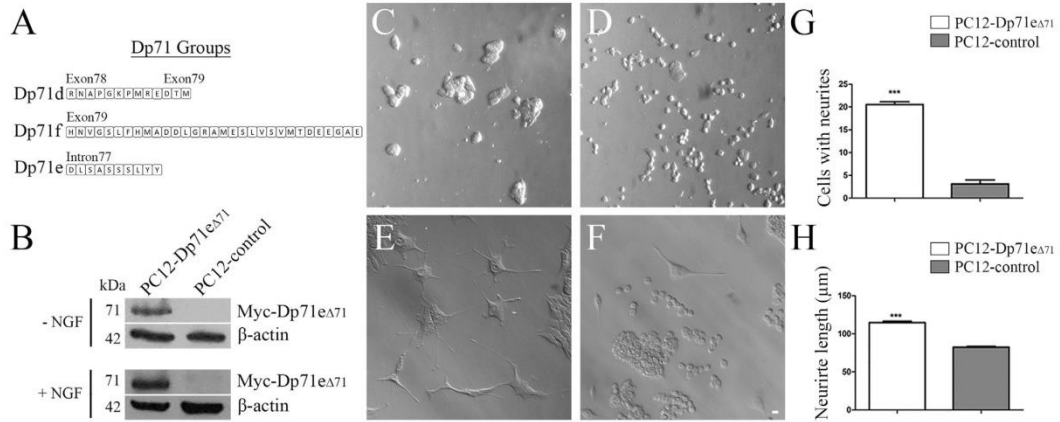


Fig. 1. Expression of dystrophin Myc-Dp71e Δ 71 and morphometric analysis of undifferentiated and NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells. Cell lines were differentiated with NGF for nine days. (A) The scheme shows the differences between the C-terminal ends of Dp71 isoforms. (B) Expression of dystrophin Myc-Dp71e Δ 71 in undifferentiated and NGF-differentiated PC12 Tet-On cells, as analysed by WB. The morphometric analysis was performed on clear field micrographs of undifferentiated (C) and NGF-differentiated (E) PC12-Dp71e Δ 71 cells compared to PC12-control cells (D and F), respectively. (G and H) Quantification of the differentiation ratio and neurite lengths of NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells compared to PC12-control cells. The scale bar represents 20 μ m.

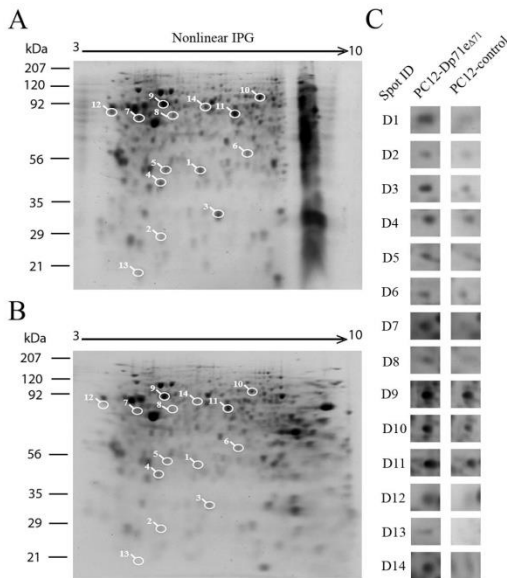


Fig. 2. 2-DE gel images of proteins from NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 and PC12-control cells. Total protein extracts of NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 and control cells were collected nine days after the induction of differentiation and separated on a pH 3–10 nonlinear strip (7 cm), followed by 12% SDS-PAGE. Gels were stained with Coomassie colloidal blue. (A) Protein profile of PC12-Dp71e Δ 71 cells. (B) Protein profile of PC12-control cells. Numbers 1–14 indicate the IDs of differentially expressed protein spots. (C) Magnified views of the differentially expressed protein spots. Arrows represent the nonlinear immobilized pH gradient used for IEF. The positions of standard markers for the second dimension are shown on the left side of each image.

nucleus $49.90 \pm 3.52\%$; $P = 0.985$). Interestingly, HspB1 also was observed along the neurites (Fig. 4H). The quantification of the fluorescence intensity from three independent experiments showed that HspB1 immunoreactivity was 3-fold higher in NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells than in PC12-control cells (Fig. 4M). In addition, the merged image of dystrophin and HspB1 staining showed colocalization of these proteins in NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells (Fig. 4I). We measured three independent experiments using NGF-differentiation PC12-Dp71e Δ 71 and PC12-control cells and calculated colocalization ratios of 25.60% and 1.7%, respectively (Fig. 4N). Based on these results, HspB1 expression is increased in NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells, and Myc-Dp71e Δ 71 dystrophin and HspB1 are located in close proximity.

4. Discussion

PC12 cells have been used as a model to study neuronal differentiation, as the addition of NGF leads to cell cycle arrest and differentiation of cells resembling sympathetic neurons [8]. Modifications associated with NGF-induced differentiation include morphological changes such as neurite outgrowth and the development of electrical excitability [25]. Studies of PC12 cells have shown differential expression and subcellular distribution of Dp71d and Dp71f throughout NGF-induced differentiation [13]. Dp71 expression is reported to be essential for neurite outgrowth [14]. Several isoforms of Dp71 are expressed in PC12 cells, and the localization of these isoforms is determined by their specific C-terminal ends (exons 78, 79 and intron 77) [10]. The recombinant Myc-Dp71e Δ 71 protein was mainly located in the cell periphery and cytoplasm, with a small amount detected in the nucleus of undifferentiated PC12 Tet-On cells. The subcellular distribution was similar in NGF-differentiated PC12 Tet-On cells; however, the level of the recombinant Myc-Dp71e Δ 71 protein in the nucleus increased [10]. Interestingly, a dystrophin Dp71 Δ 78–79 mutant that lacks exons 78 and 79 is localized in the cell periphery of undifferentiated and NGF-differentiated PC12 cells [20]. In addition, the Dp71 Δ 78–79 mutant stimulates neurite outgrowth from PC12 cells by increasing the expression and phosphorylation of HspB1 [21]. The major difference in each group of Dp71 isoforms is the lack of the two last exons, 78 and 79; nevertheless, the groups share exons 63–77 (with the exception of exon

Table 1
Proteins identified by mass spectrometry.

Spot ID	Variation	Fold-change in spot	MS	Accession no. ^a	Protein	Gene	MW [kDa]	pI	Match Pept	SC (%) ^b
1	+	5.4	MALDI	P14602	Heat shock protein beta-1	Hspb1	23.0	6.1	3	53.6
2	+	1.9	MALDI	P62965	Retinoic acid-binding protein I	Crabp1	15.6	5.2	1	34.6
3	+	3	MALDI	P07632	Superoxide dismutase	Sod1	15.9	5.8	3	32.7
4	+	2.4	MALDI	P31044	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	Pebp1	20.8	5.4	9	82.8
5	+	2.9	MALDI	P42930	Heat shock protein beta-1	Hspb1	22.9	6.1	3	20.9
6	+	1.7	MALDI	P18420	Proteasome subunit alpha type-1	Psm1	29.5	6.1	3	49
				O09131	Glutathione S-transferase omega- 1	Gsto1	27.5	6.9	1	37.5
7	+	2.6	MALDI	P07323	Gamma enolase	Eno2	47.1	5.0	11	72.3
8	+	1.9	MALDI	P07335	Creatine kinase B-type	Ckb	42.7	5.4	2	25.5
9	+	1.8	MALDI	P63039	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	60.9	5.9	14	47.5
10	+	2.2	MALDI	O35814	Stress-induced-phosphoprotein 1	Stip1	62.6	6.4	11	49.4
11	+	3	MALDI	P04764	Alpha enolase	Eno1	47.1	6.1	4	29.1
12	+	1.9	MALDI	O35887	Calumenin	Calu	37.0	4.5	4	39.7
13	+	4	MALDI	P05964	Protein S100-A6	S100a6	10	5.3	1	28.1
14	+	2.6	MALDI	Q10758	Keratin, type II cytoskeletal 8	Krt8	54.0	5.8	5	28.4

^a Accession number according to the Swiss-Prot *Rattus norvegicus* database.

^b SC % = % of the sequence identified.

71). Dp71^{eΔ71} expression increases during NGF-induced differentiation, suggesting a role for this protein in the differentiation process [11] and although contains the same exons as the Dp71^{Δ78-79} mutant, their subcellular distributions are different [10,20]. These data support the hypothesis that the C-terminal end is essential for determining the subcellular localization and probably the specific function of each Dp71 isoform.

In the present study, we explored the effect of inducible Dp71^{eΔ71} expression on the neuronal differentiation process in PC12 Tet-On cells. Dp71^{eΔ71} expression stimulates neuronal differentiation by increasing the percentage of cells with neurites and neurite length. These data support the hypothesis that this protein has an important role in neurite outgrowth, and the two last exons are not required to induce neuronal differentiation. Besides, Dp71e mRNA was detected in SH-SY5Y cells, suggesting that this protein could have an important function in human [11]. In addition, Dp71^{eΔ71} mainly displays a cytoplasmic distribution along the neurites, and less staining is observed in the nucleus of NGF-treated cells at 9 days after the induction of differentiation, unlike that observed in transiently transfected NGF-differentiated PC12 Tet-On cells where Dp71^{eΔ71} has a greater presence in the nucleus [10]. Interestingly, the distribution of Dp71^{eΔ71} was different from the distribution of the Dp71^{Δ78-79} protein that also lacks exons 78 and 79, which was mainly localized in the cell periphery. Thus, the C-terminal end of Dp71^{eΔ71}, which is composed of 10 amino acids (DLSASSLYY), is important for determining its subcellular distribution. Considering the morphological changes observed in the PC12-Dp71^{eΔ71} cells and to obtain a better understanding of the mechanism by which Dp71^{eΔ71} increases the percentage of differentiated cells, we compared the protein expression profiles of PC12-Dp71^{eΔ71} cells and PC12-control cells. This analysis allowed us to identify differentially expressed proteins. Dp71^{eΔ71} modifies the expression of 3.6% of proteins; interestingly, all

these proteins were up-regulated.

The identified proteins were clustered based on their biological process according to Gene Ontology (GO) analysis and were classified into four categories: i) metabolism-associated proteins such as alpha and gamma enolase, HspB1, glutathione S-transferase omega-1 and creatine kinase B-type, retinoic acid-binding protein I, ii) response to stimulus such as stress-induced-phosphoprotein 1, HspB1, and superoxide dismutase, iii) structural molecules such as keratin, type II cytoskeletal 8, and iv) calcium ion binding proteins such as calumenin and S100-A. The increased expression of proteins with structural functions could explain the morphological changes required to stimulate neurite outgrowth in PC12-Dp71^{eΔ71} cells. The protein displaying greatest increase in expression was HspB1, with an increase of > 5.4-fold. This protein promotes actin polymerization, contributing to axonal outgrowth [26–29]. Interestingly, when the dystrophin Dp71^{Δ78-79} mutant is expressed, neurite outgrowth is stimulated by increasing the expression and phosphorylation of HspB1 [21]. We validated the change in HspB1 expression using a WB assay and we also observed the subcellular localization of this protein using ImmP staining. HspB1 has been described to be located within dendrites or axons and in synaptic components [30]. According to our previous study, HspB1 is located in the cytoplasm and along the neurites in PC12-C11 cells [21]. Interestingly, HspB1 showed the same distribution in PC12-Dp71^{eΔ71} cells. Based on the increased expression and the subcellular localization of HspB1 following Dp71^{eΔ71} overexpression, Dp71^{eΔ71} dystrophin might stimulate neurite outgrowth by increasing the expression of HspB1.

S100A6 (calyculin) was the second most highly up-regulated protein, with an increase of 4-fold (Table 1). This protein belongs to the calcium-binding protein family and is related to cytoskeletal dynamics, cell proliferation, differentiation, Ca²⁺ homeostasis and cell adhesion [31]. S100A6 binds to tropomyosin, annexins, caldesmon, and

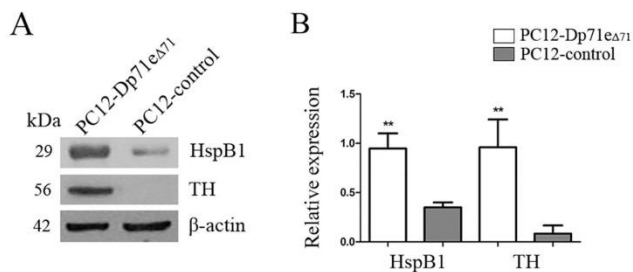


Fig. 3. Validation of the differentially expressed protein HspB1 and the neuronal marker TH in NGF-differentiated PC12-Dp71^{eΔ71} cells. Protein extracts were obtained from Dp71^{eΔ71} cells and control cells that had been differentiated with NGF for nine days and analysed by WB. (A) Expression of HspB1 and TH proteins. (B) Relative expression of HspB1 and TH proteins was determined as indicated in the Materials and Methods. The graph presents the means \pm SD from three independent experiments. ** $P < 0.003$ and 0.006 for HspB1 and TH, respectively. The β -actin protein was used as a loading control. MW is indicated in kDa.

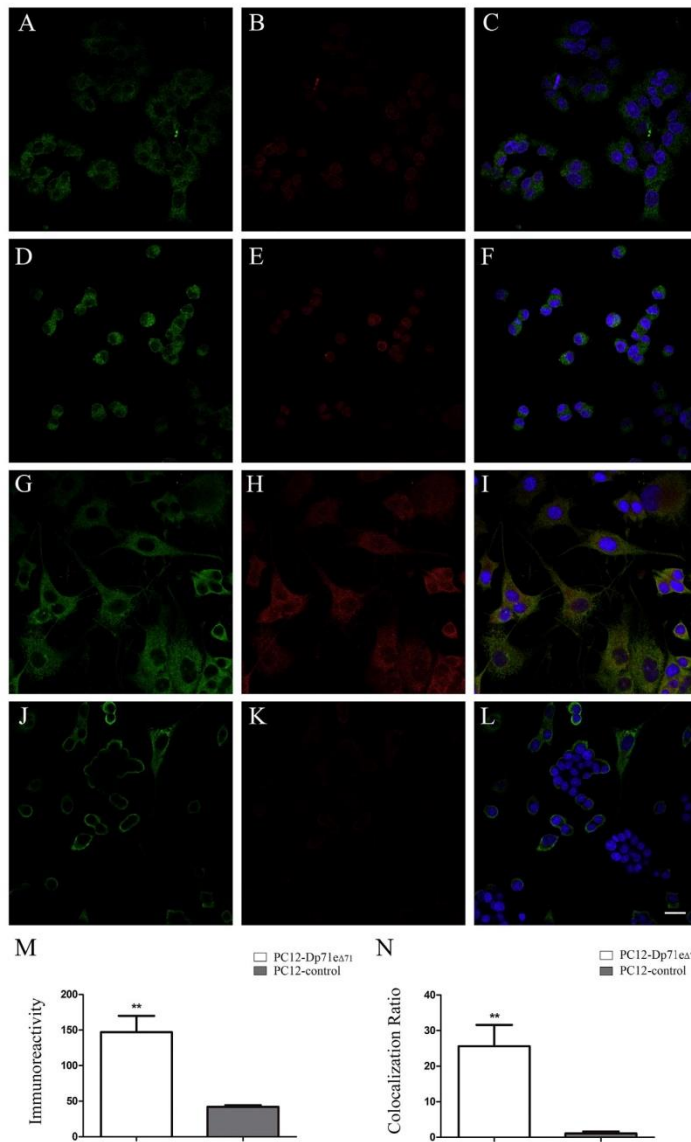


Fig. 4. Cellular distribution of the HspB1 protein in undifferentiated and NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells. Indirect ImmF staining was performed on undifferentiated and NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 and PC12-control cells nine days after the induction of differentiation. ImmF staining for the Myc-Dp71e Δ 71 protein was performed with the anti-c-Myc antibody (green) and anti-HspB1 antibody (red). Nuclei were stained with DAPI (blue). Images represent a single equatorial Z-section from confocal images to show the localization of each protein. (A–C) Undifferentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells. (D–F) Undifferentiated PC12-control cells. (G–I) NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 cells. (J–L) NGF-differentiated PC12-control cells. (B and E) Subcellular distribution of HspB1 in undifferentiated PC12-Dp71e Δ 71 and PC12-control cells, respectively. (H and K) Subcellular distribution of HspB1 in NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 and PC12-control cells, respectively. (A, G, D and J) Subcellular distribution of the c-Myc epitope in undifferentiated and NGF-differentiated PC12-Dp71e Δ 71 and PC12-control cells. (C, F, I, and L) Merged images of the c-Myc epitope and HspB1 protein. (M and N) Fluorescence intensity data are presented as the means \pm SD from three independent experiments (** $P < 0.0014$). (N) Colocalization ratio from three independent experiments (** $P < 0.0022$). The scale bar represents 20 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

calponin, suggesting that this protein may regulate the actin cytoskeleton [32]. In addition, S100A6 has also been detected in physiological fluids and cell culture media, suggesting a possible role for this protein in regulating secretory processes [33,34]. In PC12 cells, the inducible expression of S100A6 (designated as 42C) induces neurite outgrowth in the absence of NGF [35]. Moreover, the observed increase in the levels of this protein induced by Dp71e Δ 71 overexpression may play a crucial role in stimulating neurite outgrowth. Also, it has been reported that overexpression of Dp71a (Dp71 Δ 71) and Dp71b (Dp71f) dystrophin increases proliferation, migration and invasion in human bronchial

epithelial cells [17].

Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (HCNP) enhances the cholinergic phenotype and stimulates the synthesis of acetylcholine, inducing ChAT activity in cholinergic neurons in the medial septal nucleus [36,37]. HCNP is derived from HCNP precursor protein (HCNP-pp), also known as phosphatidylethanolamide binding protein (PEBP) and Raf kinase inhibitor protein (RKIP) [38]. Interestingly, the levels of HCNP-pp were increased 2.4-fold, suggesting that HCNP-pp might increase ChAT levels to influence the cholinergic phenotype in PC12-Dp71e Δ 71 cells. In addition, levels of TH, a specific

marker of noradrenergic neurons, were increased upon Dp71e_{Δ71} overexpression. Based on these results, Dp71e_{Δ71} has an important role in stimulating neurotransmitter synthesis, suggesting that these cells have the potential to release catecholamines and acquire characteristics of a cholinergic phenotype. This hypothesis is supported by previously published results from studies in which both transmitter systems were co-expressed in the same cell [39–41].

On the other hand, the levels of the type II cytoskeletal 8 protein, also called cytokeratin-8 or keratin-8 (K8), were increased 2.6-fold. This protein belongs to a large superfamily of intermediate filament (IF) proteins [42]; they are categorized as Type I (acidic, K9-K23) and Type II (basic, K1-K8). The function of the cytokeratin filaments is to provide mechanical support for cells, although earlier reports also implicate cytokeratins in cell signalling and apoptosis [43]. Interestingly, K8 and K19 may associate with dystrophin by interacting with the actin-binding domain [44]. The increased levels of this protein suggest that Dp71e_{Δ71} might interact with K8 to promote structural changes and stimulate neurite outgrowth observed in PC12 cells. Furthermore, exons 78 and 79 of Dp71 isoforms do not have a crucial role in neuronal differentiation process, since both endogenous (Dp71e_{Δ71}) and mutant Dp71 (Dp71_{Δ78–79}) lacking the two last exons have a better NGF response. In contrast, a role for Dp71f (without exon 78) in the synaptic process has been suggested, due to the co-localization with synaptophysin in varicosities and growth cones [13]. Additionally, we evaluated a different clone of PC12-Dp71e_{Δ71} cells called C9, which displays greater neurite outgrowth than PC12-control cells, as another form of validation of the effect of Dp71e_{Δ71} expression on neuronal differentiation (Supplementary Fig. S1). Both clones presented long neurites after nine days of NGF-induced differentiation and displayed the same subcellular distribution of Dp71e_{Δ71}. These results support the hypothesis that Dp71e_{Δ71} is the protein responsible for promoting these changes.

In summary, the changes observed in the protein expression profile of PC12-Dp71e_{Δ71} cells support the hypothesis that the Dp71e_{Δ71} dystrophin isoform has an important role in the neuronal differentiation process by regulating the expression of proteins involved in the cytoskeletal structure (HspB1, S100A6, and K8) and neurotransmitter synthesis (HCNP). The mechanism by which Dp71e_{Δ71} up-regulates the expression of proteins related to neuronal differentiation should be the focus of future studies.

5. Conclusions

In this work, we reported a specific role for a Dp71 isoform in the neuronal differentiation process. Dp71e_{Δ71} expression stimulates neurite outgrowth, increasing the percentages of cells with neurites as well as the neurite length. Additionally, Dp71e_{Δ71} modifies the protein expression profile of PC12 Tet-On cells and increases the expression of proteins with important roles in differentiation, such as HspB1, S100A6, K8, HCNP and TH. These data support the hypothesis that each Dp71 isoform has a specific function.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.027>.

Authors' contributions

CMJ and CPG designed the study, performed the proteomic analysis, analysed the data and wrote the paper. JPRG designed and performed the MS analysis. VC, JA, and LSM performed the cell cultures, participated in constructing the vectors, provided technical assistance and contributed to the revision of the paper. CM coordinated the study, analysed the results and wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the following grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): C. Merino-Jiménez Postdoctoral Fellowship 221088, C. García-Cruz Doctoral Fellowship 282052 and C. Montañez Grant CB-2013-222054.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We thank the proteomics service unit from Instituto Nacional de Medicina Genómica for identifying the peptides, Ivan Galván, MSc, for his assistance with the confocal microscopy and Clemencia Salas for providing technical assistance.

References

- [1] F. Daoud, N. Angeard, B. Demerre, I. Martie, R. Benayou, F. Leturcq, M. Cossée, N. Deburgrave, Y. Saillour, S. Tuffery, Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression, *Hum. Mol. Genet.* 18 (20) (2009) 3779–3794.
- [2] D. Lederfein, Z. Levy, N. Augier, D. Mornet, G. Morris, O. Fuchs, D. Yaffe, U. Nudel, A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (12) (1992) 5346–5350.
- [3] R.C. Austin, G.E. Morris, P.L. Howard, H.J. Klamut, P.N. Ray, Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain, *Neuromuscul. Disord.* 10 (3) (2000) 187–193.
- [4] A. Richard, P.L. Howard, V.N. D'Souza, H.J. Klamut, P.N. Ray, Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71, *Hum. Mol. Genet.* 4 (9) (1995) 1475–1483.
- [5] S.J. Winder, The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 18 (6) (1997) 617–629.
- [6] D.J. Blake, R. Hawkes, M.A. Benson, P.W. Beesley, Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia, *J. Cell Biol.* 147 (3) (1999) 645–658.
- [7] A. Waite, S.C. Brown, D.J. Blake, The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease, *Trends Neurosci.* 35 (8) (2012) 487–496.
- [8] L.A. Greene, A.S. Tischler, 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) (1976) 2424–2428.
- [9] B. Cisneros, A. Rendon, V. Genty, G. Aranda, F. Marquez, D. Mornet, C. Montañez, Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation, *Neurosci. Lett.* 213 (2) (1996) 107–110.
- [10] J. Aragón, A. Martínez-Herrera, J. Romo-Yáñez, V. Ceja, C. Azotla-Vilchis, L. Siqueiros-Márquez, G. Soid-Raggi, A. Herrera-Salazar, C. Montañez, Identification of Dp71 isoforms expressed in PC12 cells: subcellular localization and colocalization with β -dystroglycan and α 1-syntrophin, *J. Mol. Neurosci.* 58 (2) (2016) 201–209.
- [11] A. Saint Martín, J. Aragón, F. Depardon-Benítez, A. Sánchez-Trujillo, G. Mendoza-Hernández, V. Ceja, C. Montañez, Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end, *FEBS J.* 279 (1) (2012) 66–77.
- [12] J. Aragón, M. González-Reyes, J. Romo-Yáñez, O. Vacca, G. Aguilar-González, A. Rendón, C. Vaillend, C. Montañez, Dystrophin Dp71 isoforms are differentially expressed in the mouse brain and retina: report of new alternative splicing and a novel nomenclature for Dp71 isoforms, *Mol. Neurobiol.* 55 (2) (2018) 1376–1386.
- [13] F. Marquez, B. Cisneros, F. Garcia, V. Ceja, F. Velazquez, F. Depardon, L. Cervantes, A. Rendon, D. Mornet, H. Rosas-Vargas, Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process, *Neuroscience* 118 (4) (2003) 957–966.
- [14] R. Acosta, C. Montañez, L. Fuentes-Mera, E. Gonzalez, P. Gómez, L. Quintero-Mora, D. Mornet, L.M. Alvarez-Salas, B. Cisneros, Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells, *Exp. Cell Res.* 296 (2) (2004) 265–275.
- [15] J. Cerna, D. Cerecedo, A. Ortega, F. García-Sierra, F. Centeno, E. Garrido, D. Mornet, B. Cisneros, Dystrophin Dp71f associates with the β 1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion, *J. Mol. Biol.* 362 (5) (2006) 954–965.
- [16] R. Tadayoni, A. Rendon, L. Soria-Jasso, B. Cisneros, Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene, *Mol. Neurobiol.* 45 (1) (2012) 43–60.
- [17] S. Tan, S. Zhao, Z. Chen, Q. Ma, W. Wang, S. Cheng, Q. Wen, S. Tan, J. Xie, Altered biological properties in Dp71 over-expressing HBE cells, *Cell. Physiol. Biochem.* 43 (5) (2017) 2022–2036.
- [18] L. Siqueiros-Marquez, R. Bénard, O. Vacca, H. Charles-Messance, R. Bolanos-Jimenez, X. Guilloneau, F. Sennlaub, C. Montañez, J.A. Sahel, A. Rendon, Protection of glial muller cells by dexamethasone in a mouse model of surgically induced blood-retinal barrier breakdown, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58 (2) (2017).

- [19] A. Herrera-Salazar, R. García-Villegas, J. Aragón, A. Sánchez-Trujillo, V. Ceja, A. Martínez-Herrera, C. Merino-Jiménez, C. Montañez, Overexpression of mutant dystrophin Dp71 [INCREMENT] 78-79 stimulates cell proliferation, *Neuroreport* 27 (1) (2016) 6-11.
- [20] J. Aragón, J. Romo-Yáñez, A. Martínez-Herrera, V. Ceja, A. Rendon, C. Montañez, Characterization of Dp71A78-79, a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation, *J. Neurochem.* 119 (4) (2011) 697-707.
- [21] C. Merino-Jiménez, J. Aragón, V. Ceja, G. Rodríguez-Martínez, F.E. Cázares-Raga, S. Chardonnet, C. Pionneau, A. Rendon, C. Montañez, Dp71A78-79 dystrophin mutant stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via upregulation and phosphorylation of HspB1, *Proteomics* 16 (9) (2016) 1331-1340.
- [22] A. Tischler, L. Greene, Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, *Lab. Invest.* 39 (2) (1978) 77-89.
- [23] J.S. Cottrell, U. London, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* 20 (18) (1999) 3551-3567.
- [24] J.A. Vizcaino, A. Csordas, N. Del-Toro, J.A. Dienes, J. Griss, I. Lavidas, G. Mayer, Y. Perez-Riverol, F. Reisinger, T. Ternent, 2016 update of the PRIDE database and its related tools, *Nucleic Acids Res.* 44 (D1) (2015) D447-D456.
- [25] J.D. Pollock, M. Krempin, B. Rudy, Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP, and dexamethasone on neurite outgrowth and sodium channel expression in PC12 cells, *J. Neurosci.* 10 (8) (1990) 2626-2637.
- [26] J.N. Lavoie, E. Hickey, L.A. Weber, J. Landry, Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27, *J. Biol. Chem.* 268 (32) (1993) 24210-24214.
- [27] J. Landry, J. Huot, Modulation of actin dynamics during stress and physiological stimulation by a signaling pathway involving p38 MAP kinase and heat-shock protein 27, *Biochem. Cell Biol.* 73 (9-10) (1995) 703-707.
- [28] J. Guay, H. Lambert, G. Gingras-Breton, J.N. Lavoie, J. Huot, J. Landry, Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27, *J. Cell Sci.* 110 (3) (1997) 357-368.
- [29] K.L. Williams, M. Rahimtulua, K.M. Mearow, Heat shock protein 27 is involved in neurite extension and branching of dorsal root ganglion neurons in vitro, *J. Neurosci. Res.* 84 (4) (2006) 716-723.
- [30] T. Schmidt, B. Bartelt-Kirbach, N. Golenhofen, Phosphorylation-dependent sub-cellular localization of the small heat shock proteins HspB1/Hsp25 and HspB5/ α B-crystallin in cultured hippocampal neurons, *Histochem. Cell Biol.* 138 (3) (2012) 407-418.
- [31] R. Donato, Intracellular and extracellular roles of S100 proteins, *Microsc. Res. Tech.* 60 (6) (2003) 540-551.
- [32] W. Leśniak, L.P. Slomnicki, A. Filipek, S100A6—new facts and features, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390 (4) (2009) 1087-1092.
- [33] J.E. Celis, D. Crüger, J. Kiiil, K. Dejgaard, J.B. Lauridsen, G.P. Ratz, B. Basse, A. Celis, H.H. Rasmussen, G. Bauw, A two-dimensional gel protein database of noncultured total normal human epidermal keratinocytes: identification of proteins strongly up-regulated in psoriatic epidermis, *Electrophoresis* 11 (3) (1990) 242-254.
- [34] G. Thordarson, J.N. Southard, F. Talamantes, Purification and characterization of mouse decidua calyculin: a novel stimulator of mouse placental lactogen-II secretion, *Endocrinology* 129 (3) (1991) 1257-1265.
- [35] P. Masiakowski, E. Shooter, Changes in PC12 cell morphology induced by transfection with 42C cDNA, coding for a member of the S-100 protein family, *J. Neurosci. Res.* 27 (3) (1990) 264-269.
- [36] K. Ojika, S.-i. Kojima, Y. Ueki, N. Fukushima, K.-i. Hayashi, M. Yamamoto, Purification and structural analysis of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, *Brain Res.* 572 (1) (1992) 164-171.
- [37] K. Ojika, S. Mitake, N. Tohdoh, S.H. Appel, Y. Otsuka, E. Katada, N. Matsukawa, Hippocampal cholinergic neurostimulating peptides (HCNP), *Prog. Neurobiol.* 60 (1) (2000) 37-83.
- [38] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K.D. Katsanakis, D.W. Rose, H. Mischak, Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP, *Nature* 401 (6749) (1999) 173-177.
- [39] U. Ernsberger, H. Patzke, H. Rohrer, The developmental expression of choline acetyltransferase (CHAT) and the neuropeptide VIP in chick sympathetic neurons: evidence for different regulatory events in cholinergic differentiation, *Mech. Dev.* 68 (1) (1997) 115-126.
- [40] D. Higgins, L. Iacovitti, T. Joh, H. Burton, The immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase within rat sympathetic neurons that release acetylcholine in culture, *J. Neurosci.* 1 (2) (1981) 126-131.
- [41] J.L. Hoard, D.B. Hoover, A.M. Mabe, R.D. Blakely, N. Feng, N. Paolucci, Cholinergic neurons of mouse intrinsic cardiac ganglia contain noradrenergic enzymes, nor-epinephrine transporters, and the neurotrophin receptors tropomyosin-related kinase A and p75, *Neuroscience* 156 (1) (2008) 129-142.
- [42] E. Fuchs, D.W. Cleveland, A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease, *Science* 279 (5350) (1998) 514-519.
- [43] J. Kirfel, T. Magin, J. Reichelt, Keratins: a structural scaffold with emerging functions, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (1) (2003) 56-71.
- [44] J.A. Ursitti, P.C. Lee, W.G. Resneck, M.M. McNally, A.L. Bowman, A. O'Neill, M.R. Stone, R.J. Bloch, Cloning and characterization of cytokeratins 8 and 19 in adult rat striated muscle interaction with the dystrophin glycoprotein complex, *J. Biol. Chem.* 279 (40) (2004) 41830-41838.