



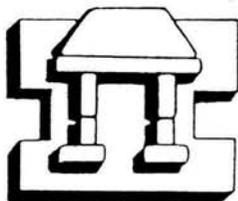
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

FOSFORILACION DE LA Dp71 EN LAS
CELULAS PC12

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
LUIS ALBERTO CALDERILLA BARBOSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. BULMARO CISNEROS VEGA



IZTACALA

LOS REYES, IZTACALA, EDO. DE MEX.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

-Tabla De abreviaturas	2
A) 1.- Introducción	3
1.1 La distrofina	3
1.2 El complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAP´s)	3
1.3 La Dp71	4
2.- Transporte a núcleo	6
2.1 Regulación del transporte a núcleo por fosforilación	7
2.2 Fosforilación del a distrofina y de la Dp71	9
B) 3.- Objetivos	12
C) 4.-Metodología	13
D) 5.- Resultados	15
5.1 Obtención de extractos totales de proteínas de células PC12	15
5.2 Inmunoprecipitación de distrofina y Dp71 con anti-fosfoaminoácidos	17
E) 6.- Discusión	25
F) 7.- Conclusiones	27
G) 8.- Bibliografía	28

Tabla de abreviaturas

AMPC.....	Adenosin monofosfato ciclico
CaMKII.....	Cinasa dependiente de calcio-calmodulina II
CK2.....	Casein cinasa 2
DAP´ s.....	Complejo de proteínas asociadas a distrofina
DMD.....	Distrofia muscular de Duchenne
ERK.....	Cinasa regulada extracelularmente
GFP.....	Proteína verde fluorescente
GSK3.....	Cinasa de la glicógeno sintasa 3
GTP.....	Trifosfato de guanosina
Kb.....	Kilobases
KDa.....	Kilo-Dalton
MAPK.....	Proteína cinasa activada por mitogenos
NES.....	Señal de exporte nuclear
NLS.....	Señal de localización nuclear
NPC.....	Complejo de poro nuclear
p34 Cdc2.....	Cinasa p34 dependiente de ciclina
PKA.....	Protein cinasa A
PKC.....	Proteina cinasa K
TPA.....	Forbol de acetato tetradecanoico
WGA.....	Aglutinina de germen de trigo

A) 1.- INTRODUCCIÓN

1.1 LA DISTROFINA

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad muscular ligada al cromosoma X, y que afecta a 1 de cada 3,500 varones nacidos vivos (Koenig *et al.*, 1988). El gen causante de esta enfermedad produce a la distrofina, una proteína con un peso molecular de 427 kDa, y esta proteína forma un puente entre la matriz extracelular y el medio citoplasmático, uniéndose a actina por medio de su extremo amino terminal y a un complejo de glicoproteínas que se unen en su extremo carboxilo. las cuales hacen contacto con proteínas de matriz extracelular.

El gen de la distrofina codifica para 7 transcritos que se producen bajo la activación de siete promotores diferentes, que son tejido específicos. Tres de los promotores codifican para la proteína completa, los cuatro restantes producen formas más cortas de la proteína: Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71. Las primeras tres distrofinas de longitud corta se expresan principalmente en sistema nervioso central y periférico; en tanto que la Dp71 se expresa en una gran variedad de tejidos (Tinsley *et al.*, 1994).

La distrofina se ha dividido en cuatro dominios: un dominio amino terminal que se une a actina; un dominio central parecido a espectrina; un dominio rico en cisteínas, y un dominio carboxilo terminal. Deleciones en esta última región del gen están asociadas a fenotipos severos de distrofia muscular, lo que indica la importancia de este dominio en la función de la distrofina (Blake y Kruger, 2000).

El extremo carboxilo de la distrofina puede interactuar con múltiples proteínas con diferentes funciones. El extremo carboxilo de la distrofina se ha dividido en diferentes dominios: 1) dominio WW; 2) dominio ZZ o de manos EF; 3) dominio rico en cisteínas (el cual tiene un dedo de zinc putativo) y 4) las regiones H1 y H2. Los primeros dos dominios se unen con la proteína β -dístroglicano, el tercer dominio une calcio y calmodulina y el cuarto dominio puede formar heterodímeros con las distrobrevinas (Di Vignano *et al.*, 2000).

1.2. EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA (DAP'S)

La función de la distrofina no esta relacionada únicamente con la estructura de ésta proteína, sino también con la de un complejo de proteínas que se asocian a ella. Este

complejo se ha denominado como DAP (Proteínas Asociadas a Distrofina) y está formado por diferentes proteínas entre las que se encuentran los distroglicanos: α -distroglicano (120-156 kDa), y β -distroglicano (43 kDa); los sarcoglicanos: α -sarcoglicano (50 kDa); β -sarcoglicano (43 kDa); γ -sarcoglicano (35 kDa); δ -sarcoglicano (35 kDa); y otras proteínas con diferente función como: el sarcospan (25 kDa); la α -sintrofina (58 kDa); la β 1 sintrofina (58 kDa); la β 2-sintrofina (58 kDa); la α 1-distrobrevina (87 kDa); la α 2 distrobrevina y la β -distrobrevina (Michalak *et al* 1996; Balasubramanian *et al*, 1998). Así mismo, las proteínas que forman el complejo DAP's, pueden unirse a varias proteínas con diferentes funciones, por ejemplo β -sarcoglicano puede unirse con la proteína Grb2 la cual es una proteína adaptadora involucrada en la transducción de señales y organización de citoesqueleto en músculo y en cerebro (Rosa *et al*, 1996). También se une a una cinasa de adhesión focal p125FAK que está implicada en la despolarización de membranas y en la activación de receptores de neurotransmisores (Cavallesi *et al*, 1999), y a la rapisina que es necesaria para la agrupación de receptores de acetilcolina (Cartaud *et al*, 1998). En pacientes con la distrofia muscular de Duchenne el número de complejos DAP's se reduce de manera considerable.

Hasta el momento se desconoce la función exacta de la distrofina, sin embargo, los ejemplos anteriores sugieren fuertemente que la función de la distrofina está más allá de la función mecánica y estabilizadora en la membrana de células musculares. Es posible que participe también en procesos tan importantes como la transducción de señales y la formación de sinapsis (Blake y Kruger, 2000).

1.3 LA Dp71

Dentro de las isoformas de distrofina se encuentra la Dp71, la cual se expresa en una gran variedad de tejidos, incluyendo cerebro, retina, pulmón, hígado, riñones, testículos, y en niveles más bajos en músculo cardíaco y esquelético fetal. El promotor de la isoforma Dp71 se encuentra dentro del exón 62 de la distrofina y produce un transcrito de 6.5 Kb. La traducción del marco abierto de la Dp71 origina un primer exón único formado por 7 aminoácidos, y contiene los dominios rico en cisteínas y carboxilo terminal que posee la distrofina de 427 kDa.

La Dp71 es el producto del gen DMD más abundante en cerebro, lo que ha llevado a especular que está relacionada con los problemas de retraso mental presentes en el 30% de personas afectadas con la distrofia muscular de Duchenne. Una evidencia de que la Dp71

podiera tener un papel en el sistema nervioso es que en el cerebro se le ha detectado en membranas plasmáticas sinápticas, microsomas y en vesículas sinápticas (Jung *et al.*, 1993), además de que se ha observado que su expresión se incrementa durante la maduración del sistema nervioso y durante la diferenciación neuronal de la línea celular PC12 (Cisneros *et al.*, 1996).

Algo que incrementa la complejidad de esta proteína es que el transcrito que la codifica esta sujeto a “splicing” alternativo en el extremo 3' lo que ocasiona cambios en la secuencia de aminoácidos de su extremo carboxilo. Uno de los eventos de splicing más comunes ocurren en el exon 78, lo cual cambia el marco de lectura de la proteína, reemplazando sus últimos 13 aminoácidos, que forman un extremo hidrofílico, por 31 aminoácidos que le dan un carácter hidrofóbico a la proteína (Austin *et al.*, 1995). Además se ha demostrado que existe una expresión diferencial tejido específico de las isoformas de la Dp71 con ó sin el exon 78. La isoforma que contiene el exon 78 se expresa en cerebro, músculo, riñones y testículos, en tanto que la variante carente de este se expresa en hígado y corazón (Austin *et al.*, 1995).

Por medio de inmunofluorescencias se ha demostrado que la Dp71 se ubica en membrana celular. En los ratones mdx, que carecen de la distrofina de 427 kDa, la presencia de Dp71 restaura al complejo DAP's en la membrana de células musculares, sin embargo no elimina los defectos musculares. Esto sugiere que las funciones de la Dp71 son diferentes a las de la distrofina de 427 kDa.

Considerando que el splicing del exon 78 modifica las propiedades fisicoquímicas de la Dp71, se ha especulado que esto puede alterar su función, posiblemente regulando las interacciones que ocurren normalmente en esta región de la proteína, o regulando su localización subcelular.

Recientemente, mediante el uso de fusiones genéticas GFP-Dp71 nuestro grupo de trabajo reportó la presencia de la Dp71 en el núcleo de diferentes líneas celulares (HeLa, C₂C₁₂, N1E115), la isoforma que presenta el exon 78 se localizó exclusivamente en núcleo, mientras que la isoforma que no posee los dominios codificados por los exones 71 y 78 presentó una localización citoplasmática (González *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la Dp71 que se expresa de manera endógena en las células HeLa presenta una localización predominantemente nuclear cuando los transcritos contienen el exon 78 y una localización citoplasmática cuando los transcritos carecen del exon 78 (Fuentes, 2000). La localización nuclear de la Dp17 no es un fenómeno restringido a un tipo celular, dado que las líneas

celulares utilizadas (que son de linaje epitelial, muscular y neuronal) hasta ahora presentan el mismo patrón de distribución subcelular.

Cabe destacar que la Dp71 no tiene una señal de localización nuclear (NLS) clásica, aunque es posible que tenga una NLS atípica. Alternativamente se sugiere que la Dp71 sea transportada a núcleo por alguna proteína que facilite su interacción con la maquinaria de transporte, y quizá se trate de alguna proteína del complejo de las DAP's, a este respecto se sabe que el β -dístroglicano tiene una NLS putativa, y que se localiza en cierta proporción en el núcleo (Fuentes, 2000).

El significado biológico de la localización nuclear de la Dp71 es desconocido, por lo que es importante estudiar como es que se regula su transporte hacia el núcleo y con que proteínas interactúa dentro de este compartimiento celular.

2 TRANSPORTE A NÚCLEO

El transporte de proteínas entre núcleo y citoplasma ocurre a través del complejo de poro nuclear (NPC). Debido al tamaño del NPC las proteínas con un tamaño menor a 40 kDa pueden entrar al núcleo por difusión pasiva, mientras que las mayores a 40 kDa deben de ingresar al núcleo mediante un transporte dependiente de señales (Sweitzer *et al*, 2000).

El importe nuclear mediado por señales requiere energía, temperatura fisiológica, una NLS y una maquinaria soluble de transporte. El proceso de importe nuclear puede describirse en tres pasos generales: 1) unión al NPC; 2) translocación y 3) la deposición de la proteína en el núcleo.

De manera clásica se ha descrito que para que una proteína sea transportada núcleo debe contener una señal de localización nuclear (NLS). Estas NLS's están formadas por algunos residuos de carácter básico, son de naturaleza altamente hidrofílica, se encuentran precedidas por una vuelta β y forman estructuras altamente antigénicas (Roberts *et al*, 1987). Existen numerosas proteínas que contienen dos o más NLS's, las cuales son requeridas para un eficiente importe nuclear y una variante de este tipo de señales son aquellas denominadas NLS's bipartitas, que consisten de dos series de aminoácidos básicos separados por 10-12 aminoácidos. Las NLS's tanto bipartitas como únicas son reconocidas por proteínas que pertenecen a la familia de la importina α , que sirven como adaptadores entre proteínas con diferentes NLS's y la importina β (Nigg, 1997).

Este complejo trimerico se une al NPC y se transloca al núcleo de manera dependiente de GTP, este paso es facilitado por la GTPasa Ran/TC4 y la proteína

p10/pp15/NTF-2. Dentro del núcleo la forma de Ran-GTP se une a la importina β desplazando a la importina α y a la proteína con la NLS (Moroianu, 1999; Nigg, 1997).

Recientemente se ha reportado que existen múltiples vías para el importe de proteínas que difieren del patrón clásico de importe nuclear, por ejemplo la hnRNP A1 es enviada a núcleo mediante una región de 38 aminoácidos llamada dominio M9, y en este caso la proteína que la reconoce en citoplasma y la lleva al núcleo se llama transportina (Pollard *et al*, 1996).

Estos dos ejemplos de importe nuclear son similares en que ambos son sensibles a la aglutinina del germen de trigo (WGA), a la ausencia de energía y a análogos de GTP no hidrolizables, además son independientes de calcio. También se han postulado otros mecanismos donde el importe depende de calcio, pero no de GTP (Sweitzer y Hanover, 1996). Otra variante de importe nuclear es la llamada piggy-back, en donde proteínas que no tienen ninguna NLS tienen que asociarse con proteínas que la contengan y así ingresar al núcleo. Ejemplos de este mecanismo son los de algunas cinasas dependientes de ciclinas (cdc2) que llegan al núcleo mediante su interacción con las ciclinas (ciclina B), las cuales son transportadas activamente a núcleo. Una vía de transporte nuclear diferente a las anteriores es la de la PKC α , esta vía no es bloqueada por anticuerpos contra la importina β ni es inhibido por la WGA, y es independiente de GTP (Schmalz *et al*, 1998).

Las principales maneras en las cuales se puede llevar a cabo la regulación del transporte a núcleo son: 1) que la proteína a ser importada sea modificada de manera tal que se afecte su capacidad de unión con el receptor (importinas); 2) que el complejo proteína-receptor se una a un componente celular insoluble, lo cual impediría su posterior importe al núcleo, y 3) que algunos elementos de la maquinaria de transporte sean modificados, principalmente por fosforilaciones lo que afectaría su interacción con las proteínas a ser transportadas.

2.1 REGULACIÓN DEL TRANSPORTE A NÚCLEO POR FOSFORILACIÓN.

Dentro de los patrones de regulación del importe nuclear, uno de los más importantes es el de la fosforilación, que tiene como función la de modular la afinidad de la proteína a ser transportada con la maquinaria de transporte nuclear.

Uno de los efectos de la fosforilación en regiones cercanas a la NLS de algunas proteínas tienen como efecto el enmascaramiento de esa NLS, lo que evita que sea

reconocida por la maquinaria de transporte. Un ejemplo de este mecanismo de regulación es el de la lamina B2, esta proteína de membrana nuclear se queda en citoplasma mediante la fosforilación de dos residuos cercanos a la NLS (Jans y Hubner, 1996). Otro caso es el del factor de transcripción Swi5 de levadura, implicado en el ciclo celular, que se encuentra en citoplasma en la fase S, mitosis y G2; en el final de la mitosis el factor Swi5 se transloca a núcleo por medio de una NLS bipartita. El factor Swi5 es fosforilado por la cdc28 (homólogo de cdc2 de mamíferos) en tres residuos de serina que se requieren para su localización nuclear. Se ha propuesto que la fosforilación previene que este factor se una con la maquinaria de importe nuclear, el decremento en la actividad de cdc28, al terminar la mitosis, es lo que lleva a estados de no fosforilados de la proteína que hacen que sea importada a núcleo (Moll *et al*, 1991).

El factor de transcripción Pho4 de levaduras esta implicado en el crecimiento de levaduras en condiciones bajas de fosfato inorgánico en el ambiente, en estas circunstancias se mantiene en el núcleo en una forma desfosforilada. En cuanto se detecta la presencia de fosfato en el ambiente, este factor se fosforila en cinco residuos de serina, y se induce su exporte del núcleo mediante su interacción con la proteína Msn5, homóloga de la importina- β , que reconoce y se une únicamente a la forma fosforilada de la proteína Pho4 (Kaffman y O'Shea, 1999).

El factor de transcripción NF-AT es importante en células T y tiene efectos importantes en el sistema inmune. El NF-AT se libera luego de la estimulación del receptor de células T, lo cual lleva a un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, activa a la calcinerina, que desfosforila y se une a NF-AT. Este complejo es translocado a núcleo y ahí activa la transcripción de genes involucrados en la respuesta inmune. El factor NF-AT pertenece a una familia de varios factores de transcripción donde el miembro NF-AT2 tiene dos NLS (una en el extremo amino y otra en el carboxilo) y una señal de exporte nuclear (NES). En este caso, la fosforilación del NF-AT2 en una de las NLS lleva a cambios conformacionales de la proteína que resultan en la interacción de las dos NLS's inactivándolas y dejando a este factor de transcripción en el citoplasma.

Un ejemplo donde la fosforilación activa el transporte a núcleo de una proteína es el del factor de transcripción NF- κ B, que se encuentra retenido en el citoplasma mediante su interacción con la proteína I κ B, la cual enmascara la NLS del factor de transcripción, estímulos activadores fosforilan específicamente tres sitios en I κ B, lo cual lo hace blanco

de degradación por la vía de la ubiquitinación, lo que libera a NF- κ B para que puede viajar al núcleo (Karin y Hunter, 1995).

IZT.

2.2 FOSFORILACIÓN DE LA DISTROFINA Y LA Dp71

Se ha demostrado que la distrofina aislada de sarcolema, triadas musculares, células de músculo esquelético cultivadas, y extractos totales de músculo se encuentra fosforilada. Esta fosforilación es sensible a tratamientos con AMPc (lo que incrementa la fosforilación aproximadamente con respecto a las células sin estímulo), GMP (que incrementa 8 veces la fosforilación) y por Ca^{2+} /calmodulina. Los sitios posibles de fosforilación se encuentran principalmente en la zona central de la proteína y en el extremo carboxilo (Luise *et al.*, 1993), y se han reportado sitios consenso para CKII, MAPK y para p34^{cdc2} (Milner, 1993; Shemanko *et al.*, 1995)

Dentro del extremo carboxilo de la proteína existen diversos residuos de aminoácidos que presentan fosforilación por diferentes cinasas, por ejemplo la CaM cinasa II fosforila a las serinas 3,616 y 3624 que se localizan en el exón 76 (Madhavan y Jarret, 1999); a la treonina 3,685, ubicada en el exón 79 y aparentemente a la serina 3,538 que se encuentra en el exón 75 (Walsh *et al.*, 1995); también se ha detectado fosforilación en la treonina 3677 y en la serina 3530; esta actividad de CaM cinasa II está asociada a membrana, lo cual es un indicio de que la distrofina puede ser fosforilada tanto por cinasas presentes en el citoplasma, así como por cinasas intrínsecamente asociadas a la membrana celular. Uno de los efectos de esta fosforilación por CaM cinasa II es la inhibición de la unión de la distrofina con la α 1-sintrofina, además se ha propuesto un mecanismo de regulación particular con el complejo Ca^{++} - CaM, en el que cuando se une este dímero de moléculas se previene la fosforilación de la distrofina en los sitios de fosforilación presentes en la región de unión, sin embargo este evento favorece la fosforilación por esta cinasa (Madhavan y Jarret, 1994; Madhavan y Jarret, 1999). Por otra parte, la cinasa p34^{cdc2} fosforila a las treoninas 3,676 y 3,685 codificadas por los exones 78 y 79, respectivamente (Madhavan y Jarret, 1994; Walsh, *et al.*, 1995) y se ha demostrado también que no hay fosforilación por esta cinasa en la región rica en cisteínas (Milner *et al.*, 1993).

Adicionalmente, la distrofina puede ser fosforilada por otras cinasas como la MAP cinasa p44^{erk1} y/o la p42^{rapk}, que modifican residuos de treonina (Shemanko *et al.*, 1995), por la cinasa de la glicogeno sintasa 3 (GSK3) (Michalak *et al.*, 1996) y por la CDK1 (Shemanko *et al.*, 1995). Sin embargo, estos sitios no han sido mapeado todavía. De manera



U.N.A.M. FES
IZTACALA

curiosa el sitio para la GSK3 se crea solamente cuando la distrofina es fosforilada por la CKII, y esta cooperatividad entre cinasas podría crear grupos de fosforilación en esta región de la proteína, aunque el significado biológico de esto es desconocido.

Existen pocos trabajos en los que se aborde al mismo tiempo el estudio de la fosforilación de la distrofina y sus efectos biológicos, en uno de estos trabajos se reporta que la distrofina puede ser fosforilada por la PKA, que es una cinasa dependiente de AMPc, y que esta fosforilación incrementa la unión con F-actina, mientras que la fosforilación por PKC o por CKII inhiben la unión entre estas dos proteínas, todos estos sitios de fosforilación se encuentran en el extremo amino terminal de la distrofina, el cual es diferente al de la Dp71 (Senter *et al.*, 1995).

Así mismo, la distrofina puede ser desfosforilada por calcineurina y por SMP-1, que es una fosfatasa de tipo2A, aunque con una actividad 3 veces menor que la calcineurina (Walsh *et al.*, 1995).

Aún no se ha demostrado completamente que la distrofina sea fosforilada por PKC, ya que existen reportes en los que se aísla la proteína de músculo y si se utiliza estaurosporina, que inhibe a la PKC, decrementa la fosforilación de la distrofina (Luis *et al.*, 1993), lo que apunta hacia una posible participación por parte de PKC para fosforilar a la distrofina, pero también hay reportes en los que en ensayos *in vitro* la distrofina no es sustrato de PKC adicionada exógenamente, y además mediante ensayos de fosforilación *in vitro* con PKC de cerebro no hay detección de la incorporación de fósforo radioactivo a proteínas de fusión con la secuencia del extremo carboxilo terminal de la distrofina (Milner *et al.*, 1993; Shemanko *et al.*, 1995).

Hablando específicamente de la Dp71, el único reporte que habla sobre su fosforilación, es un reporte en el que sobre-expresan la Dp71 en células musculares de ratones *mdx*, y se menciona que esta proteína se marca metabólicamente utilizando P³² en el medio de cultivo, y que utilizando inhibidores de cinasas se modifica la movilidad electroforética de la Dp71, lo cual indica que hay fosforilación de la misma, sin embargo no hay que perder de vista que esta proteína fue sobre-expresada, y que se utiliza un modelo muscular, donde normalmente no hay Dp71. Además, si bien es cierto esta Dp71 sobre-expresada en músculo es capaz de restaurar el complejo de las DAP's en membrana muscular, no puede reparar los daños causados por la ausencia de la distrofina, lo cual sugiere que estas proteínas tienen una función diferente (Cox *et al.*, 1994).

Hasta la fecha solamente se ha reportado que la distrofina es fosforilada en residuos de serina y de treonina, pero no en tirosina (Luise *et al*, 1993), también se han hecho mapas peptídicos en los que no se detecta fosforilación en tirosina (Madhavan y Jarret, 1999).

Es importante señalar que algunos miembros de las DAP's también son fosforilados, la distrobrevina presenta fosforilación en tirosina y se cree que esta modificación regula la distribución de la isoforma de distrobrevina PYCT⁺ (Balasubramanian *et al*, 1998).

El β -dístroglicano se fosforila en residuos de tirosina y esta modificación afecta negativamente su interacción con la utrofina. En este caso se demostró que la fosforilación es, además, dependiente de la adhesión celular (James *et al*, 2000).

Tomando en cuenta que la distrofina comparte los dominios rico en cistinas y carboxilo terminal con la Dp71, es razonable suponer que la fosforilación que sufre la distrofina en estos dominios también está presente en la Dp71. De hecho, se ha demostrado que la Dp71 se fosforila en residuos de serina y treonina en un ratón transgénico que expresa a la Dp71 en el músculo esquelético (Cox *et al*, 1994).

De manera interesante, el sitio para fosforilación ubicado en el exón 78 para la cinasa p34^{cdc2}, y el sitio del exón 79 para CaM cinasa II se perderían cuando la Dp71 sufre splicing alternativo de este exón y en su lugar aparecería un sitio de fosforilación para la CKII, dentro de los 31 residuos que se adicionan cuando ocurre el corrimiento en el marco de lectura de la Dp71. Tomando en cuenta que la isoforma nuclear de la Dp71 contiene el dominio codificado por el exón 78 y que la isoforma citoplasmática carece de este, es interesante analizar la posible participación de la fosforilación en la localización subcelular de las dos isoformas de la Dp71.

B) 3.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la fosforilación de la Dp71 en células PC12.

OBJETIVOS PARTICULARES

Demostrar la fosforilación de la Dp71 endógena en las células PC12.

Determinar el efecto de TPA, suero y AMPc sobre la fosforilación de la Dp71 en células PC12.

C) 4.- METODOLOGÍA

Cultivo celular

Las células PC12 se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero inactivado de caballo, 5% de suero fetal bovino, 25 U/ml de penicilina y 25 µg/ml estreptomycin. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con CO₂ al 5%.

Los estímulos se hicieron agregando al medio de cultivo TPA a una concentración final de 100 nM, AMPc 500µM y para el suero, se cambió el medio de las células una noche antes de hacer el estímulo con una concentración de suero fetal bovino de 2.5%, y esta concentración se elevó hasta 15 y 20%. Todos los estímulos fueron por espacio de 1 hora y de 30 min para el caso del estímulo de suero de al 20%.

Obtención de extractos de proteínas totales

Para el aislamiento de proteínas el medio de cultivo se aspiró mediante vacío, y las células se lavaron con 1 ml de PBS; el PBS se removió por aspiración y se adicionaron 500 µl de RIPA 2X(EGTA 2 mM, Tris HCl pH7.5 20 mM, NaCl 316 mM) suplementado con inhibidores de fosfatasa (Na₃VO₄ 20 mM, Na₂MoO₄ 20mM, NaF 50mM) y con inhibidores de proteasas (mini-complete Roche Labs). La mezcla resultante se pasó de 3 a 5 veces por una jeringa de 1 ml, y se incubó en hielo por 15 min y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford.

Inmunoprecipitación.

Se tomaron de 1 a 2 mg de proteína y se incubaron en agitación constante durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo inmunoprecipitante (H5A3 para la distrofina de 427 kDa y las dos isoformas de la Dp71, y 5F3 para la isoforma de la Dp71 que carece del exón 78) acoplado a agarosa-proteína A.. Después de la incubación el inmunoprecipitado se centrifugó en frío por 15 minutos a 13,000 rpm y la pastilla se lavó 2-4 veces con NET-BSA (BSA 0.25%, TrisHCl pH 7.5 50mM, NaCl 150 mM, NP-40 0.1%, EDTA pH 8.0 1 mM, Na₃VO₄ 1mM, Na₂MoO₄ 20 mM, NaF 10 mM, PMSF 0.5 mM). Los lavados tienen como función la remoción de las proteínas que se unieron inespecíficamente a la agarosa-proteína A.

Inmunodetección en fase sólida

La pastilla de agarosa-proteína A obtenida del inmunoprecipitado se disolvió en 25 μ l del amortiguador de muestra y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente del 3 al 10 %. La electroforesis se corrió a 120 volts por 90-120 min.

Las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa empleando 35 volts durante toda la noche. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau, para corroborar que las proteínas se transfirieron eficientemente a la membrana. La membrana se bloqueó por una hora con leche al 6% y finalizado este lapso de tiempo se mantuvo en PBS hasta que se colocó en contacto con el anticuerpo a probar. El anticuerpo primario H5A3, se uso a una dilución de 1:100 en TBST y de 1:200 para 5F3. Se emplearon 500 μ l de la solución por carril, y la incubación fue por toda la noche.

Posteriormente, la membrana se lavó por 5, 10 y 15 min con TBST, y se incubó con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5,000. Se utilizaron los mismos volúmenes que para el caso del anticuerpo primario.

La membrana se lavó de nuevo por 5, 10 y 15 min con TBST, y se procedió con el revelado de la placa por quimioluminiscencia (ECL). Se colocó sobre la superficie de la membrana 700 μ l de la solución A y 700 μ l de la solución B; pasado 1 min se removió el exceso de líquido y se expuso la membrana a una placa radiográfica por 5 min y/o por 1 hora. La membrana se desnudó de acuerdo a las condiciones recomendadas por el vendedor y se reprobó con otros anticuerpos primarios.

D) 5.-RESULTADOS.

Obtención de extractos totales de proteínas de células PC12.

Un primer paso en el estudio de la fosforilación de la Dp71 en las células PC12 fue la estandarización de la obtención de extractos proteicos a partir de esta línea celular. Para este fin, utilizamos células a una confluencia mayor al 80%, y el método de extracción de proteínas denominado RIPA. Con esta metodología se obtuvieron concentraciones de proteínas que variaron entre los 3 y 6 μg de proteína por μl . En la figura 1 se muestra el perfil de proteínas totales de las células PC12 en donde es evidente la integridad de las proteínas tanto de alto como de bajo peso molecular.

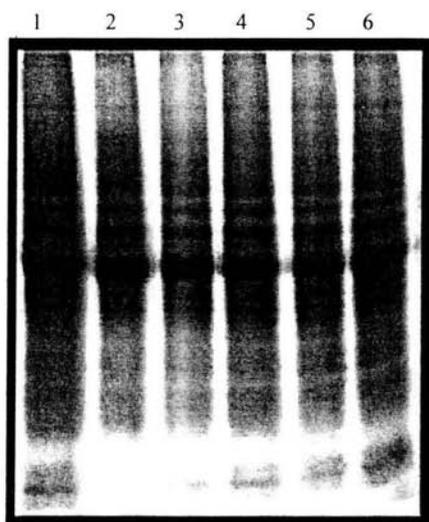


Figura 1. Perfil de proteínas totales de las células PC12. Los extractos de proteínas se obtuvieron por el método de RIPA, como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se muestra un gel de poli-acrilamida en gradiente del 3 al 10% con SDS, teñido con azul de coomassie. Los carriles 1 y 2 corresponden a extractos obtenidos a partir de cultivos controles de células PC12. En los carriles 3-4 y 5-6 se muestran los perfiles de proteínas obtenidos de las de células PC12 estimuladas con TPA y suero, respectivamente.

Se decidió probar la especificidad de los anticuerpos H5A3 y 5F3, que reconocen a la Dp71, para lo cual se empleó la técnica de electro-transferencia y detección en fase sólida. El anticuerpo H5A3, reconoce una parte de la Dp71 que está localizada en la región codificada por los exones 74 y 75 de la distrofina, los cuales son compartidos por las isoformas de la Dp71 que tienen y que carecen del exón 78. Por su parte, el anticuerpo 5F3 reconoce la secuencia de los últimos 31 aminoácidos de la región carboxilo terminal de la isoforma de la Dp71 que carece del dominio codificado por el exón 78. Para estas pruebas se emplearon extractos de proteínas totales de células PC12 y de cerebro de ratón, este último a manera de control positivo de la reacción.

Una inmunodetección típica utilizando ambos anticuerpos se muestra en la figura 2. Con el anticuerpo 5F3, la señal correspondiente a la Dp71 se observó abajo del marcador de 68 kDa (carriles 2-4) mientras que con el anticuerpo H5A3 la banda de esta proteína migró arriba del marcador mencionado (carriles 5-7). La validez de estos resultados se corroboraron en extractos de cerebro (carriles 1 y 8). El anticuerpo H5A3 detectó además una banda que migró arriba del marcador de 200 kDa. En las células PC12, esta señal corresponde a la utrofina (carriles 5-7) ya que esta línea celular no expresa a ninguna de las distrofinas de 427 kDa. En el extracto de cerebro, esta banda puede corresponder a la distrofina de 427 kDa y/o a la utrofina. La banda inferior del marcador de 200 kDa es de origen no identificado, y considerando que en las células PC12 solo se expresa la Dp71, lo más probable es que esta banda sea un producto inespecífico no relacionado con las distrofinas, por lo que esta banda no se toma en cuenta en los ensayos con el anticuerpo H5A3.

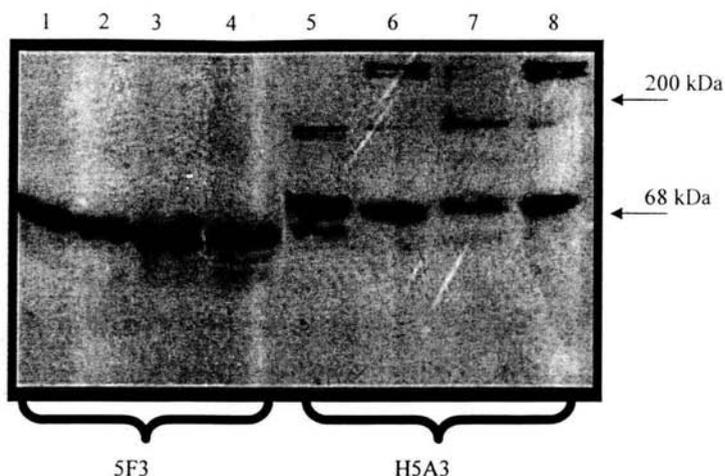


Figura 2. Inmunodetección de la Dp71 en las células PC12. Los extractos de proteínas se obtuvieron como se describe en Materiales y Métodos. Se cargaron 80 μ g de proteínas en cada carril del gel de poliacrilamida y estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, como se describe en Materiales y Métodos. La detección de la Dp71 se realizó mediante el uso del anticuerpo 5F3 (carriles 1-4) ó H5A3 (carriles 5-8). Proteínas de cerebro de ratón (carriles 1 y 8). Proteínas de las células PC12 (carriles 2-7). En el lado derecho de la figura se señalan los marcadores de peso molecular.

Inmunoprecipitación de distrofina y DP71 con anti-fosfoaminoácidos.

Una de las estrategias utilizadas para evidenciar la fosforilación de alguna proteína en particular es la utilización de anticuerpos que reconocen residuos de aminoácidos fosforilados como la serina, treonina o tirosina. Con estos anticuerpos se puede inmunoprecipitar a las proteínas que presenten fosforilación en cualquiera de estos aminoácidos dentro de cualquier lugar en su secuencia y posteriormente se puede revelar la señal de la proteína con el empleo de anticuerpos específicos. Por lo tanto, para investigar si la Dp71 esta fosforilada en las células PC12, se realizaron ensayos para inmunoprecipitarla con anticuerpos que reconocen aminoácidos fosforilados. En base a los antecedentes de que la distrofina 427 se fosforila en residuos de serina y treonina, la primera reacción de inmunoprecipitación de la Dp71 se hizo con anticuerpos antifosforserina y la inmunodetección con el anticuerpo H5A3. En la figura 3 se observa la detección de un par de bandas a la altura de 68 kDa, que podrían corresponder a la Dp71; la banda

adicional que se observa a la altura de 29 kDa corresponde a las cadenas ligeras de los anticuerpos antifosfo-serina.

En el siguiente ensayo se utilizó una mezcla de anticuerpos antifosfo-serina y antifosfo-treonina en una sola reacción de inmunoprecipitación con el fin de detectar más fácilmente cualquier posible fenómeno de fosforilación en células PC12 sin ningún tipo de estímulo y se reveló utilizando el anticuerpo H5A3. En la figura 4A se observa la detección de la banda correspondiente a la Dp71, y otra señal superior al marcador de 200 kDa que identifica a la utrofina. Con este resultado se decidió utilizar los anticuerpos inmunoprecipitantes por separado, y en este caso se observó que la señal de la Dp71 es de una intensidad mayor cuando la inmunoprecipitación se llevó a cabo con el anticuerpo antifosfo-treonina comparado con la señal obtenida con el anticuerpo antifosfo-serina (figura 4B).

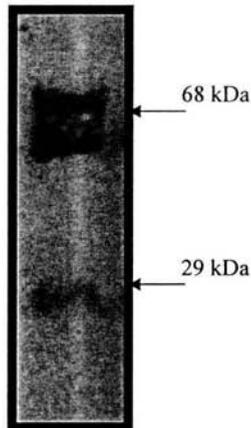


Figura 3. Fosforilación de la Dp71 en residuos de serina. Un extracto de proteínas totales de las células PC12 sin ningún estímulo se inmunoprecipitaron con anticuerpos antifosfo-serina y se revelaron con el anticuerpo H5A3, como se describe en Materiales y Métodos. Las bandas a la altura del marcador de 68 kDa corresponden a la Dp71, y la señal al nivel del marcador de 29 kDa corresponde las cadenas ligeras de los anticuerpos inmunoprecipitantes.

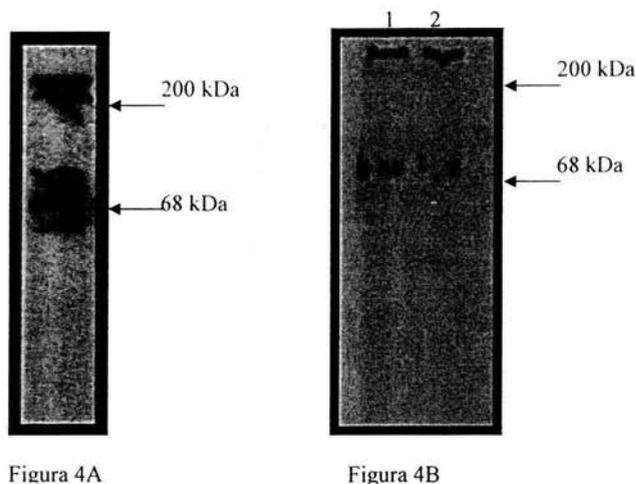


Figura 4. Fosforilación de la Dp71 y de utrofina. Los extractos de proteínas totales de las células PC12 se inmunoprecipitaron con una mezcla de anticuerpos anti-fosfoserina y anti-fosfotreonina (A) o con cada anticuerpo por separado (B) y se revelaron con el anticuerpo H5A3 como se describe en Materiales y Métodos. Carriles: 1, extractos inmunoprecipitados con anticuerpos antifosfotreonina, 2, extractos inmunoprecipitados con anticuerpos anti-fosfoserina. Estos extractos se dejaron correr mas tiempo por lo que no se observa la banda de las cadenas ligeras de los anticuerpos inmunoprecipitantes como en la figura anterior.

Antes de proseguir con los experimentos de inmunoprecipitación con los tres antifosfoaminoácidos y su posterior inmunodetección con los anticuerpos antidistrofina, se realizó una reacción de inmunoprecipitación con los antifosfoaminoácidos y se inmunodetectó con un anticupero anti-MAPK, que reconoce a las enzima ERK-1 y ERK-2, esto con la finalidad de poder manejar la reacción de inmunoprecipitación, ya que se ha reportado que estas proteínas se encuentran fosforiladas de manera basal y esta fosforilación es afectada mediante el uso de diferentes estímulos.

En la figura 5 se observan un par de bandas a al altura de 43 kDa, estas bandas corresponden a las isoformas de ERK 1 (44 kDa) y ERK-2 (42 kDa), este ensayo comprueba que no hay problemas para llevar a cabo las reacciones de inmunoprecipitación, además de que se puede observar que hay un incremento en la señal de los inmunoprecipitados en las células estimuladas con TPA y suero, con respecto al control (carriles 6 y 5 con el 7), y en extractos totales la intensidad no varía demasiado, aunque se

observó un ligero aumento con los estímulos, este es mas evidente en los inmunoprecipitados.

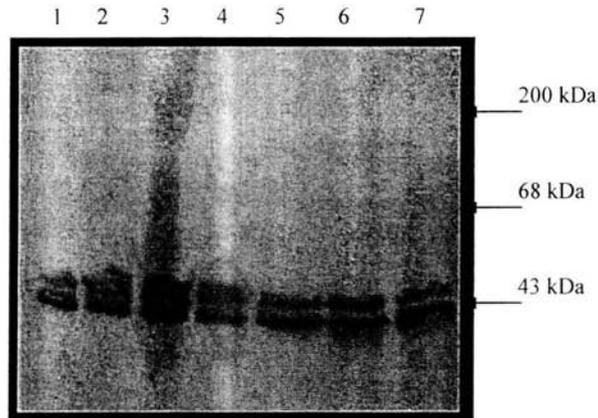


Figura 5. Ensayos control para inmunoprecipitación con antifosfoaminoácidos. Se llevaron a cabo reacciones de inmunoprecipitación con el anticuerpo antifosfo-tirosina, y se inmunodetectaron ERK-1 y ERK-2, de la misma manera que se describe en materiales y metodos. Carriles: 1. extracto total de proteínas de cerebro de rata; 2 extracto total de PC12 estimulada con suero; 3 extracto total de PC12 estimuladas con TPA; 4 extracto total de PC12 sin estímulo; 5 inmunoprecipitado con antifosfo-tirosina de células PC12 estimuladas con suero; 6 inmunoprecipitado con antifosfo-tirosina de células PC12 estimuladas con TPA; 7 inmunoprecipitado con antifosfo-tirosina de células PC12 sin estímulo.

Una conclusión que se obtiene de las figuras 3 y 4 es que la Dp71 se fosforila de manera basal y con la finalidad de conocer como se regula la fosforilación de la Dp71, se utilizaron en un inicio ensayos de inmunoprecipitación de la Dp71 en células PC12 estimuladas con TPA (el TPA es un estér de forbol que estimula a la proteína cinasa C, [(PKC)], AMPc (que estimula a la proteína cinasa A, [PKA]) y con incremento de suero (para estimular varios tipos de cinasas a la vez). Las reacciones de inmunoprecipitación se realizaron con anticuerpos antifosfo-serina, antifosfo-treonina y antifosfo-tirosina por separado. Como se observa en la figura 6, las bandas a nivel del marcador de 68 kDa, que corresponden a la Dp71 de las células que fueron estimuladas con TPA por 30 minutos presentan un incremento sustancial en su intensidad. Este fenómeno se observó con los tres antifosfo-aminoácidos diferentes, las intensidades de estas bandas se cuantificaron

densitométricamente y se obtiene un valor de 18 para cada uno de los tres antifosfoaminoácidos (estas medidas son arbitrarias), estos valores se incrementan cuando las células son estimuladas con TPA y los valores se elevan un 22% más que en el control para fosfoserina, 44% para fosfotreonina, y a 61% para fosfotirosina. También se observa la banda correspondiente a utrofina, la banda superior al marcador de 200 kDa, esta banda no sufre cambios en la intensidad aun con la diferencia en los tratamientos, lo cual indica que la respuesta para Dp71 es específica. Se observó una banda inferior que podría también derivarse de la Dp71, sin embargo no hay evidencia de que se expresen otros miembros de la familia de la distrofina en esta línea celular por lo que el origen de esta banda así como de la banda que se observa entre el marcador de 68 kDa y el marcador de 200 kDa son de origen desconocido.

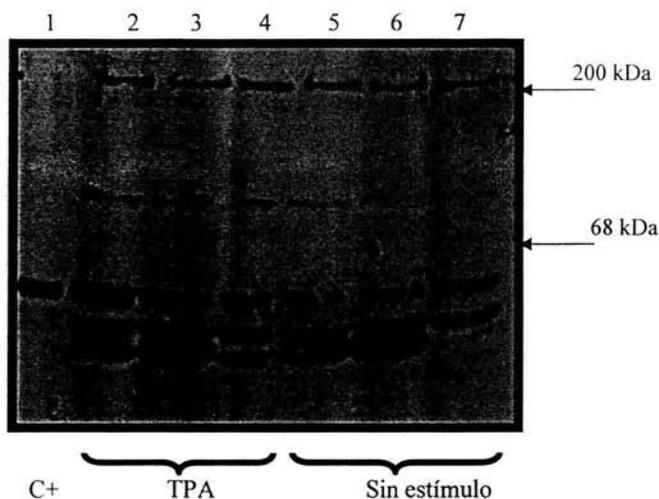


Figura 6. Fosforilación de la Dp71 en las células PC12 estimuladas con TPA. La inmunoprecipitación de los extractos de proteínas y la detección con el anticuerpo H5A3 de llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se observa un doblete a la altura de 68 kDa, que corresponde a la Dp71 y una banda superior a los 200 kDa, que corresponde a utrofina. Carriles: 1, extracto total de proteínas de cerebro, 2 y 5, extractos inmunoprecipitados con antifosfo-tirosina; 3 y 6, extractos inmunoprecipitados con antifosfo-treonina y 4 y 7, extractos inmunoprecipitados con antifosfo-serina. Sin estímulo, células sin tratamiento. TPA, células estimuladas con este compuesto. En el lado derecho de la figura se señalan los marcadores de tamaño.

En la figura 7 se observa el resultado de las inmunoprecipitaciones con células PC12 estimuladas con AMPc, y suero. En estas condiciones las intensidades de las bandas no cambian con respecto a las células sin estímulo, aun cuando se observa un decremento en las bandas de las células tratadas con suero. También se observa la banda correspondiente a utrofina (arriba del marcador de 200 kDa), y esta banda no sufre cambios en su intensidad con ninguno de los tratamientos.

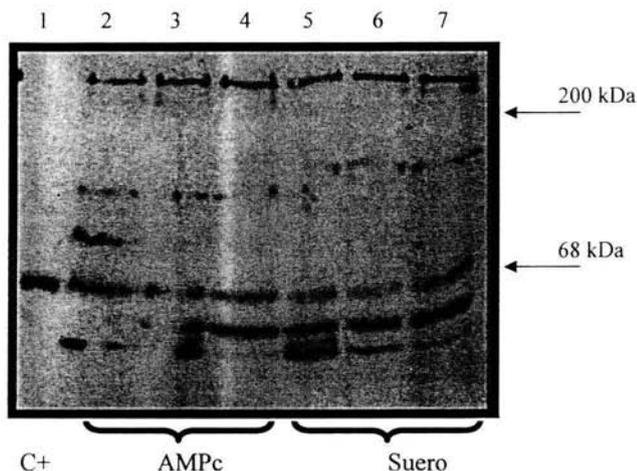


Figura 7. Fosforilación de la Dp71 en las células Pc12 estimuladas con suero y AMPc. La inmunoprecipitación de los extractos de proteínas y la detección con el anticuerpo H5A3 se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Carriles: 1., extracto total de proteínas de cerebro, como control positivo; 2 y 5, inmunoprecipitación con antifosfotirosina; 3 y 6, inmunoprecipitación con antifosfo-treonina; 4 y 7: inmunoprecipitación con antifosfo-serina. AMPc, células estimuladas con AMP cíclico. Suero, células estimuladas con suero. En el lado derecho de la figura se señalan los marcadores de tamaño.

Con el objetivo de corroborar estas observaciones, se repitió el ensayo de la estimulación de las células con TPA y suero, en esta ocasión la concentración de suero se elevó hasta 20% y no a 15% como en la figura 6. Como se observa en la figura 8, se obtiene nuevamente una fosforilación basal en las células sin estímulo y esta fosforilación se incrementa cuando las células se estimulan con TPA, por esto la fosforilación de la Dp71 en respuesta al TPA es reproducible.

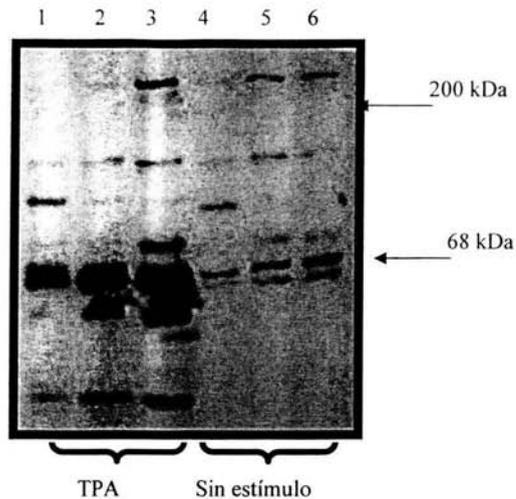


Figura 8. Fosforilación de la Dp71 e las células PC12 estimuladas con TPA y suero. La inmunoprecipitación de los extractos de proteínas y la detección con el anticuerpo H5A3 de llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se observa un doblete a la altura de 68 kDa, que corresponde a la Dp71 y una banda superior a los 200 kDa, que corresponde a utrofina. Carriles: 1 y 4 inmunoprecipitaciones con anti-fosfotirosina; carriles 2 y 5 inmunoprecipitaciones con anti-fosfotreonina; carriles 3 y 6 inmunoprecipitaciones con antifosfoserina. TPA, células estimuladas con este compuesto. Sin estímulo, células sin tratamiento. En el lado derecho de la figura se señalan los marcadores de tamaño.

Con la finalidad de averiguar si la fosforilación de la Dp71 está presente en la isoforma de esta proteína que carece del dominio codificado por el exon 78, se utilizaron las membranas analizadas previamente con el anticuerpo H5A3 y se reprobaron con el anticuerpo 5F3, que reconoce a los 31 aminoácidos que se incorporan a la molécula cuando se pierde el exon 78. En la figura 9 observamos la presencia de una banda a la altura del marcador de 68 kDa correspondiente a la Dp71, no observamos las bandas superiores presentes cuando se revela con el anticuerpo H5A3, lo cual es un indicio de que la señal obtenida en este caso es específica para la isoforma de la Dp71 que no tiene el exon 78. De manera interesante, se observó que la isoforma de la Dp71 (-78) no presenta fosforilación en serina bajo ninguna de las condiciones experimentales (Figuras 9 y 10) y la señal incluso

es menor en las células estimuladas con TPA, sobre todo en el caso de los inmunoprecipitados con anti-fosfotirosina. Sobre todo para el caso del inmunoprecipitado con antifosfo-tirosina. En las células estimuladas con suero solo se detecta a la DP71 (-78) cuando se inmunoprecipita con el anticuerpo antifosfo-tirosina (figura 10) y la señal de la Dp71 en células estimuladas con AMPc se mantiene constante para serina y tirosina.

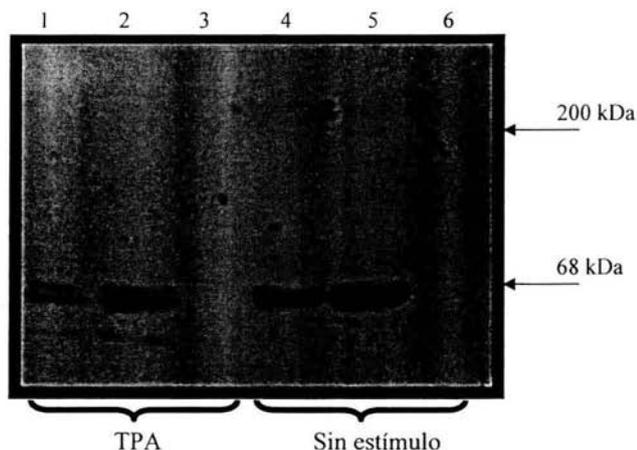


Figura 9. Fosforilación de la isoforma de la Dp71 (-78) en células PC12 estimuladas con TPA. La inmunoprecipitación de la Dp71 con anticuerpos anti-fosfo aminoácidos y el revelado con el anticuerpo anti-Dp71 5F3 se llevo a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Carriles: 1 y 4: inmunoprecipitación con antifosfo-tirosina; 2 y 5: inmunoprecipitación con antifosfo-treonina; carriles 3 y 6: inmunoprecipitación con antifosfo-serina. TPA, células estimuladas con este compuesto. Sin estímulo, células sin tratamiento.

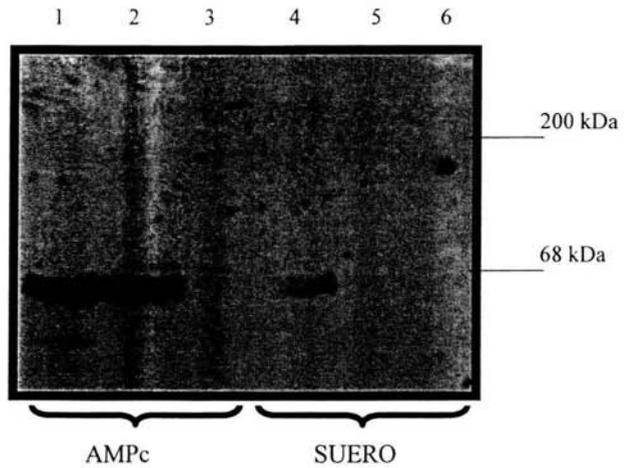


Figura 10. Fosforilación de la Dp71 en las células Pc12 estimuladas con suero y AMPc. La inmunoprecipitación de la Dp71 con anticuerpos anti-fosfo aminoácidos y el revelado con el anticuerpo anti-Dp71 5F3 se llevo a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Carriles: 1 y 4: inmunoprecipitación con antifosfo-tirosina; 2 y 5: inmunoprecipitación con antifosfo-treonina; carriles 3 y 6: inmunoprecipitación con antifosfo-serina. AMPc, células estimuladas con AMP cíclico. Suero, células estimuladas con suero.

E) 6.- DISCUSIÓN

Recientemente se han descrito varios estudios sobre las isoformas de la Dp71 generadas por variaciones en el corte y empalme del RNA mensajero primario (Austin *et al.*, 2000; Chavez *et al.*, 2000). De manera interesante, nuestro grupo de investigación demostró que las isoformas alternativas de la Dp71 presentan una localización diferencial en las células PC12, HeLa y N1E115. La isoforma que carece de los dominios codificados por los exones 71 y 78 tiene una localización citoplasmática mientras que la isoforma - 71/+78 tiene una localización nuclear.(González *et al.*, 2000).

El transporte nuclear de proteínas esta regulado principalmente por la presencia de señales de localización nuclear (NLS) presentes en la molécula cargo. Estas señales consisten en un grupo de aminoácidos básicos que son reconocidos por una familia de proteínas conocidas como importinas. Sin embargo, la presencia de una NLS en la molécula a ser transportada no asegura su ingreso al núcleo, se ha demostrado que la fosforilación de la proteína a transportar regula el funcionamiento de la NLS (Jans y Hubner, 1996). La fosforilación de proteínas puede anclar a la molécula cargo al citoplasma, impidiendo su viaje a núcleo, o bien puede liberar a la proteína de alguna interacción que la mantenía secuestrada en el citoplasma permitiendo así su ingreso al núcleo. (Moll *et al.*, 1991; Karin y Hunter, 1995; Heist *et al.*, 1998). A este respecto, es importante mencionar que en el dominio codificado por el exón 78 de la Dp71 existe un sitio de fosforilación para la cinasa p34^{cdc2} (Milner *et al.*, 1993; Shemanko *et al.*, 1995), y un sitio para la CaM cinasa II en el dominio codificado por el exón 79. Estos sitios potenciales para fosforilación se pierden cuando se remueve el exón 78 por procesamiento alternativo del RNAm. Así mismo este procesamiento del transcrito inserta un nuevo sitio de fosforilación para la CKII. Tomando en consideración estos antecedentes es posible que la fosforilación de la Dp71 este regulando su localización subcelular.

Hasta ahora solo se ha reportado la fosforilación de la distrofina de 427 kDa (Luise *et al.*, 1993; Milner *et al.*, 1993; Madhavan Y Jarret, 1994; Walsh *et al.*, 1995; Shemanko *et al.*, 1995; Michalak *et al.*, 1996; Madhavan y Jarret, 1999), y respecto a la Dp71, solo existe un reporte de su fosforilación, esto en un ratón transgénico que expresa de manera antinatural a esta distrofina en musculo. (Cox *et al.*, 1994).

Con base a los antecedentes mencionados, en este estudio decidimos averiguar si la Dp71 se fosforila en las células PC12. Nuestros resultados indican que la Dp71 es fosforilada en residuos de serina y de treonina (figuras 3 y 4) lo cual coincide con lo reportado para la distrofina de 427 kDa, cuyo extremo carboxilo, compartido con la Dp71, es fosforilado en ambos residuos por una gran cantidad de cinasas (Milner *et al.*, 1993; Madhavan Y Jarret, 1994; Walsh *et al.*, 1995; Shemanko *et al.*, 1995; Michalak *et al.*, 1996; Madhavan y Jarret, 1999). Sin embargo, detectamos que la Dp71 puede ser fosforilada también en residuos de tirosina; a este respecto se sabe que dentro de la secuencia de la distrofina 427kDa hay un sitio consenso (tirosina 3215) para fosforilación por tirosin cinasas, pero no existen reportes que avalen su funcionalidad (Luise *et al.*, 1993; Madhavan y Jarret, 1999). Esta tirosina se encuentra dentro del sitio rico en cisteínas de la Dp71, que es importante para las interacciones que lleva a cabo con diferentes proteínas del complejo de DAP's, por lo cual su fosforilación podría ser un elemento importante en la regulación de estas interacciones. Estos resultados indican que existe una fosforilación particular para Dp71, que no es la misma que para la distrofina y esto apoya la idea de que la función de estas proteínas es diferente, además pueden formar complejos DAP's que cambien en su composición.

Nuestros resultados demostraron que la fosforilación de la Dp71 es sensible a TPA; este compuesto es un ester de forbol que estimula a la PKC. De hecho, ante este estímulo se observó un incremento en la fosforilación de los tres diferentes tipos de aminoácidos. Estos datos son novedosos ya que incluso para la distrofina 427 kDa no es claro si la PKC puede fosforilar a la distrofina (Luise *et al.*, 1993; Shemanko *et al.*, 1995). La familia de PKC comprende al menos 12 isoformas que se dividen en tres grupos: las PKCs clásicas que se denominan, α , β_1 , β_{II} , y γ , que son sensibles a Ca^{2+} , diacil-glicerol, o ester de Forbol (como el TPA); las PKCs nuevas, llamadas δ , ϵ , η , θ , y μ , que son sensibles a DAG y ester de forbol, pero no a calcio; y las PKCs atípicas, ζ y λ/ι , que son insensibles a calcio, DAG y ester de forbol (Wooten *et al*, 2001). Por todo esto será importante averiguar cual de las PKCs sensibles a ester de forbol, clásicas y nuevas, es la causante de la fosforilación de la Dp71.

Contrario a lo reportado de que el AMPc incrementa hasta 6 veces la fosforilación de la distrofina 427 kDa (Luise *et al*, 1993) nosotros no pudimos detectar cambio alguno en la fosforilación de la Dp71 en presencia de este compuesto (figuras 5 y 6).

En este estudio también observamos que la isoforma de la Dp71 -78 es fosforilada en residuos de treonina y de tirosina, pero no en residuos de serina. Cuando se remueve el exon 78 se eliminan dos treoninas de la molécula (una codificada en el exón 78 y otra en el exon 79), pero se mantienen los residuos de serina, de los cuales hay dos en el dominio codificado por el exón 76. Estos resultados pueden explicarse con base a que a que el procesamiento del exón 78 puede ocasionar cambios conformacionales en la proteína que hagan inaccesibles a los residuos de serina para la acción de las cinasas.

Para completar una idea sobre la fosforilación de las diferentes isoformas de la dp71 es necesario ejecutar experimentos paralelos con el empleo de anticuerpos que distingan específicamente a la isoforma +78.

Consideramos que el presente estudio establece las bases para estudiar el papel fisiológico de la fosforilación de la Dp71. Un fenómeno interesante que debe de evaluarse es la participación de la CaM cinasa II, la CKII y la p34cdc2 dado que estas cinasas tienen sitios de fosforilación en el exon 78 o en el exon 79, esto quizá mediante el uso de inhibidores específicos para cada una de estas cinasas además de determinar si esta modificación post-traducciona regula la localización subcelular de las isoformas de la Dp71 en las células neuronales PC12.

IZT.

F) 7.-CONCLUSIONES



La Dp71 se fosforila de manera basal en residuos de treonina, serina y tirosina

La fosforilación de la Dp71 se estimula con TPA.

La isoforma Dp71 -78 no se fosforila en residuos de serina.

G) 8.- BIBLIOGRAFÍA

Austin R.C., Howard P.L., D'Souza V.N., Klamut H.J. y Ray P.N. 1995. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum. Mol. Gen.* **4**: 1475-1483.

Austin R.C., Morris G.E., Howard P.L., Klamut H.J., y Ray P.N. 2000. Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord.* **(3)**:187-93

Balasubramanian S., Fung E.T. y Haganir R.L. 1998. Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of distrobrevin isoforms. *FEBS Lett.* **432**: 133-140.

Blake D.J., y Kroger S. 2000. The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?. *TINS.* **23**: 92-99.

Cartaud A., Coutant S., Petrucci T. y Cartaud J. 1998. Evidence for *in situ* and *in vitro* association between β .dystroglycan and the subsynaptic 43K rapysin protein. *J. Biol. Chem.* **273**:11321-11326.

Cavaldesi M., Macchia G., barca S., Defilippi P., Tarone G. y Petrucci T.C. 1999. Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J. Neurochem.* **72**:1648-1655.

Chavez O., Harricane M.C., Aleman V., Dorbani L., Larroque C., Mornet D., Rendon A., y Martinez-Rojas D. 2000. Mitochondrial expression of a short dystrophin-like product with molecular weight of 71 kDa. *Biochem Biophys Res Commun* **274**:275-80

Cisneros B., Rendón A., Genty V, Aranda G., Marquez F., Mornet D. y Montañez C. 1996. Expresión of dystrophyn Dp71 during PC12 cells differentiation. *Neuros. Lett.* **213**:107-110.

Cox G.A., Sunada Y., Campbell K.P. y Chamberlain J.S. 1994. Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nat. Genet.* **8**: 333-339.

Di Vignano A.T., Di Zenzo G., Sudol M., Cesaren G. y Dente L. 2000. Contribution of the different modules in the utrophin carboxy-terminal region to the formation and regulation of the DAP complex. *FEBS Lett.* **471**: 229-234.

Fuentes M.L. 2000. Estudios del mecanismo del transporte de la Dp71 en células HeLa. Tesis de maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

González E., Montañez C., Ray P.N., Howard P.L., García-Sierra F., Mornet D. y Cisneros B. 2000. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of Dystrophin Dp71. FEBS letters. 24154:1-6.

Howard P.L., Klamut H.J. y Ray P.N. 1998. Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. FEBS Lett. **441**: 337-341.

James M., Nuttal A., Ilsey J.L., Ottersbach K., Tinsley J.M., Sudol M. y Winder S.J. 2000. Adhesion dependent tyrosine phosphorylation of β -dystroglycan regulates its interaction with utrophin. J. Cell Sci. **113**: 1717-1726.

Jans D.A. y Hubner S. 1996. Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. Physiol. Rev. **76**: 651-685.

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

Kaffman A. y O'Shea E.K. 1999. Regulation of nuclear localization: A key to a door. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **15**:291-339.

Karin M., y Hunter T. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. Curr. Biol. **5**:747-757

Koenig M., Monaco A.P. y Kunkel L.M. 1988. The complete sequence of dystrophin products a rod shaped cytoskeletal protein. Cell. **53**: 219-226.

Luise M., presotto G., Senter L., Bello R., Ceoldo S., Furlan S., Salvatori S., Sabbadini R.A. y Salviati G. 1993. Dystrophin is phosphorylated by endogenous protein kinases. Biochem. J. **293**:243-247.

Madhavan R. y Jarret H.W. 1994. Calmodulin activated phosphorylation of dystrophin. Biochem. **355**: 5797-5804.

Michalak M., Fu S.Y., Milner R.E., Busaan J.L. y Hance J.E. 1996 Phosphorylation of the carboxil-terminal region of dystrophin. Biochem. Cell Biol. **74**: 431-437.

Milner R.E., Busaan J.L., Holmes Ch. F.B., Wang J.H. y Michalak M. 1993. The carboxil-terminal region of dystrophin is a substrate for *in vitro* phosphorylation by p34 cdc2 protein kinase. J. Biol. Chem. **268**: 21901-21906.

Moll T., Tebb G., Surane U., Robitsch H. y Nasmyth K. 1991. The role of phosphorylation and the cdc28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell*. **66**:743-758.

Moroianu J. 1999. Nuclear import and export: transport factors, mechanisms and regulation. *Crit. Rev. Eukary. Gen Exp*. **9**: 89-106.

Pollard V.W., Michael W.M., Nakielny S., Siomi M.C., Wang F. y Dreyfuss G. 1996. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*. **86**: 985-994.

Madhavan R. y Jarret H.W. 1999. Phosphorylation of dystrophin and α -synthrophin by Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochem. Biophys. Acta*. **1434**: 260-274.

Nigg E.A. 1997. Nucleocytoplasmatic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*. **386**: 779-787.

Rando O.J., Zhao K. y Crabtree G.R. 2000. Searching for a function for nuclear actin. *Trends in Cell Biol*. **10**: 92-97.

Roberts B., Richardson W. D, y Smith A.E. 1987. The effect of protein context on nuclear localization signal function. *Cell*. **50**: 465-475.

Rosa G., Ceccarini M., Cavaldesi M., Zini M. y Petrucci T. 1996. Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of β -dystroglycan. *Biochem. Biophys. Res. Comm*. **223**:272-277.

Schmalz D., Hucho F. y Buchner K. 1998. Nuclear import of porotein kinase C occurs by a mechanism distinct from the mechanism used by proteins with a classical nuclear localization signal. *J. Cell Sci*. **111**:1823-1320.

Senter L., Ceoldo S., Petrusca M. M., y Salviati G. 1995. Phosphorylation of dystrophin: effects on actin binding. *Biochem, Biophys. Res*. 206 (1): 57-63.

Shemanko C.J., Shangera J.S., Milner R.E., Pelech S. y Michalak M. 1995. Phosphorylation of the carboxil terminal region of dystrophin by mitogen activated ptoein (MAP) kinase. *Mol. Cell Biochem*.**152**: 63-70.

Sweitzer T. y Hanover J. 1996. Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **93**:14574-14579.

Sweitzer T.D., Love D.C. y Hanover J.A. 2000, Regulation of nuclear import and export. *Curr. Top. Cell. Reg*. **36**:77-94.

Tinsley J.M. Blake D.J., Zuellig R.A., y Davies K.E. 1994. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **91**: 8307-8313.

Walsh M.P., Busaan J.L., Fraser E.D., Fu S.Y., Pato M.D. y Michalak M. 1995. Characterization of recombinant c-terminal domain of dystrophin: phosphorylation by calmodulin-dependent protein kinase II and desphosphorylation by type 2B protein phosphatase. *Biochem.* **34**: 5561-5568.

Wooten M. W., Vandeplass M. L., Seibenhener M: L., Geetha T. y Diaz-Meco M. T. 2001. Nerve growth factor stimulates multisite tyrosine phosphorylation and activation of the atypical protein kinase C's via a src kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21(24): 8414-8427.