



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“Identificación de proteínas que interaccionan con las
distrofinas Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 y Dp40 en células
PC12”**

Tesis que presenta:

COZTLI OCELOTL AZOTLA VILCHIS

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directora de tesis:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda

Ciudad de México,

Septiembre de 2020

Agradecimiento a CONACYT

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con los proyectos CONACYT CB-2009-127600, CB-A1-S-24868, SEP-CONACYT-ECOS-ANUIES M11-S02 B000/064/12 y ECOS NORD CONACYT 2016-276330, fue realizado en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda y con la asesoría de: Dra. Rosa María Bermúdez Cruz, Dr. Luis Marat Álvarez Salas, Dr. Francisco Javier Estrada Mena, Dr. Javier Hernández Sánchez y Dr. José Romo Yáñez. Además, durante el desarrollo del trabajo el alumno Coztli Ocelotl Azotla Vilchis fue becario del CONACYT, con número de CVU 257706.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a la Dra. Cecilia Montañez por su paciencia, verdadero apoyo y dirección de este proyecto.

Al Dr. Jorge Aragón por sus invaluable enseñanzas y amistad.

A la Dra. Rosa María Bermúdez y al Dr. Luis Marat por su valiosa asesoría.

Al Dr. Javier Estrada y al Dr. José Romo, por sus consejos y motivaciones.

Al Dr. Javier Hernández, por todo su apoyo y disposición.

A Emmanuel Ríos, por todos sus consejos y procesamientos con espectrometría de masas.

A la Biol. Alejandra Sánchez y al QBP. Víctor Ceja por su preciado apoyo.

A los compañeros y amigos del laboratorio Clemen, Cande, Lulú, Sandy, Mayram, César, Pablo y todos los demás que han rotado en el laboratorio, por su amistad y por hacer placentero trabajar en el Cinvestav.

A Cande especialmente por su apoyo en la estrategia que permitió concluir este trabajo.

A Gaby por toda su disposición y ayuda con trámites.

A mi madre Flor y mi hermano Cuauhtli por su apoyo incondicional, a Arath por ser parte de la familia.

A Fabi por todo su apoyo y cariño.

Índice

Resumen	
Abstract	
1.- Introducción.....	1
1.1.- Distrofinopatías.....	1
1.2.- Gen <i>DMD</i>	2
1.3.- Correlación fenotipo neurocognitivo – genotipo en pacientes con DMD	4
1.4.- Proteína Distrofina	5
1.5.- Distrofinas Dp260, Dp140 y Dp116	7
1.6.- La isoforma Dp71	7
1.7.- Complejos proteicos.....	13
1.8.- Complejo Proteico Asociado a Distrofina (DAPC).....	14
1.8.1.- β -Distroglicano	15
1.8.2.- Sintrofina.....	15
1.8.3.- Distrobrevina.....	16
1.8.4.- Sarcoglicanos.....	16
1.9.- Complejos Dp71/DAPC.....	17
1.9.1.- Retina	17
1.9.2.- Núcleo	18
1.9.3.- Composición del complejo Dp71f _{Δ71} /DAPC durante la diferenciación de células PC12	18
1.9.4.- Otros complejos	18
1.10.- Células PC12.....	19
2.- Justificación.....	20
3.- Objetivos:.....	21
General.....	21
Específicos.....	21
4.- Estrategias experimentales	22
5.- Materiales y Métodos	24
5.1.- Cultivos de células PC12.....	24
5.2.- Extracción de proteínas en condiciones nativas y análisis por geles azul nativos	25

5.3.- Geles segunda dimensión SDS PAGE.....	27
5.4.- Tinción con plata.....	27
5.5.- Extracción de proteínas y “cross link” con paraformaldehído.....	27
5.6.- Western blot.....	28
5.7.- Coinmunoprecipitación.....	29
5.8.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	30
5.9.- Digestión de proteínas en gel.....	31
5.10.- Protocolo de elución suave de proteínas inmunoprecipitadas.....	31
5.11.- Electroforesis y preparación de muestras para proteómica cuantitativa.....	32
5.12.- Cuantificación absoluta de proteínas por análisis de espectrometría de masas LC/ESI-IMS-QTOF.....	33
5.13.- Análisis de datos.....	34
5.14.- Análisis estadístico.....	34
6.- RESULTADOS.....	35
6.1.- Identificación de complejos que contengan Myc/Dp71d _{Δ71} en células PC12 mediante BN-PAGE y espectrometría de masas.....	35
6.2.- Identificación de complejos que contengan Myc/Dp71d _{Δ71} en células PC12 mediante “cross link”, coinmunoprecipitación y espectrometría de masas.....	42
6.2.1.- Estandarización de inmunoprecipitación con anti-Myc policlonal Myc/Dp71d _{Δ71}	46
6.2.2.- Interacción de β-distroglicano con Myc/Dp71d _{Δ71} , Myc/Dp71d _{Δ71-74} y Myc/Dp40.....	46
6.3.- Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d _{Δ71} mediante inmunoprecipitación, sin “cross link” y su análisis por espectrometría de masas.....	55
6.4.- Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d _{Δ71} mediante coinmunoprecipitación y cuantificación absoluta por espectrometría de masas.....	58
7.- Discusión.....	70
7.1.- Dp71d _{Δ71} se asocia a un complejo proteico de 700 kDa.....	71
7.2.- Formación de complejos proteicos por “cross link”.....	72
7.3.- Dp71d _{Δ71} se asocia principalmente a β-distroglicano de 30 kDa.....	73
7.4.- Asociación entre el anticuerpo anti-Myc monoclonal y la sefarosa/proteína G.....	75
7.5.- Proteómica cuantitativa.....	76
8.- Conclusiones.....	82
9.- Bibliografía.....	83

Resumen

Las distrofinas Dp71 y Dp40 son proteínas que participa en el funcionamiento del sistema nervioso central, distintas isoformas de estas proteínas se generan por procesamientos alternativos y difieren en su expresión, así como en su localización subcelular en diversos tejidos y células. El hecho de que las isoformas difieran en el contenido de los exones, principalmente cuando presentan modificaciones en sitios de interacción con ciertas proteínas, puede modificar sus interacciones con otras proteínas y por tanto cambiar su localización y función. Considerando esto, este trabajo tuvo como objetivo identificar proteínas que interaccionan con las distrofinas Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} y Dp40 en células PC12 utilizando las siguientes estrategias: a. Identificación de complejos de proteínas que contengan Myc/Dp71d_{Δ71} en células PC12, mediante BN-PAGE y espectrometría de masas. b. Obtención de complejos de proteínas que contengan Myc/Dp71d_{Δ71}, Myc/Dp71d_{Δ71-74} y Myc/Dp40 en células PC12, mediante “cross link” y su análisis por coimmunoprecipitación y espectrometría de masas. c. Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d_{Δ71} mediante inmunoprecipitación, sin “cross link”, y su análisis por espectrometría de masas y d. Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d_{Δ71} mediante coimmunoprecipitación y cuantificación absoluta por espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron que Myc/Dp71d_{Δ71} está presente en un complejo proteico de 700 kDa en células PC12, en donde se identificaron proteínas que forman parte del degradosoma. El uso de paraformaldehído para unir proteínas por “cross link” permitió observar dos complejos entre Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} y Dp40 y β-distroglicano, se determinó que la forma de β-distroglicano de 30 kDa es la que interacciona principalmente con Dp71d_{Δ71}. La estrategia de coimmunoprecipitación y cuantificación absoluta por espectrometría de masas permitió identificar 7 nuevas proteínas asociadas a Dp71d_{Δ71}: β-tubulina, sintasa de S-adenosilmetionina, molécula adaptadora crk, helicasa con dedo de zinc 2, dominio de repetido WD 93, ciclina L2 y miosina 10. Estas proteínas participan en migración o crecimiento celular y pueden estar relacionadas con la función de Dp71.

Abstract

Dystrophins Dp71 and Dp40 are proteins involved in the central nervous system function, several isoforms of these proteins are generated by alternative splicing and differ in their expression and subcellular location in tissues and cells. The fact that isoforms have different exon composition, mainly in sites for protein interactions, could modify the binding with proteins and therefore change their location and function. The aim of this work was to identify proteins that interact with the dystrophins Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} and Dp40 in PC12 cells through the following strategies: a. identification of protein complexes containing Myc/Dp71d_{Δ71} in PC12 cells, using BN-PAGE and mass spectrometry. b. Obtain protein complexes with Myc/Dp71d_{Δ71}, Myc/Dp71d_{Δ71-74} and Myc/Dp40 in PC12 cells, by “cross link” and their analysis by co-immunoprecipitation and mass spectrometry. c. Identification of proteins associated with Myc/Dp71d_{Δ71} by immunoprecipitation, without “cross link”, and their analysis by mass spectrometry and d. Identification of proteins associated with Myc/Dp71d_{Δ71} by co-immunoprecipitation and absolute quantification by mass spectrometry. The results showed that Myc/Dp71d_{Δ71} is present in the 700 kDa proteasome complex in PC12 cells, the use of paraformaldehyde to bind proteins by “cross link” allowed to observe two complexes between Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} and Dp40 and β-dystroglycan; the 30 kDa β dystroglycan peptide interacts with Dp71d_{Δ71}. Following the strategy of co-immunoprecipitation and absolute quantification by mass spectrometry, seven new proteins associated with Dp71d_{Δ71} were identified: β tubulin, S-adenosylmethionine synthase, crk adapter molecule, zinc finger 2 helicase, WD repeat domain93, cyclin L2 and myosin 10. These proteins are involved in cell growth or migration and might be participating in Dp71 function.

1.- Introducción

1.1.- Distrofinopatías

Las distrofinopatías abarcan un espectro de enfermedad muscular ligada al cromosoma X, la primera caracterización clínica se atribuye al médico Guillaume-Benjamin Amand Duchenne quien en 1861 describió a un niño que sufría una enfermedad que denominó “paraplejía hipertrófica congénita de la niñez”, una condición caracterizada por una aparente hipertrofia de músculos. En 1868 aportó más detalles de este padecimiento y lo nombró “distrofia muscular pseudohipertrófica”, actualmente esta enfermedad es conocida como Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).¹

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades que se caracterizan por la degeneración progresiva y regeneración del músculo esquelético, que conducen a distintos grados de debilidad muscular, afectando a diferentes grupos musculares y con severidad variable dependiendo del tipo de distrofia muscular. Estas distrofias incluyen a las distrofinopatías como es el caso de la DMD, distrofia muscular de Becker (DMB) y la cardiomiopatía dilatada asociada a DMD.²

La DMD es una de las causas más comunes de distrofia muscular en el mundo,³ afecta 1 de cada 3,500 - 4,700 masculinos recién nacidos y tiene un modo de herencia recesiva ligada al cromosoma X,^{4,5} se presenta generalmente en la infancia temprana con retraso para lograr sentarse y pararse de forma independiente, una debilidad proximal que causa dificultad para la marcha y para subir escaleras. Este padecimiento progresa rápidamente, los niños afectados llegan a depender de silla de ruedas a los 12 años y presentan miocardiopatía en promedio a los 18 años, pocos sobreviven más allá de la tercera década de la vida, siendo las complicaciones respiratorias y la miocardiopatía las causas de muerte.⁵ En biopsias de músculo se observa degeneración de fibras musculares, algunas con datos de regeneración y presencia de células inflamatorias crónicas, fibrosis e

hipertrofia de ciertas fibras musculares así como presencia de tejido adiposo e incremento del tejido conectivo fibroso.³

La distrofia muscular de Becker es una enfermedad alélica a DMD, que se caracteriza por debilidad muscular de inicio más tardío manteniéndose la marcha hasta los 20 años. La edad promedio de muerte en estos casos ocurre en la quinta década de la vida y se debe principalmente a insuficiencia cardíaca.⁵ Estudios de electroretinograma muestran que el 88% de los pacientes con DMD o DMB tienen reducida las amplitudes de la onda “b”, bajo condiciones escotópicas, mientras que la onda “a” es normal, lo cual es indicativo de una alteración en la neurotransmisión retinal.⁶ En la mayoría de los pacientes con DMD la enfermedad muscular se asocia con grados variables de afectación cognitiva, con puntajes significativamente bajos para la habilidad verbal y retraso en el aprendizaje de la lectura.⁷

En 1987 se descubrió el gen cuya alteración origina la distrofia muscular de Duchenne, se le nombró *DMD* y desde entonces se han realizado investigaciones para encontrar un tratamiento curativo. Actualmente existen numerosas líneas de investigación prometedoras, sin embargo, a pesar de los esfuerzos aún no existe una cura para la DMD y el manejo se centra en prolongar la sobrevivencia y mejorar la calidad de vida de los pacientes.^{8,9}

1.2.- Gen *DMD*

El gen *DMD* fue localizado en Xp21 mediante clonación posicional, es el gen más grande que se ha descrito en el humano con un tamaño aproximado de 2.5 Mb y está compuesto por 79 exones separados por grandes intrones. El mRNA de longitud completa se expresa predominantemente en músculo tanto esquelético como cardíaco, y en menor cantidad en cerebro.¹⁰

La expresión de la distrofina completa está controlada por tres promotores independientes que funcionan de manera tejido específico, regulados

independientemente y que son nombrados de acuerdo con el órgano en donde ocurre su mayor expresión: cerebro (B), músculo (M) y células de Purkinje en cerebelo (P). Todos ellos expresan la distrofina de longitud completa con un peso molecular de 427 kDa.^{7,10} El gen *DMD* también tiene promotores internos (R de Retina, B3 de Cerebro, S de células de Schwann, G por General), que dan origen a transcritos más cortos que codifican para isoformas con extremos N-terminales truncos, denominados como distrofinas Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71/Dp40, en referencia al peso molecular de las proteínas generadas por estos transcritos (Fig. 1) ^{6,10,11}, estas isoformas se expresan principalmente en sistema nervioso.^{10,12} Los transcritos codificados por el gen *DMD*, además de ser tejido específicos, son regulados durante el desarrollo embrionario y además son sometidos a procesamientos alternativos en distintos sitios, generando una familia de isoformas que difieren en tamaño y estructura.^{13,14}

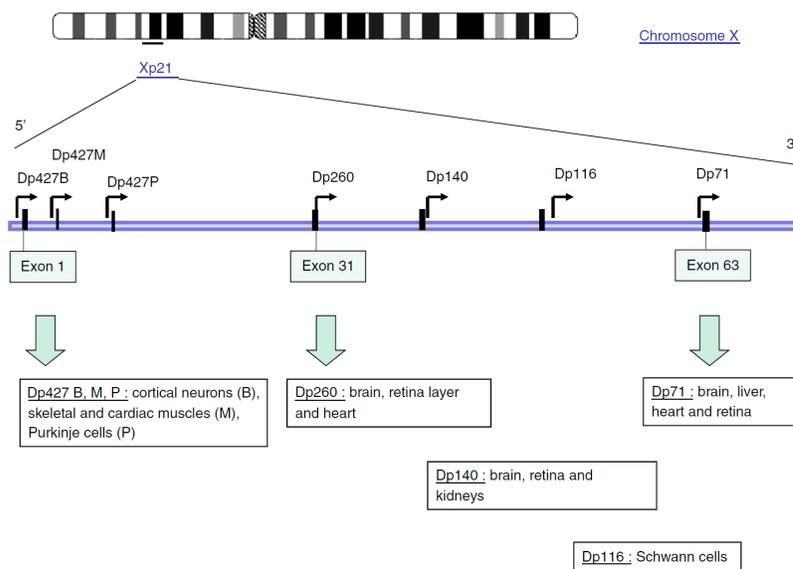


Figura 1.- Organización genómica del gen *DMD*. Localización del gen *DMD* en el cromosoma X y representación de los 7 promotores específicos que generan las diferentes isoformas (distrofinas).¹⁵

Las mutaciones que originan la DMD generalmente causan la ausencia o reducción de los niveles de distrofina, mientras que los pacientes con DMB generalmente presentan una

proteína parcialmente funcional.¹⁰ Aproximadamente del 65 al 80% de los pacientes con DMD o DMB tienen grandes deleciones o duplicaciones en el gen *DMD* que pueden abarcar más de un exón, en algunos casos una deleción o duplicación puede conducir a la expresión de un transcrito trunco en una región interna del gen y sin cambiar el marco de lectura abierto, lo que produciría una versión de distrofina más pequeña pero funcional, sin embargo, si la deleción o duplicación crea un cambio en el marco de lectura, provocando la terminación prematura de la traducción, resultará en la síntesis de una proteína trunca no funcional. La gran mayoría de las grandes deleciones que se presentan en el gen *DMD* ocurren en dos regiones “hot spots”; la región I abarca los exones 45-53 mientras que la región II abarca los exones 2-20, la mayoría de los puntos de ruptura de la región II ocurren en los intrones 1 al 7. Un tercio de los casos de DMD son causados por deleciones pequeñas y mutaciones puntuales distribuidas a lo largo del gen y la mayoría introducen codones de paro prematuros. Gran parte de las deleciones grandes pueden ser detectadas mediante una prueba de PCR multiplex o una variante de esta técnica que permite detectar dosis, como lo es MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).^{10,16} Las deleciones en la región central o terminal del gen *DMD* se correlacionan con cambios más severos en los electroretinogramas de los pacientes con DMD.^{6,17}

1.3- Correlación fenotipo neurocognitivo – genotipo en pacientes con DMD

Diversos estudios han determinado diferentes alteraciones neurocognitivas en pacientes con DMD, entre las que destacan discapacidad intelectual, alteración del espectro autista, hiperactividad y déficit de atención.¹⁵ En cerebro, la ausencia o disfunción de todos los productos de distrofina está asociada con las formas más severas de discapacidad intelectual no progresiva observadas en pacientes con DMD o DMB, siendo la isoforma Dp71 el factor que determina esta severidad.^{6,7,15,18} Estudios de correlación fenotipo-genotipo han mostrado que pacientes con DMB y discapacidad intelectual tienen

mutaciones localizadas en los exones 75 y 76, o mutaciones que afectan la expresión de Dp71. Pacientes con fenotipo de DMD que presentan mutaciones previas al exón 62 que conducen a la pérdida de la función de todos los productos de distrofina, excepto de la isoforma Dp71, se asocian a un desempeño cognitivo normal o límite. ¹⁸ En un estudio donde catalogaron a los pacientes con DMD en 3 grupos dependiendo de la ubicación de mutaciones dentro del gen *DMD*, encontraron una mayor presentación de afección cognitiva, desorden del espectro autista e hiperactividad en el grupo de pacientes con mutaciones después del exón 63. Presumiblemente estas alteraciones cognitivas estarían causadas por la deficiencia de la proteína Dp71, al ser la isoforma mayormente expresada en cerebro. ¹⁵

Mutaciones en el gen *DMD* que afectan a Dp71 también se han encontrado en pacientes con discapacidad intelectual ligada al cromosoma X y sin afectación muscular, en quienes también se demostró una disminución de la expresión de Dp71 en linfocitos. ¹⁹

1.4.- Proteína Distrofina

La proteína codificada por el transcrito de longitud completo es llamada distrofina y es una proteína de citoesqueleto con un peso de 427 kDa, miembro de la familia de proteínas β -espectrina/ α -actina que, se caracterizan por tener el dominio N-terminal de unión a actina o dominio homólogo de calponina para la regulación del calcio. Además de un dominio de mano EF para la detección/unión a calcio seguido de un número variable de repetidos similares a espectrina. ^{10,20}

La distrofina contiene cuatro dominios principales: (1) un dominio amino terminal que contiene un par de módulos con homología a calponina que unen filamentos de actina, (2) el dominio “barra” central compuesto de 24 unidades repetidas similares a los repetidos triple hélice de la espectrina interrumpidos por cuatro dominios “bisagra” ricos en prolina, que pueden conferir flexibilidad a la proteína, (3) una región que está compuesta por un dominio WW, el cual es un motivo pequeño con estructura de lámina β plegada que usualmente está involucrado en la señalización intracelular a través del reconocimiento

de secuencias peptídicas lineares fosforiladas o ricas en prolina. El dominio WW de distrofina reconoce al motivo PPXY y está involucrado en la interacción con β distroglicano. El dominio WW es seguido por un dominio rico en cisteína con dos motivos de EF hand y dos módulos ZZ en serie que unen a colmodulina en una forma dependiente de calcio, que se predice, forman los sitios de coordinación para los cationes metálicos divalentes como el Zn^{2+} . (4) el dominio COOH terminal que contiene dos cadenas polipeptídicas llamadas dominio CC (coiled coil).^{10,11} El dominio C-terminal forma el sitio de unión para distrobrevina y modula la interacción entre sintrofina y otras proteínas que se asocian con la distrofina llamadas en conjunto complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC).¹⁰ Fig. 2.

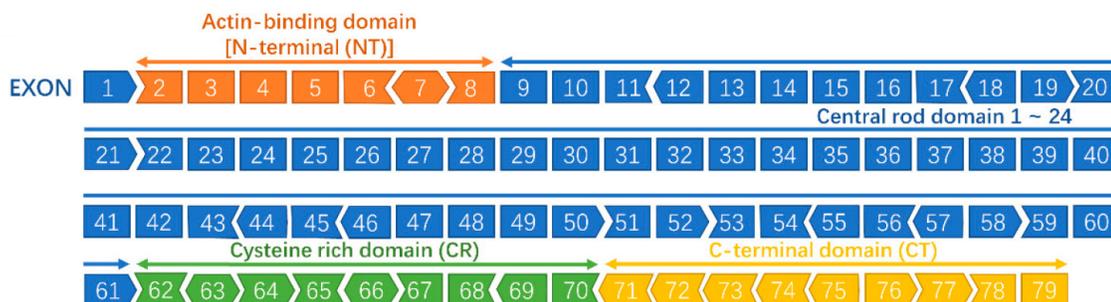


Figura 2.- Estructura del gen DMD. El gen de la distrofina contiene 79 exones que conforman: el dominio N-terminal: exón 2–8; el dominio central: exón 9–61; el dominio rico en cisteína: exón 64–70; y el dominio C-terminal: exón 71–79.⁹

Al menos cinco sitios de unión a actina se han identificado en el gen *DMD*: ABS1, ABS2 y ABS3 que están localizados en los primeros 230 aa de la Dp427 y son codificados por los exones 2-7; ABS4 se localiza en una sección del dominio “barra” codificado por el exón 56 y se presenta tanto en Dp427 como en Dp260, mientras que, el sitio ABS5 se encuentra en la región N-terminal de Dp71.¹³ Se ha demostrado que la distrofina es fosforilada en residuos serina y treonina por proteínas cinasas endógenas.²¹

1.5.- Distrofinas Dp260, Dp140 y Dp116

La distrofina Dp260 es codificada por los exones 30-79 del gen *DMD*, presenta una expresión alta en retina y baja en cerebro o corazón. En retina se localiza en la región presináptica de las células fotorreceptoras y está asociada directamente con las alteraciones electrofisiológicas de la retina.⁶ El promotor que expresa esta distrofina se encuentra en el intrón 29 y genera un transcrito de 10 kb que contiene un primer exón específico, con un extremo amino terminal único de 13 aminoácidos. Contiene 15 de los 24 repetidos de espectrina, el dominio rico en cisteína y el C-terminal.¹⁰

La distrofina Dp140 se expresa en el sistema nervioso central, su promotor se encuentra entre los exones 44 y 45 y genera un transcrito de 7.5 kb, el cual contiene un exón específico unido a los exones 45 al 79. La traducción de Dp140 comienza en el primer ATG del transcrito localizado en el exón 51. Esta proteína, contiene 5 de los repetidos de espectrina, el dominio rico en cisteína y el C-terminal, se expresa en la membrana periférica de las células gliales y está implicada en el desarrollo del riñón.¹⁰

Dp116 se expresa ampliamente en sistema nervioso central y periférico. Su promotor se encuentra entre los exones 55 y 56, el transcrito tiene 5.1 Kb y contiene un exón único seguido de los exones 56 al 79. Esta distrofina contiene los últimos dos repetidos de espectrina, el dominio rico en cisteína y el C-terminal. Dp116 se localiza en las vainas de mielina que rodean a los nervios periféricos y es producida en las células de Schwann.²²

1.6.- La isoforma Dp71

El transcrito de Dp71 es codificado por cerca del 6% del gen *DMD*,²³ se expresa a partir de un promotor tipo “house keeping” localizado en el intrón 62 que contiene una región rica en GC con varios sitios de unión al factor de transcripción Sp1 (Fig. 3).²⁴

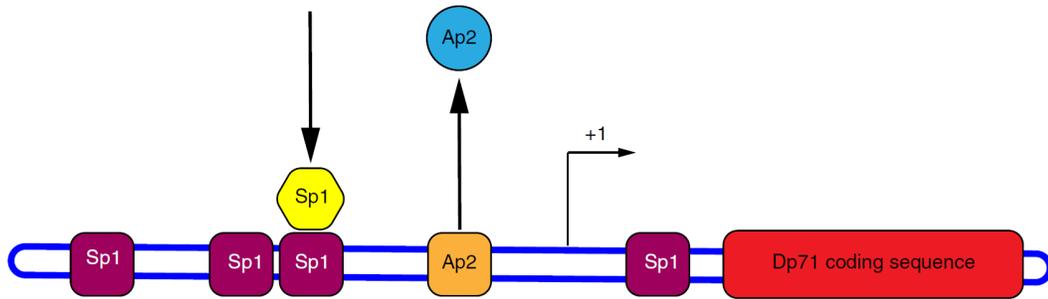


Figura 3.- Región promotora de Dp71. La expresión de Dp71 en la diferenciación neuronal se mantiene mediante la acción de SP1 y Ap2, como reguladores positivo y negativo, respectivamente.²⁵

Dp71 carece del dominio de unión a actina presente en la distrofina completa y de los repetidos similares a espectrina, sin embargo, la región N-terminal de esta proteína tiene un motivo de unión a actina que contiene los aminoácidos LKGHET, fusionados al dominio rico en cisteína y al C-terminal. Este motivo permite la unión directa de Dp71 con el citoesqueleto de actina, ya que se ha demostrado que se localiza con filamentos de actina en cultivos celulares de músculo.^{13,23,26} Dp71 mantiene el dominio rico en cisteína y el dominio C-terminal que son suficientes para la asociación de Dp71 con la membrana plasmática.²⁶

Dp71 tiene una expresión ubicua, se ha demostrado su presencia en cerebro, retina, pulmón, hígado, testículo, riñón y músculo liso, niveles bajos se han detectado en músculo cardiaco y esquelético fetal. Esta distrofina es el producto más abundante del gen *DMD* en cerebro, en cultivos neurales y de células gliales. Los niveles de expresión varían entre los diferentes tejidos y durante la diferenciación celular.^{17,27}

El gen *DMD* se expresa en células madre embrionarias pluripotentes; sin embargo, sólo el mRNA de Dp71 es detectado por RT-PCR y Southern blot en estas células. Dp71 se expresa durante el desarrollo temprano, mientras que durante la diferenciación de células especializadas, los otros promotores localizados corriente arriba son activados.²³

Dp71 es fundamental para el desarrollo del sistema nervioso, sus niveles se incrementan temprana y gradualmente en el prosencéfalo embrionario normal y persisten hasta la

edad adulta.⁷ En el sistema nervioso central adulto, Dp71 se expresa ampliamente en retina, cerebelo, corteza cerebral, epéndimo y coroides. Los métodos de hibridación *in situ* indican que Dp71 tiene expresión predominante en el giro dentado del hipocampo y en menores niveles en bulbo olfatorio, región CA3 del hipocampo y en la corteza cerebral. Dp71 también se expresa en epitelio renal.²⁴

Por otro lado, la expresión de Dp71 en neuronas juega un papel importante en la organización y función de la sinapsis glutamatérgica²⁸ y podría intervenir en la actividad funcional del sistema hipotálamo-neurohipófisis al estar involucrada en la osmorregulación dada por el núcleo supraóptico y en la liberación de vasopresina en neurohipófisis.²⁹

Se ha sugerido que en neuronas cerebrales, los productos proteicos del gen *DMD* podrían funcionar en varios pasos de la cascada de señalización celular y que, la alteración de Dp71 y/u otras isoformas de distrofina podrían alterar la función de esta cascada de señalización en pacientes con DMD induciendo disfunción cerebral.³⁰

Las proteínas adaptadoras como la distrofina o la Dp71 al igual que otras de las proteínas del complejo DAPC son una clase de proteínas importante que carecen de cualquier actividad enzimática intrínseca, pero que pueden poseer varios dominios de unión, los cuales les confieren la propiedad de unirse e interactuar con proteínas específicas. Por esta razón sirven de andamiaje para la formación de varios complejos de señalización, facilitando la correcta localización subcelular y proximidad de las proteínas asociadas, y por tanto regulando y coordinando los respectivos eventos de señalización tanto espacialmente, como temporalmente.³¹

Diferentes isoformas de Dp71 son generadas por procesamiento alternativo del mRNA (Fig. 4). El procesamiento alternativo es una característica común de muchas proteínas que son reguladas en el desarrollo embrionario.³²

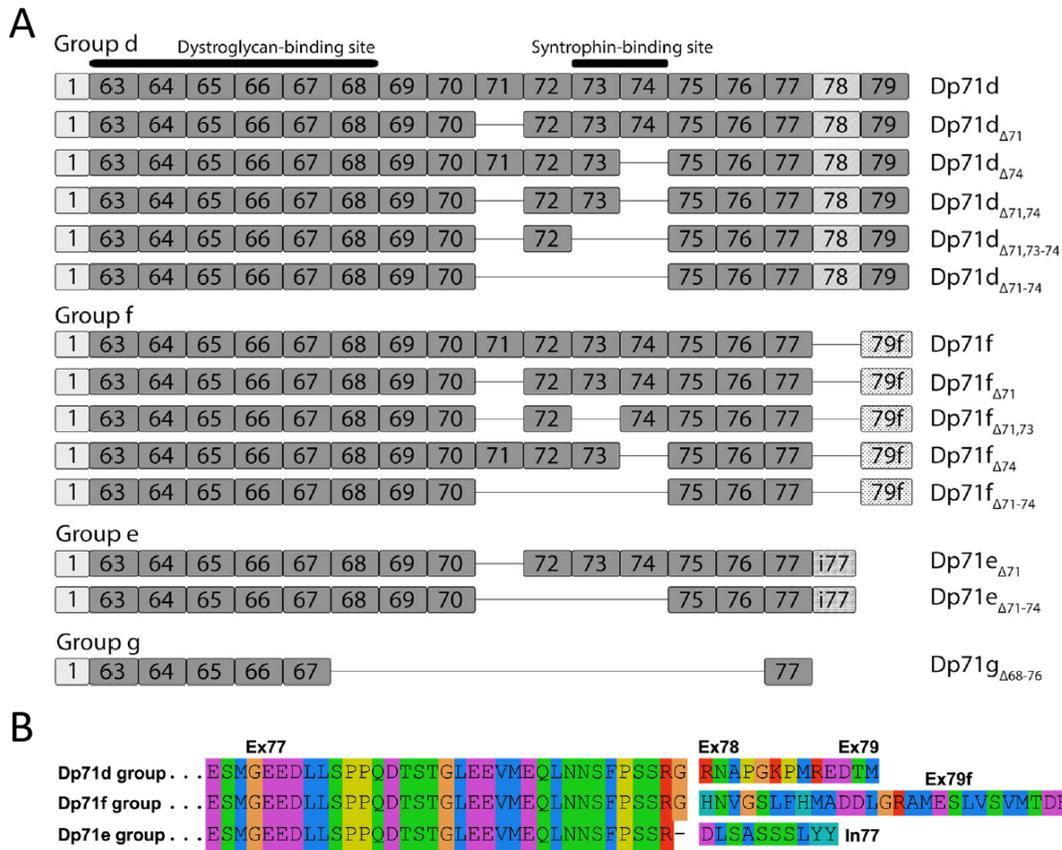


Figura 4.- Representación esquemática de las isoformas de Dp71. A. Dp71 completa y las variantes generadas por procesamiento alternativo, agrupadas de acuerdo con sus extremos carboxilo terminal, grupos d (+ exón 78), f (- exón 78), e (+ intrón 77) y g (- exones 78 y 79), el promotor que las genera se encuentra en el intrón 62 y se muestran los exones que las conforman, las isoformas se nombran de acuerdo al grupo al que pertenecen y con el símbolo Δ se indican los exones ausentes.²⁵ B. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los grupos Dp71d, Dp71f y Dp71e.¹⁴

De acuerdo con la nomenclatura propuesta por Aragón et. al, 2018, las isoformas Dp71 son clasificadas por grupos en base al extremo carboxilo terminal (grupos d, f y e) y en base a los exones que presentan resultado de los diferentes procesamientos alternativos. El grupo Dp71d porta los exones 78 y 79, el grupo Dp71f carece del exón 78 y tiene un exón alternativo 79 (79f), el grupo Dp71e contiene el intrón 77 (i77) y carece de los exones 78 y 79.¹⁴

De acuerdo con esta clasificación el grupo Dp71d incluye: Dp71d (de longitud completa), Dp71d Δ 71 (Dp71a), Dp71d Δ 74, Dp71d Δ 71,74, Dp71d Δ 71,73-74 y Dp71d Δ 71-74 (Dp71c), mientras que el grupo Dp71f incluye Dp71f (Dp71b), Dp71f Δ 71 (Dp71ab), Dp71f Δ 74 y Dp71f Δ 71-74 (Dp71 Δ 110). Por otro lado, el grupo Dp71e contiene Dp71e Δ 71 (Dp71e) y Dp71e Δ 71-74 (Dp71ec) (Fig. 4).

La pérdida de los exones 71 – 74 (330 pb) no afecta el marco de lectura de la proteína, pero elimina parte del sitio de unión a sintrofina. La pérdida del exón 78 causa un cambio en el marco de lectura en los últimos 13 aminoácidos de Dp71 que son reemplazados por 31 nuevos aminoácidos conocidos como secuencia founder y por tanto las isoformas con esta característica son denominadas Dp71f.¹⁷ Dp71d Δ 71-74 se expresa en etapas tempranas del desarrollo neural, y pudiera estar participando en este proceso.³²

Un transcrito de 2.2 kb, que se expresa a partir del promotor de Dp71 se identificó en una biblioteca de cDNA de Schwannoma de rata. Este transcrito genera una proteína de 340 aminoácidos con un peso molecular de 40 kDa, que inicialmente se nombró apo-distrofina 3 y actualmente se conoce como Dp40.¹⁷

Se ha demostrado que el procesamiento alternativo determina la localización subcelular de Dp71. La ausencia de los aminoácidos codificados por los exones 71 y 78 le confieren a Dp71 una distribución citoplásmica, mientras que la presencia de estos exones otorga una localización nuclear en células HeLa, C2C12 y N1E-115.²¹ En las células PC12 diferenciadas en presencia de NGF, Dp71d muestra una localización nuclear, en este caso la proteína contiene el exón 78, mientras que se observa una localización citoplásmica cuando la proteína carece del exón 78. Asimismo, por inmunohistoquímica se localizó a Dp71f y Dp71d en el complejo de Golgi y en los núcleos de neuronas, mientras que sólo Dp71d fue encontrado en neurofilamentos citoplasmáticos, los procesamientos alternativos también difieren en el tipo celular.³⁰

En nuestro equipo de trabajo se ha estudiado la localización de las isoformas de Dp71 en células PC12, utilizando el vector de expresión pTRE2-Pur-Myc que es parte del sistema Tet-On inducible con doxiciclina y que agrega el epítipo Myc a la región amino terminal

de la proteína en cuestión. Con estos estudios se ha observado que Dp71d Δ 71 (Dp71a), Dp71f Δ 71 (Dp71ab) y Dp71e Δ 71 (Dp71e) se localizan principalmente en la periferia y citoplasma de células PC12. Dp71d Δ 71 se observó también en el núcleo. Las isoformas que carecen de los exones 71-74 se localizaron casi exclusivamente en la periferia celular, lo que sugiere que estos exones participan en la localización citoplasmática de las isoformas de Dp71d Δ 71 y Dp71e Δ 71, ya que en ausencia de éstos las isoformas pierden su localización en el citoplasma. En células PC12 Tet-On diferenciadas con NGF Dp71d Δ 71, Dp71e Δ 71 y Dp71e Δ 71-74 incrementan su localización nuclear. Dp71f Δ 71 y Dp71d Δ 71-74 muestran el mismo patrón de localización en células PC12 no diferenciadas que al inducir la diferenciación con NGF. (Fig. 5)

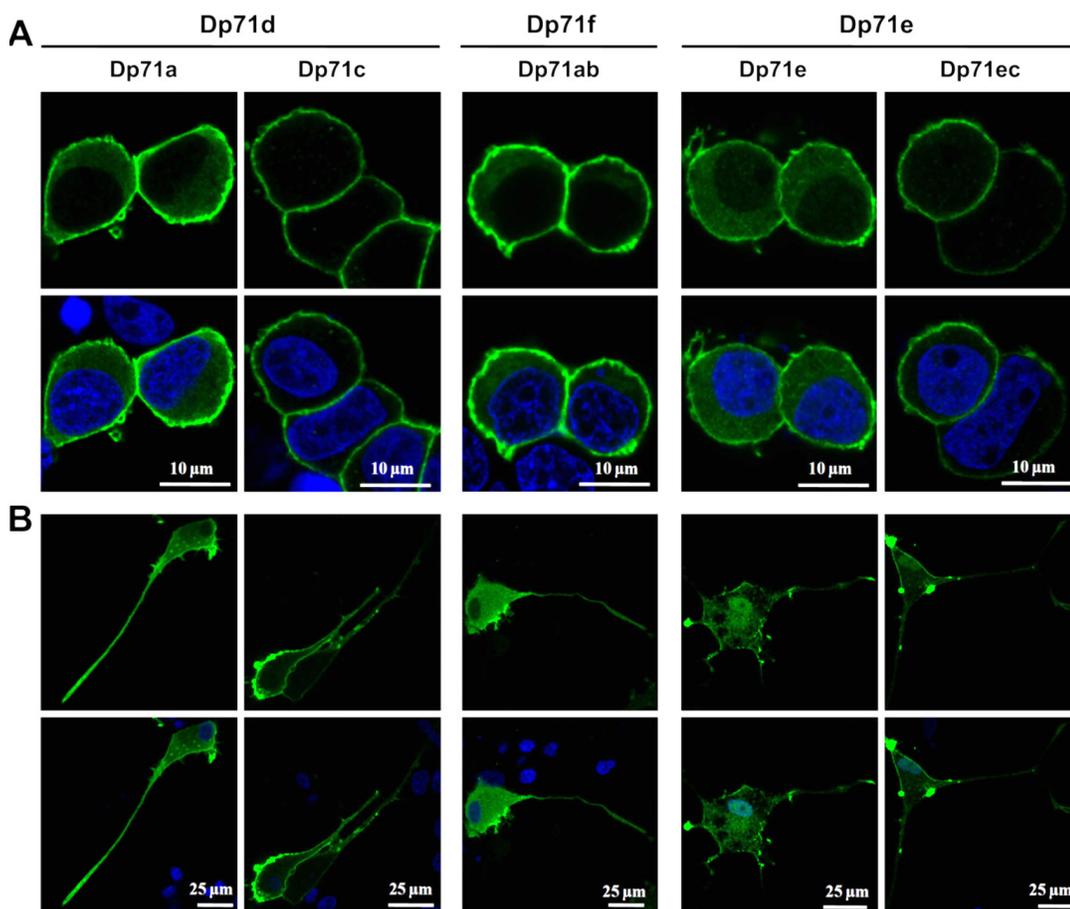


Figura. 5. Localización subcelular de proteínas recombinantes Myc-Dp71. Inmunofluorescencias de células PC12 no diferenciadas (A) y diferenciadas (B), transfectadas con vectores codificando Myc-Dp71, en color verde se aprecia la localización subcelular utilizando anticuerpo anti c-Myc, en color azul núcleos con DAPI.³³

1.7.- Complejos proteicos

Las proteínas son biomoléculas que exhiben una amplia diversidad de formas y características topológicas (disposiciones espaciales dadas por su plegamiento) determinadas por su composición de aminoácidos que les confieren diferentes propiedades físicas y químicas. Estas características topológicas propias de cada proteína participan en las interacciones proteicas y dan lugar a diferentes funciones biológicas específicas.³⁴

La expresión génica diferencial, el procesamiento alternativo, la regulación postranscripcional mediante micro-RNAs así como otros mecanismos de regulación postraduccional generan diferentes patrones espacio temporales.³⁵

Las proteínas tienen mecanismos que regulan su abundancia, su localización, así como interacciones entre ellas para formar complejos, actualmente la investigación proteómica está contribuyendo de manera importante a encontrar la función de las proteínas y a identificar factores que contribuyen con su función. Las proteínas juegan un papel importante en todos los aspectos de la función celular, incluyendo metabolismo, procesamiento de información, transporte, organización celular. Se sabe que las proteínas participan en diferentes funciones interactuando físicamente con otras proteínas y otras moléculas como son, metabolitos, lípidos y ácidos nucleicos. Las interacciones proteína - proteína median funciones tales como detección del medio ambiente, transducción de señales, regulación de la actividad de enzimas metabólicas y de señalización, conversión de energía en movimiento físico y organización celular, entre otras funciones.^{34,36}

Desde el invento de la microcentrifugación por Svedberg quien propuso que las proteínas eran moléculas grandes con propiedades químicas, se sugirió que pequeñas subunidades se agregan formando grandes complejos proteicos, tiempo después se demostró que las proteínas pueden existir como complejos que se pueden disociar y asociar *in vivo* y se marcó el descubrimiento de la estructura cuaternaria.³⁶

Las funciones de las proteínas no derivan explícitamente de su estructura 3D, existe evidencia creciente de que regiones no estructuradas que no corresponden a dominios, a menudo son funcionales y pueden participar en la unión con otras proteínas o funcionar como enlazadores flexibles que tienen un papel en el ensamble de complejos.³⁵

1.8.- Complejo Proteico Asociado a Distrofina (DAPC)

En el tejido muscular la distrofina completa se une al complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC) que consiste en distroglicano, sintrofina, distrobrevina y sarcoglicanos (Fig. 6). Esta unión proporciona estabilidad al sarcolema durante la contracción muscular, al servir como un puente para conectar la matriz extracelular al citoesqueleto. Además de esta función el complejo modula la señalización celular presente en la membrana plasmática¹⁷ y se ha reportado que todos los componentes que participan en este complejo son importantes para la maduración de la sinapsis neuromuscular.³⁷ En general la sintrofina, distrobrevina y distrofina permiten acoplar proteínas celulares a sus sitios de acción específicos a través de sus múltiples motivos de interacción proteína – proteína, por tanto regulan localización intracelular de otras proteínas y de este modo también su función.³¹

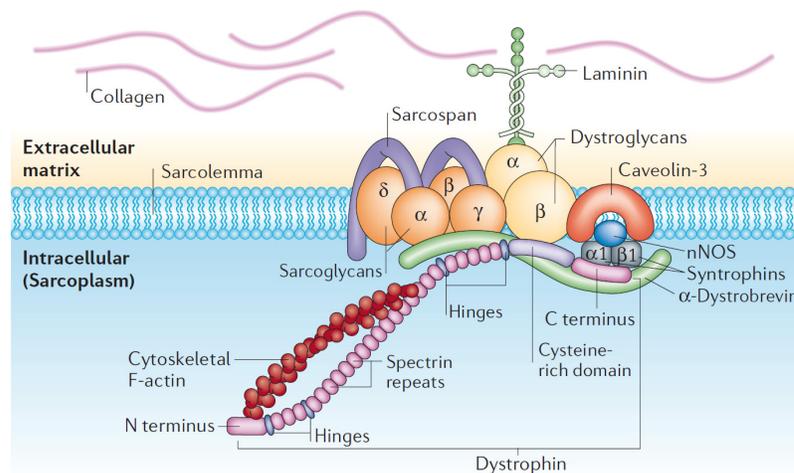


Figura 6.- Complejo Proteico Asociado a Distrofina (DAPC). En músculo esquelético, la distrofina está localizada en el sarcolema y se une al DAPC a través del dominio C-terminal. DAPC está formado de proteínas sarcoplásmicas (α -distrobrevina, sintrofinas y sintasa de óxido nítrico (nNOS)), proteínas transmembranales (β -distroglicano, sarcoglicanos, caveolina 3 y sarcospan) y

proteínas extracelulares (α -dístroglicano y laminina). El dominio N terminal se une al citoesqueleto a través de los filamentos de (F)-actina. DPAC provee una unión mecánica fuerte entre el citoesqueleto intracelular y la matriz extracelular.³⁸

1.8.1.- β -Dístroglicano

El gen del dístroglicano *DAG1* codifica para una proteína precursora que sufre una escisión proteolítica postraduccional, lo cual produce dos subunidades (α y β) no covalentes del complejo de dístroglicano. α -dístroglicano es una proteína extracelular extensamente glicosilada con dos dominios globulares conectados por una porción extensible. El glicoepítotope del α -dístroglicano media la unión de componentes de la matriz extracelular, ambos dístroglicanos juegan un papel importante en el mantenimiento de la conexión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular a través de la formación de múltiples interacciones β -dístroglicano interacciona con MEK y ERK lo que sugiere que puede actuar como una proteína de andamiaje que interactúa con componentes de la cascada ERK-MAPK. De igual forma en la membrana nuclear está involucrado en la organización nuclear y la estructura y funciones de la envoltura nuclear en mioblastos. De manera más general, el dístroglicano se considera un receptor de la superficie celular para proteínas de la matriz extracelular, que participa en la polaridad celular, la organización de la matriz y la estabilidad mecánica de los tejidos, β -dístroglicano tiene un peso de 43 kDa y se ha descrito la presencia de un procesamiento postraduccional mediado por metaloproteasas que genera un β -dístroglicano de 30 kDa.^{11,39}

1.8.2.- Sintrofina

Las sintrofinas son una familia de múltiples proteínas adaptadoras asociadas a membrana, de 58 a 60 kDa que se caracterizan por la presencia de un dominio PDZ (postsynaptic density protein-95/disc large/zona occludens-1) un dominio PH (pleckstrin homology) que sirve de unión a lípidos fosfatidilinositol en membranas biológicas, tienen el papel de reclutar proteínas a diferentes membranas. α 1-sintrofina es una proteína asociada al

DAPC o DGC (complejo glicoproteico de distrofina) y se ha demostrado que sirve de unión entre la matriz extracelular y el aparato de señalización celular interno y el citoesqueleto celular, también es importante para la unión de nNOS a la membrana postsináptica en músculo esquelético. Sintrofina es clave por ser el blanco de interacción de varias proteínas en la membrana y la regulación de varios eventos de señalización intracelular.³¹

1.8.3.- Distrobrevina

Las distrobrevinas son codificadas por dos genes diferentes, α y β , y tienen homología con el dominio rico en cisteína de la distrofina. α -distrobrevina es expresada predominantemente en músculo y cerebro, mientras que β -distrobrevina es expresada en tejidos no musculares, es abundante en cerebro, riñón, pulmón e hígado. Esta proteína se une con proteínas involucradas en la integridad estructural: sincolina, disbindina, desmuslina y DAMAGE. Las distrobrevinas también están involucradas en el señalamiento intracelular.¹¹

1.8.4.- Sarcoglicanos

El complejo de sarcoglicanos consiste de seis miembros (α , β , γ , δ , ϵ y ζ) y la composición de este complejo varía dependiendo del tejido. Cada gen de sarcoglicano codifica para una proteína que contiene un dominio transmembranal y que es glicosilada en su dominio extracelular, la inestabilidad del complejo de sarcoglicano en la membrana citoplasmática en músculo es una característica molecular común de diversas distrofias musculares y cardiomiopatías. Durante el procesamiento postraduccional y tráfico del complejo de sarcoglicano, β y δ sarcoglicano son ensamblados primero, seguido por la adición de γ sarcoglicano y luego α sarcoglicano. Este complejo ensamblado es transportado al sarcolema presumiblemente a través del transporte vesicular a lo largo de las redes de microtúbulos.⁴⁰

1.9.- Complejos Dp71/DAPC

Al igual que la distrofina completa en músculo, se ha demostrado la asociación de Dp71 con proteínas del DAPC, como β -dístroglicano, distrobrevina y sintrofina.

En ratones transgénicos *mdx*, que no expresan la distrofina pero expresan Dp71 en sus músculos, Dp71 se localiza en la membrana plasmática y restaura los niveles normales las proteínas DAPC, sin embargo, Dp71 no puede sustituir funcionalmente a la distrofina completa.⁴¹ La asociación de Dp71 con componentes del DAPC ha provisto evidencia de la importancia de Dp71 en el desarrollo del cerebro, la formación de sinapsis y la plasticidad cerebral.²⁹ Se han realizado diferentes estudios para elucidar el complejo DAPC de Dp71. Una Dp71 recombinante, que carece de los exones 71 al 74, falla en la unión a sintrofina en ensayos de coimmunoprecipitación; sin embargo, es capaz de interactuar con β -dístroglicano, ya que contiene el dominio rico en cisteína, importante para esta unión.⁴¹

1.9.1.- Retina

En retina las células gliales de Müller expresan Dp71 como el único producto del gen *DMD* así como diferentes componentes del DAPC. Ensayos de inmunoprecipitación revelaron que Dp71 forma un complejo similar a DAPC en estas células gliales, incluyendo α y β dístroglicanos, α 1 sintrofina y α distrobrevina. Por otro lado, los canales de entrada de potasio Kir y los canales de agua, que son necesarios para las propiedades de señalización de las neuronas, se encuentran concentrados en los pies terminales de las células de Müller en retina, mientras que son escasos en otros sitios de estas células. Kir4.1 y AQP4 son los canales que predominan en las células de Müller, se ha demostrado que su expresión polarizada depende de DAPC, en los ratones nulos de Dp71 la distribución de Kir4.1 y AQP4 se altera.^{37,42}

1.9.2.- Núcleo

Dp71d se localiza en el núcleo de células neuronales formando un complejo similar a DAPC, que incluye sintrofina, β distroglicano, distrobrevina, α sarcoglicano y emerina. Se ha propuesto que el DAPC nuclear podría estar funcionalmente conectado con la envoltura nuclear y que Dp71d trabaja como proteína de andamiaje para la apropiada localización y estabilidad de las proteínas de la envoltura nuclear. La fracción de Dp7d asociada con la matriz nuclear se incrementa durante la diferenciación neuronal inducida por NGF en células PC12.¹⁷

1.9.3.- Composición del complejo Dp71f Δ 71/DAPC durante la diferenciación de células PC12

Dp71ab (Dp71f Δ 71) forma un complejo con β -distroglicano, α 1-sintrofina, β -distrobrevina y α - β - y γ - sarcoglicanos en células PC12 no diferenciadas, mientras que al inducir la diferenciación con NGF, la composición del complejo cambia, ya que Dp71ab en células PC12 diferenciadas se asocia solo con β -distroglicano, α 1-sintrofina, β -distrobrevina y δ -sarcoglicano. La sintasa de óxido nítrico se asocia con el complejo Dp71ab/DAP durante el tratamiento con NFG.⁴³

1.9.4.- Otros complejos

Se ha demostrado que Dp40 forma complejos con proteínas presinápticas como syntaxina 1a, SNAP25 y VAMP2, que participan en la exocitosis de vesículas presinápticas, lo que sugiere una participación importante de Dp40 en funciones presinápticas en el cerebro.⁴⁴

1.10.- Células PC12

La línea celular PC12, derivada de un feocromocitoma de rata, es un modelo para estudiar la diferenciación neural ya que puede ser diferenciada hacia células muy parecidas en estructura y función a neuronas en presencia del factor de crecimiento neural (NGF).⁴⁵

Cuando las células PC12 se cultivan en medio que contiene suero, adoptan una morfología redonda y proliferan, bajo estas condiciones, las células muestran muchas de las propiedades asociadas con células cromafines de la médula suprarrenal. En niveles fisiológicos de NGF, estas células cesan su división, llegan a ser eléctricamente excitables, extienden largas neuritas ramificadas y gradualmente adquieren características de neuronas simpáticas maduras.⁴⁶

Las células PC12 expresan las siguientes isoformas de Dp71: Dp71d, Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ74}, Dp71d_{Δ71-74}, Dp71f, Dp71f_{Δ71} y Dp40 (M. en C. Paul-González, datos no publicados) y se ha encontrado que los niveles del mRNA y de la proteína se incrementan durante la diferenciación de las células con NGF.⁴⁷

2.- Justificación

Dp71 es una proteína que participa en el funcionamiento del sistema nervioso central, diferentes isoformas de esta proteína se generan por procesamientos alternativos y difieren en su expresión en diferentes tejidos, así como en su localización subcelular.

El hecho de que las isoformas difieran en el contenido de los exones, principalmente cuando carecen de sitios de interacción con ciertas proteínas, podría ocasionar una interacción diferente con otras proteínas y por tanto cambios en su localización y función.

Considerando lo anterior, en este trabajo se pretende identificar proteínas que interaccionan con las distrofinas Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} y Dp40 en las células PC12 para contribuir al conocimiento de la función de estas distrofinas.

3.- Objetivos:

General

- Identificar proteínas que interactúan con las distrofinas Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 y Dp40 en células PC12.

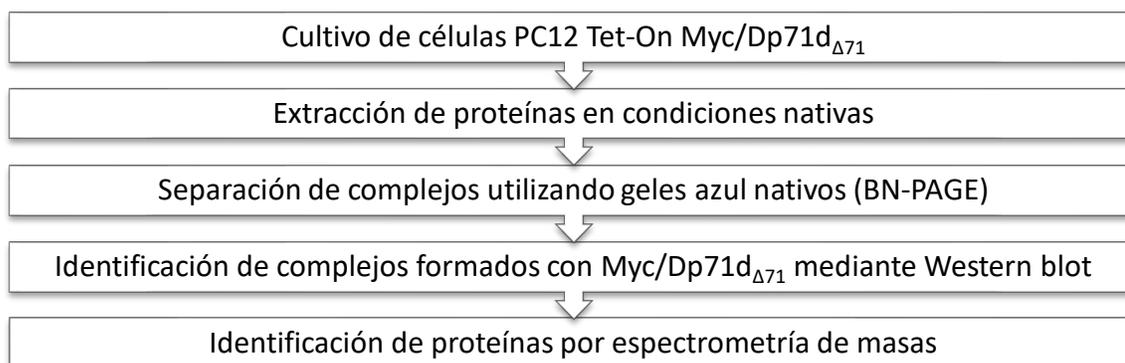
Específicos

1. Identificación de complejos de proteínas que contengan Myc/Dp71d Δ 71 en células PC12, mediante BN-PAGE y espectrometría de masas.
2. Obtención de complejos de proteínas que contengan Myc/Dp71d Δ 71, Myc/Dp71d Δ 71-74 y Myc/Dp40 en células PC12, mediante “cross link” y su análisis por coimmunoprecipitación y espectrometría de masas.
3. Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d Δ 71 mediante inmunoprecipitación, sin “cross link” y su análisis por espectrometría de masas.
4. Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d Δ 71 mediante coimmunoprecipitación y cuantificación absoluta por espectrometría de masas.

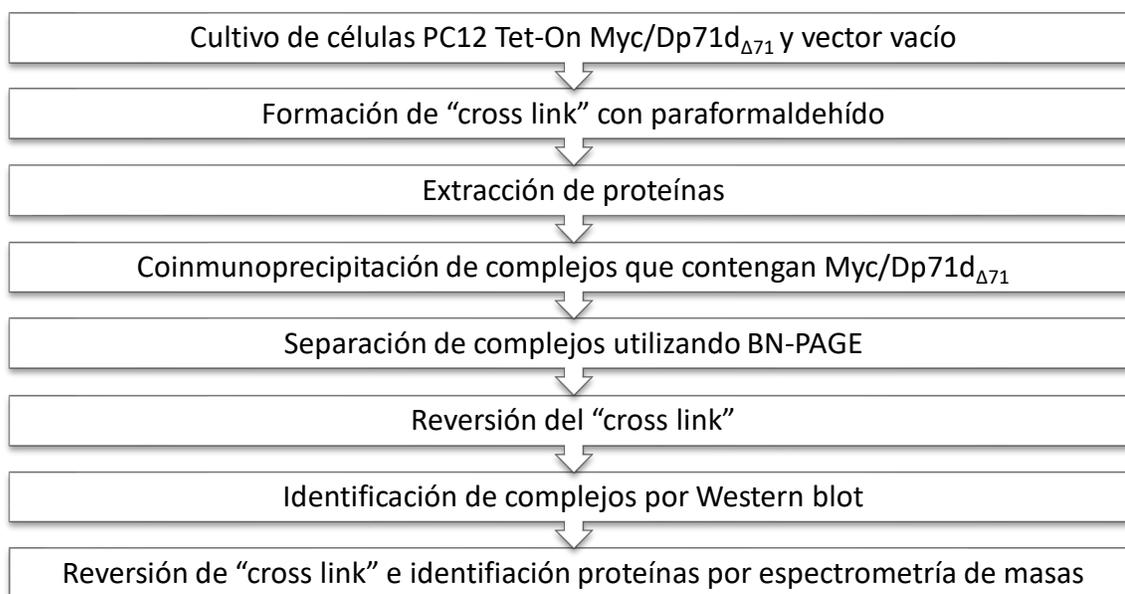
4.- Estrategias experimentales

Con el objeto de identificar proteínas que formen complejos con las isoformas de la Dp71 y Dp40 se llevaron a cabo las siguientes estrategias:

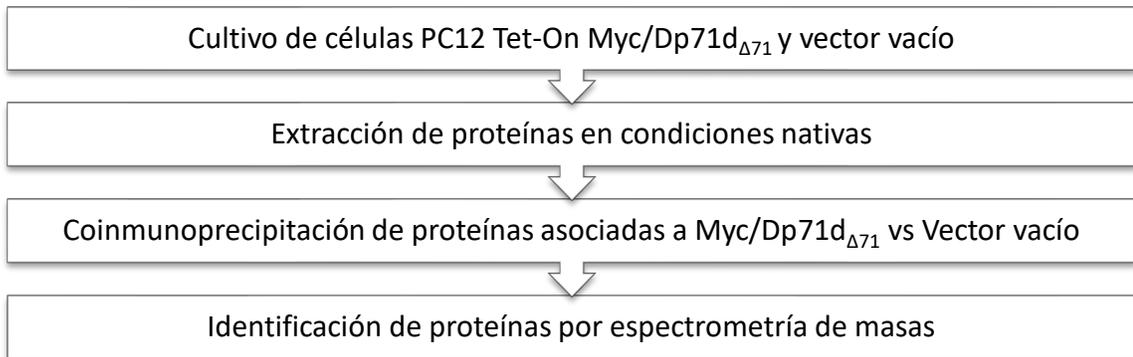
4.1.- Identificación de complejos de proteína que contengan Myc/Dp71d_{Δ71} en células PC12 mediante **BN-PAGE** y espectrometría de masas.



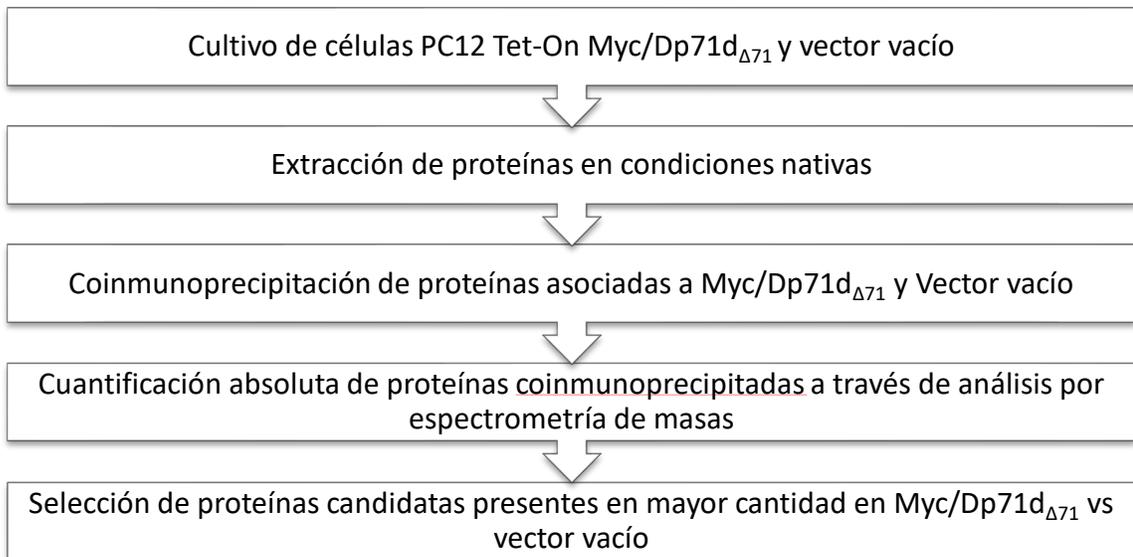
4.2.- Obtención de complejos de proteínas que contengan Myc/Dp71d_{Δ71}, Myc/Dp71d_{Δ71-74} y Myc/Dp40 en células PC12 mediante **“cross link”** y su análisis por **coimmunoprecipitación** y **espectrometría de masas**.



4.3.- Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d_{Δ71} mediante **inmunoprecipitación sin “cross link”**, y su análisis por espectrometría de masas.



4.4.- Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d_{Δ71} mediante **coinmunoprecipitación y cuantificación absoluta** por espectrometría de masas



5.- Materiales y Métodos

5.1- Cultivos de células PC12

Las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71, Myc/Dp71d Δ 71-74 y Myc/Dp40 constituidas por células PC12 TetOn establemente transfectadas con los vectores pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71³³, pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71-74 y pTRE2pur-Myc/Dp40 respectivamente, junto con la clona PC12 TetOn vector vacío compuesta de células PC12 TetOn establemente transfectadas con el vector pTRE2pur-Myc descrito por Herrera-Salazar, et al, 2016⁴⁸ el cual no contiene la secuencia que codifica para ninguna isoforma Dp71, fueron cultivadas en placas plásticas de cultivo de 100 mm en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero de caballo inactivado por calor, 100 U/ml penicilina, 1 mg/ml estreptomicina (Gibco, Rockville, Maryland, USA), 5% de suero fetal bovino libre de tetraciclina (Clontech), 150 μ g/ml geneticina (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) y 350 ng/ml puromicina (Clontech) a 37°C con 5% CO₂. El sistema TetOn (Clontech) permite una expresión génica regulada en respuesta a concentraciones variables de doxiciclina. Fig. 7. Las células PC12 TetOn se encuentran establemente transfectadas con el plásmido regulador pTetOn.

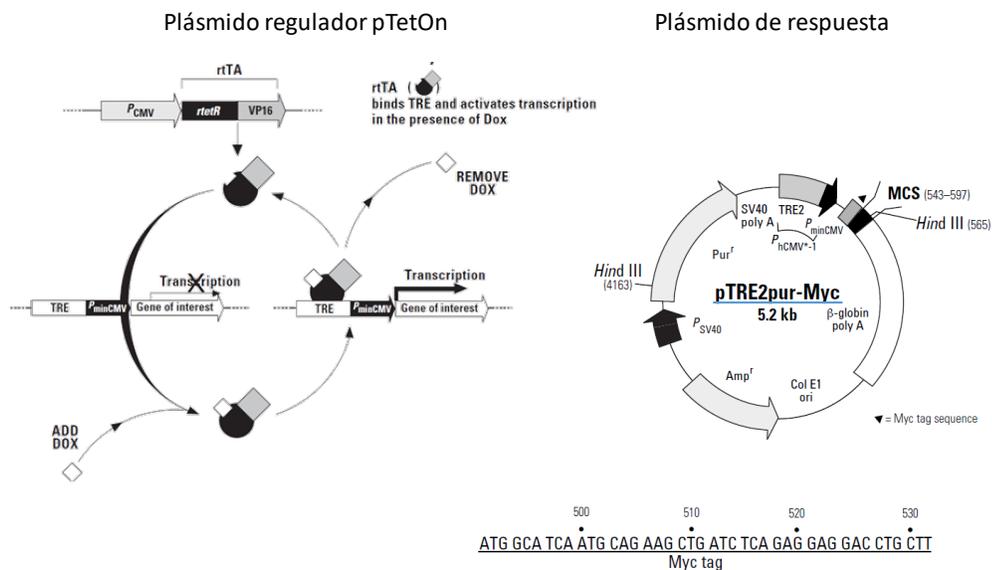


Figura. 7. Sistema TetOn. La línea celular PC12 Tet-On contiene el plásmido regulador pTetOn, que expresa al transactivador controlado por tetraciclina (rtTA), el vector pTRE2pur-Myc

(plásmido de respuesta que permite la fusión de la etiqueta Myc al gen insertado) contiene el segundo componente del sistema TetOn, el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE) compuesto de repetidos de secuencias del operador tet. Con doxiciclina en el medio, rtTA activa la transcripción por unión directa a TRE, el cual funciona como promotor.

5.2- Extracción de proteínas en condiciones nativas y análisis por geles azul nativos

Para la extracción de proteínas que fueron analizadas por los geles azul nativos (BN-PAGE, Blue Native), las células se removieron de las cajas de cultivo mediante pipeteo suave, se recuperaron por centrifugación a 4°C y se lavaron con PBS frío, el botón celular se resuspendió en 100 µl de buffer de lisis BN frío (Bis-Tris 20 mM, ácido aminocaproico 500 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10%, triton X-100 0.5% e inhibidor de proteasas complete 1x), se incubaron en agitación y en hielo por 30 min, y se centrifugaron a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se dializó con una membrana de diálisis previamente preparada (membrana cortada de tamaño conveniente, hervida por 10 min en solución de bicarbonato de sodio 2% y EDTA 1 mM, lavada con agua y hervida por otros 10 min en solución 1 mM EDTA (pH 8.0)). Las muestras se dializaron en 100 ml de buffer de diálisis BN (Bis-Tris 20 mM, ácido aminocaproico 500 mM, NaCl 20 mM, EDTA 2 mM, Glicerol 10%, triton X-100 0.1%, pH 7.0), e inhibidor de proteasas complete 1x, en agitación con un agitador magnético durante toda la noche.

Los geles azul nativos fueron preparados con un gradiente del 4 al 12%, con buffer gel BN (Bis-tris 150 mM, ácido aminocapróico 200 mM, pH 7) y acrilamida-bisacrilamida 32:1 con acrilamida al 40%. Fig. 8.

Para el gel separador al 4% se prepararon 4.5 ml mezclando 1.49 ml de Buffer gel BN, 0.45 ml de acrilamida-bisacrilamida, 2.54 ml agua, 20 µl de persulfato de amonio al 10% y 2 µl de TEMED. Para el gel al 12% se mezclaron 1.48 ml de Buffer gel BN, 1.44 ml de acrilamida-bisacrilamida, 1.31 ml de glicerol 70%, 15.7 µl de persulfato de amonio al 10%

y 1.7 μl de TEMED. Para preparar el gel se utilizó un mezclador de gradiente. El gel concentrador al 3.2% se preparó mezclando 1 ml de Buffer gel BN, 0.24 μl de acrilamida-bisacrilamida, 1.76 ml de agua, 28 μl de persulfato de amonio y 2.8 μl de TEMED.

Para correr las muestras en los geles BN, se tomaron 5 μl de la muestra extraída en condiciones nativas, se desnaturalizó con SDS 1%, se hirvió por 10 min y se cargó en uno de los carriles. 1-20 μl de muestras nativas se corrieron en otros carriles y se utilizó como marcador NativeMark Unstained Protein Standard (life technologies). Para la electroforesis se utilizó una cámara de electroforesis con buffer de cátodo (Bis-Tris 15 mM, tricina 50 mM, azul de Coomassie 0.02 %, pH 7) y buffer de ánodo (Bis-Tris 50 mM, pH 7). Se corrieron a 100 V hasta que las muestras entraran al gel separador y se subió a 180 V hasta que el colorante (frente de corrida) llegara al final del gel.

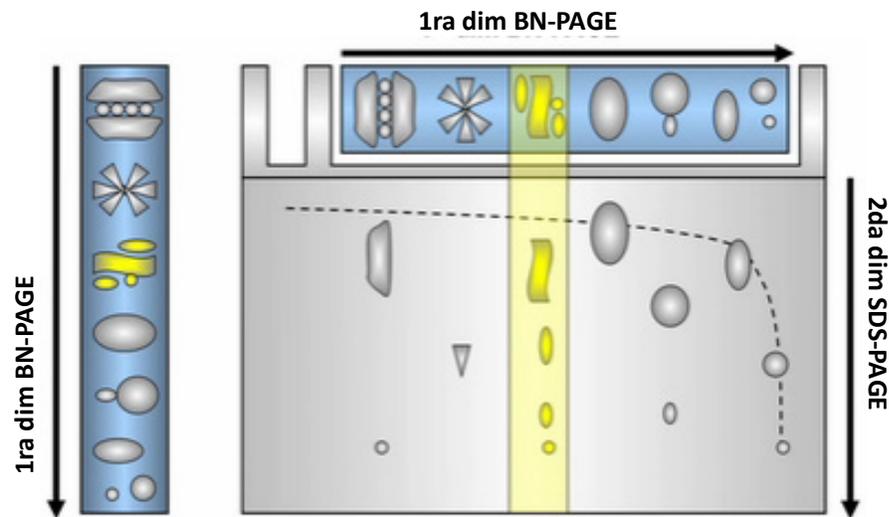


Figura 8.- Representación gráfica de los geles azul nativos (BN-PAGE). Del lado izquierdo, la electroforesis permite la separación de complejos de gran tamaño en una primera dimensión en condiciones nativas con el uso de azul de Coomassie. Del lado derecho, se muestra una segunda dimensión desnaturalizante (SDS-PAGE) que incluye el carril de la primera dimensión, permitiendo la separación de cada una de las proteínas que componen los complejos proteicos obtenidos en la primera dimensión.⁵⁴

5.3.- Geles segunda dimensión SDS PAGE

Para la segunda dimensión la banda seleccionada fue cortada y colocada en buffer de muestra SDS (Tris 12.5 mM, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.02%, pH 6.8.), se calentó por 20 seg en horno de microondas y se dejó incubando por 20 min en el mismo buffer caliente. La banda cortada fue colocada en la parte superior dentro de un formador de gel, y una solución de gel separador SDS-PAGE al 10% fue vertida dentro el formador del gel, dejando la banda incluida dentro del gel, se realizó la formación de un pozo para el marcador de peso molecular y el gel fue corrido a 100 V hasta que el frente de corrida saliera del Gel. Se procedió a realizar tinción o transferencia a una membrana para análisis por Western blot de acuerdo a condiciones ya descritas.

5.4.- Tinción con plata

Para las tinciones con plata los geles fueron fijados con solución de fijación compuesta por etanol 30% / ácido acético 10% y lavados con las siguientes soluciones: etanol 20% por 10 min, etanol 10% por 10 min, agua ultra pura 5 min y nuevamente agua ultra pura 5 min. Los geles fueron sensibilizados con tiosulfato de sodio al 0.02% por 1 min, lavados 2 veces con agua por 5 seg. e incubados con una solución con nitrato de plata al 0.212% por 30 min. Lavados con agua por 15 seg. y revelados con solución preparada a 50 ml con 1.5 gr de carbonato de sodio, 6.25 µl de tiosulfato de sodio 10% y 150 µl de formalina 10% (para 10 ml se mezclaron 1 ml de formaldehído al 37%, 40 mg de fosfato de sodio monobásico y 65 mg de fosfato de sodio dibásico). El tiempo de revelado 10 – 30 min, dependió de la intensidad de la señal de las bandas en el gel y la tinción se detuvo con ácido acético 5% por 15 min y los geles fueron lavados con agua.

5.5.- Extracción de proteínas y “cross link” con paraformaldehído

Para la formación del “cross link” con paraformaldehído, células PC12 de las diferentes clonas fueron cultivadas en placas de 100 mm, se lavaron con 1 ml de PBS y fueron incubadas en 1 ml de solución PBS con paraformaldehído a diferentes concentraciones

(0.25, 0.5, 1 y 2%) y con diferentes tiempos de incubación (5, 10, 20, 40 y 60 min) a temperatura de 37° C. Para detener la reacción se utilizó una solución de 1.25 M de glicina que fue añadida a la reacción durante 5 min a temperatura ambiente, para tener una concentración final de 125 mM. Las células fueron cosechadas y lavadas 2 veces con 0.5 ml de PBS y resuspendidas en 200 µl de buffer de extracción de proteínas BE2 (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, cOmplete inhibidor de proteasa 1X), por 20 min en agitación en hielo. Las células lisadas fueron centrifugadas por 15 min a 14,000 RPM, el sobrenadante fue colectado, las proteínas cuantificadas y el extracto proteico fue mezclado con buffer Laemmli de carga 5X (2% SDS, 10% glicerol, 40% m Tris pH 6.8, 715 mM beta mercaptoetanol) diluido a 1X (50 µl). Las muestras fueron calentadas por 10 min a 65°C previo al SDS-PAGE.

5.6.- Western blot

Para el Western blot, las proteínas extraídas con BE2 y con “cross link” con paraformaldehído fueron separadas en 10 % SDS-PAGE y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada por 2 h y después incubadas toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal c-Myc de ratón (9E10, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:250, anticuerpo policlonal c-Myc de conejo (A-14, Santa Cruz Biotechnology) dilución 1:500, anticuerpo beta distroglicano monoclonal (Ab49515 Abcam) dilución 1:500 o anticuerpo policlonal actina (donado por Dr. Manuel Hernández del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV) dilución 1:300. Las bandas inmunoreactivas fueron detectadas con 1:10,000 anticuerpo secundario anti-ratón o anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Invitrogen) y utilizando Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Santa Clara, CA, USA). Las diluciones de los anticuerpos y los lavados fueron realizados en solución TBS-T 1X (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 a 0.05%).

Para los geles azul nativos se prepararon alícuotas de 60-80 µg de proteína total y se sometieron a electroforesis en geles azul nativos de gradientes 4-12%. El carril con el

marcador de peso molecular NativeMark Unstained Protein Standard (life technologies) fue cortado, separado, y teñido, mientras que, para el resto del gel, las proteínas se transfirieron con buffer de transferencia (Bis-Tris 15 mM, tricina 50 mM, pH 7) a membranas PVDF (previamente activadas en metanol 15 seg, 2 min en agua destilada y 5 min en buffer de transferencia) a 20 V, 30 mA, por 3.5 h y a una temperatura de 4°C.

Las membranas PVDF, fueron desteñidas, con lavados con metanol, bloqueadas con leche descremada al 5% en buffer TBS-T 1X (Tris 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 0.05% 20) durante 2 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche con el anticuerpo primario monoclonal c-Myc de ratón 1:250 (9E10, Santa Cruz Biotechnology) o con anticuerpo policlonal c-Myc de conejo 1:500 (A-14, Santa Cruz Biotechnology) a 4 °C, diluido en buffer TBS-T 1X. Se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón o anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa para detección del anticuerpo primario a una dilución de 1:10,000 en buffer de bloqueo. Las bandas inmunorreactivas fueron detectadas de acuerdo con el sistema de Western Blot ECL (Amersham Pharmacia Biotech) y se hizo la correlación de los pesos de las bandas comparando la membrana con el carril del marcador de peso molecular previamente teñido.

5.7.- Coimmunoprecipitación

La clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y la clona PC12 vector vacío fueron sembradas a una concentración de 2×10^6 y 3.5×10^6 células respectivamente, por duplicado en placas para cultivo celular de 100 mm y fueron crecidas por 24 h. Después, las células fueron tratadas con doxiciclina (50µg/ml) para inducir la expresión de Myc/Dp71d Δ 71 por 24 h. El medio de cultivo fue aspirado y las células fueron lavadas con PBS frío, posteriormente las células fueron cosechadas en hielo por pipeteo suave con 1 ml de buffer RIPA modificado (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 1X coctel de inhibidor de proteasas cOmplete (Roche Molecular Biomedicals), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 1 mM ortovanadato de sodio activado) ⁴⁹ y lisadas por 2 a 4 °C con agitación suave

seguida de centrifugación a $3500 \times g$ por 5 min a 4°C . El sobrenadante fue colectado y cuantificado por método de Bradford.

Los lisados celulares fueron preaclareados para remover proteínas no específicas por incubación por 2 horas a 4°C con $40 \mu\text{l}$ de proteína G con sefarosa, en agitación suave. La proteína G con sefarosa fue separada y descartada por centrifugación a $3500 \times g$ por 5 min a 4°C . El sobrenadante fue colectado y separado en dos partes iguales para el control positivo y el negativo (IP+ e IP-). El inmunoprecipitado positivo realizado con $4 \mu\text{g}$ ($20\mu\text{l}$) de anticuerpo c-Myc monoclonal ($200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 9E10, Santa Cruz Biotechnology) y el control negativo (sin anticuerpo) fueron obtenidos por incubación toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente $20 \mu\text{l}$ de proteína G con sefarosa fueron añadidos a todas las muestras y estas fueron incubadas por 2 horas a 4°C con agitación suave, después la pastilla fue obtenida por centrifugación a $3500 \times g$ por 5 min a 4°C . Las muestras inmunoprecipitadas fueron lavadas 3 veces con $500 \mu\text{l}$ de buffer RIPA modificado por 5 min en agitación suave y una vez con 1 ml de PBS frío.

5.8.- Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para verificar el inserto de DP71d $_{\Delta 71}$ fue realizada con las siguientes condiciones de PCR, utilizando: $5 \mu\text{l}$ de Buffer PCR 10X, $3.5 \mu\text{l}$ de MgCl_2 25 mM, $1 \mu\text{l}$ de mix de dNTPs, $1 \mu\text{l}$ ($200 \text{ ng}/\mu\text{l}$) de cada uno de los oligonucleótidos (pTRE2-F y pTRE2-R), $5 \mu\text{l}$ del DNA genómico de cada clona (PC12 Myc/Dp71d $_{\Delta 71}$, PC12 TetOn y PC12 vector vacío), $0.3 \mu\text{l}$ de Taq DNA polimerasa ($5\text{U}/\mu\text{l}$) y ajustando a un volumen de $50 \mu\text{l}$ con agua.

Secuencias de oligonucleótidos

pTRE2-F ATGGCCATGGCTAGTAGAATTCACATGGCATCAATGCAGAAGCTG,

pTRE2-R AACAATCAAGGGTCCCCAACT

Las condiciones en el termociclador fueron $95^\circ\text{C}/2$ min iniciales, $95^\circ\text{C}/30\text{s}$, $68^\circ\text{C}/3\text{min}$ por 35 ciclos y $72^\circ\text{C}/7\text{min}$. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X con bromuro de etidio $5 \mu\text{g}/\text{ml}$.

5.9.- Digestión de proteínas en gel

Las bandas extraídas fueron cortadas en pedacitos de aproximadamente 1 -2 mm³ que se colocaron en un tubo de 1.5 ml, se añadieron 200 µl de solución de lavado (metanol 50%, ácido acético 5%) y se dejó enjuagar por 4 horas, se removió y descartó la solución de lavado, este paso fue realizado nuevamente, se añadieron 200 µl de acetonitrilo y se dejaron deshidratando las piezas de gel por 5 min. Se removió el acetonitrilo, se dejó secar a temperatura ambiente. Se añadieron 30 µl de DTT 10 mM (1ml de bicarbonato de amonio 100 mM y 1.5 mg de DTT) por 30 min a temperatura ambiente. Se removió el DTT y se añadieron 30 µl de iodoacetamida 100 mM (1 ml de bicarbonato de amonio 100 mM y 18 mg de iodoacetamida), se dejaron alquilando por 30 min a temperatura ambiente. Se removió la iodoacetamida y se añadieron 200 µl de acetonitrilo por 5 min. Se removió el acetonitrilo y se rehidrataron las piezas de gel por 10 min con 200 µl de bicarbonato de amonio 100 mM. Se removió el bicarbonato de amonio y se añadieron 200 µl de acetonitrilo por 5 min. Se removió el acetonitrilo y se dejaron secar completamente a temperatura ambiente, se añadieron 30 µl de la solución de tripsina (1 ml de bicarbonato de amonio frío, 20 µg de tripsina) y se dejó que las piezas de gel se rehidrataran por 10 min. Se removió la solución de tripsina y se añadieron 5 µl de bicarbonato de amonio 50 mM y dejó toda la noche a 37°C.

Se añadieron 30 µl de bicarbonato de amonio 50 mM a la digestión y se incubó la muestra por 10 min. Se colectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 0.5 ml, se añadieron 30 µl de solución de extracción (acetonitrilo 50%, acetonitrilo 5%) a las piezas de gel por 10 min y se colectó el sobrenadante junto con el extracto anterior, este paso se repitió nuevamente. Se redujo el volumen del extracto a 20 µl evaporando en centrifuga con vacío.

5.10.- Protocolo de elución suave de proteínas inmunoprecipitadas

La elución suave de proteínas inmunoprecipitadas fue realizada de acuerdo a el método descrito por Antrobus, et al, 2011 ⁵⁰. Las muestras inmunoprecipitadas fueron resuspendidas en 100 μ l de buffer de elución suave (0.2% SDS, 0.1% Tween-20, 50 mM Tris-HCl, pH= 8.0), incubadas por 7 min a 25°C y con agitación 1000 rpm. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 \times g por 5 min a 4 °C y el sobrenadante fue transferido a tubos de 1.5 ml (este proceso se repitió dos veces para cada inmunoprecipitado y los sobrenadantes fueron colectados en el mismo tubo correspondiente). Los eluidos fueron centrifugados 16,000 \times g por 1 min y el sobrenadante (200 μ l) fue transferido a un nuevo tubo de 1.5 ml. Las proteínas fueron precipitadas con 1 ml de acetona (-20°C), incubadas a -20°C por 18 h y centrifugadas a 10,000 \times g por 5 min, 4°C. El sobrenadante fue removido y la pastilla se dejó secar al aire por 5 min.

5.11.- Electroforesis y preparación de muestras para proteómica cuantitativa

Las pastillas de los inmunoprecipitados fueron resuspendidas en 30 μ l de buffer de muestra Laemmli 2X (0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glicerol, 10 % 2-mercaptoetanol y 0.004 % azul de bromofenol). Previo a la electroforesis las muestras fueron calentadas por 5 min a 95°C.

Para obtener proteínas para ser analizadas por espectrometría de masas, las muestras totales fueron cargadas en un gel al 10 % SDS-PAGE y se corrieron hasta que entraran a una distancia de \approx 5 mm en el gel de separación. El gel fue fijado con solución 40% etanol / 10% ácido acético por 15 min, lavado con agua, y teñido con colorante Coomassie coloidal (161-0803, BIO-RAD) por 18 h a temperatura ambiente con agitación suave y después fue desteñido con agua por 3 h. Las bandas teñidas fueron cortadas con hojas de bisturí nuevas y fueron puestas en tubos de 1.5 con 200 μ l de 10% metanol y almacenadas a 4°C hasta la identificación de proteínas.

5.12.- Cuantificación absoluta de proteínas por análisis de espectrometría de masas LC/ESI-IMS- QTOF

Las bandas corridas en los geles SDS-PAGE 10%, conteniendo todas las proteínas fueron cortadas y digeridas enzimáticamente de acuerdo con el protocolo modificado de Shevchenko, et al, 2006 ⁵¹. Como estándar interno se usó la proteína alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) de *Saccharomyces cerevisiae* (Uniprot accession: P00330) digerida con tripsina, que fue añadida a las muestras de péptidos para obtener una concentración final de 25 fmol.μL⁻¹. Después, 4.5 μL de péptidos digeridos (112.5 fmol de estándar interno) de cada condición fueron cargados por triplicado en precolumnas Symmetry C18 Trap V/M (Waters, Milford, MA); 180 μm X 20 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula 5 μm desalado utilizando como fase móvil A ácido fórmico 0.1% en agua y fase móvil B ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo bajo el siguiente gradiente isocrático: 99.9% fase móvil A y 0.1% de fase móvil B a un flujo de 5 μL.min⁻¹ durante 3 min. Posteriormente, los péptidos se cargaron y separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA); 75 μm X 150 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula 1.8 μm.

Se utilizó UPLC ACQUITY M-Class (Waters, Milford, MA) con las fases móviles mencionadas anteriormente, bajo el siguiente gradiente: 0 min 7% B, 30.37 min 40% B, 32.03 a 35.34 min 85% B, 37 a 42 min 7% B, a un flujo de 400 nL.min⁻¹ y 45 °C como temperatura de columna. Los datos de los espectros se adquirieron en un espectrómetro de masas con ionización por electrospray (ESI) y separación de movilidad iónica (IMS) Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA) operado con adquisición independiente de datos (DIA) y espectrometría de movilidad iónica utilizando modo alta definición multiplexado MS/MS (HDMS^E).

La sintonía para la ionización se configuró con los siguientes parámetros: 2.75 kV en el capilar del muestreador, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el offset de la fuente, 70 °C para la temperatura de la fuente, 0.5 Bar para el nanoflujo de gas y 150 L.hr⁻¹ para el flujo de gas de purga.

Se obtuvieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modos positivo en un rango de m/z 50-2000 con un tiempo de escaneo de 500 ms. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en la transferencia utilizando una rampa de energía de colisión de 19-55 V. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LANSE) en el Cinvestav.

5.13.- Análisis de datos

Los archivos *.raw (en modo HDMS^E) conteniendo los espectros MS y MS/MS fueron analizados, desconvolucionados, comparados y cuantificados en forma absoluta utilizando Progenesis QI for Proteomics v3.0.3 software ⁵² contra las bases de datos *.fasta (downloaded from UniProt UP000002494, secuencias de proteínas 29951), concatenado con su base de datos reversa. Los parámetros utilizados para la identificación de proteínas fueron: tripsina como enzima de corte y se permitió una escisión perdida; carbamidometil (C) como modificación fija y oxidación (M), amidación (C-terminal), desamidación (Q, N) o fosforilación (S, T, Y) como modificaciones variables; la tolerancia de péptidos y fragmentos se estableció en automático, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por péptido: 2, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por proteína: 5, coincidencias mínimas de péptidos por proteína: 1 y tasa de falsos positivos inferior al 4%. Para la cuantificación absoluta se utilizó el promedio de la intensidad de los tres péptidos más abundantes por proteína (Hi3) según el método descrito por Silva et al, 2006 ⁵³. Synapt G2-Si se calibró con fibrinopéptido [Glu1], $[M+2H]^{2+} = 785.84261$ a menos de 1.5 ppm.

5.14.- Análisis estadístico

Los datos de cada duplicado biológico con sus valores por triplicado técnico (cargas de muestra en espectrometría de masas) se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism 6, la significancia de los datos se analizó mediante ANOVA de una vía. Al valor p se le asignaron 5 grados de libertad y finalmente se aplicó un post-test de Tukey para comparar los datos obtenidos.

6.- RESULTADOS

6.1.- Identificación de complejos que contengan Myc/Dp71d Δ 71 en células PC12 mediante BN-PAGE y espectrometría de masas

Con la intención de obtener complejos de proteínas asociados con las distrofinas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71, Myc/Dp71d Δ 71-74 y Myc/Dp40 e identificar a las proteínas que formen parte de estos complejos, se llevaron a cabo cuatro estrategias. En la primera estrategia se utilizó la formación de complejos y su análisis en condiciones no desnaturizantes por medio de geles azul nativos (BN-PAGE), de acuerdo al protocolo descrito por Fiala, et al., 2011.⁵⁴ Esta metodología permite la separación de complejos de proteínas, al realizarse una electroforesis en condiciones no desnaturizantes, utilizando azul de Coomassie.

Para visualizar los complejos de proteínas que contienen a la Dp71d Δ 71 y Dp40, se realizó la extracción de proteínas de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71, PC12 Myc/Dp40 y PC12 vector vacío en condiciones nativas, como se indica en la sección de Materiales y Métodos, y los extractos de proteínas se corrieron en geles BN-PAGE. La electroforesis en geles azul nativos de las proteínas se muestra en la figura 9, en A y B se visualizaron bandas correspondientes a diferentes complejos proteicos con un patrón reproducible. En el panel A se observan complejos desde 140 kDa y mayores de 669 kDa, mientras que en B se observan complejos de hasta 1,236 kDa. No se identificaron diferencias entre el patrón de las bandas de los lisados totales de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y PC12 Myc/Dp40 con respecto al de las células control PC12 vector vacío.

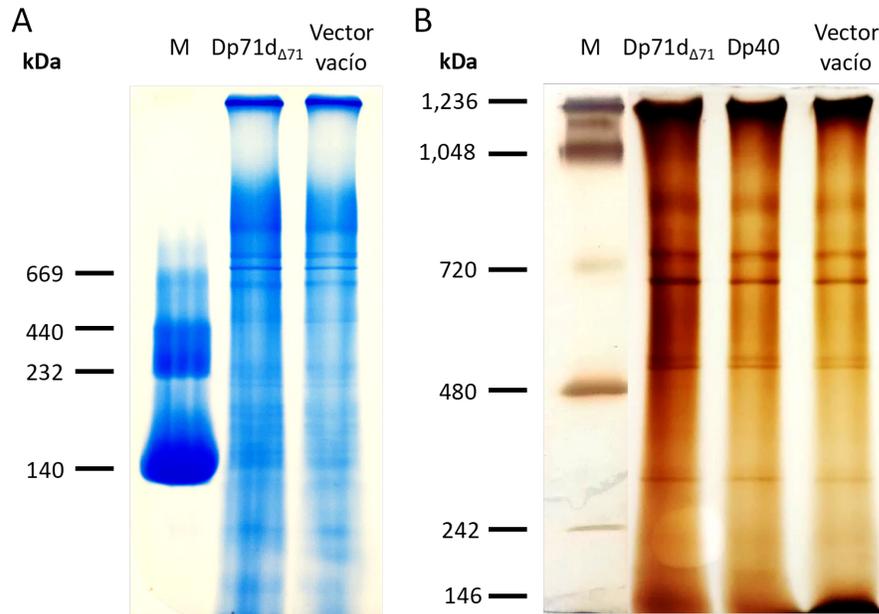


Figura 9.- Separación de complejos proteicos utilizando la técnica BN-PAGE. Se analizaron lisados totales de las clonas en gels de gradiente BN-PAGE de 4 a 12% de acrilamida. A. Lisados totales de las clonas PC12 TetOn Myc/Dp71d Δ 71 y PC12 TetOn vector vacío fijados y teñidos con azul de Coomassie, se utilizó el marcador de peso molecular (M) HMW (Amercham pharmaccia biotech). B. Lisados totales de las clonas PC12 TetOn Myc/Dp71d Δ 71, PC12 TetOn Myc/Dp40 y PC12 TetOn vector vacío, teñidos con plata coloidal, el marcador de peso molecular (M) utilizado es native Mark unstained protein standard protocol (life technologies).

Una vez estandarizada la metodología de extracción de proteínas y la separación por electroforesis BN-PAGE, se procedió a realizar la identificación de complejos que pudieran contener a la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 mediante la técnica de Western blot, utilizando 120 o 30 μ g de extracto de proteínas (Fig. 10).

Al llevar a cabo el Western blot, utilizando anticuerpo policlonal anti-Myc, una banda de aproximadamente 700 kDa fue visualizada de manera reproducible en la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y no así en los extractos de la clona PC12 vector vacío o de la clona PC12 TetOn (Fig. 10). Las condiciones desnaturizantes desensamblan los complejos y se observa una banda que corresponde a la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71.

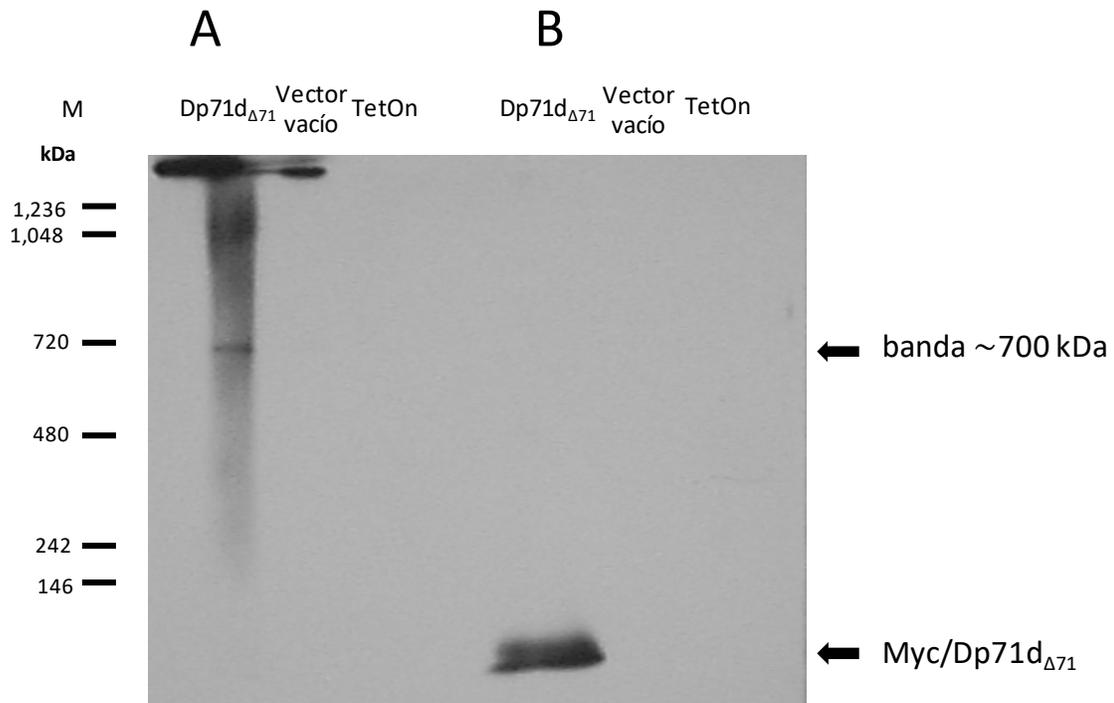


Figura 10. Identificación de complejos proteicos con Myc/Dp71d Δ 71. Western blot en geles BN-PAGE de gradiente 4 – 12%, revelado con anticuerpo policlonal anti-Myc como se indica en Materiales y Métodos. A. En la parte izquierda del gel se muestra la corrida en condiciones nativas de 120 μ g de proteínas totales de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71, PC12 vector vacío y PC12 TetOn: en el carril en donde se colocaron proteínas de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 se observa la presencia de un barrido y de una banda de aproximadamente 700 kDa, en el caso de los extractos de las clonas PC12 vector vacío y PC12 TetOn no se observa presencia de bandas. B. En la parte derecha del gel 30 μ g de las mismas muestras que en A, corridas con buffer de carga desnaturante y hervidas. M marcador de peso molecular.

La banda de aproximadamente 700 kDa también fue visualizada en lisados totales de la clona PC12 Myc/Dp40 utilizando geles azul nativos y Western blot como se muestra en la figura 11. Las condiciones desnaturantes desensamblan los complejos y se observa una sola banda que corresponde a la proteína recombinante Myc/Dp40.

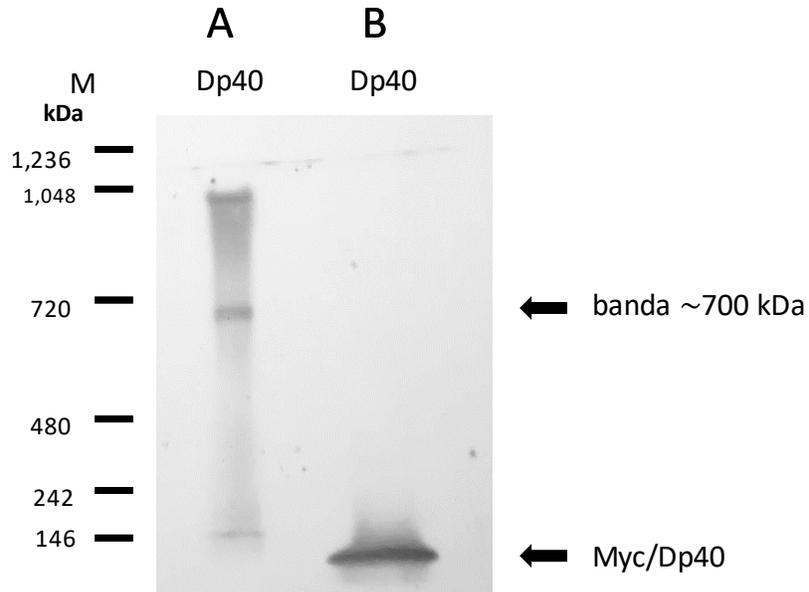


Figura 11.- Identificación de complejos proteicos con Myc/Dp40. Western blot en geles BN-PAGE de gradiente 4 – 12%, revelado con anticuerpo policlonal anti-Myc. A. Condiciones nativas: se puede observar que en el caso de la muestra de proteínas totales de células PC12/Myc/Dp40 la presencia de un barrido y de una banda de aproximadamente 700 kDa. B. La misma muestra que en A, corrida con buffer de carga desnaturalizante y hervida. M marcador de peso molecular.

Para determinar la presencia de la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 en la banda de 700 kDa identificada por Western Blot previamente, tanto la banda correspondiente al lisado total de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 como la de la clona PC12 TetOn fueron extraídas del gel BN-PAGE, fueron desnaturalizadas y se corrieron por electroforesis en una segunda dimensión mediante SD-PAGE, para posteriormente teñir los geles con azul de Coomassie. En la segunda dimensión se observaron escasas manchas muy tenues y no se observaron diferencias entre el extracto de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y la clona PC12 TetOn (Fig. 12).

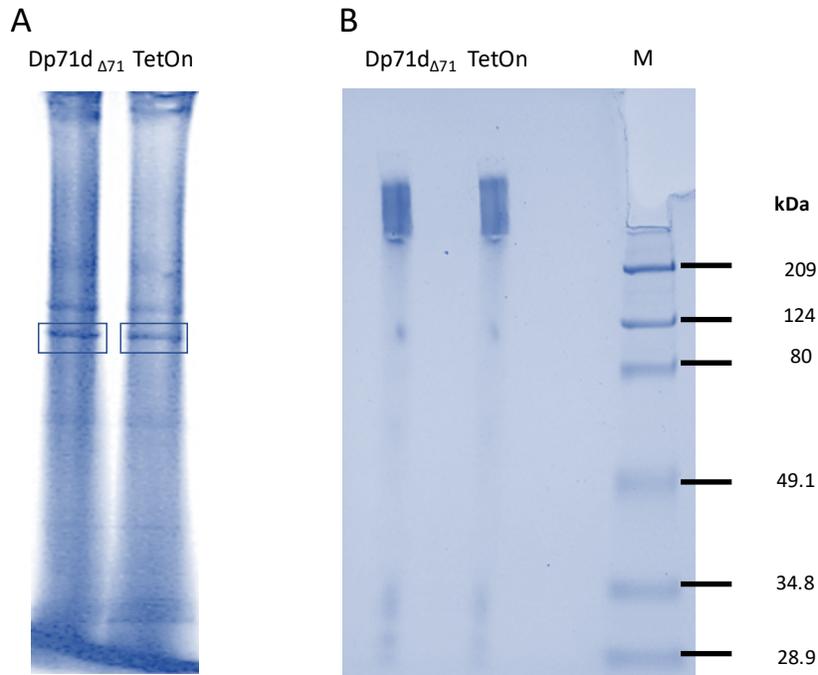


Figura 12.- Separación de proteínas del complejo de 700 kDa. A. Separación de complejos de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y de la clona PC12 TetOn, en una primera dimensión mediante un gel azul nativo BN-PAGE, teñido con azul de Coomassie, utilizando 120 μ g de extracto proteico. Se muestra en el recuadro la banda correspondiente a 700 kDa aproximadamente. B. La banda correspondiente a 700 kDa fue cortada del primer gel, desnaturalizada e incluida en un gel SDS-PAGE 10% (2da dimensión). Las proteínas fueron separadas por electroforesis y el gel fue teñido azul de Coomassie. M. marcador de peso molecular.

A pesar de que no se observaron diferencias en el patrón de proteínas de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 comparada con la clona PC12 TetOn, las proteínas separadas de ambas clonas, con la segunda dimensión en SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y reveladas utilizando el anticuerpo policlonal anti-Myc. En el Western blot las muestras de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 desnaturalizadas en la segunda dimensión mostraron señal por debajo de los 80 kDa que corresponde a la proteína Myc/Dp71d Δ 71 y no así extracto de la clona TetOn, demostrando que la proteína recombinante de interés forma parte del complejo de 700 kDa identificado mediante BN-PAGE (Fig. 13).

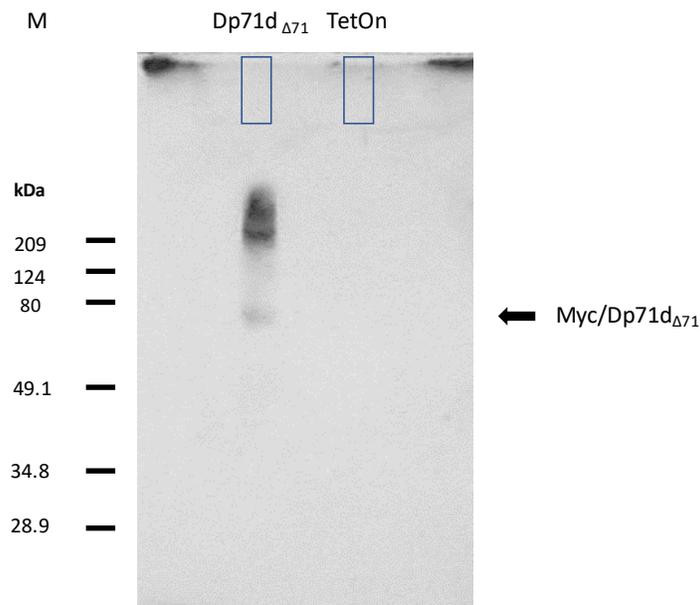


Figura 13.- Presencia de Myc/Dp71d Δ 71 en el complejo de 700 kDa. La banda correspondiente a 700 kDa fue cortada de un primer gel BN-PAGE, desnaturalizada e incluida en un gel SDS-PAGE 10% (2da dimensión), se realizó Western blot con anticuerpo policlonal anti-Myc. Se observan al menos tres bandas en los extractos de la clona de Dp71d Δ 71 y no en TetOn. M. marcador de peso molecular.

Una vez demostrado que la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 se encontraba presente en la banda de 700 kDa, se procedió a la identificación de las proteínas que forman parte de este complejo. Para esto, se extrajeron proteínas de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 se separaron mediante BN-PAGE, el gel fue teñido con azul de Coomassie y la banda correspondiente a 700 kDa fue cortada y digerida con tripsina. Los péptidos fueron separados mediante cromatografía líquida en el equipo Ekspert nanoLC y analizados por espectrometría de masas en un equipo 4800 MALDI TOF/TOF, este procedimiento se realizó por duplicado y los datos obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Proteínas identificadas en el complejo de 700 kDa

Experimento 1			Experimento 2		
Total score	%Cov	Name	Total score	%Cov	Name
14	52.941	Proteasome subunit alpha type-3	16		Proteasome subunit alpha type-3
12.57	48.374	Proteasome subunit alpha type-6	15.78		Proteasome subunit alpha type-6
10.75	41.065	Proteasome subunit alpha type-1	12.01		Proteasome subunit alpha type-1
10.66	50.958	Proteasome subunit alpha type-4	12		Proteasome subunit alpha type-7
6.06	25.214	Proteasome subunit alpha type-2	10		Proteasome subunit alpha type-4
6	41.129	Proteasome subunit alpha type-7	6		Proteasome subunit alpha type-5
3.15	21.162	Proteasome subunit alpha type-5	6.34		Proteasome subunit alpha type-2
17.87	69.962	Proteasome subunit beta type	17.55		Proteasome subunit beta type-1
12.1	47.917	Proteasome subunit beta type-1	10.64		Proteasome subunit beta type-5
9.15	31.559	Proteasome subunit beta type-4	12		Proteasome subunit beta type-3
8.15	23.891	Proteasome subunit beta type-7	9.66		Proteasome subunit beta type-7
8.02	36.594	Proteasome subunit beta type-8	9.1		Proteasome subunit beta type-10
5.16	27.363	Proteasome subunit beta type-2	9.05		Proteasome subunit beta type-4
4.07	35.122	Proteasome subunit beta type-3	9.92		Proteasome subunit beta type-8
2	15.966	Proteasome subunit beta type-6	7.4		Proteasome subunit beta type-2
2	10.046	Proteasome subunit beta type-9	5.22		Proteasome subunit beta type-6
2	14.593	26S protease regulatory subunit 6B	2.53		Proteasome subunit beta type-9
6	13.333	Actin, cytoplasmic 1 o 2	9		Actin, cytoplasmic 1 o 2
3.52	21.042	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase	4.11		Aromatic-L-amino-acid decarboxylase
6.99	14.286	Elongation factor 1-alpha 1	9.29		Elongation factor 1-alpha 1 o 2
5.17	14.677	Endoplasmic reticulum chaperone protein BiP	4.61		Endoplasmic reticulum chaperone protein BiP
2.01	24.024	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4.38		Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
2	12.162	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	4		Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
14.55	28.039	Heat shock protein HSP 90-beta	14.3		Heat shock protein HSP 90-beta
3.1	14.068	Keratin, type I cytoskeletal 10	11.23		Keratin, type I cytoskeletal 10
5.7	23.181	Keratin, type II cytoskeletal 1 o 5	8.71		Keratin, type II cytoskeletal 1
22.04	20.752	Pyruvate carboxylase, mitochondrial	6.03		Keratin, type II cytoskeletal 5
3.3	8.7948	Synaptophysin	7		Pyruvate carboxylase, mitochondrial
12.41	26.675	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	4		Synaptophysin
11.25	30.155	Tubulin alpha-1A o 1B chain	40.79		Transitional endoplasmic reticulum ATPase
9.28	30.222	Tubulin alpha-3 chain	14.82		Tubulin alpha-1C o 1A chain
15.55	26.517	Tubulin beta-2B chain	10.37		Tubulin alpha-4A chain
15.52	19.891	Tubulin beta-4B chain	17.35		Tubulin beta-5 chain
15.52	27.928	Tubulin beta-5 chain			
2.01	23.154	ADP/ATP translocase 1	4.22		GTP-binding nuclear protein Ran
2	11.337	Calnexin	5.57		Heat shock cognate 71 kDa protein
2.02	17.133	Elongation factor 2	6		Histone H4
0.89	7.1605	Growth differentiation factor 11	10.01		Isoform RC6-IS of Proteasome subunit alpha type-7
13.47	31.924	Heat shock protein HSP 90-alpha			
2	19.945	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial			
0.8	19.565	LRRGT00041			
4	22.326	RAB14, member RAS oncogene family			
2	17.512	Ras-related protein Rab-11B			
0.8	18.617	Ras-related protein Rab-7a			
6.84	29.92	Tyrosine 3-monooxygenase			
0.7	20.437	Uncharacterized protein			

Los resultados obtenidos permiten identificar diversas subunidades α y β del proteosoma que integran la subunidad 20S. Otras proteínas identificadas en ambos experimentos fueron actina, L-aminoácido aromático descarboxilasa, factor de elongación 1 alfa, endoplasmína, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, subunidad de la proteína de

unión a nucleótidos de guanina tipo beta-2 1, proteína HSP 90 beta, queratinas I y II, piruvato carboxilasa, sinaptofisina, ATPasa de retículo endoplásmico transicional, además de las tubulinas alfa 1A y beta 5. Queratinas son encontradas frecuentemente en estudios de espectrometría de masas y pueden corresponder a péptidos contaminantes.

Considerando que uno de los complejos presentes en la banda de 700 kDa corresponde al proteosoma y que debido a que este complejo fue aislado por electroforesis en una sola dimensión, podrían existir otro y otros complejos con el mismo patrón de migración dificultando la identificación del o los complejos de interés.

6.2.- Identificación de complejos que contengan Myc/Dp71d_{Δ71} en células PC12 mediante “cross link”, coimmunoprecipitación y espectrometría de masas.

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente, se decidió emplear una estrategia que permitiera separar e identificar complejos específicos con proteínas que interaccionaran con Dp71d_{Δ71}. La estrategia seleccionada incluyó “cross link” con paraformaldehído y coimmunoprecipitación utilizando el anticuerpo policlonal anti-Myc. La ventaja del “cross link” con paraformaldehído es que evita la pérdida de complejos transitorios al establecer la formación de puentes de metileno entre aminoácidos lisina cercanos y mantener la unión entre proteínas que interactúan, además los complejos pueden ser sujetos a condiciones desnaturalizantes manteniendo su integridad estructural y es posible revertirlo.

Para la formación de “cross link”, se establecieron la concentración (0.25, 0.5, 1 y 2%) y los tiempos de incubación (5, 10, 20, 40 y 60 min) con paraformaldehído más adecuados para formar el “cross link” (Fig. 14).

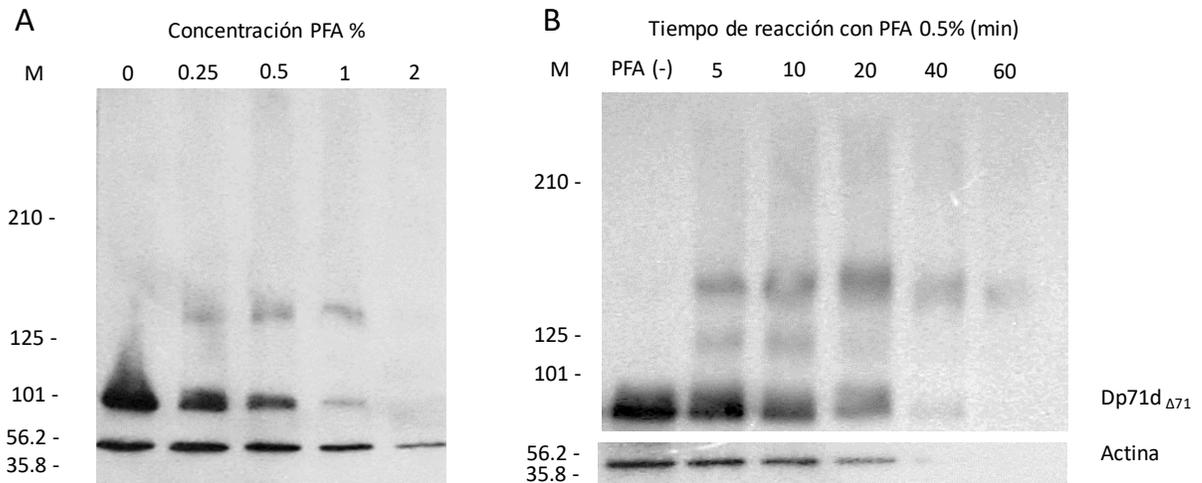


Figura 14.- Estandarización de la formación de complejos con “cross link”. Las células cosechadas de la clona PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} fueron incubadas a 37° en 1 ml de solución con paraformaldehído. A. Se utilizaron diferentes concentraciones de paraformaldehído: 0.25, 0.5, 1 y 2% por 20 min y la reacción fue detenida con glicina 1.25 M en PBS durante 5 min. Las células fueron lisadas, los extractos de proteína fueron separados por SDS-PAGE y analizados en Western blot con anti-Myc monoclonal usando anti-actina como control de carga. B. Se probaron diferentes tiempos de incubación con paraformaldehído al 0.5%; 5, 10, 20, 40 y 60 min, las muestras fueron corridas por electroforesis en SDS-PAGE y analizadas por Western blot con anti-Myc monoclonal y anti-actina. M. marcador de peso molecular.

Con una concentración de 0.5 % de paraformaldehído y un tiempo de 10 min de incubación, se visualizaron de manera clara al menos 2 bandas por arriba del peso de la proteína recombinante Myc/Dp71d_{Δ71} en los análisis por Western blot, lo que indicó que al menos 2 posibles complejos se mantuvieron con el “cross link”.

Con la intención de establecer las condiciones para la reversión del “cross link”, que es necesario para poder analizar los complejos obtenidos por espectrometría de masas, los extractos de Myc/Dp71d_{Δ71} previamente tratados con paraformaldehído fueron hervidos durante 25 min, separados en SDS-PAGE y analizados por Western blot. Los resultados obtenidos muestran, como se esperaba, que el “cross link” se pierde al hervir las muestras por 25 min (Fig. 15).

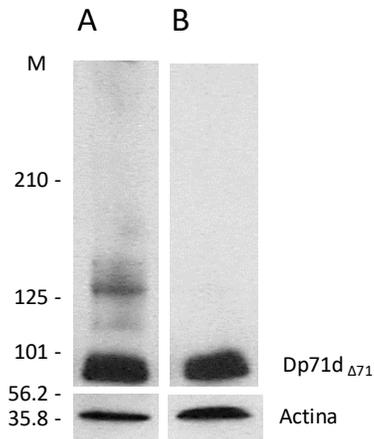


Figura 15.- Reversión de “cross link”. Células de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 previamente tratadas con paraformaldehído al 0.5% fueron lisadas y las proteínas extraídas fueron tratadas a 65° por 10 min (A) o hervidas 25 min (B), para posteriormente ser cargadas en un gel SDS-PAGE y reveladas por Western blot con anti-Myc monoclonal y anti-actina. En el caso de la muestra hervida, se observa que las bandas por arriba del peso de la Dp71d Δ 71 se disocian y únicamente se aprecia la banda correspondiente a Dp71d Δ 71. Se utilizó actina como control de carga. M. marcador de peso molecular.

Con el objeto de hacer un análisis comparativo entre complejos de proteínas asociadas a las proteínas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71, Myc/Dp71d Δ 71-74 y Myc/Dp40, cultivos de estas 3 clonas fueron tratados con paraformaldehído, las proteínas fueron extraídas, corridas en SDS-PAGE y analizadas por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Myc. Se observaron al menos dos bandas por arriba del peso de cada proteína recombinante que corresponden a complejos proteicos (Fig. 16).

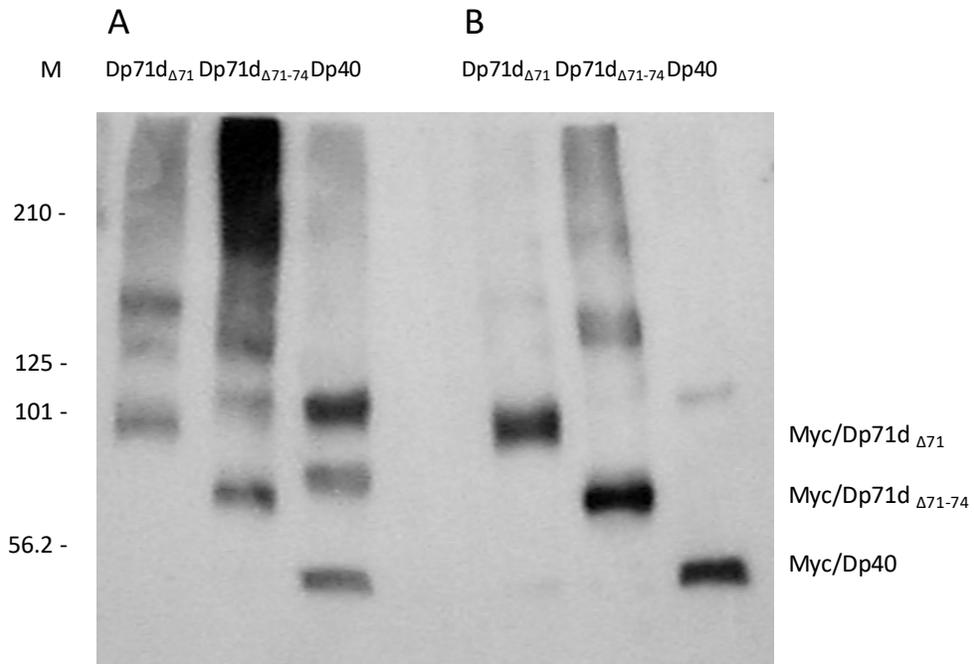


Figura 16.- Formación de complejos por “cross link” en las clonas PC12 Myc/Dp71d_{Δ71}, Myc/Dp71d_{Δ71-74} y Myc/Dp40. Cultivos de clonas que sobreexpresan cada una de las 3 proteínas recombinantes Myc/Dp71d_{Δ71}, Myc/Dp71d_{Δ71-74} y Myc/Dp40 fueron incubados con paraformaldehído al 0.5% por 10 min, las proteínas fueron extraídas, se corrieron por SDS-PAGE 10% y se analizaron por Western blot utilizando anticuerpo policlonal anti-Myc, como se ha descrito en Materiales y Métodos. A. Se observan los pesos correspondientes a cada una de las proteínas recombinantes (Myc/Dp71d_{Δ71}: 71.1 kDa, Myc/Dp71d_{Δ71-74}: 60.1 kDa y Myc/Dp40: 41.5 kDa) y dos bandas por arriba de ese peso. B. Los mismos extractos de proteínas fueron hervidos durante 25 min y las muestras se cargaron en el mismo gel. Se observa un enriquecimiento en las bandas que corresponden a las proteínas recombinantes y una disminución en la cantidad de los dos complejos. M. marcador de peso molecular.

En la figura 16 se observa que las proteínas Myc/Dp71d_{Δ71}, Myc/Dp71d_{Δ71-74} y Myc/Dp40 formaron complejos equivalentes ya que las diferencias en los tamaños observada por Western blot correlacionan con la diferencia de tamaño entre las isoformas Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} y Dp40.

6.2.1.- Estandarización de inmunoprecipitación con anti-Myc policlonal Myc/Dp71d Δ 71

Se estandarizaron las condiciones para inmunoprecipitación con Myc. Se observó que Myc/Dp71d Δ 71 es precipitado adecuadamente. Fig. 17.

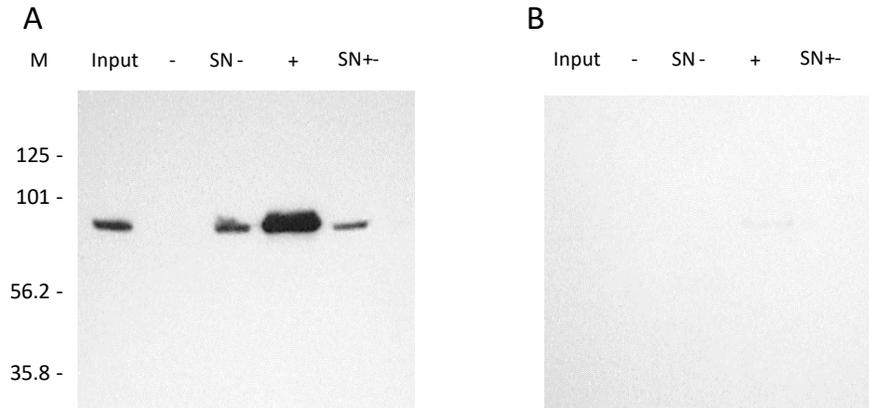


Figura 17. Inmunoprecipitación de complejos con Myc/Dp71d Δ 71. A partir de un extracto de proteínas de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 se realizó inmunoprecipitación de la proteína recombinante como se indica en Materiales y Métodos. A. Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Myc. Input: extracto total, -: control negativo (sin anticuerpo), SN-: sobrenadante del control negativo, +: inmunoprecipitado positivo, SN+: sobrenadante del inmunoprecipitado positivo. B. La misma membrana expuesta sólo al anticuerpo secundario, donde se puede observar la ausencia de fondo. En A, en el carril con el inmunoprecipitado positivo (+) se observa el enriquecimiento de la banda de un peso aproximado a 71.1 kDa que corresponde a la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71. M. marcador de peso molecular.

6.2.2.- Interacción de β -dístroglicano con Myc/Dp71d Δ 71, Myc/Dp71d Δ 71-74 y Myc/Dp40

Se ha reportado que β -dístroglicano interacciona con isoformas de Dp71, en este trabajo se analizó la interacción de esta proteína con la isoforma recombinante Myc/Dp71d Δ 71 en células PC12, por coimmunoprecipitación como se indica en Materiales y Métodos. Para esto, el extracto proteico de la clona Myc/Dp71d Δ 71 fue inmunoprecipitado con el anticuerpo policlonal anti-Myc, el precipitado se sometió a electroforesis por SDS-PAGE y se analizó por Western blot con el anticuerpo anti β -dístroglicano. Los resultados obtenidos

muestran que la forma de β -dístroglicano de 30 kDa coimmunoprecipita con la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 y no la de 43 kDa (Fig. 18).

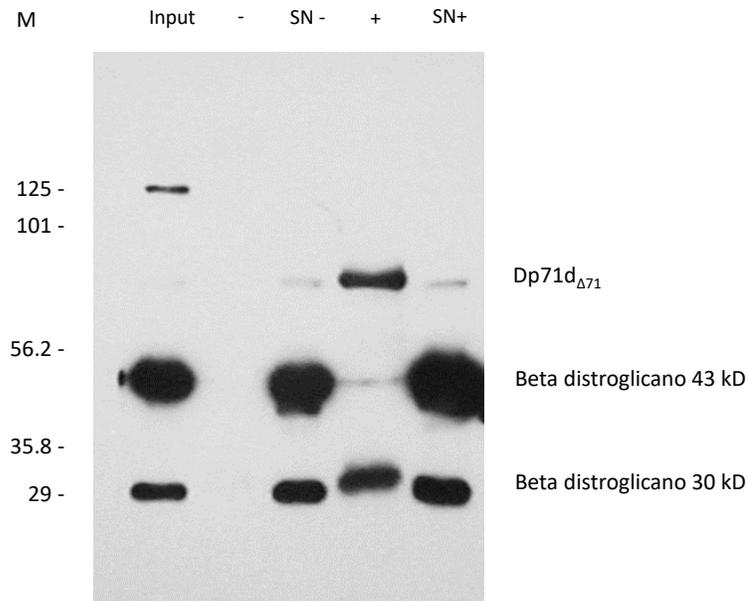


Figura 18.- Coinmunoprecipitación de β -dístroglicano y Dp71d Δ 71. El extracto de proteínas de la clona PC12 Myc/ Dp71d Δ 71 fue sometido a coimmunoprecipitación con el anticuerpo policlonal anti-Myc y revelado por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-Myc y el anticuerpo monoclonal anti β -dístroglicano. Input: extracto total, -: control negativo (sin anticuerpo), SN-: sobrenadante del control negativo, +: inmunoprecipitado positivo, SN+: sobrenadante del inmunoprecipitado positivo. En el carril del extracto total se observa la presencia de dos bandas correspondientes a β -dístroglicano, una es la forma de 43 kDa y la otra de 30 kDa. En el carril correspondiente al control negativo, no se observa señal de β -dístroglicano y en el caso del carril que corresponde al inmunoprecipitado positivo (+) se observa la presencia de Dp71d Δ 71 y un enriquecimiento en la banda del β -dístroglicano de 30 kDa con respecto a la forma de 43 kDa. M. marcador de peso molecular.

Después de haber demostrado la interacción de la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71 con la forma de 30 kDa de β -dístroglicano, se analizó la formación de complejos entre β -dístroglicano y las proteínas recombinantes Myc/Dp71d Δ 71-74 y Myc/Dp40, comparando con los resultados obtenidos con la proteína Myc/Dp71d Δ 71. Los extractos de las clonas previamente mencionadas fueron incubados con paraformaldehído para formar “cross link” y revisar asociación con los complejos vistos con las isoformas de Dp71 estudiadas,

las proteínas fueron extraídas, corridas en SDS-PAGE y analizadas por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti β -dístroglicano. Se observó, que al igual que los complejos vistos con el anticuerpo monoclonal anti-Myc, se aprecian bandas con tamaños diferentes entre los extractos que contienen las diferentes isoformas que parecen proporcionales a los tamaños de las diferentes isoformas. Estos resultados sugieren una asociación entre el β -dístroglicano y las isoformas recombinantes Myc/Dp71 y Myc/Dp40 estudiadas (Fig. 19).

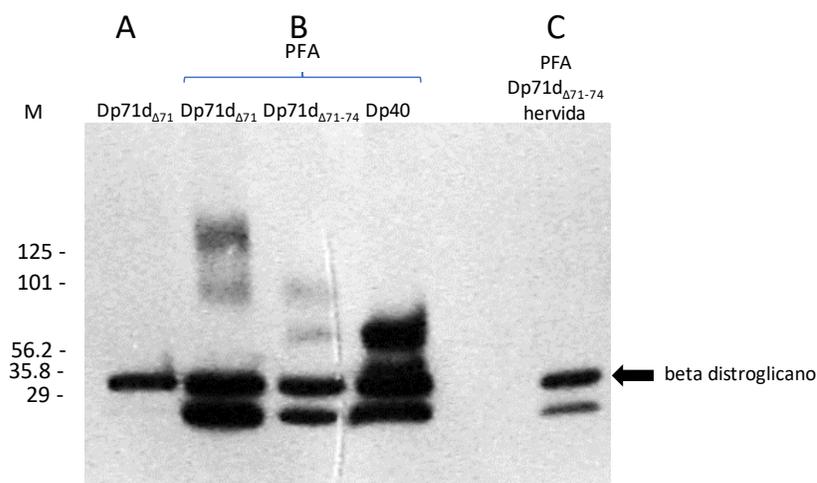


Figura 19.- Complejos obtenidos entre β -dístroglicano y las proteínas Myc/Dp71 Δ 71, Myc/Dp71 Δ 71-74 y Myc/Dp40. Análisis por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti β -dístroglicano en un gel SDS-PAGE al 10%. A. Extracto proteico de la clona PC12 Myc/Dp71 Δ 7. B. Las clonas PC12 Myc/Dp71 Δ 71, Myc/Dp71 Δ 71-74 y Myc/Dp40, fueron incubadas con paraformaldehído (PFA) al 0.5% por 10 min, las proteínas fueron extraídas y corridas. C. Misma muestra de la clona PC12 Myc/Dp71 Δ 71 tratada con PFA, hervida durante 25 min. La flecha indica la banda de β -dístroglicano, presente como única banda en el extracto de la clona Myc/Dp71 Δ 71 (sin PFA). En los carriles de las muestras tratadas con PFA se observan dos bandas por arriba de la banda de beta dístroglicano, podemos ver una diferencia de tamaño de probables complejos, que se correlaciona con la clona analizada. En el carril de la muestra PFA Myc/Dp71 Δ 71-74 hervida, se pierden los 2 probables complejos y sólo se observan dos bandas que corresponden a β -dístroglicano de 43 y 30 kDa. M. marcador de peso molecular.

Para evaluar si era posible coimmunoprecipitar complejos obtenidos por “cross link”, se realizaron inmunoprecipitaciones con el anticuerpo policlonal anti-Myc con los extractos de la clona PC12 Myc/Dp71 Δ 71 con y sin incubación con paraformaldehído. Estas

muestras fueron analizadas por SDS-PAGE y analizadas por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-Myc. Los resultados obtenidos mostraron la coimmunoprecipitación de una banda cercana a los 125 kDa en las células tratadas con paraformaldehído y que no se observa en las muestras que no fueron tratadas con paraformaldehído. Esto indica que hay complejos entre Dp71 y β -dístroglicano que pudieron inmunoprecipitarse cuando ocurre el “cross link”. Además, se buscó la presencia de β -dístroglicano en estos mismos extractos, encontrando que en el caso de la muestra inmunoprecipitada tratada con paraformaldehído hubo un aumento en la señal cercana a los 125 kDa sugiriendo la presencia de un complejo entre Dp71 Δ 71 y β -dístroglicano (Fig. 20).

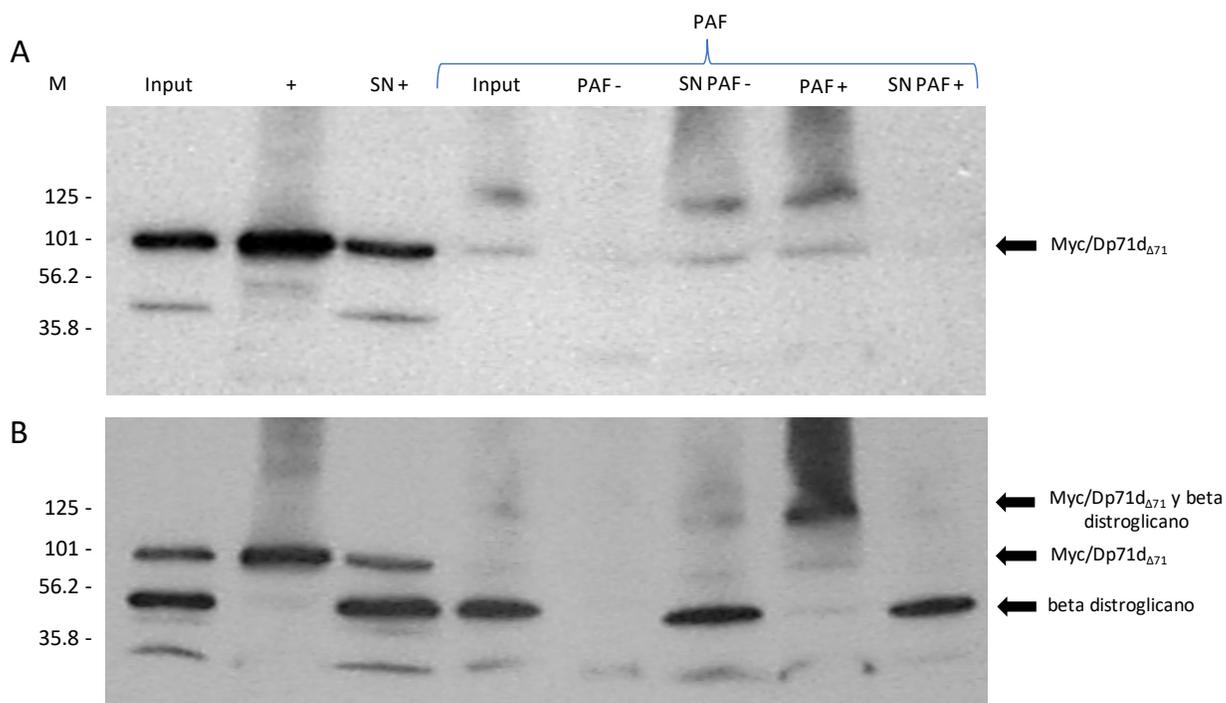


Figura 20.- Inmunoprecipitación de complejos entre Myc/Dp71 Δ 71 y β -dístroglicano. Los extractos proteicos de la clona Myc/Dp71 Δ 71, previamente tratada con y sin incubación con PFA al 0.5% por 10 min fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-Myc. Las muestras se corrieron por electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% y se analizaron por Western blot. Input: extracto total, +: inmunoprecipitado positivo, SN+: sobrenadante del inmunoprecipitado positivo, PAF-: incubado con PAF, control negativo, SN PAF-: incubado con PAF, sobrenadante del control negativo, PAF+: incubado con PAF e inmunoprecipitado positivo, SN PAF+: incubado con PAF, sobrenadante del inmunoprecipitado positivo. A. membrana revelada con anticuerpo monoclonal anti-Myc se observa una banda correspondiente a la proteína Myc/Dp71 Δ 71 con mayor intensidad

en los extractos sin PFA, mientras que en los extractos con PFA la banda es menor observándose la presencia de una banda y un barrido por arriba de los 125 kDa, que puede corresponder a un complejo. B. La misma membrana previamente revelada con anticuerpo anti-Myc fue revelada con anticuerpo monoclonal anti β -dístroglicano, se puede observar además de las bandas previas, la banda correspondiente al β -dístroglicano de 43 kDa y una mayor intensidad en la banda de 125 kDa del inmunoprecipitado positivo (PFA +), que pudiera corresponder a la asociación de Dp71d Δ 71 y β -dístroglicano. M marcador de peso molecular.

Una vez que se logró obtener complejos de proteínas en donde estuviera presente Myc/Dp71d Δ 71 utilizando “cross link” e inmunoprecipitación, se procedió a analizar si era posible identificar complejos de mayor tamaño utilizando geles azul nativos. Para esto, células de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 se incubaron con paraformaldehído, se lisaron y los extractos fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-Myc separando las proteínas por BN-PAGE, para su posterior análisis por Western blot. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de al menos 4 bandas que pueden corresponder a complejos (Fig. 21).

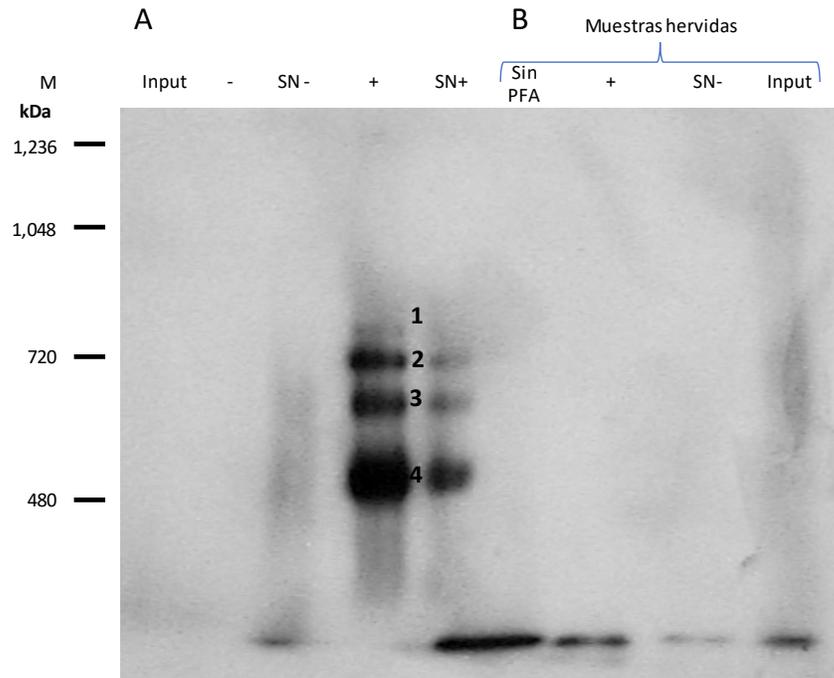


Figura 21.- Inmunoprecipitación de complejos obtenidos por “cross link” con Myc/Dp71d Δ 71. Extractos de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 tratados con PFA al 0.5% por 10 min, fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-Myc, se corrieron en gel BN PAGE con gradiente del 4 al 12% y se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal anti-

Myc. A. Input: extracto total, -: control negativo, SN-: sobrenadante del control negativo, +: inmunoprecipitado positivo, SN+: sobrenadante del inmunoprecipitado positivo. En los carriles + y SN+ se observan al menos 4 bandas (1, 2, 3 y 4). Estas bandas no se aprecian en el resto de las condiciones (input, -, SN-). B. Al someter a las muestras a un proceso de desnaturalización por ebullición 25 min, los complejos de desensamblan y únicamente se observa una banda que correspondiente a Myc/Dp71d Δ 71. M. marcador de peso molecular.

Una vez que se observaron por Western blot los posibles complejos con Myc/Dp71d Δ 71, se procedió a separar éstos mediante geles azul nativos, para cortar las bandas y analizarlas por espectrometría de masas. Para esto la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 fue incubada con PFA, lisada e inmunoprecipitada con el anticuerpo policlonal anti-Myc. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles BN-PAGE y el gel fue teñido con azul de Coomassie como se indica en Materiales y Métodos. En la Figura 22 se observan 4 bandas con los mismos pesos moleculares que las observadas por Western blot. Estas bandas fueron cortadas, colocadas en buffer desnaturalizante y hervidas durante 25 min para posteriormente ser digeridas y analizadas por espectrometría de masas. Sin embargo, no fue posible identificar proteínas en ninguna de las 4 bandas aún cuando los experimentos se realizaron por duplicado. Al parecer esta estrategia no fue exitosa debido a que no fue posible revertir eficientemente el “cross link” entre las proteínas obtenidas a partir de las bandas de gel. Por lo anterior no se continuó trabajando con “cross link”.

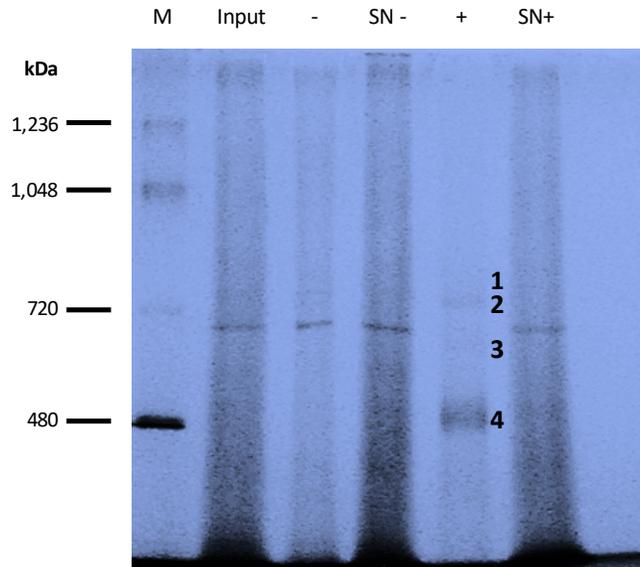


Figura 22.- Análisis de posibles complejos con Myc/Dp71d_{Δ71} por geles BN PAGE. Extractos de la clona PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} tratados con PFA al 0.5% por 10 min, fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo policlonal anti-Myc, se corrieron en gel BN PAGE con gradiente del 4 al 12%, el gel fue fijado y teñido con azul de Coomassie. M: marcador de peso molecular, Input: extracto total, -: control negativo, SN-: sobrenadante del control negativo, +: inmunoprecipitado positivo, SN+: sobrenadante del inmunoprecipitado positivo. Se visualizaron 4 bandas (1, 2, 3 y 4) en el inmunoprecipitado positivo.

El anticuerpo policlonal anti-Myc (Santa Cruz) utilizado en los experimentos anteriores fue discontinuado y se tuvo que usar el anticuerpo monoclonal anti-Myc de la misma marca, por lo que los siguientes experimentos fueron realizados con este anticuerpo tanto para las inmunoprecipitaciones como para los Western blot.

Para estudiar los complejos que coinmunoprecipitan con Myc/Dp71d_{Δ71}, sin realizar “cross link”, se realizó una inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal anti-Myc, las proteínas inmunoprecipitadas fueron separadas por BN-PAGE y analizadas por Western blot con el mismo anticuerpo monoclonal anti-Myc. En la figura 23 en el gel BN PAGE el inmunoprecipitado sin “cross link” presenta una banda y un barrido ascendente por arriba del marcador de 146 kDa. Esta banda corresponde al anticuerpo anti-Myc, que está constituido por una inmunoglobulina de ratón IgG₁, que en condiciones no reductoras tiene un peso cercano a los 160 kDa. Se probaron diferentes condiciones para reducir parcialmente y separar mejor las proteínas, como lo fue la adición de SDS al 0.2% en

diferentes cantidades y la combinación con tiempo de incubación a 67°C. Los resultados muestran que, a mayores condiciones reductoras, mayor presencia de diferentes bandas (Fig. 23).

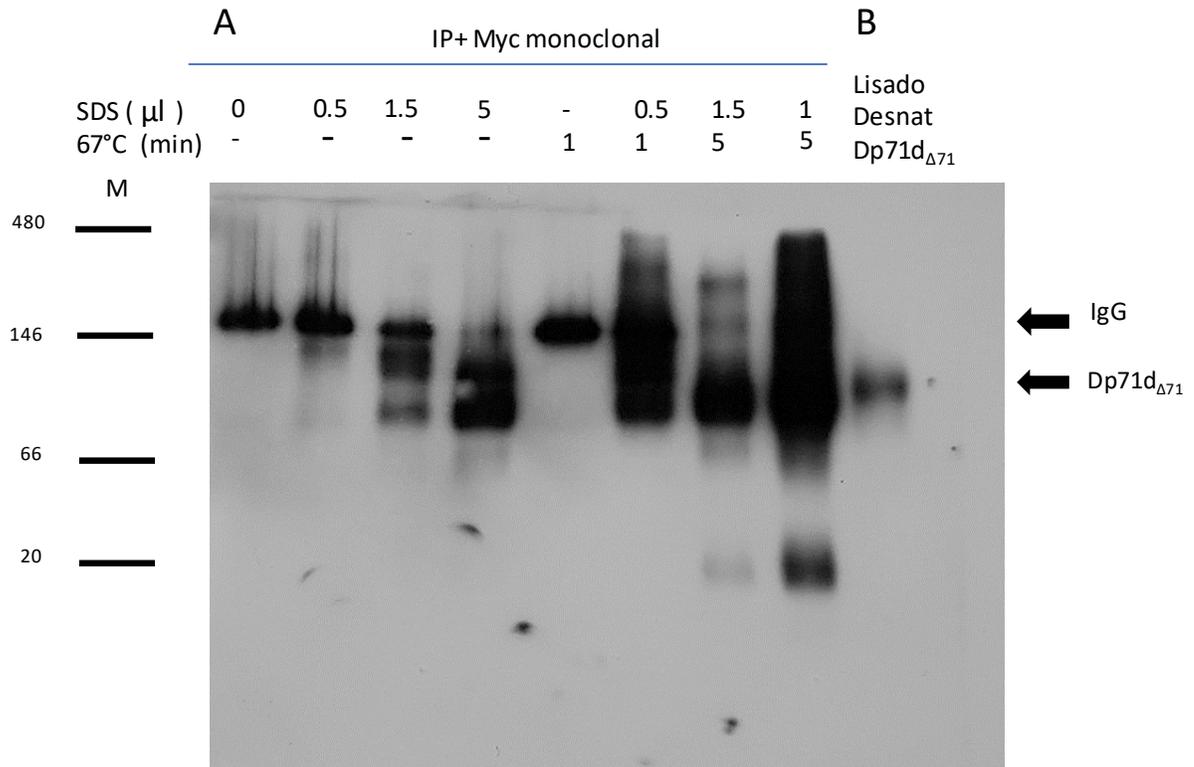


Figura 23.- Inmunoprecipitación con Myc sin “cross link”. Inmunoprecipitación con anti-Myc monoclonal (IP+) en extracto de la clona PC12 Myc/Dp71d _{Δ 71} corrida en un gel BN-PAGE de gradiente y analizada por Western blot con anticuerpo anti-Myc monoclonal. A. El inmunoprecipitado fue sometido a diferentes condiciones: cantidades diferentes (0, 0.5, 1.5, 5 μ l) de una solución con SDS (Laemmli 5X) y/o incubación con 67°C por 1 o 5 min en algunas muestras. B. Un lisado total de la clona Myc/Dp71d _{Δ 71} en condiciones desnaturizantes se cargó en el último carril (flecha Dp71d _{Δ 71}). En condiciones no desnaturizantes una banda y un barrido se observan por arriba del marcador de 146 kDa (flecha IgG), mientras que, con diferentes grados de condiciones reductoras, la banda disminuye y se observan bandas de diferentes pesos. M. marcador de peso molecular.

Se procedió a investigar la presencia de bandas en condiciones parcialmente desnaturizantes en el extracto de las clonas PC12 TetOn y PC12 vector vacío y de cargar únicamente anticuerpo monoclonal anti-Myc con las perlas de sefarosa/proteína G, en

condiciones nativas y en condiciones parcialmente desnaturizantes. Se observó que el anticuerpo junto con la sefarosa se asocian y forman una banda, y que al ser parcialmente desnaturizado se observan diferentes bandas, con un patrón similar al que se obtiene en el inmunoprecipitado de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 (Fig. 24).

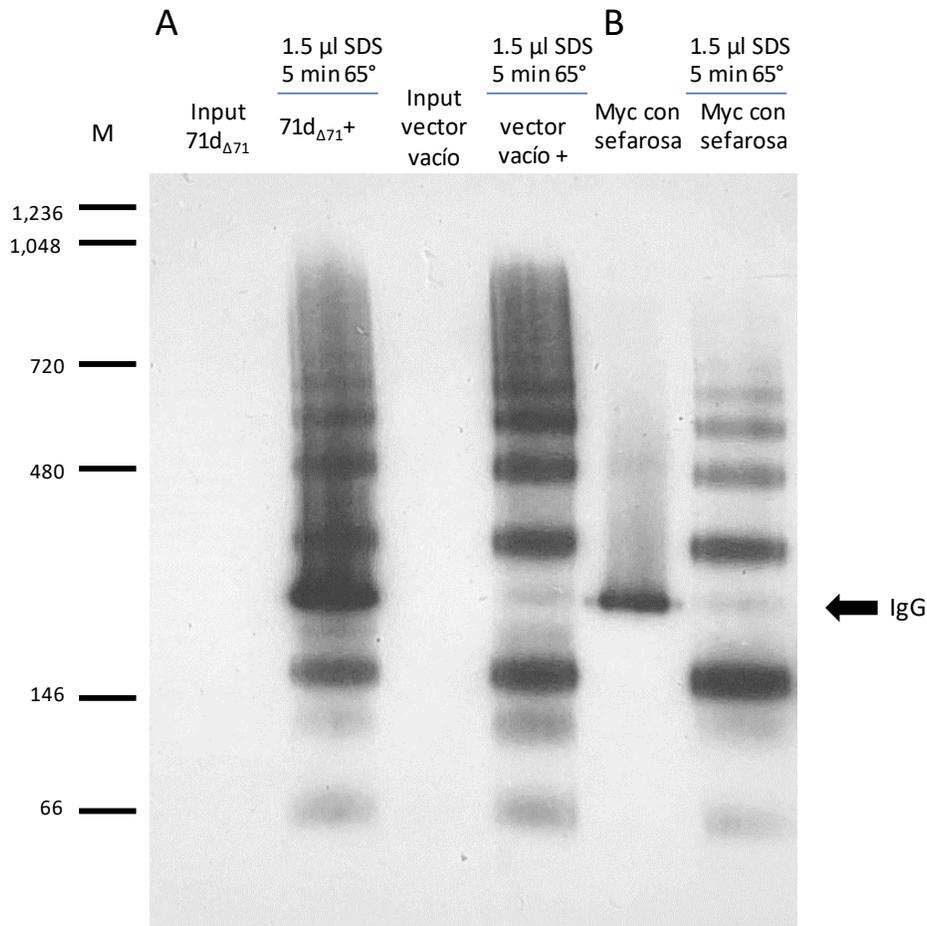


Figura 24.- Asociación de anticuerpo monoclonal anti-Myc con perlas de sefarosa. Western blot revelado con anticuerpo monoclonal anti-Myc. A. extractos totales (input) e inmunoprecipitaciones con anti-Myc monoclonal en extractos de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y PC12 vector vació, las muestras inmunoprecipitadas fueron incubadas con 1.5 μ l de Laemmli 5X y 5 min a 65°C, observando un patrón de bandeado parecido en ambas muestras. B. Anticuerpo monoclonal anti-Myc y sefarosa fueron incubados y cargados en el gel, en condiciones nativas y con condiciones parcialmente desnaturizantes (1.5 μ l de Laemmli 5X y 5 min a 65°C), observando en condiciones no desnaturizantes una banda con un barrido (flecha) y en condiciones parcialmente desnaturizantes, un patrón de bandas similar al observado en los inmunoprecipitados. M. marcador de peso molecular.

6.3.- Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d Δ 71 mediante inmunoprecipitación, sin “cross link” y su análisis por espectrometría de masas.

En las estrategias anteriores no fue posible identificar a las proteínas que se asocian a los complejos de Myc/Dp71d Δ 71, mediante coimmunoprecipitación y geles azul nativos. En esta estrategia se procedió a obtener y analizar los inmunoprecipitados totales de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y PC12 vector vacío obtenidos al utilizar el anticuerpo monoclonal anti-Myc, con la intención de identificar proteínas que solamente hubieran precipitado en la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y no en la clona PC12 con el vector vacío. En este caso los extractos proteicos de ambas clonas, obtenidos con buffer de lisis BN fueron inmunoprecipitados con anticuerpo monoclonal anti-Myc, corridos en un gel SDS PAGE 10%, el gel fue teñido con plata coloidal, las bandas fueron cortadas y analizadas por espectrometría de masas, como se indica en Materiales y Métodos (Fig. 25).

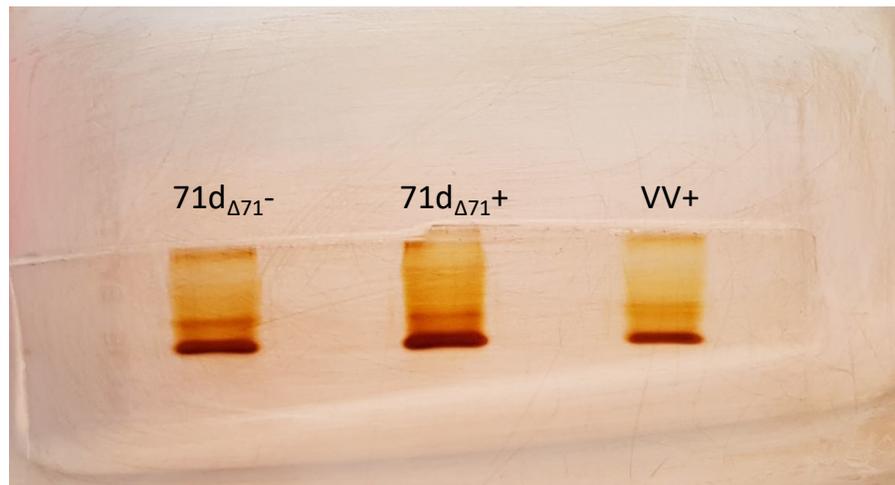


Figura 25.- Coinmunoprecipitación de proteínas asociadas a Myc/Dp71d Δ 71 y Myc vector vacío. Los extractos de proteínas de las clonas Pc12 Myc/Dp71d Δ 71 y PC12 vector vacío fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-Myc. Las muestras se corrieron 0.7 cm en un gel separador SDS-PAGE 10%, el gel fue teñido con plata coloidal.

Se identificaron un número muy grande de proteínas, más de mil, en los inmunoprecipitados de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71 y PC12 vector vacío. Dentro de estas proteínas se buscaron aquellas de las que se conoce su asociación con distrofinas. Los valores de los espectros de los 3 principales péptidos identificados fueron calculados

con logaritmo base 10, para estimar una abundancia relativa de las proteínas. En la tabla 2 se muestran los valores obtenidos de algunas proteínas con asociación conocida con Dp71 tanto en el inmunoprecipitado positivo como en el negativo.

Tabla 2. Proteínas de interés asociadas a Dp71 identificadas en inmunoprecipitado con anti-Myc positivo y control negativo.

Proteína identificada	Dp71d _{Δ71} +	Dp71d _{Δ71} -
Distrofina	5.26	4.49
Distroglicano	4.95	-
Beta Sintrofina	4.45	-
Proteína de interacción con sintasa de óxido nítrico	3.88	-

De la gran cantidad de proteínas identificadas en los inmunoprecipitados de muestras obtenidas mediante lisis con buffer BN y dializadas no se encontraron diferencias entre las dos clonas, por lo que se decidió utilizar el buffer de lisis BE2 para aumentar astringencia en la inmunoprecipitación. Los inmunoprecipitados positivos y negativos obtenidos de las PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} y PC12 vector vacío fueron separados en geles SDS-PAGE, se dejó que las muestras corrieran 0.5 cm, el gel fue fijado y teñido con Coomassie coloidal, las bandas visualizadas fueron cortadas, desteñidas, las proteínas fueron eluidas y digeridas con tripsina (Fig. 26).

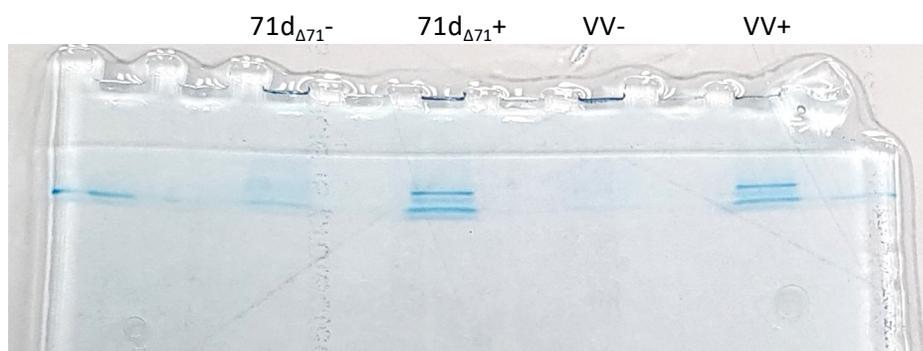


Figura 26.- Coimmunoprecipitación de proteínas asociadas a Myc/Dp71d_{Δ71} y Myc vector vacío. Los coimmunoprecipitados de las clonas PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} y PC12 vector vacío fueron corridos 0.5 cm en un gel separador y teñidos con Coomassie coloidal.

Las proteínas identificadas con esta estrategia en los controles Dp71d Δ 71-, VV- y VV+ fueron restadas a las proteínas identificadas en el inmunoprecipitado positivo (con anticuerpo), las proteínas que quedaron se muestran en la tabla 3. Este experimento fue realizado por triplicado, pero los resultados solamente se reprodujeron en dos de los experimentos por lo que no fueron considerados concluyentes.

Tabla 3. Proteínas identificadas sólo en el inmunoprecipitado Dp71d Δ 71+.

protein.key	protein.Entry	Accession	Protein.Description	score	falsePositive Rate	Matched Products	Matched Peptides
529	DMD_RAT	P11530	Dystrophin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Dmd PE=1 SV=	120.2502	0	71	26
4711	A0A0G2K477	A0A0G2K477	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus OX=10116 PE=4	123.847	0	25	3
26034	TBB5_RAT	P69897	Tubulin beta-5 chain OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Tubt	110.6181	0	20	6
1042	BRCC3_RAT	B2RYM5	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36 OS=Rattus norvegicus C	56.1787	3.64	18	4
7940	Q4V8G6_RAT	Q4V8G6	Methyltransferase-like 3 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=I	54.1621	3.57	17	6
25887	TBB2A_RAT	P85108	Tubulin beta-2A chain OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Tul	56.8124	3.74	12	4
2268	RL7_RAT	P05426	60S ribosomal protein L7 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=	56.2804	3.67	9	3
194	CXD2_RAT	O70610	Gap junction delta-2 protein OS=Rattus norvegicus OX=10116 C	93.7986	1.33	7	3
15732	D3ZTK5_RAT	D3ZTK5	60S ribosomal protein L27 OS=Rattus norvegicus OX=10116 PE=	71.873	3.49	7	1
529	DMD_RAT	P11530	Dystrophin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Dmd PE=1 SV=	100.5432	0	51	15
6341	Q5BJT9_RAT	Q5BJT9	Creatine kinase U-type_ mitochondrial OS=Rattus norvegicus O	137.9565	0	23	4
12776	G3V7C6_RAT	G3V7C6	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Tubb4	71.799	0	8	4
22945	B4F7C2_RAT	B4F7C2	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Tubb4	66.3797	0	7	3
19052	A0A0G2K1Z8	A0A0G2K1Z8	Bromodomain-containing protein 2 OS=Rattus norvegicus OX=1	53.0411	1.59	6	1
10779	A0A0H2UHM	A0A0H2UHM7	Tubulin alpha chain OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=LOC1	41.2279	2.56	6	1
18384	F1M927_RAT	F1M927	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus OX=10116 PE=4	60.8125	0	3	1
24075	Q4QQV0_RA	Q4QQV0	Tubulin beta chain OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Tubb6	58.4865	0	1	1
529	DMD_RAT	P11530	Dystrophin OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Dmd PE=1 SV=	741.386	0	157	39
478	EIF3A_RAT	Q1JU68	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Rattus n	72.5705	3.38	53	17
16362	M0R8M9_RA	M0R8M9	Uncharacterized protein OS=Rattus norvegicus OX=10116 PE=3	127.4933	0	44	16
5756	A0A096MIX2	A0A096MIX2	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17_ isoform CRA_a O	277.0981	0	43	12
21233	A0A0G2JSW3	A0A0G2JSW3	Globin a4 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Hbb PE=1 SV=1	743.9403	0	42	7
22252	Q6AYI1_RAT	Q6AYI1	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 OS=Rattus norvegici	285.9426	0	40	11
6774	Q3ZAV2_RAT	Q3ZAV2	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Rattus norvege	305.851	0	39	7
11510	A0A0G2K8K0	A0A0G2K8K0	Splicing factor proline and glutamine rich OS=Rattus norvegicus	103.7673	0.88	37	10
10625	A0A0G2JYN7	A0A0G2JYN7	Paraspeckle component 1 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=	156.208	0	35	9
4082	M0R735_RAT	M0R735	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q OS=Rattus norvegi	144.569	0	35	11
20943	F1M614_RAT	F1M614	Laminin subunit alpha 2 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=L	98.513	0.85	31	22
31067	LAP2_RAT	Q62733	Lamina-associated polypeptide 2_ isoform beta OS=Rattus norv	171.0065	0	26	8
16747	A0A0G2JZQ5	A0A0G2JZQ5	Zinc finger protein 532 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Zf	98.8907	0.86	26	11
22848	D3ZN21_RAT	D3ZN21	DEAD-box helicase 3_ Y-linked OS=Rattus norvegicus OX=1011	43.7388	3.5	24	9
17056	M0R9K1_RAT	M0R9K1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K-like OS=Rattus nor	153.1833	0	22	3
12371	F1LPS8_RAT	F1LPS8	Transcriptional activator protein Pur-alpha OS=Rattus norvegicu	232.7902	0	21	7
14372	A0A0H2UHW	A0A0H2UHW3	Zinc finger protein 426 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Zf	81.2161	2.21	18	10
4851	F1LZZ1_RAT	F1LZZ1	WD repeat domain 38 OS=Rattus norvegicus OX=10116 GN=Wc	91.6294	0.83	14	5
5171	G3V712_RAT	G3V712	Keratin complex 2_ basic_ gene 7_ isoform CRA_a OS=Rattus n	81.9996	2.24	14	6

a), b) y c) corresponden a 3 experimentos independientes.

6.4.- Identificación de proteínas asociadas con Myc/Dp71d_{Δ71} mediante coimmunoprecipitación y cuantificación absoluta por espectrometría de masas.

Finalmente se modificó la estrategia para obtener proteínas específicas asociadas a la distrofina Dp71d_{Δ71}, una de las modificaciones consistió en modificar el protocolo de lisis celular. Se realizó inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Myc en la clona PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} así como en la clona PC12 vector vacío, y se llevó a cabo la cuantificación absoluta de las proteínas presentes en los complejos mediante espectrometría de masas. Se seleccionaron proteínas que se encontraran al menos 2 veces más en cantidad en la clona PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} con respecto a la clona PC12 vector vacío.

Para verificar que las clonas en estudio PC12 Myc/Dp71d_{Δ71} contenían la secuencia de esta isoforma recombinante insertada en su genoma, el DNA genómico de las clonas PC12 Myc/Dp71d_{Δ71}, PC12 TetOn y PC12 vector vacío fueron extraídos. Para verificar la presencia de la secuencia de Dp71 se realizó un PCR punto final utilizando oligonucleótidos que flanquean el sitio de clonación múltiple del vector pTRE2pur-Myc y el producto de las reacciones fue analizado por electroforesis en un gel de agarosa y visualizado con bromuro de etidio. Como se muestra en la figura 27, se amplificó un producto de tamaño esperado en la clona PC12 Myc/Dp71d_{Δ71}, no hay producto en la clona PC12 TetOn y se observa un pequeño fragmento en el vector vacío correspondiente al amplificado sin la secuencia de Dp71.

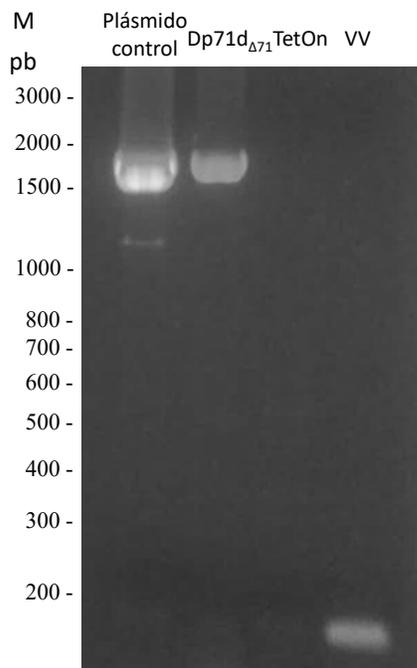


Figura 27.- Detección de la secuencia de Dp71d Δ 71 en la clona PC12 Dp71d Δ 71. Se extrajo el DNA de las clonas PC12 Myc/Dp71d Δ 71, PC12 TetOn y PC12 vector vacío. Se llevó a cabo una reacción de PCR para amplificar la secuencia Dp71d Δ 71, utilizando los oligonucleótidos pTRE2-F y pTRE2-R. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se utilizó como DNA control el plásmido pTRE2pur-Myc/Dp71d Δ 71. En los carriles donde se cargó el producto de PCR del plásmido control y en el del DNA de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 se observa la presencia de un producto de 1,700 pb, mientras que no hay producto de amplificación en la clona PC12 TetOn, y un producto de tamaño pequeño en la muestra del vector vacío. M. marcador de peso molecular en pares de bases.

Las clonas Myc/Dp71d Δ 71 y vector vacío previamente verificadas, fueron lisadas con buffer RIPA modificado, se extrajeron las proteínas, se inmunoprecipitaron con el anticuerpo monoclonal anti-Myc, fueron preaclaradas, corridas en un gel SDS-PAGE, fijadas y teñidas con Coomassie coloidal como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28.

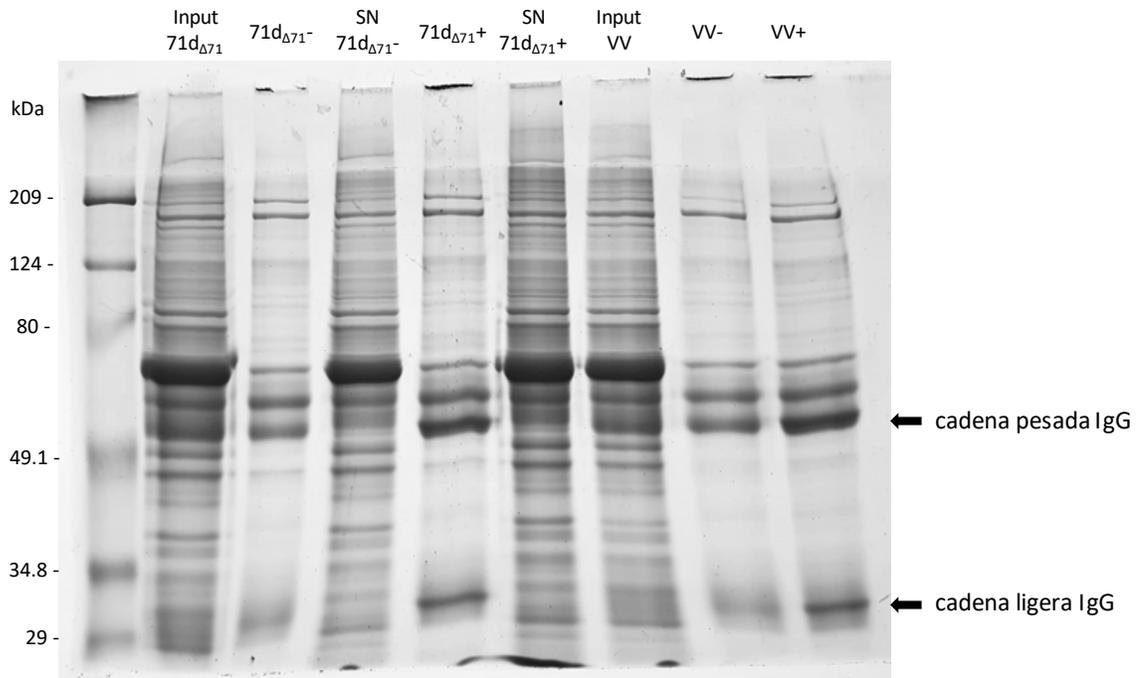


Figura 28. Comparación de proteínas totales e inmunoprecipitadas de las clonas PC12 Myc/Dp71 Δ 71 y PC12 vector vacío. Los extractos de las clonas PC12 Myc/Dp71 Δ 71 y PC12 vector vacío fueron inmunoprecipitados con el anticuerpo monoclonal anti-Myc. Las muestras se analizaron en un gel SDS PAGE 10%, fijado y teñido con Coomassie coloidal. Input: extracto total, -: control negativo (sin anticuerpo), SN: sobrenadante, +: inmunoprecipitado positivo, VV: vector vacío. Se aprecia una gran cantidad de proteínas en los extractos totales y los sobrenadantes de la inmunoprecipitación. En los carriles con los inmunoprecipitados negativos (-) y positivos (+), se observan bandas inmunoprecipitadas que son menores a las observadas en los extractos totales. No se observa diferencia entre los inmunoprecipitados positivos Dp71 Δ 71 y vector vacío. Las flechas señalan las bandas correspondientes a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo con el que se inmunoprecipitó. M marcador de peso molecular en kDa.

En la figura 28 no fue posible observar diferencias entre los inmunoprecipitados positivos Dp71 Δ 71 y vector vacío, por lo que para disminuir la cantidad de proteínas que se estuvieran uniendo de forma inespecífica a la sefarosa, se aumentaron los lavados de los inmunoprecipitados de 3 a 5 con buffer RIPA modificado y un lavado con PBS, posterior a este tratamiento las muestras fueron analizadas por SDS-PAG. Los resultados se muestran en la figura 29.

Nuevamente no se encontró diferencia entre los inmunoprecipitados positivos Dp71d Δ 71 y vector vacío, al aumentar el número de lavados, esto sugiere que hay una asociación fuerte de algunas proteínas inespecíficas con el complejo anti-Myc/sefarosa/proteína G, que a pesar de los lavados, no pueden ser eliminadas del complejo de inmunoprecipitación.

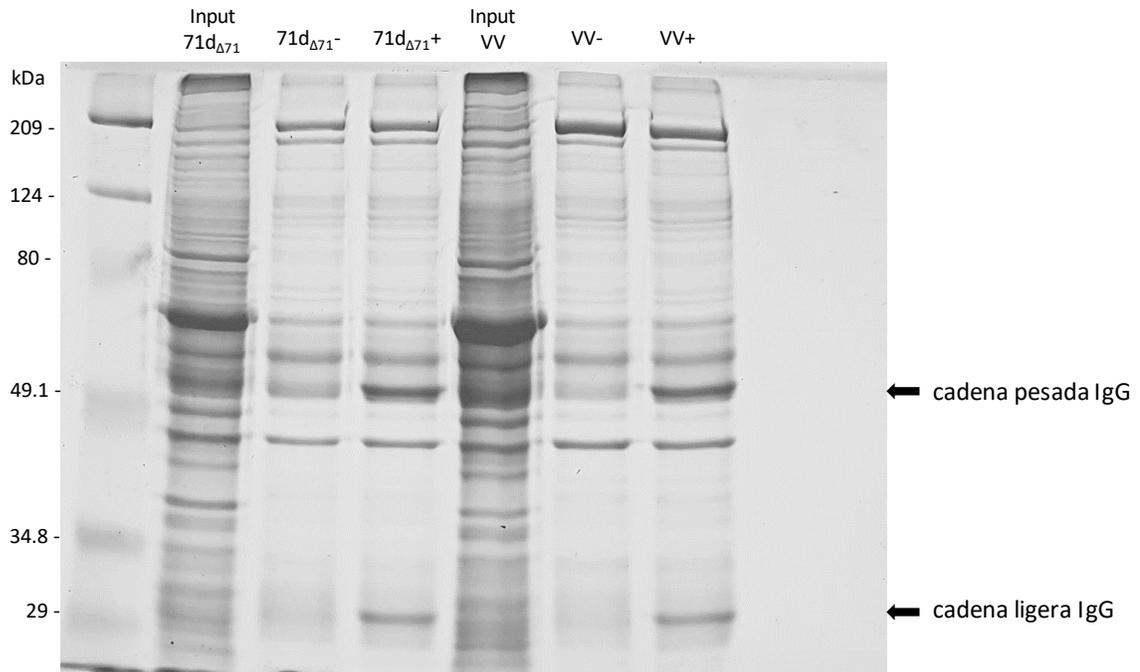


Figura 29. Comparación de proteínas totales e inmunoprecipitadas, tratadas con un mayor número de lavados. SDS PAGE 10%, fijado y teñido con Coomassie coloidal, los extractos de las clonas Myc/Dp71d Δ 71 y vector vacío fueron inmunoprecipitados con anticuerpo monoclonal anti-Myc, las perlas fueron lavadas 5 veces con buffer de lisis y 1 con PBS. Input: extracto total, -: control negativo (sin anticuerpo), +: inmunoprecipitado positivo, VV: vector vacío. Se aprecia la gran cantidad de proteínas en los extractos totales (Input) y los sobrenadantes (SN), en el caso de los carriles con los inmunoprecipitados negativos (-) y positivos (+), disminuye el número e intensidad de bandas, no se observa mucha diferencia entre los inmunoprecipitados, las flechas señalan las bandas correspondientes a las cadenas pesada y ligera del anticuerpo con el que se inmunoprecipitó. M marcador de peso molecular en kDa.

Para eliminar las perlas de sefarosa y disminuir la cantidad de anticuerpo presente en los inmunoprecipitados, se realizó el protocolo de elución suave, que consiste en incubar los inmunoprecipitados en un buffer parcialmente reductor. Esto provoca la separación de

proteínas de las perlas de sefarosa, en mayor proporción que el anticuerpo de la proteína G de las perlas de sefarosa. Los inmunoprecipitados negativos (sin anticuerpo) y positivos de clona Myc/Dp71d Δ 71 y de la clona vector vacío fueron sometidos a este proceso (Fig. 30).

Al analizar las muestras se observó una menor intensidad en las proteínas de la clona Myc/Dp71d Δ 71, y se pudieron observar algunas diferencias entre los inmunoprecipitados negativo y positivo eluidos de la clona Myc/Dp71d Δ 71, entre las diferencias se encontró mayor intensidad en una banda del inmunoprecipitado positivo que migra arriba del marcador de 209 kDa, con respecto al inmunoprecipitado negativo Fig. 30. Esta banda fue extraída del gel y analizada por espectrometría de masas, identificándose péptidos correspondientes a miosina 9, la cual tiene un peso de 226 kDa y que se correlaciona con el peso observado.

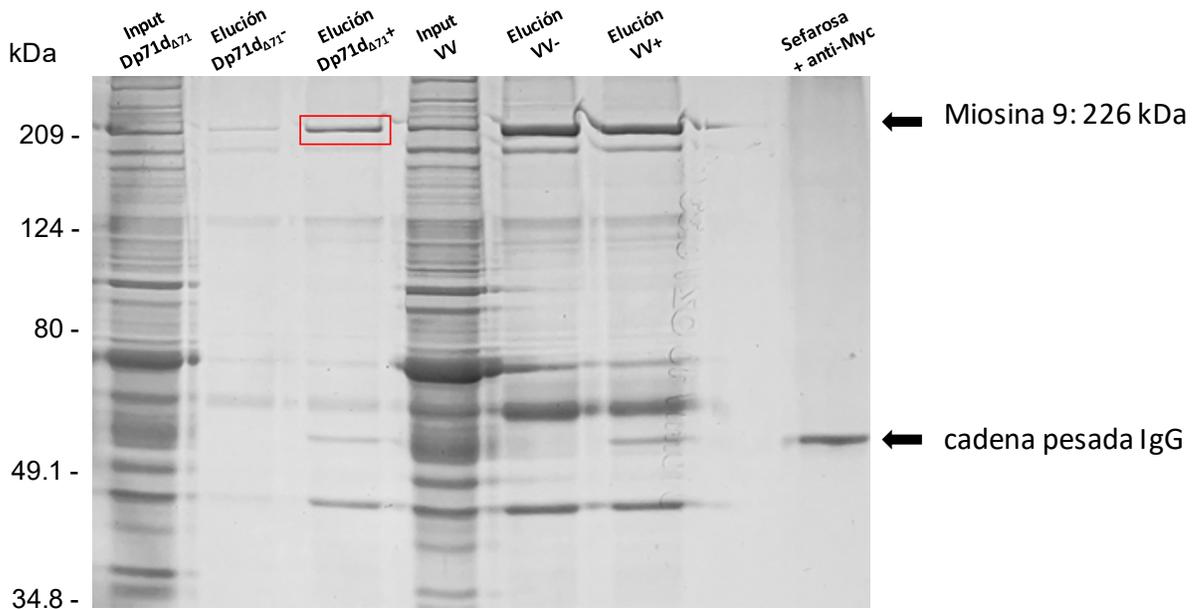


Figura 30. Comparación entre proteínas totales e inmunoprecipitadas, tratadas por elución suave. SDS PAGE 10%, fijado y teñido con Coomassie coloidal, los extractos de las clonas Myc/Dp71d Δ 71 y vector vacío fueron inmunoprecipitados con anticuerpo monoclonal anti-Myc, las proteínas fueron eluidas con el buffer de elución suave. Input: extracto total, -: control negativo (sin anticuerpo), +: inmunoprecipitado positivo, VV: vector vacío. Se aprecia una menor intensidad de las bandas y diferencias entre los inmunoprecipitados eluidos de la clona Myc/Dp71d Δ 71 con

respecto a vector vacío, una banda fue más intensa en el inmunoprecipitado positivo (flecha superior) la cual fue extraída y procesada por espectrometría de masas identificando a miosina 9. La flecha inferior señala la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo con el que se inmunoprecipitó. M marcador de peso molecular en kDa.

Para tratar de disminuir la cantidad de proteínas unidas de forma inespecífica a la sefarosa/proteína G, previo a la inmunoprecipitación, las perlas de sefarosa fueron incubadas con albúmina sérica bovina 5% (BSA) y posteriormente usadas para la inmunoprecipitación. Se realizó la inmunoprecipitación como se describió anteriormente, las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE, el gel fijado y teñido con Coomassie coloidal, y se compararon los patrones de los inmunoprecipitados eluidos con los realizados con las perlas bloqueadas con BSA. Los resultados se muestran en la Fig. 31. No se encontraron diferencias notorias entre los inmunoprecipitados positivo y negativo (sin anticuerpo) obtenidos con las perlas bloqueadas con BSA.

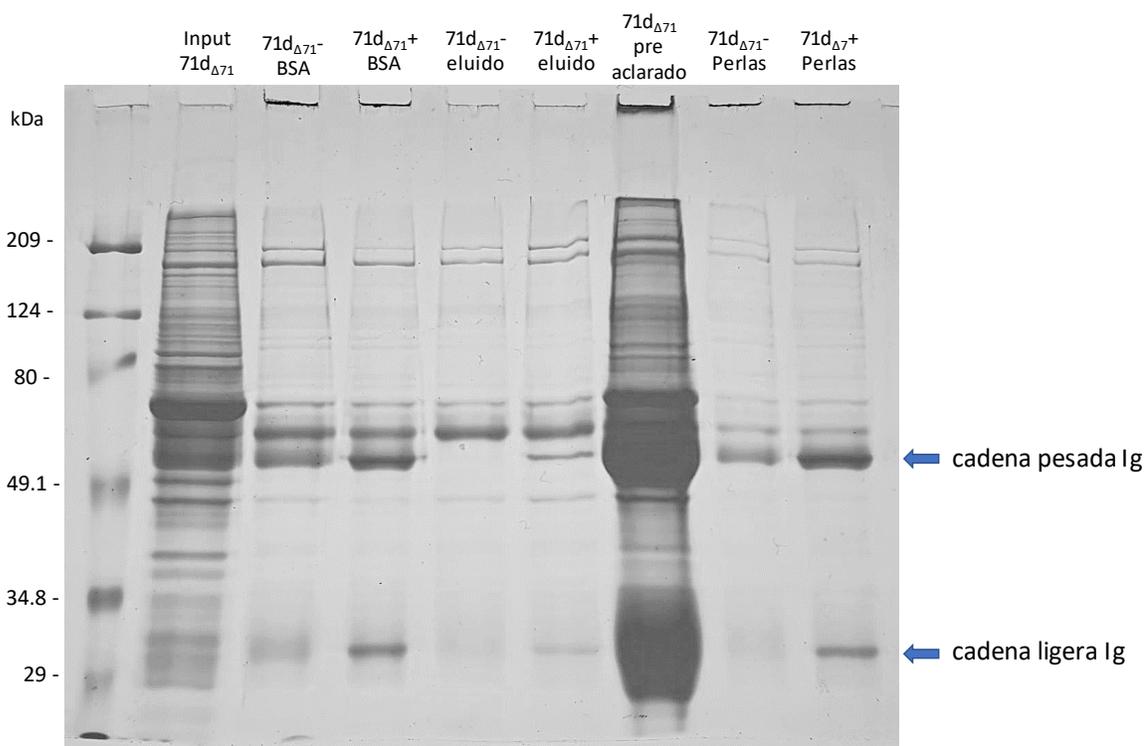


Figura 31.- Comparación de proteínas inmunoprecipitadas, tratadas con el protocolo de elución suave. SDS PAGE 10%, fijado y teñido con azul de Coomassie, los extractos de las clonas Myc/Dp71 Δ 71 fueron inmunoprecipitados con y sin anticuerpo monoclonal anti-Myc y con perlas

de sefarosa/proteína G bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) y comparadas con los inmunoprecipitados eluidos con el buffer de elución suave. Input: extracto total, -: control negativo (sin anticuerpo), +: inmunoprecipitado positivo. Se aprecian más diferencias entre inmunoprecipitado positivo y negativo en las condiciones eluidas, que en el caso del uso de perlas con BSA. También se corrieron las perlas utilizadas en el preaclareamiento (carril preaclareado), en donde se puede observar gran cantidad de proteínas unidas a la sefarosa, y en los últimos dos carriles se cargaron las perlas resultantes de la elución, se observa la disminución de la intensidad de las bandas correspondientes a las cadenas pesada y ligera en el caso de las muestras eluidas y el aumento de intensidad en las perlas precipitadas (flechas). M marcador de peso molecular en kDa.

Para verificar la expresión de la proteína recombinante y su adecuada precipitación con anticuerpo monoclonal anti-Myc, las muestras inmunoprecipitadas fueron corridas en gel SDS-PAGE, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y revelada con anti-Myc monoclonal (Fig. 32). Los resultados permiten observar una banda con intensidad moderada en el input (extracto total) y en los sobrenadantes de las inmunoprecipitaciones, mientras que en el carril del inmunoprecipitado de la clona Myc/Dp71d Δ 71 se observa una banda con mayor intensidad. Se demuestra también, la ausencia de la proteína recombinante en la clona de vector vacío.

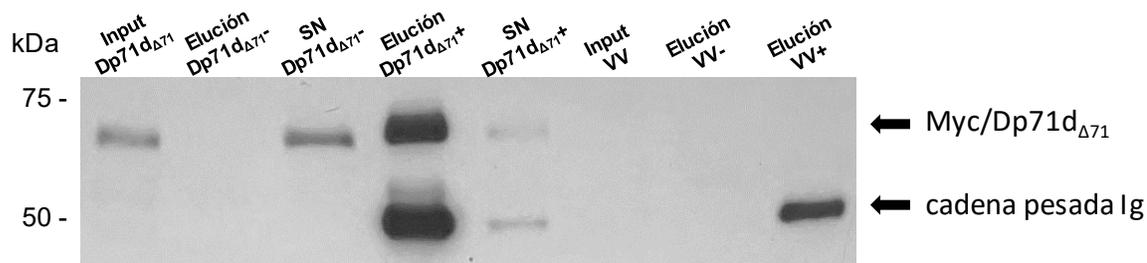


Figura 32.- Inmunoprecipitación de Dp71 Δ 71. Western blot de inmunoprecipitados con el anticuerpo Myc monoclonal de las clonas Myc/Dp71 Δ 71 y vector vacío sometidos al protocolo de elución suave, se corrieron muestras de extractos totales (input), sobrenadantes (SN), inmunoprecipitados positivos (+) y negativos (-). Se observa la señal de Myc/Dp71 Δ 71 enriquecida en el inmunoprecipitado positivo y ausencia en el vector vacío. (flecha superior). La flecha inferior señala la banda correspondiente a la cadena pesada del anticuerpo anti-Myc utilizado para inmunoprecipitar, presente en ambos inmunoprecipitados positivos.

Una vez establecidas las condiciones para el tratamiento de los inmunoprecipitados, se procedió a realizar la extracción de proteínas e inmunoprecipitaciones de las clonas PC12Myc/Dp71d Δ 71 y vector vacío, sometidas al protocolo de elución suave y cargadas en su totalidad en un gel SDS-PAGE, para ser corridas por 0.5 cm dentro del gel separador. El gel fue fijado y teñido con Coomassie coloidal (Fig. 33).

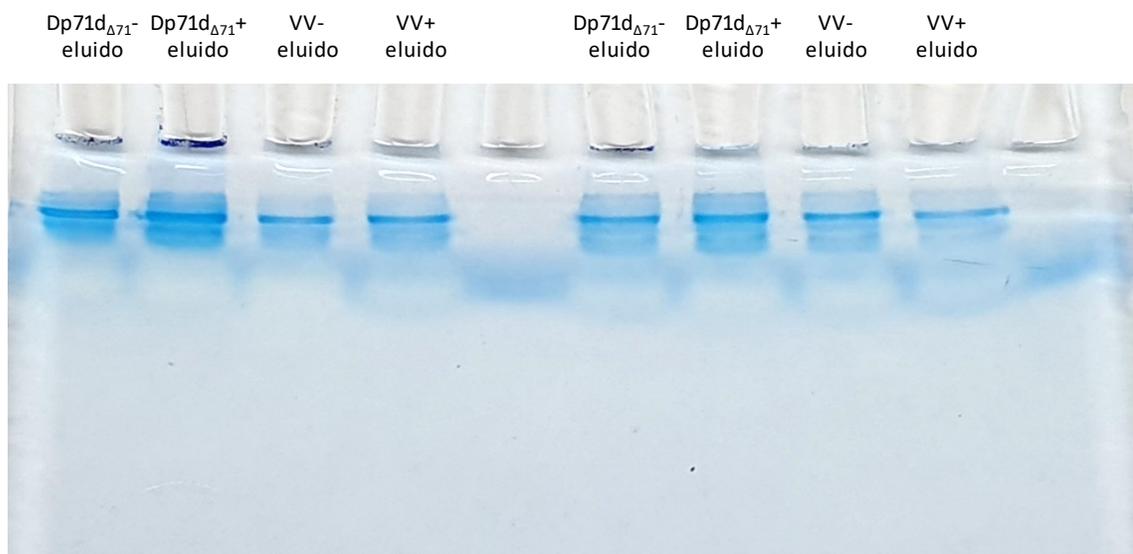


Figura 33.- Separación de proteínas en gel SDS-PAGE para análisis cuantitativo por espectrometría de masas. Gel SDS-PAGE al 10 %, se cargaron las muestras eluidas de inmunoprecipitados con anti-Myc monoclonal de las clonas Myc/Dp71d Δ 71 y vector vacío, positivas y negativas, se corrieron muestras por duplicado a una distancia de alrededor de 5 mm del gel separador, el gel fue fijado y teñido con Coomassie coloidal.

Para el análisis de proteómica cuantitativa las bandas del gel de cada inmunoprecipitado fueron cortadas, digeridas con tripsina y se adicionó alcohol deshidrogenasa 1 (ADH1) digerida por tripsina, con una concentración conocida a cada una de las muestras. Los péptidos obtenidos fueron separados por cromatografía líquida e inyectados por triplicado en el espectrómetro de masas, se utilizó el software Progenesis Q1, se definieron los criterios de tolerancia. SE identificaron 121 proteínas y las cuantificaciones fueron normalizadas con el control interno. Las cuantificaciones absolutas de los péptidos obtenidos fueron analizadas manualmente y se seleccionaron las proteínas que se encontraron en mayor abundancia (al menos 2X) en el inmunoprecipitado positivo de la

clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 con respecto al inmunoprecipitado positivo de la clona PC12 de vector vacío (Tabla 4).

Tabla 4. Proteínas más abundantes que se inmunoprecipitaron con Dp71d Δ 71.

Acceso	Descripción	Cuantificación absoluta (fmol)				Relación (veces) (Dp71d Δ 71+/VV+)
		Dp71d Δ 71+	Dp71d Δ 71-	VV+	VV-	
B4F7C2	Tubulin beta chain	4.14	2.57	0	0.18	Sólo en Dp71d Δ 71+
P18298	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2	19.38	11.97	0.12	0.13	166.13
Q63768	Adapter molecule crk	208.75	141.61	20.41	34.06	10.23
D4ADC2	Helicase with zinc finger 2	8.13	5.80	1.06	1.41	7.67
D3ZYU1	WD repeat domain 93	6.88	4.90	1.00	1.56	6.86
Q510H5	Cyclin-L2	50.88	35.59	11.56	10.55	4.40
Q9JLT0	Myosin-10	0.23	0.15	0.12	0.07	2.03

Los datos de cada duplicado biológico con sus valores por triplicado técnico (inyecciones de muestra en espectrometría de masas) se analizaron estadísticamente, la significancia de los datos se analizó mediante ANOVA de una vía.

β -tubulina fue la proteína con mayor diferencia entre ambas clonas, porque no fue detectada en el vector vacío. Fig. 34.

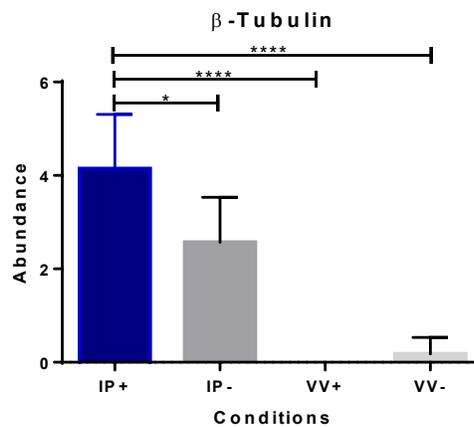


Figura 34. Cuantificación absoluta de β -tubulina en el complejo con Myc/Dp71d Δ 71. Gráfica comparativa de la abundancia absoluta (fmol) del inmunoprecipitado positivo de la clona Myc/Dp71d Δ 71 y las condiciones control. IP+: inmunoprecipitado positivo, IP-: inmunoprecipitado negativo, VV+: vector vacío positivo, VV-: vector vacío negativo. En el caso del inmunoprecipitado positivo de vector vacío (VV+) no se detectó cantidad. *p < 0.05, ****p < 0.0001.

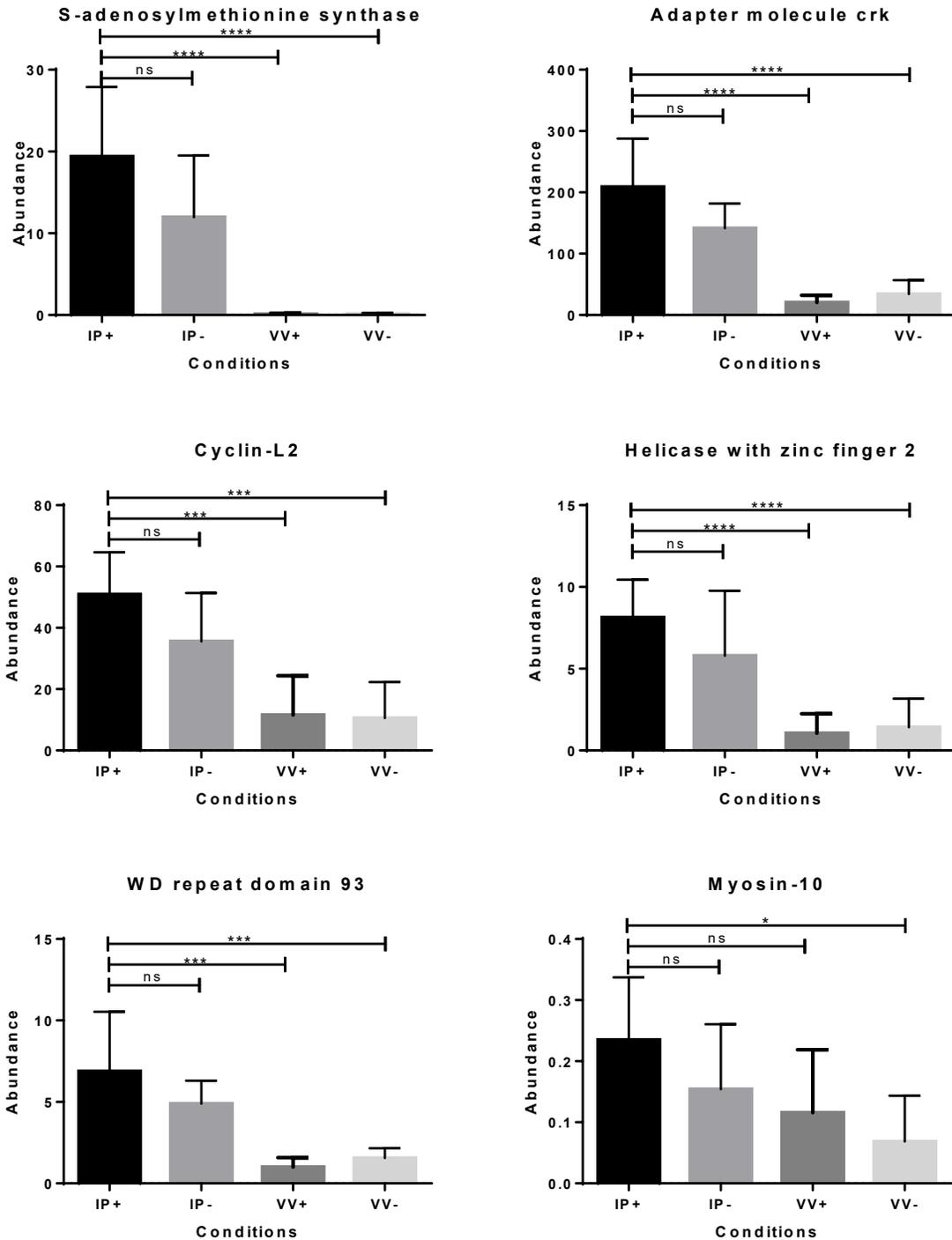


Figura 35. Cuantificación absoluta de proteínas conimmunoprecipitadas más abundantes en Myc/Dp71d Δ 71. Gráfica de la abundancia relativa entre el inmunoprecipitado positivo de la clona Myc/Dp71d Δ 71 (IP+) y las condiciones control. IP+: inmunoprecipitado positivo, IP-: inmunoprecipitado negativo, VV+: vector vacío positivo, VV-: vector vacío negativo. ns no significativo, * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.0001$.

Al igual que en β -tubulina, las otras proteínas seleccionadas fueron graficadas. Fig. 35. En las gráficas se observa la abundancia obtenida por espectrometría de masas de cada una de las proteínas seleccionadas por su mayor cantidad en el inmunoprecipitado de la clona Myc/Dp71d Δ 71 con respecto a la clona de vector vacío, con valores estadísticamente significativos, además de mayor abundancia con respecto a los controles negativos.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los valores de Miosina 10 en el inmunoprecipitado positivo de la clona Myc/Dp71d Δ 71 (IP+) y esta misma proteína en el inmunoprecipitado del vector vacío (VV+). Fig. 35.

Por otro lado, Miosina 6 llamó la atención que a pesar de sólo estar 40% por arriba del valor del VV+, tuvo diferencias estadísticamente significativas entre inmunoprecipitado positivo de la clona Myc/Dp71d Δ 71 y el resto de las condiciones. Fig. 36.

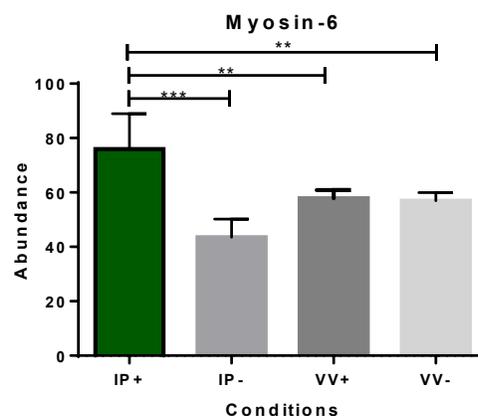


Figura 36.- Cuantificación absoluta de miosina 6 en los complejos con Myc/Dp71d Δ 71. Gráfica de la abundancia relativa entre el inmunoprecipitado positivo de la clona Myc/Dp71d Δ 71 (IP+) y las condiciones control. ** p0.0043, ***p0.0001.

Un resumen de los resultados obtenidos en esta cuarta estrategia se esquematiza en la siguiente figura.

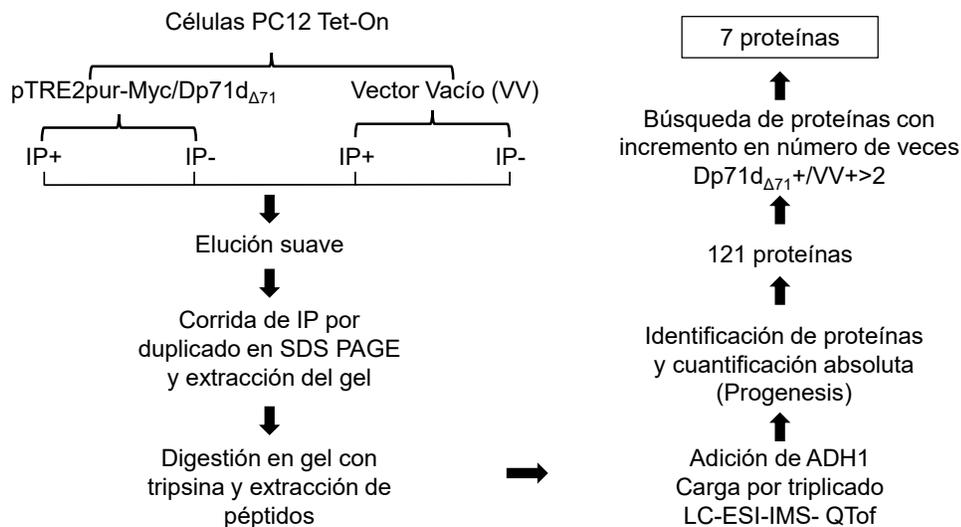


Figura 37. Esquema de la estrategia realizada para identificar proteínas asociadas con Dp71d_{Δ71} por cuantificación absoluta. La cuantificación absoluta fue obtenida a partir de Inmunoprecipitados por duplicado de ambas clonas, con sus respectivos controles negativos, se utilizó un protocolo de elución suave para eliminar la sefarosa, se corrieron en gel SDS-PAGE para posteriormente ser extraídas, digeridas y mediante la adición de la proteína ADH1 como control interno se realizó la cuantificación absoluta mediante espectrometría de masas.

7.- Discusión

Así como la distrofina completa es importante en músculo por sus interacciones con otras proteínas, sobre todo manteniendo complejos en sarcolema y vinculándolos con citoesqueleto a través de actina, Dp71 es una proteína importante para el funcionamiento del sistema nervioso central. Se generan diferentes isoformas de Dp71 por procesamientos alternativos, las cuales tienen localización subcelular y abundancia diferentes y por tanto también deben variar en función. Es de suponer, que las distintas localizaciones de cada una de las isoformas de Dp71 se deban, en parte, a interacciones entre las isoformas con otras proteínas con las que puedan estar formando diferentes complejos. Este trabajo tuvo como objetivo principal identificar nuevas proteínas que interaccionan con las distrofinas Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 y Dp40 en células PC12, para avanzar en el conocimiento de la función de cada una de ellas en el sistema nervioso. Se utilizó a las células PC12 debido a que son un modelo para la investigación de funciones neuronales y han sido ampliamente usadas para el estudio de la distribución y función de las isoformas de Dp71 y Dp40.

En este trabajo se abordaron diferentes estrategias para tratar de identificar nuevas proteínas asociadas principalmente a Dp71d Δ 71, también se exploró la identificación de proteínas asociadas a Dp71 d Δ 71-74 y Dp40. La isoforma Dp71d Δ 71 fue seleccionada como el principal objeto de estudio ya que ésta es una de las isoformas que se expresa con mayor abundancia en las células PC12, adicionalmente esta isoforma es de interés debido a que el procesamiento alternativo que eliminar el exón 71, en el RNA mensajero, es el que ocurre con más frecuencia en cerebro.¹⁴

Debido a que no existen anticuerpos específicos que reconozcan a cada una de las isoformas, dada su alta homología en su secuencia aminoacídica, nuestro laboratorio ha generado clonas que sobreexpresan de manera estable a cada una de las diferentes isoformas utilizando el sistema TetOn en células PC12. Este sistema permite la sobreexpresión génica regulada del gen reportero, en respuesta a concentraciones de

doxiciclina, utilizando el plásmido PTRE2-Pur-Myc/Dp71 o Dp40, generando proteínas recombinantes que contienen el epítipo Myc fusionado al extremo amino terminal de las distrofinas.

Los resultados obtenidos en este trabajo se agruparon en 4 estrategias, cada una de las cuales generó resultados que se discuten a continuación.

7.1.- Dp71d_{Δ71} se asocia a un complejo proteico de 700 kDa

Utilizando geles azul nativos y Western blot se pudo demostrar que Dp71d_{Δ71} se asocia a un complejo de tamaño aproximado de 700 kDa y mediante espectrometría de masas se encontró que uno de los principales componentes del complejo fue el proteosoma 20S. La subunidad 20S del proteosoma constituye la partícula core y tiene un peso aproximado de 700 kDa, éste está formado por siete diferentes subunidades alfa y beta, las cuales fueron identificadas en su totalidad en este estudio (Tabla 1). El proteosoma es el segundo complejo proteico más abundante y constituye más del 5% del contenido proteico de la célula.⁵⁴

Nuestro hallazgo es consistente con un estudio reciente, donde se demostró que la actividad del proteosoma regula los niveles de expresión de Dp71 en células PC12, los autores utilizaron varios inhibidores del proteosoma como epoxomicina y midieron los niveles de proteínas recombinantes HA-Dp71d y HA-Dp71f_{Δ71}, mostrando la degradación un poco más rápida para el caso de la HA-Dp71f_{Δ71}⁵⁵. Por otro lado el tratamiento con el inhibidor del proteosoma MG-132, rescata la expresión y localización de distrofina y de las proteínas asociadas a distrofina en la membrana plasmática de fibras musculares de ratones mdx,⁵⁶ demostrando que la distrofina completa también es regulada por el proteosoma, de la misma manera que las distrofinas truncas o con alteración causada por las mutaciones en el gen *DMD* que causan distrofia muscular de Duchenne.

El medicamento Bortezomib (Velcade), que actúa inhibiendo el proteosoma 26S, que se utiliza como tratamiento para mieloma múltiple o linfoma, induce apoptosis en cáncer y previene el crecimiento celular, fue propuesto como posible tratamiento para pacientes

con distrofia muscular de Duchenne⁵⁷. Este tratamiento ha sido probado en perros Golden retriever con distrofia muscular, sin embargo la inhibición crónica del proteosoma es tóxica, este medicamento tiene muchos efectos secundarios por lo que se han buscado otras opciones como es el caso de TRIM32, involucrado en ubiquitinación de proteínas de citoesqueleto.⁵⁸

Si bien es cierto que otros complejos diferentes al proteosoma pueden migrar en el peso molecular de 700 kDa, es de suponer que la sobreexpresión de la proteína recombinante Myc/Dp71d Δ 71, puede conducir a una mayor degradación por el proteosoma y por esto, ser el complejo identificado más abundante. Este trabajo demuestra que la isoforma Dp71d Δ 71 también se asocia al proteosoma muy probablemente para su degradación, otras proteínas que pudieran estar relacionadas con Dp71d Δ 71 identificadas fueron α y β -tubulina, HSP-90 y sinaptofisina, aunque también pudieran estar asociadas a degradación por proteosoma.

7.2.- Formación de complejos proteicos por “cross link”

Con la intención de obtener complejos estables con proteínas que interaccionen con las isoformas de la distrofina, se decidió tratar a las células PC12 con PFA. Las ventajas del uso del PFA es que forma un enlace de puente de metileno entre proteínas (“cross link”) que interaccionan a una distancia corta (2 Å), proteínas que están muy próximas físicamente y las mantiene unidas. El PFA pasa a través de la membrana celular, es inespecífico, inactiva enzimas, puede someterse a condiciones no fisiológicas, y su interacción con las proteínas es reversible, por lo que es un reactivo adecuado para realizar “cross link”.⁵⁹

La estandarización del cross link PFA, junto con un análisis por Western blot permitieron identificar al menos dos complejos presentes en los extractos de cada una de las clonas en donde Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 o Dp40 se asocian a otra u otras proteínas, una de ellas β

distroglicano, dado que complejos de tamaño semejante fueron visualizados al revelar únicamente con β -distroglicano en muestras de extractos totales.

Por otro lado, con los geles azul nativos al menos tres complejos fueron visualizados por Western blot al utilizar “cross link” con PFA en la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71, sin embargo, para identificar a las proteínas que forman parte del complejo por espectrometría de masas, es indispensable revertir el “cross link” inducido con PFA en los complejos purificados. Lo anterior debido a que el formaldehído reacciona con el grupo amino primario de los residuos de lisina, que son sitios de corte por tripsina cuando se producen los péptidos durante la digestión en gel, como paso previo a la espectrometría de masas. En este trabajo fue posible obtener complejos con las proteínas recombinantes Dp71d Δ 71, Dp71d Δ 71-74 o Dp40 y visualizarlos en geles azul nativos. El paso de reversión del “cross link” descrito en Materiales y Métodos fue ineficiente, por lo que es necesario implementar un método que permita realizar la reversión del “cross link” eficientemente, previo a su análisis por espectrometría de masas. Podría ser útil la electroelución de proteínas para extraer los complejos con “cross link” a partir de las bandas del gel cortadas y obtenerlos en solución, después hervir la muestra durante 25 min. Una vez revertido el “cross link”, se podría analizar por espectrometría de masas ya sea digiriendo directamente con tripsina o separando las proteínas en un nuevo gel SDS PAGE.

7.3.- Dp71d Δ 71 se asocia principalmente a β -distroglicano de 30 kDa

El Distroglicano se une a proteínas de la matriz extracelular y está formado por dos subunidades, α -distroglicano con localización extracelular y β -distroglicano de localización transmembranal. Mientras que α -distroglicano está altamente glicosilado y se asocia a la superficie celular y dependiendo de su patrón de glicosilación su tamaño varía de 120 a 180 kDa, β -distroglicano tiene un peso de 43 kDa. La cola citoplásmica de β -distroglicano está involucrada en varias interacciones con otras proteínas. Se ha identificado en varias líneas celulares cancerosas, la presencia de un procesamiento postraducciona que genera

un β -dístroglicano de 30 kDa. ⁶⁰ El β -dístroglicano es procesado por metaloproteasas (MMPs matrix-metallo-proeinases) que pertenecen a la familia de endopeptidasas extracelulares dependientes de Zn^{2+} que irrumpen el ectodominio del β -dístroglicano por dos mecanismos moleculares. MMP-9 induce una primera escisión dejando una región intacta C-terminal de 30 aminoácidos y una región N-terminal, mientras que MMP-2 produce múltiples cortes en la proteína entera. Ambas parecen tener un papel en la producción del fragmento de β -dístroglicano de 30 kDa.

Hnia et al, 2006, encontraron que Dp116 tiene una mayor afinidad para la forma de 43 kDa con respecto a la de 30 kDa y que una isoforma corta de utrofina, Up71 tiene una afinidad mayor por β -dístroglicano de 30 kDa en la membrana de células de Schwann de ratones mdx y propusieron que ambas proteínas pudieran estar implicadas en la proliferación celular en respuesta a estrés causado por inflamación. ⁶¹

También se ha sugerido que Dp116 y Up395 se unen a β -dístroglicano completo de manera competitiva y que la interacción de utrofinas es más débil que la distrofina Dp116 con β -dístroglicano completo (43 kDa). β -dístroglicano de 30 kDa no interactúa con α -dístroglicano, lo que indica que la escisión de la forma de 43 kDa en 30 kDa desintegra el complejo. ⁶¹

Utilizando el método de coinmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal anti-Myc y Western blot contra β -dístroglicano se encontró que la distrofina Dp71d _{Δ 71} se asocia principalmente a β -dístroglicano de 30 kDa y no con el de 43 kDa. (Datos no publicados, presentados en el congreso anual de la American Society of Human Genetics, realizado en Orlando, Florida en 2017).

Es posible que las células PC12 que corresponden a una línea celular tumoral tengan mayor contenido de la forma de β -dístroglicano de 30 kDa, sin embargo, los estudios de coinmunoprecipitación con Myc/Dp71d _{Δ 71} permitieron observar que en extracto total la banda correspondiente a β -dístroglicano de 43 kDa presenta mayor intensidad que la de 30 kDa, mientras que en el inmunoprecipitado obtenido en presencia del anticuerpo anti-

Myc, la forma mayoritaria es la de 30 kDa, lo que sugiere que hay una mayor afinidad de Dp71 Δ 71 por la forma de 30 kDa. Esto podría correlacionarse con la localización observada para Dp71 Δ 71 en membrana citoplásmica y citoplasma, ya que la forma de 30 kDa de β -dystroglicano está presente en el citoplasma. Sería interesante analizar si las isoformas como Dp71d Δ 71-74 que presentan localización predominante en membrana citoplásmica y no en citoplasma, tendrían más unión con β -dystroglicano de 43 kDa y poco con el de 30 kDa.

Al parecer todas las isoformas de distrofina y las de utrofina se unen a β -dystroglicano, lo que significaría que se encuentran compitiendo por la unión con β -dystroglicano.

7.4.- Asociación entre el anticuerpo anti-Myc monoclonal y la sefarosa/proteína G.

En este trabajo demostramos que mediante el uso de los métodos de coimmunoprecipitaciones y geles azul nativos, no fue posible identificar complejos específicos con las distrofinas, ya que se demostró que el anticuerpo monoclonal anti-Myc tanto en condiciones nativas como en condiciones parcialmente desnaturizantes forma asociaciones con la sefarosa/proteína G. Si se desea obtener complejos inmunoprecipitados se tienen que eluir previamente los complejos del anticuerpo/sefarosa/proteína G. Pardo, et al, 2017 describió un método para eluir estos componentes de los inmunoprecipitados utilizando un buffer de elución nativo, previo a cargar las muestras en los geles BN-PAGE, para posteriormente poder realizar un análisis por espectrometría de masas.⁶²

Por lo anterior los experimentos de inmunoprecipitación en geles azul nativos no permitieron aislar complejos específicos con las distrofinas recombinantes Myc Dp71 y Myc Dp40.

7.5.- Proteómica cuantitativa

La proteómica cuantitativa es una metodología que permite determinar cambios en la abundancia de proteínas en experimentos problema y control. Se seleccionó esta estrategia considerando que permitiría obtener resultados incluso si alguna de las proteínas asociadas a la isoforma Dp71 d_{Δ71} estaría inmunoprecipitándose de forma inespecífica.

Con el objetivo de identificar proteínas asociadas a la distrofina recombinante Myc/Dp71d_{Δ71}, se decidió combinar los métodos de inmunoprecipitación con proteómica cuantitativa.

La proteómica cuantitativa que consiste en identificar proteínas y cuantificar de forma absoluta por medio de un control interno (proteína añadida de la cual se conoce exactamente la concentración y por tanto la cantidad) ha sido utilizada para identificar proteínas coinmunoprecipitadas.

En esta metodología, la respuesta de la señal de espectrometría de masas promedio de la proteína estándar interna se usa para normalizar las cantidades de las otras proteínas identificadas en la mezcla, para determinar su concentración absoluta.⁵²

Con los valores de cuantificaciones absoluta, también es posible excluir proteínas que se unieron de manera inespecífica en la inmunoprecipitación. Los resultados obtenidos permitieron identificar 121 proteínas, únicamente se tomaron en cuenta aquellas que presentaron mayor abundancia (el doble) en el experimento de inmunoprecipitación de la clona Dp71d_{Δ71} con respecto a la abundancia de las proteínas de la clona PC12 que contenía el vector vacío. Aplicando estos parámetros se seleccionaron 7 proteínas que se muestran en la tabla 4.

Tanto en estudios de inmunoprecipitación e identificación con espectrometría de masas como en la última estrategia por proteómica cuantitativa, se encontró que β -tubulina coimmunoprecipita con la isoforma Dp71d Δ 71.

4.14 fmol de β -tubulina fueron cuantificados en el inmunoprecipitado con anti-Myc de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 con una secuencia peptídica compartida entre las diferentes subunidades β de tubulina mientras que en el inmunoprecipitado de la clona PC12 vector vacío, no se identificó tubulina.

Se ha reportado que las isoformas de tubulina son necesarias para que se lleven a cabo funciones específicas de los microtúbulos durante las tres etapas principales de la formación de la corteza cerebral: neurogénesis, migración neuronal y organización posmigracional. Las subunidades globulares que se ensamblan conjuntamente en grandes polímeros como es el caso de los microtúbulos, son estructuras similares a andamios con la capacidad de crecer de manera constante mediante la incorporación de heterodímeros de α/β -tubulina. Los microtúbulos desempeñan funciones clave durante las etapas del desarrollo de la corteza cerebral: proporcionan estructura a la célula y generan las fuerzas intracelulares requeridas por neuronas para migrar y desarrollar procesos axonales y dendríticos. Adicionalmente proporcionan andamios organizados para el transporte intracelular por proteínas motoras (p. ej., quinesinas y dineínas). Las interacciones entre proteínas motoras y proteínas asociadas a microtúbulos (MAP) ocurren principalmente a través de residuos presentes en el extremo C-terminal, que forman hélices en la superficie externa de la tubulina y una 'cola' de residuos principalmente ácidos que se extiende lejos del polímero de microtúbulos.

Las mutaciones que afectan a genes que codifican MAP (por ejemplo, *DCX* y *LIS1*) están asociadas con trastornos de migración neuronal. El amplio espectro de fenotipos asociados a tubulinopatía descritos hasta la fecha, varía desde agiria grave (con o sin microcefalia), pasando por paquigiria y malformaciones similares a la polimicrogiria, hasta un patrón de alteración cerebrocortical leve.

Las isoformas de tubulina comparten niveles muy altos de homología de secuencia, lo que hace que sea extremadamente difícil dilucidar las funciones específicas de las diferentes isoformas dentro de la célula. La multitud de mutaciones de tubulina que no afectan el plegamiento y son capaces de incorporarse a un citoesqueleto funcional sugieren fuertemente que actúan afectando la interacción con los MAP.⁶³

En músculo esquelético la distrofina es una proteína asociada a microtúbulos, en los ratones *mdx* con mutación sin sentido en el exón 23 del transcrito DMD resulta en la pérdida de la distrofina y la desorganización de microtúbulos.⁶⁴

Utilizando un ensayo de cosedimentación de microtúbulos y Western blot, se describió que la distrofina de longitud completa 427 kDa, la Dp260 y Δ R4-23 sedimentaron con α -tubulina, mientras que Dp71 no lo hizo, lo que sugirió que en el dominio 24 de repetidos de espectrina y hasta el primer tercio del dominio WW se encuentra el dominio de unión a microtúbulos. Se ha sugerido que el dominio de unión de distrofina a tubulina reside entre los repetidos de espectrina del 20 al 24.⁶⁴ En el músculo, específicamente en costámeros, la distrofina también interactúa con los microtúbulos a través de la anquirina-B por el dominio WW y el dominio rico en cisteína, y experimentalmente la interacción de Dp71 con la anquirina-B es un requisito para su localización en la membrana citoplasmática.⁶⁵

Se ha reportado que α y β -tubulina tienen un incremento de 2.5 veces en su expresión en músculo esquelético del ratón *mdx*.⁶⁴ Las miosinas identificadas podrían estar asociadas a β -tubulina. Los resultados del presente trabajo sugieren que Dp71d Δ 71 interactúa directamente con diferentes tipos de subunidades β tubulina (*tubb4a*, *tubb5* y *tubb2A*).

La sintasa de S-adenosilmetionina es otra de las proteínas que presentaron una cuantificación absoluta elevada de 19.38 fmol en el inmunoprecipitado de la clona Dp71d Δ 71 contra 0.12 fmol en la clona que contiene el vector vacío, lo que representó una diferencia de 166.13 veces, lo cual indica claramente una asociación entre ambas proteínas. Esta proteína tiene una función en el desarrollo y crecimiento celular y cataliza

la formación e S-adenosimetionina de metionina y ATP. En *C. elegans* que cuenta con un solo gen ortólogo a distrofina/utrofina, una mutación patogénica que resulta en la expresión de una proteína truncada, provoca una expresión incrementada de la sintasa de S-adenosilmetionina en un 60 -78 %.⁶⁶ Sin embargo; en mamíferos s-adenosilmetionina sintasa tiene 3 diferentes formas, designadas alfa, beta y gamma, la isoforma que se encontró en este trabajo fue la isoforma tipo 2, gen *mat2a* pudiera ser que el aumento en proliferación celular visto en la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 pueda tener relación con su asociación con sintasa de S-adenosilmetionina, y que esta asociación no esté presente en isoformas más cortas.

No se ha descrito la expresión de Dp71 en *C. elegans*, aunque se sabe que sus genes comparten intrones con el genoma humano y que existen proteínas equivalentes en procesamiento alternativo.

La molécula adaptadora crk también fue identificada como una proteína con niveles elevados 208.75 fmol en el inmunoprecipitado de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 contra 34.06 fmol en la clona PC12 del vector vacío (casi 6 veces más), esta proteína es una cinasa que se considera una oncoproteína, relacionada con adhesión, propagación y migración celular, desarrollo de dendritas, respuesta celular al óxido nítrico, respuesta a estímulo con factor de crecimiento neuronal entre otras funciones. Esta molécula contiene dominios SH2 y SH3 (Src homolog) con unión al dominio PDZ (PSD-95/dlg/ZO1), un dominio que posee sintrofina.^{67,68} crk también se conoce como proteína cinasa p38 y se ha encontrado una sobreactivación de proteína p38-MAPK en corazones de ratones mdx.⁶⁹ Pudiera ser que la asociación de Dp71 con la molécula adaptadora crk tenga relación con la alta proliferación celular que se observa en la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71.

La Ciclina L2 mostró un nivel de 50.88 fmol en el inmunoprecipitado de la clona PC12 Myc/Dp71d Δ 71 contra 10.55 fmol en la clona PC12 del vector vacío (casi 5 veces más), esta es una proteína que es fosforilada por la cinasa DYRK1A y está asociada con la cinasa dependiente de ciclina PITSLRE, interactúa con el factor de procesamiento 2, DYRK1A

podría regular el procesamiento a través de la fosforilación de ciclina L2.⁷⁰ Esta proteína presenta un dominio amino terminal de unión a RNA y está involucrada en la regulación transcripcional vía fosforilación del dominio C-terminal de la RNA polimerasa II.^{71,72} CDK12 también interactúa con ciclina L2 y regula el procesamiento alternativo.⁷³ La sobreexpresión de ciclina L2 inhibe el crecimiento induciendo arresto del ciclo celular y apoptosis.⁷⁴ Dado que esta proteína controla crecimiento celular pudiera tener regulación negativa por parte de Dp71d_{Δ71}, ya que el efecto visto en la clona que sobreexpresa ésta isoforma es de proliferación celular.

La estrategia utilizada en esta parte del trabajo permitió identificar nuevas proteínas que pudieran interactuar con la isoforma Dp71d_{Δ71} lo que conducirá a obtener información relevante para determinar nuevas funciones de las distrofinas. En este estudio se han identificado nuevas proteínas que pueden participar en las funciones de Dp71, no necesariamente a través de una interacción directa, la asociación puede ser por interacción con una proteína intermediaria. Estos resultados abren una línea para futuras investigaciones acerca de la relación entre estas proteínas y Dp71 e incluso con la distrofina de longitud completa.

Será necesario investigar más para documentar con otros métodos si las proteínas que inmunoprecipitaron en mayor proporción con Dp71d_{Δ71} realmente tienen una interacción específica con esta. Como perspectivas de este trabajo se plantea realizar experimentos de Western blot y estudios de colocalización con anticuerpos dirigidos contra estas proteínas candidatas.

La mayoría de las proteínas asociadas a Dp71 que se han descrito hasta el momento, están localizadas en la membrana citoplásmica, y de hecho por estudios de inmunofluoresencias realizadas por microscopía confocal en células PC12, hemos visto que todas las isoformas tienen fuerte presencia en la membrana citoplásmica, Dp71d_{Δ71} tiene una localización fuerte tanto en membrana citoplásmica como en citoplasma.

Es importante mencionar que en la inmunoprecipitación y cuantificación absoluta por espectrometría de masas no se encontraron miembros del complejo de proteínas

asociado a distrofina (DAPC). Esto puede explicarse porque no se utilizaron fracciones enriquecidas de membrana y probablemente el método de extracción de proteínas no favorece el aislamiento de proteínas asociadas a la membrana. Adicionalmente, la digestión ineficaz de ciertas proteínas obstaculiza los procedimientos de digestión con tripsina en gel, además es posible que algunas proteínas de membrana no se detecten debido a su baja solubilidad.⁷⁵ Desde el inicio del proyecto no se consideró realizar fraccionamiento de membranas, porque se querían encontrar nuevas proteínas presentes en el citoplasma.

Diferentes péptidos de la distrofina completa fueron identificados en todos los inmunoprecipitados de la clona Myc/Dp71d Δ 71, probablemente tanto Dp71 como la distrofina completa están involucradas en la formación de complejos constituidos por proteínas que pueden interactuar con ambas.

Las proteínas que actúan como elementos estructurales en células específicas o como proteínas reguladoras de vías, son un ejemplo de cómo mutaciones en un solo gen pueden producir alteraciones celulares complejas o enfermedades complejas como es el caso de la distrofina en la distrofia muscular de Duchenne.

La generación de conocimiento a través de la investigación en ciencia básica sobre las funciones, estructuras e interacciones de proteínas, es la base para el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas o genéticas.

8.- Conclusiones

- Myc/Dp71d_{Δ71} está presente en un complejo proteico de 700 kDa en células PC12.
- El uso de PFA para unir proteínas por “cross link” permitió observar dos complejos entre Dp71d_{Δ71}, Dp71d_{Δ71-74} y Dp40 y β-distroglicano.
- La forma de Beta distroglicano de 30 kDa interacciona con Dp71d_{Δ71}
- Se identificaron 7 nuevas proteínas asociadas a Dp71d_{Δ71}: β-tubulina, sintasa de S-adenosilmetionina, molécula adaptadora crk, helicasa con dedo de zinc 2, dominio de repetido WD 93, ciclina L2 y miosina 10.

9.- Bibliografía

1. Parent, A. Duchenne De Boulogne: a pioneer in neurology and medical photography. *Can J Neurol Sci* **32**, 369-377 (2005).
2. Morales, J.A. & Mahajan, K. Dystrophinopathies. in *StatPearls* (Treasure Island (FL), 2020).
3. Nadkarni, J.J., Dastur, R.S., Viswanathan, V., Gaitonde, P.S. & Khadilkar, S.V. Duchenne and Becker muscular dystrophies: an Indian update on genetics and rehabilitation. *Neurol India* **56**, 248-253 (2008).
4. Dooley, J., Gordon, K.E., Dodds, L. & MacSween, J. Duchenne muscular dystrophy: a 30-year population-based incidence study. *Clin Pediatr (Phila)* **49**, 177-179 (2010).
5. Darras, B.T., Miller, D.T. & Urion, D.K. Dystrophinopathies. (1993).
6. Claudepierre, T., et al. Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Investigative ophthalmology & visual science* **40**, 1520-1529 (1999).
7. Moizard, M.P., et al. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *European journal of human genetics : EJHG* **8**, 552-556 (2000).
8. Foster, H., Popplewell, L.J. & Dickson, G. Genetic Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Gene Ther* (2012).
9. Sun, C., Shen, L., Zhang, Z. & Xie, X. Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy: An Update. *Genes (Basel)* **11**(2020).
10. Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E. & Davies, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological reviews* **82**, 291-329 (2002).
11. Constantin, B. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1838**, 635-642 (2014).
12. Bolanos-Jimenez, F., et al. Molecular cloning and characterization of dystrophin and Dp71, two products of the Duchenne Muscular Dystrophy gene, in zebrafish. *Gene* **274**, 217-226 (2001).
13. Howard, P.L., Klamut, H.J. & Ray, P.N. Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS letters* **441**, 337-341 (1998).
14. Aragon, J., et al. 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**, 1376-1386 (2018).
15. Ricotti, V., et al. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol* **58**, 77-84 (2016).
16. Kozlowski, P., Jasinska, A.J. & Kwiatkowski, D.J. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* **29**, 4627-4636 (2008).
17. Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L.E. & Cisneros, B. Dystrophin dp71: the smallest but multifunctional product of the duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol* **45**, 43-60 (2012).
18. Daoud, F., et al. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human molecular genetics* **18**, 3779-3794 (2009).
19. de Brouwer, A.P., et al. A 3-base pair deletion, c.9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* **22**, 480-485 (2014).

20. Suozzi, K.C., Wu, X. & Fuchs, E. Spectraplakins: master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *The Journal of cell biology* **197**, 465-475 (2012).
21. Gonzalez, E., *et al.* Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS letters* **482**, 209-214 (2000).
22. Rafael, J.A., Trickett, J.I., Potter, A.C. & Davies, K.E. Dystrophin and utrophin do not play crucial roles in nonmuscle tissues in mice. *Muscle Nerve* **22**, 517-519 (1999).
23. Rapaport, D., Fuchs, O., Nudel, U. & Yaffe, D. Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. *The Journal of biological chemistry* **267**, 21289-21292 (1992).
24. Lumeng, C.N., Hauser, M., Brown, V. & Chamberlain, J.S. Expression of the 71 kDa dystrophin isoform (Dp71) evaluated by gene targeting. *Brain research* **830**, 174-178 (1999).
25. Naidoo, M. & Anthony, K. Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Neurobiol* **57**, 1748-1767 (2020).
26. Rapaport, D., Greenberg, D.S., Tal, M., Yaffe, D. & Nudel, U. Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *FEBS letters* **328**, 197-202 (1993).
27. Lederfein, D., *et al.* 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**, 5346-5350 (1992).
28. Daoud, F., *et al.* Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS one* **4**, e6574 (2009).
29. Benabdesselam, R., *et al.* A deficit of brain dystrophin 71 impairs hypothalamic osmostat. *Journal of neuroscience research* **88**, 324-334 (2010).
30. Aleman, V., *et al.* Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochemistry and cell biology* **115**, 243-254 (2001).
31. Bhat, H.F., Adams, M.E. & Khanday, F.A. Syntrophin proteins as Santa Claus: role(s) in cell signal transduction. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 2533-2554 (2013).
32. Ceccarini, M., *et al.* A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Brain Res Dev Brain Res* **103**, 77-82 (1997).
33. Aragon, J., *et al.* Identification of Dp71 Isoforms Expressed in PC12 Cells: Subcellular Localization and Colocalization with beta-Dystroglycan and alpha1-Syntrophin. *J Mol Neurosci* **58**, 201-209 (2016).
34. Bruce, J.E. In vivo protein complex topologies: sights through a cross-linking lens. *Proteomics* **12**, 1565-1575 (2012).
35. Texier, Y., Kinkl, N., Boldt, K. & Ueffing, M. From quantitative protein complex analysis to disease mechanism. *Vision research* **75**, 108-111 (2012).
36. Braun, P. & Gingras, A.C. History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics* **12**, 1478-1498 (2012).
37. Fort, P.E., *et al.* Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane. *Glia* **56**, 597-610 (2008).
38. Davies, K.E. & Nowak, K.J. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 762-773 (2006).

39. Bozzi, M., Sciandra, F. & Brancaccio, A. Role of gelatinases in pathological and physiological processes involving the dystrophin-glycoprotein complex. *Matrix Biol* **44-46**, 130-137 (2015).
40. Allikian, M.J. & McNally, E.M. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic* **8**, 177-183 (2007).
41. Greenberg, D.S., Sunada, Y., Campbell, K.P., Yaffe, D. & Nudel, U. Exogenous Dp71 restores the levels of dystrophin associated proteins but does not alleviate muscle damage in mdx mice. *Nature genetics* **8**, 340-344 (1994).
42. Connors, N.C. & Kofuji, P. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 4321-4327 (2002).
43. Romo-Yanez, J., et al. Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *Journal of cellular biochemistry* **102**, 82-97 (2007).
44. Tozawa, T., et al. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. *Molecular neurobiology* **45**, 287-297 (2012).
45. Greene, L.A. & Tischler, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**, 2424-2428 (1976).
46. Rukenstein, A., Rydel, R.E. & Greene, L.A. Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation- and transcription-independent mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **11**, 2552-2563 (1991).
47. Cisneros, B., et al. Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neuroscience letters* **213**, 107-110 (1996).
48. Herrera-Salazar, A., et al. Overexpression of mutant dystrophin Dp71 Δ 78-79 stimulates cell proliferation. *Neuroreport* **27**, 6-11 (2016).
49. Maccarrone, G., Bonfiglio, J.J., Silberstein, S., Turck, C.W. & Martins-de-Souza, D. Characterization of a Protein Interactome by Co-Immunoprecipitation and Shotgun Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* **1546**, 223-234 (2017).
50. Antrobus, R. & Borner, G.H. Improved elution conditions for native co-immunoprecipitation. *PLoS One* **6**, e18218 (2011).
51. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J.V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856-2860 (2006).
52. Li, G.Z., et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics* **9**, 1696-1719 (2009).
53. Silva, J.C., Gorenstein, M.V., Li, G.Z., Vissers, J.P. & Geromanos, S.J. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics* **5**, 144-156 (2006).
54. Fiala, G.J., Schamel, W.W. & Blumenthal, B. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J Vis Exp* (2011).
55. Gu, Z.C. & Enenkel, C. Proteasome assembly. *Cell Mol Life Sci* **71**, 4729-4745 (2014).
56. Fujimoto, T., Yaoi, T., Fushiki, S. & Itoh, K. Dp71 is regulated by phosphorylation and ubiquitin-proteasome system in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **492**, 349-355 (2017).

57. Bonuccelli, G., *et al.* Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol* **163**, 1663-1675 (2003).
58. Bonuccelli, G., *et al.* Localized treatment with a novel FDA-approved proteasome inhibitor blocks the degradation of dystrophin and dystrophin-associated proteins in mdx mice. *Cell Cycle* **6**, 1242-1248 (2007).
59. Assereto, S., *et al.* The ubiquitin ligase tripartite-motif-protein 32 is induced in Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest* **96**, 862-871 (2016).
60. Vasilescu, J., Guo, X. & Kast, J. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3845-3854 (2004).
61. Losasso, C., *et al.* Anomalous dystroglycan in carcinoma cell lines. *FEBS letters* **484**, 194-198 (2000).
62. Hnia, K., *et al.* Effect of beta-dystroglycan processing on utrophin/Dp116 anchorage in normal and mdx mouse Schwann cell membrane. *Neuroscience* **141**, 607-620 (2006).
63. Pardo, M., Bode, D., Yu, L. & Choudhary, J.S. Resolving Affinity Purified Protein Complexes by Blue Native PAGE and Protein Correlation Profiling. *J Vis Exp* (2017).
64. Breuss, M. & Keays, D.A. Microtubules and neurodevelopmental disease: the movers and the makers. *Adv Exp Med Biol* **800**, 75-96 (2014).
65. Prins, K.W., *et al.* Dystrophin is a microtubule-associated protein. *J Cell Biol* **186**, 363-369 (2009).
66. Ayalon, G., Davis, J.Q., Scotland, P.B. & Bennett, V. An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell* **135**, 1189-1200 (2008).
67. Towers, P.R., *et al.* Gene expression profiling studies on *Caenorhabditis elegans* dystrophin mutants *dys-1(cx-35)* and *dys-1(cx18)*. *Genomics* **88**, 642-649 (2006).
68. Kurochkina, N. & Guha, U. SH3 domains: modules of protein-protein interactions. *Biophys Rev* **5**, 29-39 (2013).
69. Lee, H.J. & Zheng, J.J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Commun Signal* **8**, 8 (2010).
70. Nakamura, A., Harrod, G.V. & Davies, K.E. Activation of calcineurin and stress activated protein kinase/p38-mitogen activated protein kinase in hearts of utrophin-dystrophin knockout mice. *Neuromuscul Disord* **11**, 251-259 (2001).
71. de Graaf, K., *et al.* Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J Biol Chem* **279**, 4612-4624 (2004).
72. Dickinson, L.A., Edgar, A.J., Ehley, J. & Gottesfeld, J.M. Cyclin L is an RS domain protein involved in pre-mRNA splicing. *J Biol Chem* **277**, 25465-25473 (2002).
73. Yang, L., *et al.* Cyclin L2, a novel RNA polymerase II-associated cyclin, is involved in pre-mRNA splicing and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**, 11639-11648 (2004).
74. Chen, H.H., Wang, Y.C. & Fann, M.J. Identification and characterization of the CDK12/cyclin L1 complex involved in alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **26**, 2736-2745 (2006).
75. Li, H.L., *et al.* Overexpression of cyclin L2 inhibits growth and enhances chemosensitivity in human gastric cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* **13**, 1425-1430 (2012).
76. Rabilloud, T., *et al.* Power and limitations of electrophoretic separations in proteomics strategies. *Mass Spectrom Rev* **28**, 816-843 (2009).