

UNIVERSIDAD NACIONAL ATÓNOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Caracterización parcial de la proteína Apo-distrofina 3
ó Dp40 en la línea celular PC12”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

B I O L O G A

PRESENTA:

SANTOS COY ARECHAVALETA ANDREA

**Directora de la tesis:
Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda**

México, D. F.

Marzo del 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
ESTUDIOS AVANZADOS DEL I. P. N. BAJO LA
DIRECCION DE LA DRA. SILVIA CECILIA IRENE
MONTAÑEZ OJEDA.**

**EL PRESENTE TRABAJO FUE APOYADO POR EL CONACYT
(DONATIVO: 37515M y 47026M)**

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia Montañez Ojeda por el apoyo para realizar esta tesis, y el inspirarme a mi superación profesional.

Al Dr. Francisco Depardón y Q. B. P. Víctor Ceja por el tiempo y atención que me brindaron.

Al M en C. Alejandro Martínez Herrera por su cooperación y disposición a compartir sus conocimientos conmigo.

Al Sr. Adalberto Herrera y la M en C. Guadalupe Aguilar por su apoyo técnico.

Al Dr. Sergio Vaca Pacheco por abrirme el camino en este ámbito.

DEDICATORIA

A mis papás, por el apoyo y cariño que me han dado durante toda mi vida, por que son personas admirables.

Mi madre por ser una persona humana ejemplar e inculcarme valores de bondad, tolerancia, libertad, honestidad.

Mi padre por sus consejos, por transmitirme el interés a la cultura y las artes

A mis hermanos: Ale, por su buen humor, consejos, ayudas en todos los aspectos, pláticas, risas, enseñanzas, por que despertó mi interés en una parte muy importante de mi vida, la música. Mau, por que se que cuento con él.

Mi abue, y Mon por el cariño que me han brindado.

A mis amigos Marile, Memo, Chivis, Noel, Mónica, Fernanda, Iván, mi cuñada Bk, Paulina, Alejandra, Armando, que he contado con ellos en algunos momentos mas que otros pero que gracias a ellos parte de mi es lo que es, por su buen humor, alegría y confianza.

A mis tíos, y primos por el interés que han mostrado por mi persona.

ÍNDICE

Índice de figuras	6
Resumen	7
Introducción	9
La distrofia muscular de duchenne (DMD) y el gen de la distrofina	9
Proteínas asociadas a distrofina (DAP´s)	14
Células PC12	17
La proteína Dp71	17
La apo-distrofina 3 o distrofina Dp40	18
Justificación	19
Objetivos	19
Materiales y métodos	20
Cultivo de las células PC12	20
Transcripción reversa acoplada a PCR (RT/PCR)	20
Reacciones de PCR	20
Clonación de la isoforma rDp40	21
Células competentes	22
Transformación	22
Obtención de DNA plasmídico	23
Reacciones de secuenciación	23
Transfección de células PC12	24
Inmunofluorescencia	24
Resultados	25
Análisis de la expresión del mRNA de la rDp40 (Apo-distrofina 3) antes y durante la diferenciación de las células PC12	25
Clonación de la Apo-distrofina 3 (rDp 40) de células PC12	27
Determinación de la secuencia del cDNA de rDp40	29
Clonación del cDNA de la isoforma rDp40 en el vector pcDNA4/hismax TOPO TA	33
Transfección transitoria de las células PC12 no diferenciadas con las construcciones TOPO-rDp40	39
Localización de la Dp40 en células PC12	41
Discusión	43
Conclusiones	48
Abreviaturas	49
Referencias bibliográficas	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Promotores del gen DMD	10
Figura 2. La familia de las distrofinas	12
Figura 3. Proteínas asociadas a distrofina (DAP's)	13
Figura 4. Oligonucleótidos que flanquean la secuencia de mRNA de Dp40	26
Figura 5. Expresión del mRNA de Dp40 en las células PC12	26
Figura 6. Plásmido de replicación pGEM-T Easy	27
Figura 7. Purificación de los plásmidos pGEM-T Easy-rDp40	28
Figura 8. Secuencia de cDNA de rDp40	29
Figura 9. Comparación de las secuencias de cDNA de rDp40 y rDp71	30
Figura 10. Comparación de la secuencia de aminoácidos entre rDp40 y rDp71	32
Figura 11. Obtención de los productos de PCR (cDNA) de las isoforma rDp40 para su clonación en el vector TOPO.	34
Figura 12. Análisis de candidatos rDp40 en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40	36
Figura 13. Cromatograma de la reacción de secuenciación de las clonas pcDNA4/Hismax TOPO TA Dp40	37
Figura 14. Secuencia nucleotídica del cDNA de Dp40 clonado en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40	38
Figura 15. Transfección de las células PC12 con pCMV-SPORT β gal	40
Figura 16. Localización de la rDp40 en células PC12 no diferenciadas	42

RESUMEN

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es un padecimiento causado por alteraciones en la expresión o carencia de la distrofina, produciendo degeneración muscular progresiva letal a corta edad.

El gen DMD se localiza en el brazo corto del cromosoma X y presenta 79 exones, que se transcriben en un mRNA de 14 kb. En este gen se han descrito ocho diferentes promotores.

El producto proteico de mayor tamaño del gen DMD es la distrofina de longitud completa. Ésta se expresa en todas las células musculares, se ha propuesto que sirve como un puente de unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular además de participar en mecanismos de transducción de señales.

El producto proteico de menor tamaño (340aa, 40KDa) es la Apo-distrofina-3 (Dp40). El promotor de esta proteína se encuentra entre los exones 62 y 63 (igual que DP71), pero en este caso se transcribe un mRNA de 2.2Kb.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran que la Dp40 se expresa durante la diferenciación de las células PC12.

Se determinó la secuencia nucleotídica del cDNA de Dp40, demostrándose que esta comparte la secuencia de los primeros exones de Dp71 (del 63 al 70).

Al comparar las secuencias del cDNA de Dp40 con la de Dp71 se observan únicamente 4 bases diferentes, conservándose los primeros dominios de Dp71.

Se llevó a cabo la clonación de la secuencia del gen de Dp40, en los plásmidos TOPO, Myc y HA.

CONCLUSIÓN

- Las células PC12 expresan a la distrofina rDp40. Esta proteína se expresa en células no diferenciadas y a 4, 9 y 12 días de diferenciación inducida por NGF.
- rDp40 comparte con Dp71 la región amino-terminal, el dominio rico en cisteínas, la región ZZ y WW, que corresponde al sitio de unión a distroglicanos.
- Dp40 se expresa al mismo tiempo que Dp71 en las células PC12.
- En las células PC12 la proteína rDp40 se encuentra principalmente en el núcleo.

INTRODUCCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y el gen de la distrofina

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es un padecimiento causado por mutaciones en el gen de la distrofina, que resultan en la carencia o en la expresión de formas mutantes de ésta proteína (Emery, 1992; Koenig *et al.*, 1987). La DMD es la distrofia muscular más común, afecta a 1 de cada 3,300 niños, produciendo degeneración muscular progresiva que causa la muerte a corta edad, debido a fallas cardíacas o respiratorias. Otras manifestaciones de este padecimiento son el retraso mental (Rapaport *et al.*, 1991), anomalías en la retina (Pillers, 1993), enfermedades del corazón (Emery, 1992) y posibles defectos auditivos (Allen, 1973). El gen DMD se localiza en el brazo corto del cromosoma X (región p21), abarcando más de 2500 Kb de DNA, e incluye 79 exones (Davies *et al.*, 1983). Al transcribirse este gen y por procesamiento de su RNA se obtiene una molécula de 14 Kb de longitud (Koenig *et al.*, 1987, Roberts *et al.*, 1993).

La distribución de las mutaciones que provocan los rearrreglos en la DMD no es azarosa, se conoce la presencia de dos sitios "hot-spots"; el primero, ubicado en el extremo 5' y que comprende los exones 2 al 20, con muchos puntos de ruptura en los intrones 1 y 7; el segundo, a dos tercios del gen hacia el extremo 3', comprende los exones 45 a 53, con varios puntos de ruptura en los intrones 44, 45, 47 y 50 (Abbs *et al.*, 1990, 1991, 1992). Las eliminaciones en los sitios "hot-spot" hacia el extremo 3' son resultado de una recombinación meiótica que se produce en el exón 44 y que ocurre con una frecuencia 12 veces mayor que en otros sitios (Oudet *et al.*, 1992). El retraso mental se ha asociado con la presencia de mutaciones puntuales en el extremo C-terminal del gen de la distrofina (Lenk *et al.*, 1993).

La transcripción del gen DMD esta regulada de manera tejido-específica por al menos ocho promotores diferentes (figura 1); cuatro de estos están localizados en el extremo 5' del gen y regulan la expresión de las distrofinas de longitud completa como

son la distrofina de tipo muscular, cerebral, de purkinje y la denominada L-distrofina, dos promotores más están localizados en el dominio similar a espectrina y regulan la expresión de Dp260 la cual se expresa en retina, Dp140 que se expresa en el sistema nervioso central; y los dos restantes regulan la expresión de tres proteínas; Dp116 que se expresa en nervios periféricos, Dp71 que es el producto del gen de la distrofia más ubicuo y que se expresa en tejidos no musculares, principalmente en cerebro (Greenberg *et al.*, 1996) y Dp40 (Apodistrofina 3) que comparte con Dp71 del exón 63 al 71, se expresa en diversos tejidos en etapas de desarrollo temprano (Tinsley, et al 1993).

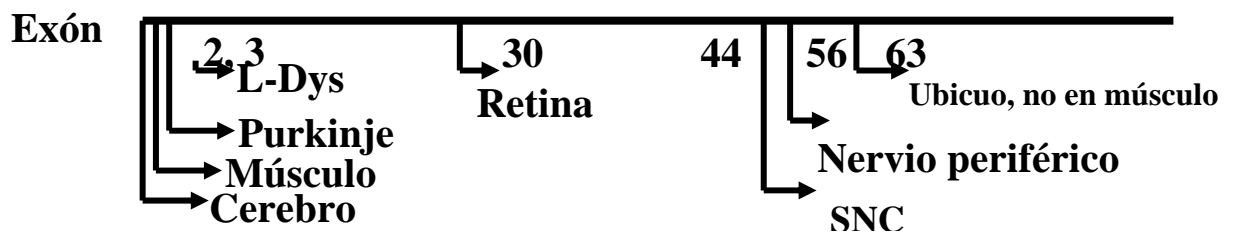


Figura 1. Promotores del gen DMD. La línea horizontal esquematiza el gen DMD, mientras que las líneas verticales representan los promotores. Los números corresponden a los exones en donde se encuentran los promotores, se indica en donde se localiza cada una de las proteínas.

El producto proteico de mayor tamaño del gen DMD, la distrofina de longitud completa, tiene un peso molecular de 427 KDa y presenta cuatro dominios distintos (figura 2): 1) Dominio N terminal, con 240 aminoácidos, homólogo al dominio de la f-actinina que se une a actina. 2) Dominio central o similar a espectrina, formado por 24 segmentos triple hélice de 109 amino ácidos cada uno con bisagras que le confieren flexibilidad. 3) Dominio rico en cisteína con 150 amino ácidos, similar al dominio C terminal de la f-actinina de Dictiostelum. 4) Dominio C terminal, con 420 aminoácidos, similar al dominio correspondiente de utrofina.

El dominio rico en cisteínas y el C-terminal, contienen varios sitios posibles de interacción con proteínas:

- Un sitio WW que se encuentra en moléculas de señalización y media la interacción entre β -dístroglicano y distrofina (Andre *et al.*, 1994, Bork y Sudol 1994);
- Dos sitios EF que potencialmente unen calcio (Koenig *et al.*, 1990);
- Un sitio ZZ que se conoce como sitio de unión a calmodulina (Ponting *et al.*, 1996);
- Un sitio de unión a sintrofinas (Ahn y Kunkel 1995, Suzuki *et al.*, 1995, Yang *et al.*, 1995);
- Una estructura de "coiled-coil", que participa en la interacción con distrobrevina (Sadoulet-Puccio 1997).

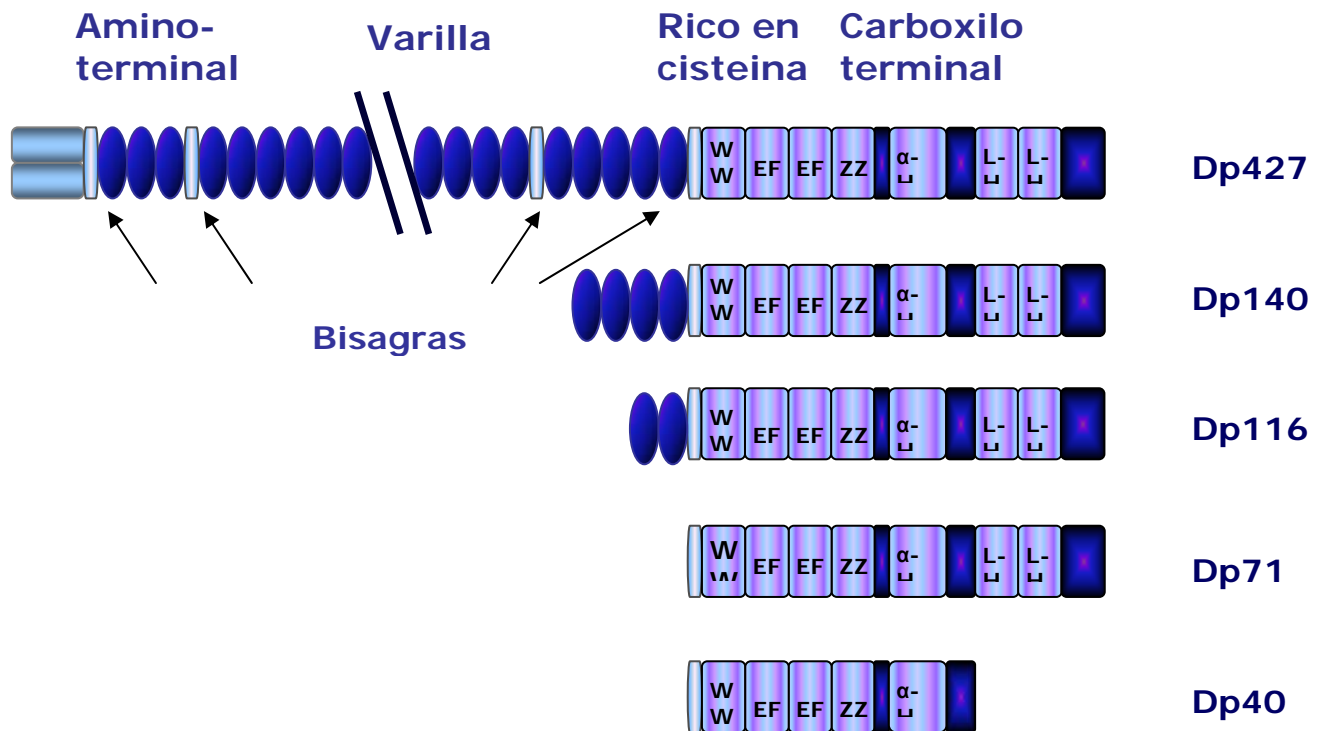


Figura 2. La familia de las distrofinas. La distrofina de longitud completa (Dp427) esta formada por cuatro dominios: el amino terminal, en donde se une a la F-actina, el similar a varilla formado por repetidos de espectrina, el rico en cisteinas que contienen el sitio de unión a β -distroglicano y el carboxilo terminal. Las proteínas Dp140, Dp116 comparten las regiones de los repetidos de espectrina, y junto con Dp71 y Dp40 los fragmentos ricos en cisteina y el carboxilo terminal. El nombre de cada proteína se debe a su peso molecular. La proteína de menor longitud es Dp40 y presenta la región rica en cisteinas, y un carboxilo terminal único.

La distrofina se encuentra en todas las células musculares, en la cara citoplasmática del sarcolema. En el músculo esquelético, se une al citoesqueleto, a través de su interacción con F-actina, su dominio C terminal está unido a un complejo oligomérico de seis proteínas, conocidas colectivamente como proteínas asociadas a distrofina o DAP's. Éste complejo incluye a los subcomplejos distroglicano, sarcoglicano, sintrofinas y a una proteína de 25 KDa conocida como sarcospan. La localización sarcolémica de distrofina, sugiere su utilidad como puente de unión entre citoesqueleto y la matriz extracelular (figura 3).

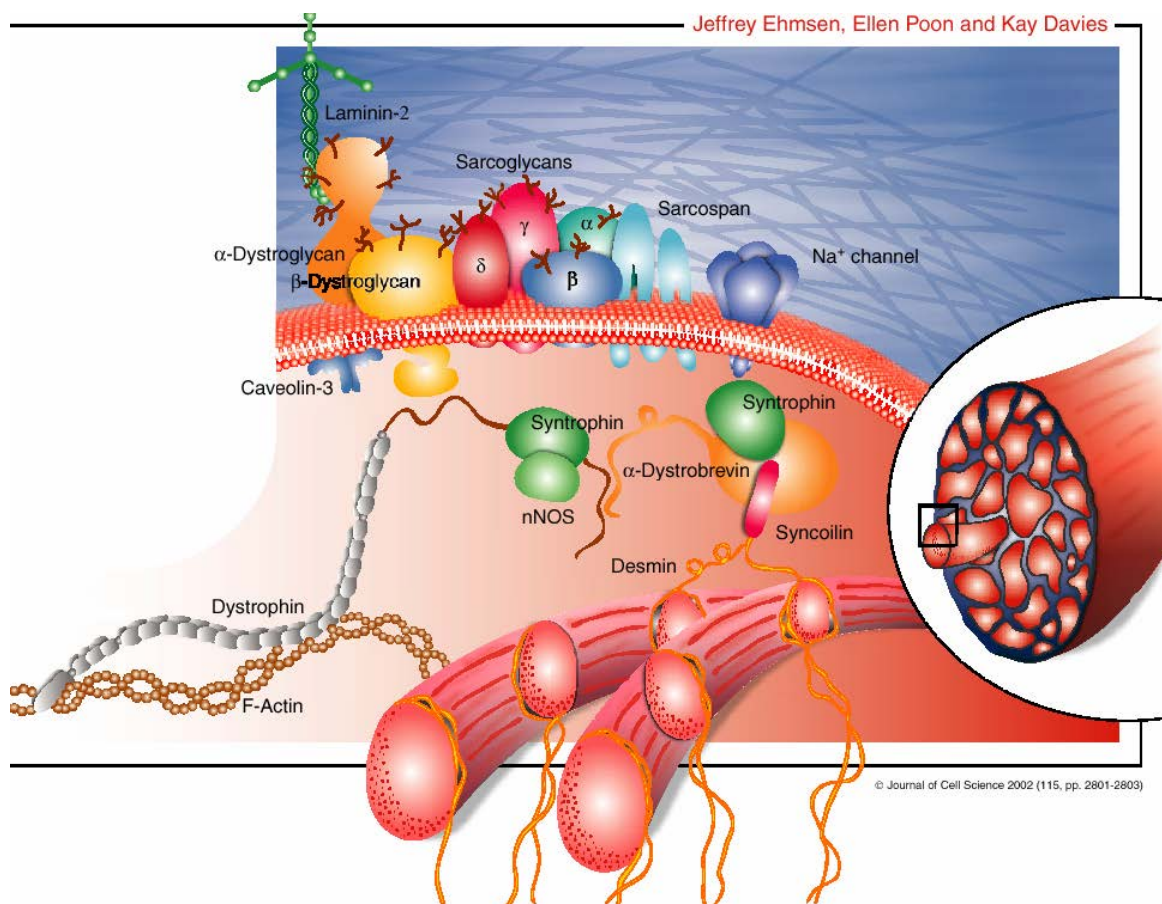


Figura 3. Proteínas asociadas a distrofina (DAP's). Se aprecia el extremo N terminal de la distrofina unido a la F-actina y la región WW del dominio rico en cisteínas unido al β-distroglicano y este a su vez a α-distroglicano. Adicionalmente la distrofina interacciona con las distrobrevinas y sintrofinas. Los sarcoglicanos y el sarcospan forman parte del complejo.

Proteínas asociadas a distrofina (DAP'S)

1. Distroglicanos

Los distroglicanos (α y β), están codificados por un mismo gen y se expresan como una sola proteína de 160 KDa o propeptido, éste sufre un procesamiento post-traducciona l y se divide en dos para formar el α -distroglicano, glicoproteína extracelular de membrana de 140 KDa y el β -distroglicano, proteína transmembranal de 43 KDa (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992, Holt *et al.*, 2000).

El α -distroglicano se une a la matriz extracelular, a través de dos dominios G de la cadena $\alpha 2$ de la proteína.

El β -distroglicano atraviesa la membrana y mediante los últimos 15 residuos de aminoácidos del extremo C-terminal se une a la región WW (Trp-Trp) así como a los sitios de unión a Ca^{2+} de la distrofina (Durbeej y Campbell 1999, Andac *et al.*, 1999, Gee *et al.*, 1993, Jung *et al.*, 1995, Matsumura *et al.*, 1992). De los componentes del complejo distrofina-DAP, el distroglicano es el que se expresa más ampliamente, encontrándose en distintos tejidos (Durbeej y Campbell 1999).

2. Sarcoglicanos

La familia de los sarcoglicanos está compuesta por el α -(50 KDa) y ε -(45 KDa) sarcoglicanos, que son proteínas transmembranales tipo I, mientras que el β -(43 KDa), γ -(35 KDa) y δ -(35 KDa) sarcoglicanos son proteínas transmembranales tipo II. Estas proteínas tienen una topología similar ya que poseen un dominio extracelular grande y un dominio intracelular pequeño, separado por un dominio transmembranal. Adicionalmente, poseen sitios potenciales de N-glicosilación en el dominio extracelular, α -, β - γ - y ε -sarcoglicanos poseen sitios potenciales de fosforilación en el dominio citoplasmático, β - γ y δ -sarcoglicanos presentan un grupo de residuos de cisteínas en la región C-terminal (Matsumura *et al.*, 1999).

Se ha demostrado que α -, β -, γ - y δ -sarcoglicanos forman un complejo, están fuertemente asociados por los dominios extracelulares, aunque la organización

molecular exacta no se conoce. Se sabe que a este complejo se asocia la proteína de 25 KDa sarcospan (Crosbie *et al.*, 1997), estudios previos muestran que ε -sarcoglicano no forma parte de este complejo (Duclos *et al.*, 1998; Hack *et al.*, 1998). La expresión de α -sarcoglicano está restringida al músculo estriado (Noguchi *et al.*, 1995, Roberds *et al.*, 1994), γ -sarcoglicano se expresa en músculo liso y estriado (Rita B *et al.*, 2000) mientras que β -, δ - y ε -sarcoglicanos se expresan en una amplia variedad de tejidos además del músculo (Ettinger *et al.*, 1997, Lim *et al.*, 1995, Nigro *et al.*, 1996,).

La deficiencia de cualquiera de los sarcoglicanos produce una variedad de distrofias musculares que son semejantes a la de Duchenne. Estos padecimientos reciben el nombre de sarcoglicanopatías y conducen a una atrofia muscular, además de que se han observado disfunciones del sistema nervioso (Bonneman *et al.*, 1995, Lim *et al.*, 1995, Nigro *et al.*, 1996, Noguchi *et al.*, 1995, Roberds *et al.*, 1994). La deficiencia primaria de alguno de los sarcoglicanos siempre esta acompañada por la reducción o pérdida completa de los demás sarcoglicanos (Mizuno, *et al.*, 1994, Sewry *et al.*, 1996). Se postula que estas proteínas proporcionan una mayor estabilidad al complejo distrofina-DAP's en el músculo, propiedad indispensable para su buen funcionamiento, ya que es un tejido que se encuentra bajo un estrés constante por las contracciones y relajaciones a las que se somete (Matsumura *et al.*, 1999).

3. Sintrofinas.

Las sintrofinas, son una familia de proteínas citoplasmáticas que se asocian con la distrofina, la utrofina y la distrobrevina, se propone que estas proteínas tienen un papel estructural y de señalización (Kramarcy *et al.*, 1994, Froehner *et al.*, 1997, Ahn y Kunkel 1995, Ahn *et al.*, 1996). Se han descrito tres sintrofinas distintas, que presentan una secuencia de aminoácidos altamente conservada con homología del 50%. Las sintrofinas se han dividido en dos clases en base a su punto isoeléctrico: la sintrofina ácida $\alpha 1$ (pI ~6.7) y las dos sintrofinas básicas $\beta 1$ y $\beta 2$ (pI ~9.0), cada una

está codificada por un gen distinto (Górecki *et al.*, 1997). Las sintrofinas funcionan en el complejo distrofina-DAP's como proteínas adaptadoras, debido a que cada isoforma de sintrofina consiste casi enteramente de dos dominios de homología ó pleckstrina PH 1) un dominio PDZ y 2) una secuencia altamente conservada de 56 aminoácidos presente en el extremo C-terminal específico de esta proteína (Gibson *et al.*, 1994, Adams 1995). La asociación de la sintrofina que mejor se ha caracterizado es aquella que se presenta entre su dominio PDZ y el de los canales de sodio dependientes de voltaje del músculo SkM1 y SkM2 (Gee *et al.*, 1998, Schultz *et al.*, 1998) así como con la oxido-nítrico sintetasa neuronal (nNOS) (Brenman *et al.*, 1996, Tochio *et al.*, 1999).

Además del distroglicano, las sintrofinas, son los otros componentes del complejo DAP que se han detectado en el cerebro (Ervasti y Campbell 1993). A la fecha se han reportado tres sintrofinas cuyos patrones de expresión son:

- α 1-sintrofina se expresa en el músculo estriado, en niveles bajos en cerebro y es apenas detectable en otros tejidos.
- β 1-sintrofina se expresa en diferentes tejidos y se encuentra en niveles bajos en el cerebro.
- β 2-sintrofina está presente en varios tejidos, específicamente se presenta en concentraciones altas en cerebro. Esta sintrofina se localiza en uniones neuromusculares (Peters *et al.*, 1994, Ahn *et al.*, 1996).

4. Distrobrevina

Las distrobrevinas son también una familia de proteínas relacionadas y asociadas a distrofina, se ha propuesto que esta proteína es importante en la formación y mantenimiento de la unión neuromuscular, ya que coprecipita con receptores de acetilcolina y con el complejo distrofina-DAP's (Tinsley *et al.*, 1994, Gieseler *et al.*, 1999).

La asociación de α -distrobrevina con distrofina ocurre a través de estructuras "coiled-coil" (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997), consistentes en dos α -hélices enlazadas entre sí (Lupas, 1996). La distrobrevina comprende tres dominios estructurales: un dominio rico en cisteínas, un dominio C-terminal, ambos homólogos a los de distrofina y un dominio único de distrobrevina (DUR) (Wagner *et al.*, 1993, Blake *et al.*, 1996, Sadoulet-Puccio *et al.*, 1996).

En mamíferos existen al menos cinco isoformas de distrobrevina generadas por procesamiento alternativo, formándose proteínas con dominios y distribución diferentes en los tejidos analizados (Blake *et al.*, 1996, Sadoulet-Puccio *et al.*, 1996).

Células PC12

El origen de la línea celular PC12 es un feocromocitoma (células cromafines de glándula adrenal) de rata la cual sintetiza una gran cantidad de catecolaminas (dopamina y norepinefrina), y expresa una gran cantidad de genes que codifican para neuropéptidos.

Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada para investigar los mecanismos celulares y moleculares que llevan a la diferenciación neuronal, ya que responde al factor de crecimiento neural (NGF) diferenciándose a células de tipo neuronal simpático, con el alargamiento de neuritas (Schubert y Klier, 1977). Estas células producen vesículas sinápticas que contienen dopamina y norepinefrina además de sintetizar y secretar acetilcolina. Los cambios provocados por el NGF son rápidos y reversibles ya que después de 24 horas de eliminar éste, la mayoría de las células pierden sus procesos neuríticos (Greene and Tischler, 1976; Grifman and Sureq, 1997).

La proteína Dp71

La proteína Dp71 se identificó por primera vez en la línea celular HepG2, corresponde a la isoforma de distrofina más ubicua y la que se expresa en mayor nivel en el sistema nervioso central. Dp71 es el producto principal del gen DMD que se detecta durante el desarrollo, esto es, se expresa en células pluripotenciales embrionarias además, durante el desarrollo temprano muestra una distribución confinada al sistema nervioso. Dp71 es el producto principal del gen DMD en tejidos no musculares incluyendo el cerebro y la capa limitante interna de la retina. La proteína carece de los dominios N-terminal y similar a espectrina, presenta únicamente el dominio rico en cisteína y C terminal de las distrofinas, como ya se mencionó, este dominio es de suma importancia debido a que es el sitio de unión del complejo de las DAP's.

La expresión de Dp71 está regulada por un promotor de tipo “house Keeping” localizado en el intron 62 del gen DMD. Este promotor no contiene caja TATA y presenta un alto contenido en GC así como varios sitios potenciales de unión a Sp1, resultando en una expresión en una amplia variedad de tejidos. Dp71 esta presente en el cerebro, retina, pulmón, hígado, riñón, testículos y músculo liso (Lederfein *et al.*, 1993).

La apo-distrofina 3 ó distrofina Dp40

Tinsley JM, et al (1993), identificó y secuenció a la Apo- distrofina -3 o Dp40, que corresponde al producto más pequeño del gen DMD. Esta proteína fue identificada al extraer RNA de una línea celular de shwannoma de rata y de diversos tejidos humanos; hígado, pulmón, cerebro, músculo fetal y músculo de adulto. La Dp40 se transcribe a partir de una secuencia de 2.2Kb, guarda una estrecha relación con Dp71 y comparte los primeros 340 aminoácidos tanto con Dp71 como con la distrofina de longitud completa. La Dp40 comprende el final del dominio central, el dominio rico en cisteinas y los primeros 48 aminoácidos del carboxilo terminal, siendo una proteína de aproximadamente 341 aminoácidos con un peso de 40KDa, pero a diferencia de los otros transcritos del gen DMD, esta se expresa durante el desarrollo embrionario.

JUSTIFICACIÓN

La Dp40 es una proteína muy poco estudiada que se expresa a partir del gen DMD. Debido a que Dp40 comparte aminoácidos de la región carboxilo terminal con Dp71, no es posible obtener un anticuerpo específico contra esta. Debido a nuestro interés de estudiar la función de la Dp40, en este trabajo nos propusimos conocer su expresión y localización en las células PC12. Para alcanzar el último objetivo, se procedió a clonar el cDNA de Dp40 en un vector que permite la fusión de la proteína de interés con un epítipo y así poder saber la localización celular en PC12.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterización parcial de la proteína Apo-distrofina-3 o Dp40 en la línea celular PC12.

Objetivos particulares

- Análisis de la expresión del mRNA de la Apo-distrofina 3 (Dp40) antes y durante la diferenciación de las células PC12 inducida por el factor de crecimiento neural (NGF)
- Clonación de la Apo-distrofina 3 (Dp 40) de células PC12
- Determinación de la secuencia del cDNA de Apo-distrofina-3 (Dp40).
- Localización subcelular de la proteína Apo-distrofina 3 (Dp40) en células PC12 indiferenciadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de las células PC12

Los cultivos celulares de PC12 se crecieron en cajas de plástico de 75 cm² en medio RPMI con 10% de suero de caballo, 5% de suero fetal de bovino, 50 U/ml de penicilina y 25 µg/ml de streptomycin a 37 °C en una atmósfera saturada de agua con 5.6% de CO₂.

Transcripción reversa acoplada a PCR (RT/PCR)

Se extrajo el RNA de las célula PC12 a los 0, 4, 9 y 12 días de diferenciación, de acuerdo al protocolo de cultivo para el RNAqueous®-4PCR Kit (Ambion). Para la síntesis del cDNA a partir del RNA total, se utilizó el Advantage™ RT-for-PCR Kit (CLONTECH), empleando el oligonucleótido específico de rDp40 cDNARAPO3: 5'-GATATAGCAAATGAAAGTTTAAAG-3'

Reacciones de PCR

Se amplificó por PCR la secuencia de rDp40 a partir del cDNA específico con los siguientes oligonucleótidos: PRIMER5: 5'-CTGACTGCCTGTGAAATCCTTAC-3' y rAPONOT3: 5'-GTTAGAGGGGGACAACATGGAAACGTGAG-3' bajo las siguientes condiciones: 94°C/1min, 35 ciclos: 94°C/30s, 68°C/3min. 70°C/10min.

Se amplificó por PCR la secuencia de rDp40 previamente clonada en el plásmido pGEM-T Easy-rDp40 linearizado con la enzima BstX1, utilizando los siguientes oligonucleótidos: 5'dPTO: 5'-ATGAGGGAACACTCAAAGGCCACG-3' y rAPONOT3: 5'-GTTAGAGGGGGACAACATGGAAACGTGAG-3' bajo las siguientes condiciones: 94°C/1min, 35 ciclos: 94°C/30s, 68°C/3min. 70°C/10min.

Los candidatos de las clonas pcDNA4/HISMAXTOPOTA-rDp40 fueron amplificados por PCR, como parte de su caracterización, con dos juegos de oligonucleótidos, PRIMER5: 5'-CTGACTCCTGTGAAATCCTTAC-3' y rAPONOT3: 5'-

GTTAGAGGGGGACAACATGGAAACGTGAG-3' y RDP715TOPO: 5'-
ATGAGGGAACACTCAAAGGCCACG-3' y rAPONOT3: 5'-
GTTAGAGGGGGACAACATGGAAACGTGAG-3' bajo las siguientes condiciones:
94°C/1min, 35 ciclos: 94°C/30s, 68°C/3min. 70°C/10min.

Se amplificó la secuencia de rDp40 a partir de las construcciones pcDNA4/HISMAXTOPOTA-rDp40 con los siguientes oligonucleotidos:

rDp715myc: 5-CTAGTAGAATTCACATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG-3'

rAPONOT3: 5'-GTTAGAGGGGGACAACATGGAAACGTGAG-3' utilizando las siguientes condiciones: 94°C/1min, 35 ciclos: 94°C/30s, 68°C/3min. 70°C/10min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (GeneAmp PCR system 2400) con 100 ng de cada oligonucleotido, 0.1 mM de cada dNTP, 1.5 unidades de Taq polimerasa en una solución amortiguadora que contiene 1.5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4). En todos los casos los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa-TBE al 1% teñido con bromuro de etidio.

Clonación de la isoforma rDp40

Los productos de amplificación obtenidos a partir del cDNA de las células PC12 al utilizar los oligonucleótidos PRIMER5 y rAPONOT3, se clonaron en el plásmido pGEM-T Easy, mezclando 5µl de Buffer de ligación (2X Rapid Ligation Buffer), 1µL del vector pGEM-T Easy (50ng), 1µL de ligasa T4, Agua MilliQ y 100ng del producto de PCR. La reacción se incubó durante 18hs a 4°C.

Los productos de amplificación de Dp40 obtenidos usando como molde el plásmido pGEM-T Easy y los oligonucleótidos RDP715TOPO y rAPONOT3 fueron clonados en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA (invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. En un tubo se mezclaron: 1µl de pcDNA4/HisMax©-TOPO® (10ng), 2µl de producto de PCR, 1µl de solución salina (1.2 M NaCl, 0.06 M

MgCl₂) y 1 µl de agua desionizada. Las reacciones se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente.

Células competentes

Se prepararon células competentes utilizando la cepa DH5α de *E.coli*, la cual es sensible a Ampicilina, éstas se incubaron toda la noche en medio SOB (triptona 2g, extracto de levadura 5g, cloruro de sodio 0.5g, sulfato de magnesio (anhidro) 2.4g, cloruro de potasio 0.186g /litro) a 37°C en agitación. El cultivo bacteriano se diluyó 1/10 en medio SOB y se incubó a 37°C en agitación hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzó una absorbancia de 0.4 a 0.6 a 550 nm para obtener una concentración de 10⁸ bacterias/ml. Se dividió el cultivo en dos volúmenes iguales y se centrifugó a 4000 rpm a 4° C por 15 min, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en FSB (KCl 100 mM, CaCl₂.2H₂O 50 mM, glicerol 10% p/v, acetato de potasio 10 mM, pH final 6.2) durante 15 min a 4° C. La muestra se centrifugó a 4000 rpm / 4° C/ 15 min, se retiró el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en FSB a 4°C, mas 70 µl de DMSO y se incubó por 5 min a 4°C. Posteriormente se añadieron 70µl de DMSO y se incubó la reacción durante 15 min a 4°C. Se prepararon alícuotas de 200 µl, las cuales se congelaron utilizando nitrógeno líquido para almacenarlas a -70° C.

Transformación

Para transformar las células competentes DH5α, se descongelaron las alícuotas de las células y éstas se mantuvieron en hielo dividiendo la suspensión bacteriana en dos volúmenes iguales, a cada alícuota se le agregaron de 1 a 5 µl del vector, se agitó en vortex por unos segundos y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente las muestras fueron sometidas a un choque térmico a 42° C por 90 s y las células fueron transferidas a tubos eppendorf con 1 ml de medio SOB, 10 µl de MgCl₂-MgSO₄ 1 M y 20 µl de glucosa 1 M. Los tubos se incubaron por 2 h a 37 ° C en agitación y las células fueron espatuladas en cajas con LB-Ampicilina. Para la

selección de las transformantes las cajas se incubaron a 37°C durante 18 horas, transcurrido este tiempo, se seleccionaron 24 colonias al azar, estas se sembraron en placas LB-Amp y se incubaron durante 18 horas. Se verificó la transformación de las colonias con el plásmido pcDNA4/HISMAXTOPOTA-rDp40 por PCR utilizando los oligonucleótidos RDP715TOP y rAPONOT3.

Obtención de DNA plasmídico

Para obtener DNA de plásmido por la técnica de "Easy prep", se sembró una colonia con el plásmido de interés en medio LB-ampicilina, y se incubó 18 h a 37°C en agitación, éste cultivo se centrifugo en un tubo eppendorf de 1.5 ml a 13,000 rpm por 1 min para formar una pastilla de células. La pastilla se resuspendió en 100 µl de Buffer de lisis (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM, BSA 0.1 mg/ml, RNAsa A 0.2 mg/ml, Sacarosa 15% p/v, Lisozima 2mg/ml), y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, después se colocó en agua en ebullición por 60 seg., inmediatamente después las muestras se colocaron en hielo por 60 seg. A continuación la muestra se centrifugó por 15 minutos a 13000 rpm el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio el cual lleva el plásmido

Reacciones de secuenciación

El fragmento de rDp40 clonado en el vector pcDNA4/HISMAXTOPOTA-rDp40, fue sometido a una reacción de secuenciación automática en el extremo 5' del inserto utilizando el oligonucleótido TopoF 5'-TATGGCTAGCATGACTGGT-3' y en el extremo 3' del inserto con el oligonucleotido 3'rAPONOT3, bajo las siguientes condiciones: 94°C/5min. 35 ciclos; 94°C/30, 55°C/30s, 60°C/10s. 60°C 5 min. La lectura del producto amplificado se realizo en el secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

Transfección de células PC12

Para la transfección transitoria de células PC12 no diferenciadas, se utilizó el método de Lipofectamine™ Reagent (Invitrogene). Se sembraron 7×10^6 células, en cubreobjetos previamente tratados con poli-L-lisina (50 $\mu\text{g/ml}$). Para cada cubreobjetos se prepararon dos tubos eppendorf de 0.5 ml con 100 μl de medio Optimem. A un tubo se le añadieron 2 μg de DNA (pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40) y al otro 20 μl de lipofectamina (Invitrogen), y se incubaron ambos tubos a temperatura ambiente por 15 minutos, a continuación los dos tubos se mezclaron y se incubaron por 15 min. Se pasaron los complejos a un tubo de 1.5 ml que contenía 800 μl de medio Optimem y se mezclaron e incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el medio de crecimiento de las células y se lavaron una vez con PBS 1X estéril. Se adicionó el medio de transfección a cada pozo, colocándolo sobre la pared de la caja y después se homogenizó. Se colocaron las células en incubadora a 37°C, al 5% de CO₂ por 5 horas, después se agregó 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (10% de suero de caballo inactivado a 56°C, 5 % de suero fetal bovino, 25 U/ml de penicilina y 25 mg/ml de estreptomicina), a cada pozo y se incubó 48 horas.

Se realizó una transfección en las condiciones descritas previamente utilizando como control el plásmido pCMV Sport β -gal, y se llevo a cabo la tinción para detectar a las células transfectadas, con ayuda del reactivo β -Gal Stainig Kit (Invitrogen), y calcular el porcentaje de efectividad comparando las células teñidas contra las no teñidas.

Inmunofluorescencia

Después de la transfección los cubreobjetos se fijaron con una solución al 3% de paraformaldehído (PFA) y 0.3% Trítón X 100 en una solución amortiguadora de citoesqueleto (CB) (10mM MES, 150mM NaCl, 5mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 5 mM glucosa). Las preparaciones se lavaron tres veces con CB y se incubaron 20 min en una solución de PFA al 3% en CB. Se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se

bloquearon 20 min con gelatina al 0.5% en PBS. Posteriormente, las preparaciones de las células transfectadas con pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40 se incubaron con el anticuerpo anti-Xpress (1:2500), durante toda la noche a 4°C. A continuación las células se lavaron tres veces con PBS por cinco minutos, la señal de las proteínas recombinantes se detectó incubando las preparaciones durante 30 minutos con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa Fluor a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las células con PBS y agua y se montaron en Vectashield (Vector laboratorios, Inc.). Las preparaciones se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioscop 40 FL, Carl Zeiss).

RESULTADOS

Análisis de la expresión del mRNA de la rDp40 (Apo-distrofina 3) antes y durante la diferenciación de las células PC12

El primer objetivo planteado en este trabajo fue saber si las células PC12 indiferenciadas y/o diferenciadas expresaban el mRNA de rDp40, para esto, a estas células se les extrajo el RNA a los 0, 4, 9 y 12 días de diferenciación y se realizó la técnica de RT - PCR. Para la síntesis de cDNA se utilizó un oligonucleótido específico complementario a la secuencia de rDp40: cDNARAPO3 y para la posterior amplificación del cDNA se usaron los oligonucleótidos PRIMER5 para el extremo 5´ y para el extremo 3´ el primer 3´rAPONOT3, el cual es específico para rDp40, la secuencia de estos oligonucleotidos flanquean a la secuencia de cDNA de rDp40 (Figura 4).

```
Ctgactgcctgtgaaatccttacaccatgaggggaacacctcaaaggccacgagacccaaacaactgttgggac      75
catcccaaatgacagagctctaccagctcttagctgacctgaataatcaggttctccgcttataggactgcatgaagc  157
tcagaagactccagaaggcccttctgctggatctcttgagcctgcagctgcatgtgacgccttgaccagcacaacctc  237
aagcaaatgatcagccatggatcctgcagataattactgtttgactactattatgaccgctggagcaagagca    317
caacaatttggtcaatgtccctctctgtgtgatgtgtgtcctcaactggcttcaatgtttatgatacgggacgaacagga  400
ggatccgtgtcctgtctttaaaactggcatcattctctgtgtaaagcacactggaagacaagtacagatacctttcaag  483
caagtggcaagtcaaccggctttgtgaccagcgtagactgggtctctctctgcatgattctattcaaatccaagacagt  566
gggtgaagttgcctccttgggggcagtaacattgagccgagtgctcaggagctgttccagtttgccaataataaacctga  647
gattgaagccgctctctccttgactggatgctgtggaaccccagctctatgggtggctgccggtctgcacagagtggct  729
gctgctgaaacagccaagcatcaggccaagtgaacatctgtaaggagtgccaatcattggattcaggtacagaagc    807
ctgaaacactttaattatgacatctgccaagctcttttctggccgagtgctaaaggccataaaatgcactaccccat   990
ggtagagtactgcactccgactacatctggagaagatgtcgtgacttccaagggtactgaaaaacaaattcgaacc  1069
aaaaggatatttgcaagcatcccgaatgggctacctccagctgcagactgttttagaggggggacaacatggaaa   1145
cgtagcg
```

Figura 4. Oligonucleotidos que flanquean la secuencia de mRNA de Dp40. La secuencia corresponde al mRNA de Dp40, los oligonucleotidos para el extremo 5´ PRIMER5 esta señalado en amarillo y el específico de Dp40 para el extremo 3´ rAPONOT3 en verde.

Las reacciones de RT-PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, demostrándose que sí hay expresión de mRNA de rDp40, antes y durante la diferenciación de dichas células con NGF (figura 5)

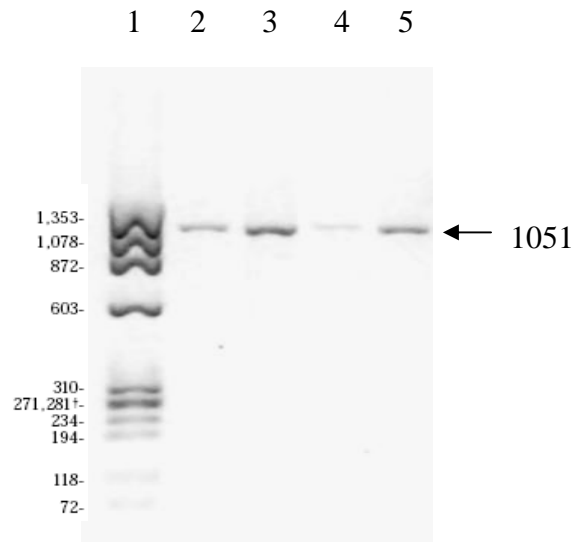


Figura 5. Expresión del mRNA de Dp40 en las células PC12. Se extrajo el RNA de las células PC12, a continuación se sintetizó el cDNA como se indica en materiales y métodos y posteriormente se procedió a amplificar las secuencias que corresponden al mRNA de Dp40 utilizando los oligonucleotidos PRIMER5 y rAPONOT3. Los productos de PCR obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% y se tiñeron con bromuro de etidio. En el primer carril se colocó el marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* II. Del segundo al quinto carril se cargaron las muestras del producto de RT-PCR a los días 0, 4, 9 y 12 de diferenciación respectivamente. El tamaño esperado para el producto de PCR específico de Dp40 es de 1051pb.

Clonación de la Dp40 (Apo-distrofina 3) de células PC12

Después de haber demostrado que las células PC12 expresan el mRNA de la distrofina Dp40, se procedió a clonar la secuencia de DNA correspondiente en el vector pGEM-T -eEasy (figura 6).

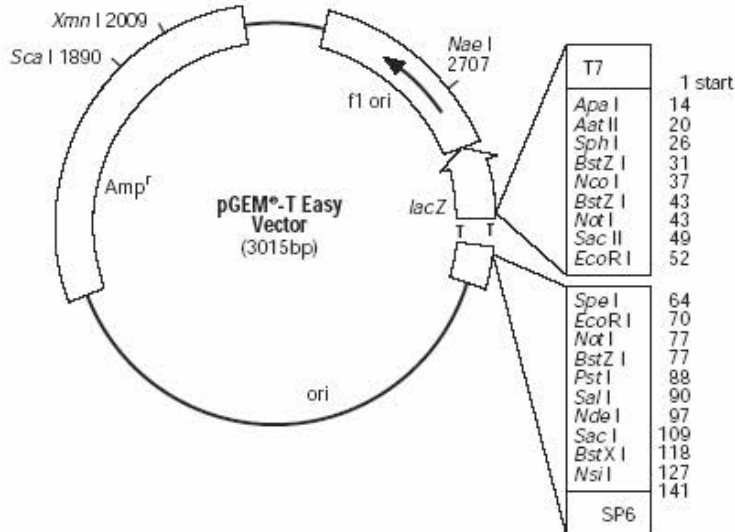


Figura 6. Plásmido de replicación pGEM-T Easy. Éste plásmido contiene colas de timinas, para una fácil clonación de insertos que son producto de reacciones de PCR, además de un gen de resistencia a ampicilina para la selección de clonas de interés.

El cDNA de rDp40, obtenido a partir del RT-PCR en donde se usaron los oligonucleótidos PRIMER5 para el extremo 5' y 3'rAPONOT3 para el extremo 3', se clonó en el vector pGEM-T Easy como se describió en materiales y métodos (figura 6), este plásmido cuenta con extremos de timina que permiten la clonación directa de productos de PCR.

Después de llevar a cabo la clonación del inserto del cDNA de Dp40, el DNA fue utilizado para transformar una cepa DH5 α de *E. coli* como se describe en materiales y métodos. A continuación se aislaron 24 colonias candidatas, previamente seleccionadas por ser resistentes a ampicilina. Posteriormente se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos RDP715TOPO y rAPONOT3 con el objeto de

caracterizar a las clonas construidas, en dicha reacción se obtuvo un fragmento de 1053pb.

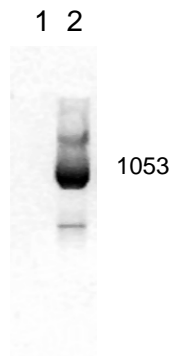


Figura 7. Purificación de los plásmidos pGEM-T Easy-rDp40. Esta clona contiene el inserto en posición adecuada.

Determinación de la secuencia del cDNA de rDp40.

Las clonas pGEM-T Easy-rDp40 previamente seleccionadas, fueron sometidas a un análisis por secuenciación para comprobar que los insertos presentaran la secuencia correspondiente (ver materiales y métodos). Para llevar a cabo la reacción de secuenciación se emplearon los oligonucleótidos PRIMER5 para el extremo 5' y rAPONOT3 para el extremo 3', descritos en materiales y métodos.

Como se muestra en la figura 8, las clonas seleccionadas pGEM-T Easy-rDp40, contienen la secuencia del DNA que corresponde a la proteína Dp40, La secuencia se comparó contra la publicada por Tinsley JM, et al (1993), utilizando el programa Clustal X

ctgactgcctgtgaaatccttacaaccatgagggaacacctcaaaggccacgagacccaacaactgttgggac	75
catcccaaaatgacagagctctaccagctttagctgacctgaataatgcaggctccgcttataggactgcatgaagc	157
tcagaagactccagaaggcccttgcttggatctctgagcctgcagctgcatgtgacgcctggaccagcacaacctc	237
aagcaaaatgatcagcccatggatatcctgcagataatttactgttgactactattatgaccgctggagcaagagca	317
caacaatttggccaatgtccctctctgtgtggatgtgtgtctcaactggcttctcaatgtttatgatacgggacgaacagga	400
ggatccgtgcctgtctttaaaactggcatcatttctgtgtaaagcacacttgaagacaagtacagatacctttcaag	483
caagtggcaagtcaaccggctttgtgaccagcgtagactgggtcttcttctgcatgattctattcaaatccaagacagtt	566
gggtgaagttgctcctttggggcagtaacattgagccgagtgctcaggagctgttccagttgccaataataaacctga	647
gattgaagccgctctcttcttctgactggatgctgtggaaccccagctctatggtgtggctgccggcttgcacagatggct	729
gctgctgaaacagccaagcatcaggccaagtgaacatctgtaaggagtgccaatcattggattcaggtacagaagc	807
ctgaaacactttaattatgacatctgccaagctgctttttctggccgagttgctaagggccataaaatgcactacccat	990
ggtagagtactgcactccgactacatctggagaagatgttcgtgacttccaagggtactgaaaaaaaatttgaacc	1069
aaaaggatatttgcgaagcatccccgaatgggctacctccagtcagactgtgttagagggggacaacatggaaa	1145
cgtagcg	

Figura 8. Secuencia de cDNA de rDp40. En rojo esta señalado el codón de inicio y en azul se señala el codón de paro de la traducción.

Se ha reportado que la rDp40 comparte el promotor de la Dp71 ubicado en el intrón 62. Al comparar la secuencia obtenida de la Dp40 con la secuencia del cDNA de Dp71 (figura 9), se pudo observar que estas dos secuencias son iguales del exón 1 al 70 excepto por 5 bases ubicadas en los exones 67 y 68. Dp40 tiene su propio codón de paro TGA indicado con una flecha. La comparación de las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa ClustalX

dp71rat rapo3	CTGACTGCCTGTGAAATCCTTACAACCATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAA CTGACTGCCTGTGAAATCCTTACAACCATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACGAGACCCAA *****	dp71rat rapo3	GAGCCAACTGTCAGGAGCTGTTCCAGTTTGCCAAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCT GAGCCGAGTGTGAGGAGCTGTTCCAGTTTGCCAAATAAACCCTGAGATTGAAGCCGCT *****
dp71rat rapo3	ACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAAT ACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGTCTTTAGCTGACCTGAAT *****	dp71rat rapo3	CTCTTCCTTGACTGGATGCGTCTGGAACCCCAAGTCTATGGTGTGGCTGCCGCTCTGCAC CTCTTCCTTGACTGGATGCGTCTGGAACCCCAAGTCTATGGTGTGGCTGCCGCTCTGCAC *****
dp71rat rapo3	AATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAACTCAGAGACTCCAGAAGGCCCTT AATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAACTCAGAGACTCCAGAAGGCCCTT *****	dp71rat rapo3	AGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAAAGCATCAGCCCAAGTGTAAACATCTCTAAGGAGTGT AGAGTGGCTGCTGCTGAAACAGCCAAAGCATCAGCCCAAGTGTAAACATCTCTAAGGAGTGT *****
dp71rat rapo3	TGCTTGGATCTCTTGAGCCCTGTCACTGCAATGTGACGCCCTTGGACCAGCACACCTCAAG TGCTTGGATCTCTTGAGCCCTGTCACTGCAATGTGACGCCCTTGGACCAGCACACCTCAAG *****	dp71rat rapo3	CCAATCATTGGATTGAGTACAGAAAGCCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGC CCAATCATTGGATTGAGTACAGAAAGCCTGAAACACTTTAATTATGACATCTGCCAAAGC *****
dp71rat rapo3	CAAAATGATCAGCCCATGGATATCTGCGAGATAAATAACTGTTTACTACTATTTATGAC CAAAATGATCAGCCCATGGATATCTGCGAGATAAATAACTGTTTACTACTATTTATGAC *****	dp71rat rapo3	TGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGCTAGAGTAC TGCTTTTTTCTGGCCGAGTTGCTAAGGGCCATAAAATGCACTACCCCATGCTAGAGTAC *****
dp71rat rapo3	CCTCTGGACCAAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCTCTCTGTGGATATGTGTCTC CCTCTGGACCAAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCTCTCTCTGTGGATATGTGTCTC *****	dp71rat rapo3	TGCACCTCCGACTACATCTGGAGAGATGTTCTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAA TGCACCTCCGACTACATCTGGAGAGATGTTCTGACTTTGCCAAGGTACTGAAAAACAAA *****
dp71rat rapo3	AATGCGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGCTCTCTGTCTTTT AATGCGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGATCCGCTCTCTGTCTTTT *****	dp71rat rapo3	TTTCGAACCAAAAGGTATTTGGCAAGCATCCCGAATGGGCTACCTTCCACTGCAGACT TTTCGAACCAAAAGGTATTTGGCAAGCATCCCGAATGGGCTACCTTCCACTGCAGACT *****
dp71rat rapo3	AAAACCTGGCATATTTCTCTGTGTAAGCACACTTGGAAAGCAACTACAGATACCTTTTC AAAACCTGGCATATTTCTCTGTGTAAGCACACTTGGAAAGCAACTACAGATACCTTTTC *****	dp71rat rapo3	CTGTTAGAGGGGACAAACATGGAACCCCTGCTCTGCCCCCAGCTTTCACAGGATGAT CTGTTAGAGGGGACAAACATGGAACCCCTGCTCTGCCCCCAGCTTTCACAGGATGAT *****
dp71rat rapo3	AAGCAAGTGGCAAGTTCACCCGGCTTTTGTGACCAAGCTAGACTGGGTCTTCTTCTGCAT AAGCAAGTGGCAAGTTCACCCGGCTTTTGTGACCAAGCTAGACTGGGTCTTCTTCTGCAT *****	dp71rat rapo3	ACTCAITCACCATTGACATTATGCTAGCAGGCTAGCAGAAATGGAACACAGCAATGGA ----- -----
dp71rat rapo3	GACTCTATTCAAATCCAAGGCAGTTGGGTGAAGTTGGCTCCTTTGGGGCAGTAACATT GATTCTATTCAAATCCAAGGCAGTTGGGTGAAGTTGGCTCCTTTGGGGCAGTAACATT ** *****	dp71rat rapo3	TCTTATCTAAATGATAGCATCTCTCTAATGACAGCATAGATGATGAACATTTCTTAATC ----- -----

Figura 9. Comparación de las secuencias de cDNA de rDp40 y rDp71. En el primer renglón con el nombre de "dp71rat" esta la secuencia del cDNA de rDp71, y en el segundo renglón con el nombre de "rapo3" se encuentra la secuencia del cDNA de rDp40. Los asteriscos indican las bases que no coinciden entre las dos secuencias, ambas secuencias solo difieren por cinco bases (C-T, G-A, A-G, C-A, G-C) la flecha señala el codón de paro de rDp40 en el exón 70 de rDp71.

A continuación se comparó la secuencia de aminoácidos de rDp40 con la de rDp71 utilizando la opción "Beautiful color" de <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>. Como se mencionó previamente, ambas secuencias tienen 5 bases diferentes, sin embargo, en la traducción solo un aminoácido es distinto (figura 10). Por esto, la Dp40 conserva los dominios de Dp71 hasta el exón 70; el amino-terminal, el dominio WW, la región de bisagra, el dominio rico en cisteínas, el sitio de unión a distroglicanos, el dominio ZZ y parte del carboxilo terminal.

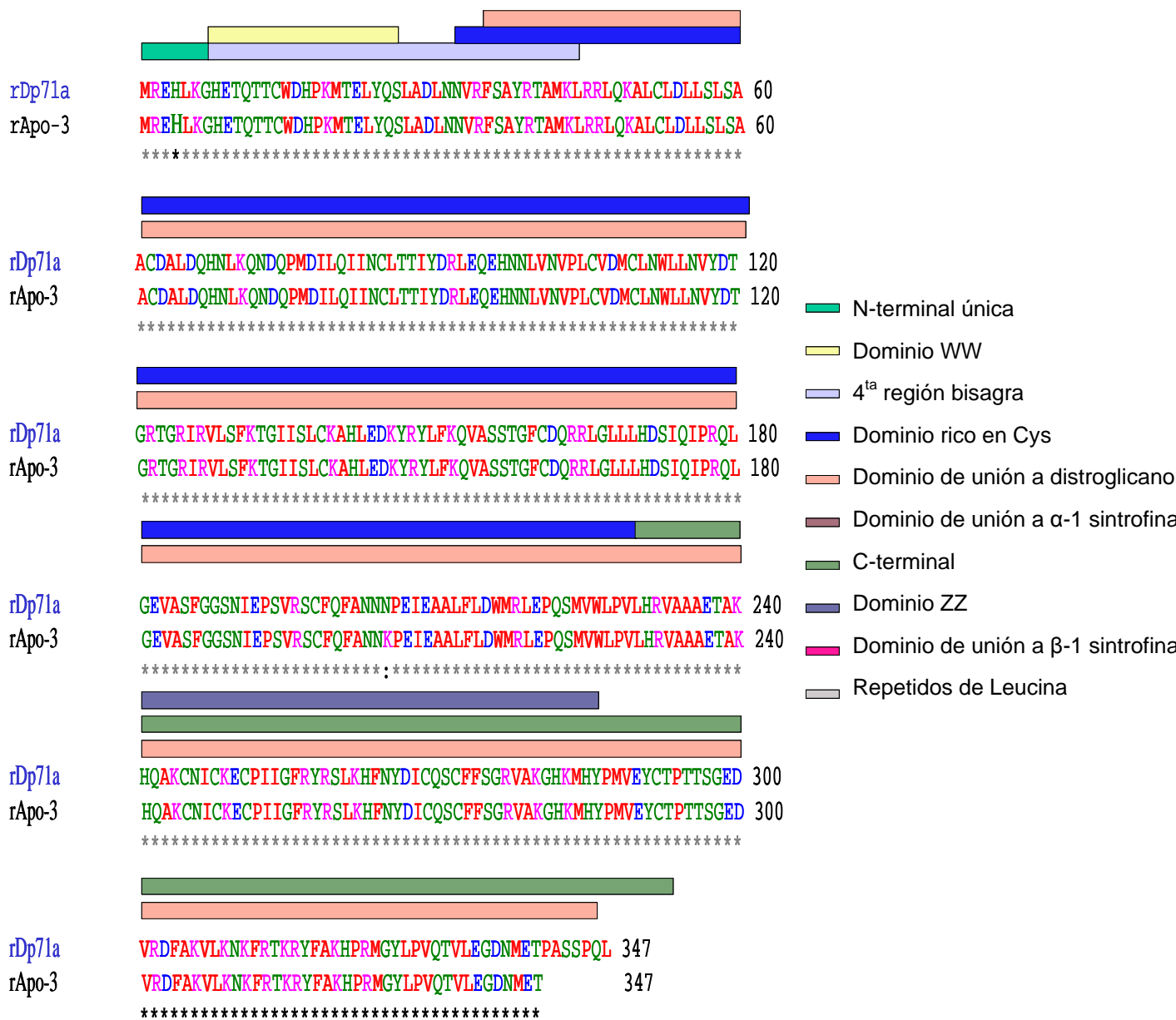


Figura 10. Comparación de la secuencia de aminoácidos entre rDp40 y rDp71. En el primer renglón con el nombre de “rDp71a” se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína rDp71, y en el segundo renglón con el nombre de “rApo3” se muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína rDp40. Los asteriscos indican cada uno de los aminoácidos que comparten las dos secuencias, se observa que solo difieren en el aminoácido ubicado en la posición 205. Las dos proteínas comparten todos los dominios que se indican a la derecha.

Clonación del cDNA de la isoforma rDp40 en el vector pcDNA4/hismax

TOPO TA

Debido a que la secuencia de aminoácidos de rDp40 resultó ser igual a la secuencia de los primeros 240 aminoácidos de rDp71, no es posible diferenciar ambas proteínas utilizando anticuerpos específicos. Es por ello que para poder estudiar la localización de esta proteína, fue necesario clonar el cDNA de Dp40 en vectores con banderas específicas y expresar de manera independiente las proteínas de fusión correspondientes en células eucariontes. Para cumplir con este objetivo se seleccionó el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA porque ofrece la ventaja de que las isoformas se expresan como proteínas de fusión, con el epítipo o bandera Xpress (8 aminoácidos, DLYDDDDK) en su región amino terminal, permitiendo el reconocimiento específico de las distrofinas mediante el uso de anticuerpo(s) dirigidos en contra de la bandera.

El primer paso que se llevo a cabo para clonar esta isoforma en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA fue obtener un producto de PCR utilizando los oligonucleótidos RDP715TOPO y rAPONOT3, estos oligonucleótidos permiten amplificar la región codificante que abarca del exón 1 de Dp71 al exón 70 para esta isoforma. Para esto, las construcciones en pGEM-T Easy fueron linearizadas con la enzima de restricción BstX1 y posteriormente sometidas a la reacción de PCR, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa (figura 11).

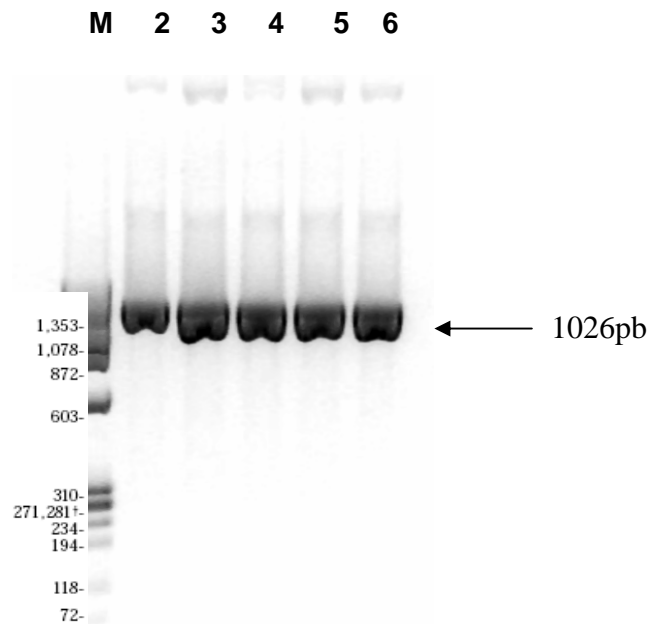


Figura 11. Obtención de los productos de PCR (cDNA) de las isoforma rDp40 para su clonación en el vector TOPO. Se muestra la imagen del gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, en donde se analizaron los productos de PCR de 1026pb que corresponden a la secuencia de rDp40. Carril 1, Marcador de peso molecular; Φ X174 RF DNA/*Hae* III; Carriles 2 al 6 banda correspondiente al producto de PCR para la isoforma rDp40

Los productos obtenidos se clonaron en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA, un vector diseñado para clonar directamente productos de PCR, de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. El DNA ligado se utilizó para transformar células competentes y a continuación se procedió a extraer el plásmido de 12 clonas candidatas para esta isoforma utilizando la técnica de “easy prep” descrita en materiales y métodos. El DNA de cada plásmido obtenido se sometió a un análisis utilizando dos reacciones de PCR independientes; por un lado se usó el oligonucleótido denominado PRIMER5, cuya secuencia se encuentra en la región 5´ UTR de la Dp71 y el oligonucleótido rAPONOT3 localizado en la región 3´ UTR, secuencias que se encuentran en el vector pGEM-T Easy; en la segunda reacción de PCR se utilizó el oligonucleotido RDP715TOPO para el extremo 5´ y el

rAPONOT3 para el extremo 3', oligonucleótidos que solo amplifican la región codificante para ambas isoformas. El motivo por el cual se realizó este doble análisis por PCR fue para diferenciar aquellas clonas cuyos fragmentos de DNA se encontraban en el vector original (pGEM), de las que se encontraban ya clonados en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA, y así continuar con el análisis de aquellas clonas que se encontrasen en pcDNA4/Hismax TOPO TA. En el caso de obtener un producto de PCR, al utilizar tanto el primero como el segundo juego de oligonucleotidos, indicaría que los insertos se encuentran en pGEM, mientras que si solo se obtiene un producto de PCR con el segundo juego de oligonucleótidos, se trata de insertos clonados en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA (figura 12). En la figura se muestra que las clonas de los carriles 8, 10, 11 y 12, son clonas cuyos cDNAs de la isoforma rD40 se encuentran en el vector pGEM, las demás clonas (carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9) contienen insertos en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA, dado que solo presentan un producto de amplificación con el segundo juego de oligonucleotidos.

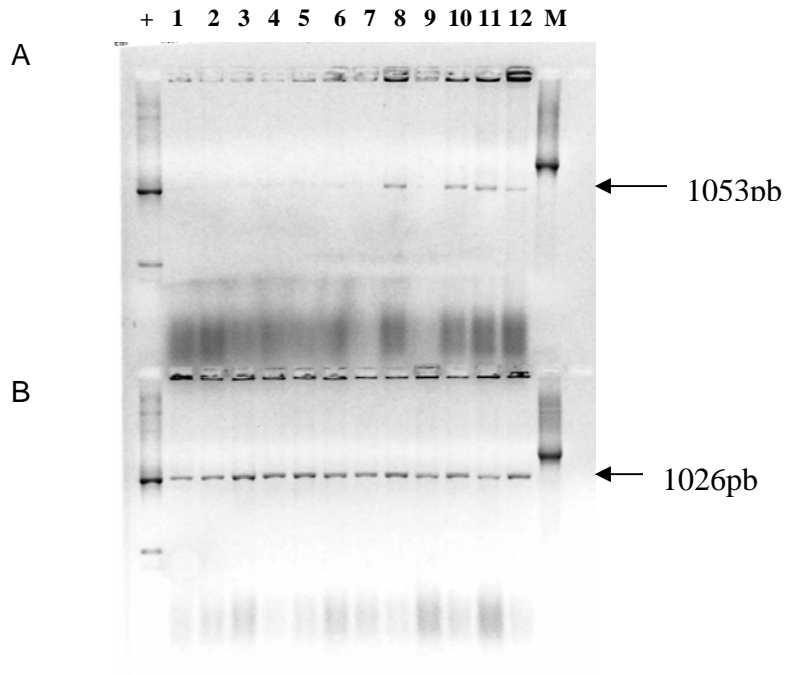


Figura 12. Análisis de candidatos rDp40 en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40. Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR para 12 candidatos utilizando los oligonucleotidos A: PRIMER5 y rAPONOT3, B: RDP715TOPO y rAPONOT3. El DNA obtenido a partir de las reacciones de amplificación se analizó en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. A.- Corresponde a los productos de PCR generados con los oligonucleótidos: PRIMER5 y rAPONOT3. B.- Corresponde a los productos de PCR generados con los oligonucleótidos: RDP715TOPO y rAPONOT3, para las mismas clonas. (+); control positivo, corresponde al inserto del plásmido TOPO. M; marcador de peso molecular; λ DNA/Hind III. Carriles del 1 al 12 clonas candidatas para la isoforma rDp40.

Con el objeto de verificar la secuencia de cDNA de Dp40 clonada en el vector se secuenciaron dos colonias, para la determinación de la secuencia se utilizó el oligonucleótido TOPOF que es complementario a la secuencia del vector, asegurando además de que correspondía a la secuencia de Dp40, la dirección del inserto. El oligonucleótido rAPONOT3 se usó para determinar la secuencia nucleotídica a partir del extremo 3' (Figura 13).

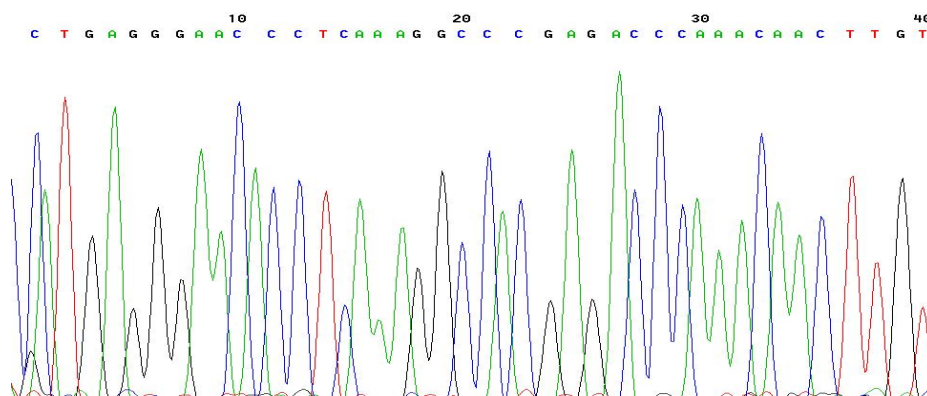


Figura 13. **Cromatograma de la reacción de secuenciación de las clonas pcDNA4/Hismax TOPO TA Dp40.** Para la obtención de la secuencia nucleotídica se utilizaron el oligonucleótido TOPO-F (secuencia del extremo 5') así como el oligonucleótido 3'rAPONOT3). Se muestra parte del cromatograma para la región secuenciada. La secuenciación se realizó en el secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).


```

apopotopof      -----
topo            CGCAGTCCGAGCCGGAGAGGGAGCGCGAGCCGCGCCGGCCCCGGACGGCCTCCGAAACCA

apopotopof      -----TGGACAGCAAA
topo            TGGGGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAA
                                     *****

apopotopof      TGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGTACAGGCCCTTATGAGGGGAACACCTCA
topo            TGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGTACAGGCCCTTATGAGGGGAACACCTCA
                                     *****

apopotopof      AAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGT
topo            AAGGCCACGAGACCCAAACAACCTTGTGGGACCATCCCAAAATGACAGAGCTCTACCAGT
                                     *****

apopotopof      CTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAA
topo            CTTAGCTGACCTGAATAATGTCAGGTTCTCCGCTTATAGGACTGCCATGAAGCTCAGAA
                                     *****

apopotopof      GACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCTTGG
topo            GACTCCAGAAGGCCCTTTGCTTGGATCTCTTGAGCCTGTCAGCTGCATGTGACGCCTTGG
                                     *****

apopotopof      ACCAGCACAACCTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAAGTGT
topo            ACCAGCACAACCTCAAGCAAAATGATCAGCCCATGGATATCCTGCAGATAATTAAGTGT
                                     *****

apopotopof      TGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCT
topo            TGACTACTATTTATGACCGTCTGGAGCAAGAGCACAACAATTTGGTCAATGTCCCTCTCT
                                     *****

apopotopof      GTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGA
topo            GTGTGGATATGTGTCTCAACTGGCTTCTCAATGTTTATGATACGGGACGAACAGGGAGGA
                                     *****

apopotopof      TCCGTGTCCTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAAAGCACACTTGAAGACA
topo            TCCGTGTCCTGTCTTTTAAACTGGCATCATTTCTCTGTGTAAAGCACACTTGAAGACA
                                     *****

apopotopof      AGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGAC
topo            AGTACAGATACCTTTTCAAGCAAGTGGCAAGTTCAACCGGCTTTTGTGACCAGCGTAGAC
                                     *****

```



Figura 14. Secuencia nucleotídica del cDNA de Dp40 clonado en el vector pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40. Se observa que el inserto esta en fase, la flecha indica el codón de inicio de Dp40. Se muestra el alineamiento entre la secuencia obtenida previamente denominada "apo3" y la secuencia denominada topoF y R obtenida por secuenciación de la construcción pcDNA4/Hismax TOPO TA-rDp40. Para el alineamiento se uso el programa Clustal X.

Transfección transitoria de las células PC12 no diferenciadas con las construcciones TOPO-rDp40

Con el objeto de conocer la distribución celular de la isoforma Dp40 en las células PC12, se procedió a transfectar a estas células con el plásmido pcDNA4/Hismax TOPO -rDp40. Previo a esto y como primer paso se procedió a establecer las condiciones adecuadas para la transfección de las células PC12, evaluando la eficiencia de transfección al usar diferentes concentraciones de DNA. Para esto se uso el plásmido reportero pCMV-SPORT β gal, que codifica para la β galactosidasa. La β galactosidasa es una enzima que en presencia del sustrato Xgal genera una coloración azul visible en el microscopio de luz, de esta manera las células que son transfectadas pueden observarse con una coloración azul. Se eligieron cinco condiciones para determinar la eficiencia de transfección: utilizando 20 μ l de lipofectamina, combinados con 650, 1300, 1950, 2600 y 3250 ng de DNA. Posteriormente se tiñeron las células y se determino el porcentaje de células transfectadas (figura 15). Los resultados demuestran que la mejor condición para la transfección de las células PC12, fue aquella que combinaba 20 μ l del reactivo lipofectamina y aproximadamente 2000 ng de DNA, obteniéndose un 3 % de transfección.

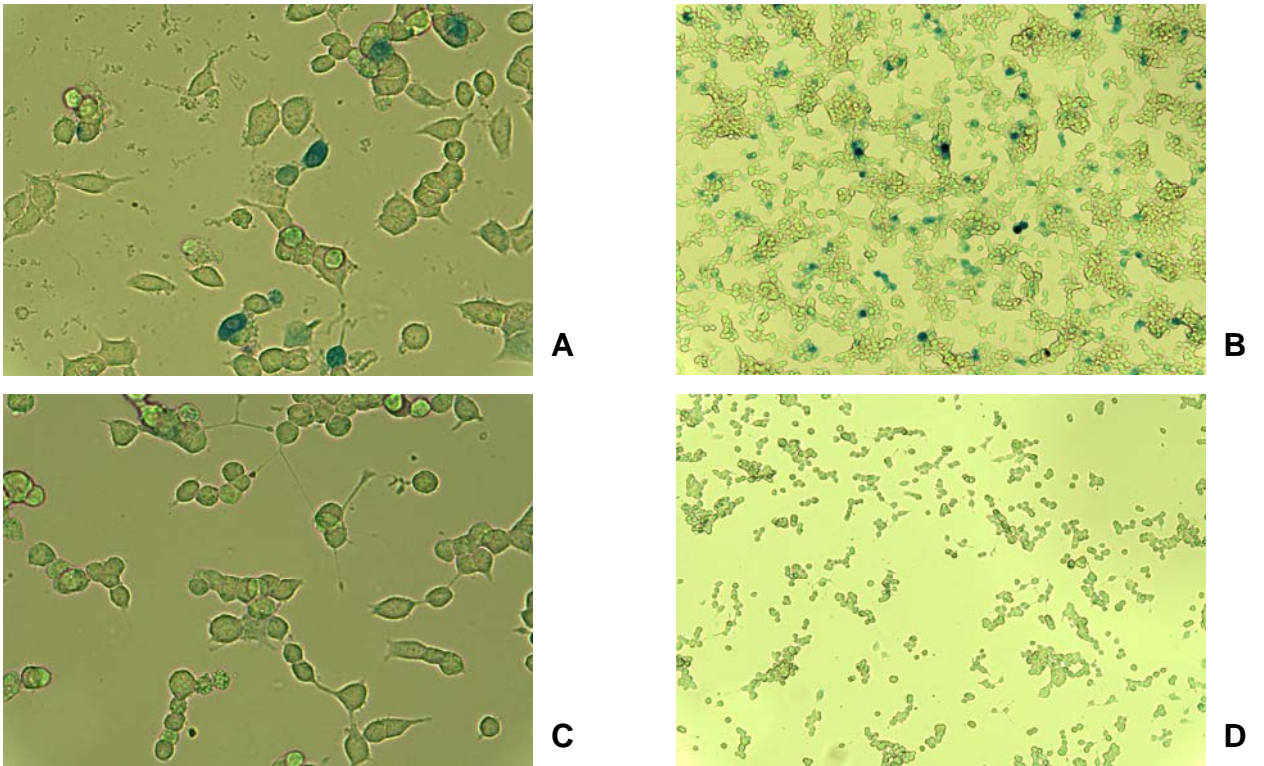


Figura. 15. Transfección de las células PC12 con pCMV-SPORT β gal. A y B corresponden a células tratadas con lipofectamina y con aproximadamente 2000ng del plásmido pCMV-SPORT β gal, C y D corresponden a células tratadas únicamente con lipofectamina. Las fotografías A y C fueron tomadas utilizando un objetivo 100x, y las B y D con un objetivo 40x.

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas para lograr la transfección de las células PC12, que corresponde al 3% de eficiencia se procedió a transfectar a las células PC12 no diferenciadas con las construcciones pcDNA4/Hismax TOPO -rDp40.

Localización de la Dp40 en células PC12

Posteriormente se llevo a cabo un ensayo de inmunofluorescencia para detectar la localización subcelular de la proteína recombinante Xpress-rDp40 utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Xpress.

Las células fueron transfectadas, fijadas, permeabilizadas y teñidas utilizando el anticuerpo anti-Xpress, de acuerdo a como se describe en materiales y métodos. Posteriormente se conjugó un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con ALEXA fluor para las células tratadas con anti-Xpress, éstas preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia. Las imágenes muestran una fuerte señal de localización de la rDp40 en células PC12 no diferenciadas, de forma particulada en el núcleo de las células (figura 16).

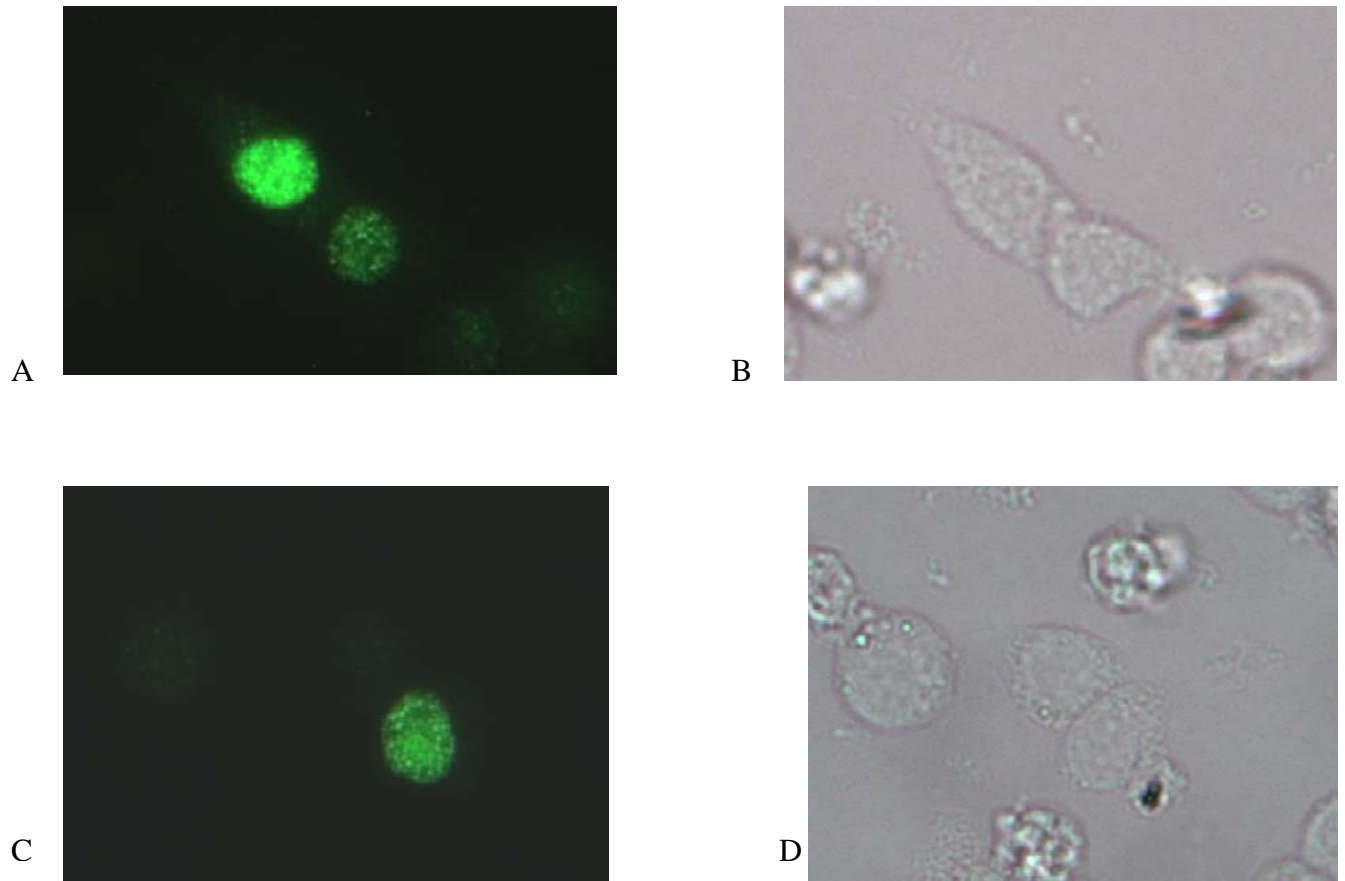


Figura.16 Localización de la rDp40 en células PC12 no diferenciadas. Para observar la localización subcelular de las proteínas recombinantes Xpress-rDp40, las células PC12 transfectadas se analizaron por inmunofluorescencia. Las células fueron transfectadas con la construcción pcDNA4/Hismax TOPO -rDp40 y se trataron con el anticuerpo primario anti-Xpress y el secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa Fluor. Las preparaciones se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axioscop 40 FL, Carl Zeiss), donde se logra apreciar que Dp40 se encuentra particulada principalmente en núcleo.

DISCUSIÓN

La Dp40 es el producto menos estudiado del gen DMD, Feener y colaboradores (1989) fueron los primeros en detectar la presencia de otros transcritos diferentes a distrofina del gen DMD que se expresan en diversos tejidos. Tinsley y colaboradores (1993), identificaron y secuenciaron al producto del gen DMD Apo-distrofina3 o Dp40, extrayendo RNA de una línea celular de schwannoma de rata, y de diversos tejidos humanos, como es el caso del hígado, pulmón, cerebro, músculo fetal y músculo de adulto, y reportaron que esta proteína se transcribe en una secuencia de 2.2Kb. El transcrito de Dp40 produce una proteína de aproximadamente 341 aminoácidos con un peso de 40 KDa, pero a diferencia de la mayoría de los transcritos del gen DMD, y al igual que Dp71 se expresa durante el desarrollo embrionario.

El producto Apo-distrofina 3 o Dp40 comparte 240 aminoácidos de la secuencia del exón 63 al 70 con Dp71 y con la distrofina de longitud completa, al final de esta secuencia rDp40 tiene su propio codón de paro. Como consecuencia, la isoforma Dp40 presenta el dominio rico en cisteínas y los primeros 48 aminoácidos de la región carboxilo terminal. Dentro de las regiones que comparte Dp40 con el resto de las distrofinas se encuentra el sitio WW, la región de bisagra 4, el dominio rico en cisteínas, el sitio de unión a distroglicanos, el dominio ZZ y parte del carboxilo terminal.

Diversos estudios genéticos muestran la importancia funcional de los dominios codificados por el extremo 3' del gen de la distrofina (Cox G. et al., 1994. Roberts R. et al., 1992). El estudio de Michiko Ishikawa (2004) demuestra que el dominio ZZ, de la distrofina, el cual comprende los aminoácidos HQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHRMHY, es esencial para la unión de la distrofina a β -distroglicano y al complejo de las DAPs siendo su papel el reforzar la unión por la interacción intramolecular con la estructura EF en "forma de mano", llamada EF1.

Ponting y colaboradores (1996) mencionaron que el dominio ZZ contiene cisteínas, Lenk, U y colaboradores, en 1996 demuestran que una mutación en la cisteína 3340, impide la unión de distrofina con el complejo de distroglicano siendo responsable de la DMD y de el retraso mental, esto lo comprobaron por la ausencia de la onda-b en un electroretinograma, que indica que las isoformas de la distrofina participan en funciones neurofisiológicas.

Huang X. et al, (2000) reportaron la estructura de cristal de la región de interacción del dominio WW del C-terminal de distrofina con la región rica en prolina del β -distroglicano, esta muestra que el dominio WW, que abarca los aminoácidos HETQTTCWDHPKMTELYQS, esta embebido en una región helicoidal adyacente que contiene dos dominios EF en forma de mano, el péptido beta-distroglicano se une a una superficie formada por el dominio WW y uno de estos EF.

Rentschler S y colaboradores (1999) reportan que la región de distrofina implicada en la unión con β -distroglicano contiene cuatro dominios presentes en proteínas modulares: WW, dos regiones de unión a calcio en forma de mano EF, y un dominio de "dedo" de Zinc. El dominio WW contiene 38 a 40 aminoácidos, es globular y contiene dos residuos de triptofano, se ha mostrado que este dominio se une a ligandos que contienen Pro Pro - x - Tyr. Los autores elucidaron el papel del dominio WW de la distrofina, demostrando que este dominio WW, junto con las regiones EF, se unen al carboxilo terminal de beta-distroglicano. A través de mutaciones sitio específicas y ensayos *in vitro* demostraron que la unión de distrofina con beta-distroglicano ocurre a través del corazón de la región Pro-Pro-x-Try.

Rentschler (1999) muestra en su artículo que el dominio WW es una pequeña región conservada, se mantiene estable en forma de hoja beta de 3 filamentos. Es un dominio de 40 aminoácidos aproximadamente, su nombre deriva de la presencia de dos residuos de triptofano separados por 20 a 23 aminoácidos, y se presentan en la mayoría de los dominios WW conocidos hasta ahora, y de una prolina. El dominio WW

se une a proteínas con dominios particulares de prolina [AP]-P-P-[AP]-Y y/o dominios que contengan fosfoserina-fosfotreonina.

Kathleen y colaboradores (1995), demuestran, que al eliminar el amino terminal o el similar a varilla, tiene efectos moderados en el funcionamiento de la distrofina, sin embargo el eliminar dominios ricos en cisteína conlleva a un fenotipo de distrofia severo, aun cuando se sigue expresando a la proteína en niveles normales. (Corrado, 1996)

Jung y colaboradores (1995) demostraron que la segunda mitad de la bisagra 4, que comprende los aminoácidos HETQTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSA YRTAMKL y el dominio rico en cisteínas, el cual abarca los aminoácidos: NVRFSA YRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDIINCLTTIYDRL EQEHNNLVNVPLCVD MCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFRTGIISLCKAHLEDKYRYLF KQVASSTGFCDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNNPEIE AALFLDWMRLEPQSMVWLPVL se une al C terminal de β -dístroglicano. Demostraron que el dominio citoplásmico de β -dístroglicano se une a SH3 de Grb2, por lo tanto se puede asumir que la interacción entre distrofina y β -dístroglicano puede estar relacionada a la secuencia rica en prolina SH3.

Corrado et al. (1996) Generó un ratón transgénico que expresaba el gen DMD pero con ausencia de los exones 71 a 74, y la expresión de esta distrofina restauró las DAP's, y previno la patología de distrofia, lo que aparenta que la proteína sin los exones 71 a 74 es capaz de mantener la unión entre el citoesqueleto y la matriz extracelular y mantener la integridad estructural de las células musculares.

El carboxilo terminal de Dp40 comprende los siguientes aminoácidos: HRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHRMHYPM VEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMET

Adicionalmente se ha reportado el procesamiento alternativo de exones cercanos al carboxilo terminal, que son tejido específico (Bies et al., 1992. Feener C. et al., 1989).

El conocer la función de las isoformas cortas de la distrofina, con procesamientos alternativos específicos, es de gran interés para entender la relación estructura función de la región carboxilo terminal, en los distintos síntomas clínicos asociados con DMD. El conocimiento de los patrones de expresión de los transcritos cortos de la distrofina puede ayudar a entender el papel funcional de esta isoforma.

Los resultados de éste trabajo indican que Dp40 se expresa en células PC12 de rata sin diferenciar y durante la diferenciación a los 4, 9 y 12 días después del tratamiento con NGF.

Otro de los objetivos de este estudio fue investigar la localización subcelular de rDp40. Reportes previos han demostrado que las isoformas de distrofina que no codifican para el exón 74, son detectadas predominantemente en cerebro, corazón y músculo liso, pero es muy raro que se exprese en músculo esquelético (Bies et al 1992). Esto indica que la interacción con sintrofinas es indispensable para la distrofina del músculo esquelético, el procesamiento alternativo en los exones 71 y 78 de la Dp71, regulan su localización citoplásmica o nuclear en células PC12 (González et al., 2000, Márquez et al., 2003),

Crawford y colaboradores (2000) compararon cepas de ratones una "wild type" y otra cepa transgénica con una distrofina de ratón a la que le eliminaron del exón 71 al 78, y sus resultados muestran que la función de la distrofina "wild type" es la misma que la de la distrofina $\Delta 71-78$, y concluyen que la sintrofina y distrobrevina pueden unirse al complejo DAP independientemente de la distrofina y su asociación es suficiente para prevenir la distrofia.

Debido a que las células PC12 expresan rDp40 (la cual tiene el codón de inicio en el exón 63 y el de paro en el intrón 70), éstas pueden ser utilizadas como modelo

de estudio para tanto la expresión como la localización e interacciones de Dp40 con otras proteínas.

A la fecha no se ha reportado ningún trabajo en donde se estudie la función de esta proteína. Dado que no se cuentan con anticuerpos específicos para distinguir rDp40, se generó una proteína recombinante con una bandera que permitiera monitorear con mayor facilidad a la Dp40, de tal forma que se pueda determinar la localización subcelular. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la distribución de la proteína Xpress-rDp40 es particulada en las células, dentro del núcleo. Este trabajo es el primer reporte de la distribución de la Dp40

Las células PC12 producen tres isoformas de Dp71; la que carece del exon 71 y cuenta con el exón 78 (Dp71d) denominada rDp71a, la que por procesamiento alternativo pierde el exon 78 rDp71ab (Dp71f), existe una tercer isoforma de Dp71 que se ha denominado rDp71c isoforma que, presenta el exón 78 pero carece de los exones 71 al 74.

rDp40 y rDp71c carecen de los exónes 71 al 74, no se asocian con sintrofina y por lo tanto no forman parte del complejo que incrementa la señal de localización nuclear, sin embargo, Dp40 se localiza en núcleo. Este resultado permitirá estudiar a futuro los factores que participan en la localización nuclear de esta isoforma sí como su función en el núcleo.

CONCLUSIONES

- Las células PC12 expresan a la distrofina rDp40. Esta proteína se expresa en células no diferenciadas y a 4, 9 y 12 días de diferenciación inducida por NGF.
- rDp40 comparte con Dp71 la región amino-terminal, el dominio rico en cisteínas, la región ZZ y WW, que corresponde al sitio de unión a distroglicanos.
- Dp40 se expresa al mismo tiempo que Dp71 en las células PC12.
- En las células PC12 la proteína rDp40 se encuentra principalmente en el núcleo.

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

cDNA: DNA complementario

C-terminal: Región carboxilo terminal

DAPs: Proteínas asociadas a distrofina

DMD: Distrofia muscular de Duchenne

h: hora(s)

Kb: kilobases

KDa: kilodaltons

µl: microlitro

mRNA: RNA mensajero.

NGF: Factor de crecimiento neural.

nm: nanómetros

nNOS: oxido nítrico sintetasa neuronal

N-terminal: Región amino terminal

pb.: pares de bases

PBS: amortiguador salino de fosfatos

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDZ: proteína de densidad postsináptica95/discos largos/zona occludens 1

PFA: paraformaldehído

PI: punto isoeléctrico

rDp40: Dp40 que se expresa en células PC12 cuyo origen es de rata

rDp71a: Dp71d que se expresa en células PC12 cuyo origen es de rata

rDp71c: Dp71d que carece de los exones 71-74, que se expresa en células PC12, cuyo origen es de rata.

RPMI: medio Roswel Park Memorial Institute

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa acoplado a la transcripción reversa.

WW: dominio rico en triptofano

ZZ: motivo de dedos de zinc

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbs S. and Bobrow M. 1992. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *Journal of medical genetics*. 29: 191-196.
- Abbs S., Roberts R., Mathew C. and Bobrow M. 1990. Accurate assessment of intragenic recombination frequency within the Duchenne muscular dystrophy gene. *Genomics*. 7: 602-606.
- Abbs S., Yau S., Clark S., Mathew C. and Bobrow M. 1991. A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: A comparative analysis with cDNA hybridisation reveals mistypings by both methods. *Journal of medical genetics*. 28: 304-311.
- Adams E. Dwyer T., Dowler L., White R and Froehner C. 1995. Mouse α 1- and β 1-syntrophin gene structure, chromosome localization and homology with a discs large domain. *Journal of Biological Chemistry*. 270:25859-25865.
- Ahn A., and Kunkel L. 1995. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *Journal of Cell Biology*. 128: 363-371.
- Ahn A., Freener C., Gussoni E., Yoshida M., Ozawa E. and Kunkel L. 1996. The three human syntrophin genes are expressed in diversified tissues, have distinct chromosomal locations and each bind to dystrophin and its relatives. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:2724-2730.
- Allen N. 1973. Hearing acuity in patients with muscular dystrophy. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 15:500-505.
- Andac Z., Sasaki T., Mann K. Brancaccio A., Deutzmann R. and Timpl R. 1999. Analysis of heparin, α dystroglycan and sulfatide binding to the G domain of the laminin α 1 chain by site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Biology*. 287:253-264.

- Andre, B. and Springel, J.Y. (1994) WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 205:1201–1205
- Bies R., Phelps S. Cortez M. Roberts R., Caskey C. Chamberlain J. 1992. *Nucleic Acids Research*; 20:1725-1731.
- Bork P. and Sudol M. 1994. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends in Biochemical Sciences*. 19: 531-533.
- Blake D., Tinsley J., Davies K., Knight A., Winder S. and Kendrick- Jones J. 1995. Coiled-coil regions in the carboxy terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends in Biochemical Sciences*. 20:133-135.
- Brenman J., Chao D., Gee S., Mc Gee A., Craven S., Santillano D., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M., Froehner S. and Bretz D. 1996. Interaction of nitric-oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha-1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell*. 84:757-767.
- Corrado K., Rafael J., Mills P., Cole N., Faulkner J., Wang K., Chamberlain J. 1996. Transgenic *mdx* Mice Expressing Dystrophin with a Deletion in the Actin-binding Domain Display a "Mild Becker" Phenotype. *Journal of Cell Biology* 134: 873-884.
- Crawford G., Faulkner J., Crosbie R., Campbell K., Froehner S., Chamberlain S. 2000. Assembly of the Dystrophin-associated Protein Complex Does Not Require the Dystrophin COOH-terminal Domain. *Journal of Cell Biology* 150(6):1399-410.
- Crosbie R., Heigway J., Venzke D., Lee J. and Campbell K. 1997. Sarcospan the 25 kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Journal of Biological Chemistry*. 272:31221-31224.

- Davies K., Pearson P., Harper P., Murray J., O'Brien T., Sarfarazi M and Williamson R. 1983. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acid Research*. 11: 2303-2312.

- Duclos F., Straub V., Moore S., Venzke P., Hrstka R., Crosbie R., Durbeej M., Lebakken C., Ettinger A., Vander Meulen J., Holt K., Lim L., Sanes J., Davidson B., Faulkner J., Williamson R. and Campbell K. 1998. Progressive muscular dystrophy in α sarcoglycan deficient mice. *Journal of Cell Biology*. 142: 1461-1471.

- Durbeej M. and Campbell K. 1999. Biochemical characterization of the epithelial dystroglycan complex. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:26609-26616.

- Emery A. 1992. Duchenne Muscular Dystrophy. *Oxford University Press*. 2nd ed. Oxford.

- Ettinger A., Feng G. and Sanes J. 1997. Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *The Journal of Biological Chemistry*. 272: 32534-32538.

- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. 1989. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*. 338:509-511

- Gee S., Blacher R, Douville P., Provost P, Yurchenko P. and Carbonetto S. 1993. Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *The Journal of Biological Chemistry*. 268: 14972-14980.

- Gee S., Madhavan R., Levinson S., Caldwell J., Scallock R. and Froehner S. 1998. Interaction of muscle and brain sodium channel with multiple members of

the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *Journal of Neuroscience*. 8:128-137.

- Gibson T., Hyvonen M., Mursachio A., Saraste M. and Virrey E. 1994. PH domain "the first anniversary". *Trends in Biochemical sciences*. 19:349-353.

- González E., Montañez C. Ray P., García-Sierra F., Mornet D. and Cisneros B. 2000. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin. Dp71. *Federation of European Biochemical Societies*. 482:209-214.

- Górecki D., Abdulrazzak H., Lukaziuk K and Barnard E. 1997. Differential expression of syntrophins and analysis of alternatively spliced dystrophin transcripts in the mouse brain. *European Journal of Neuroscience*. 9: 965-976.

- Greenberg D., Shatz Y., Levy Z., Pizzo P., Yaffe D. and Nudel U. 1996. Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Human Molecular Genetics*. 5:1299-1303.

- Greene L. A. y Tischler A. S. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 73: 2424–2428

- Grifman M. and Sureq H. 1997. Differentiation intensifies the susceptibility of pheochromocytoma cells to antisense oligodeoxynucleotide-dependent suppression of Acetyl cholinesterase activity. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*. 7:351-359.

- Hack A., Ly C., Jians F., Chendenin C., Sigust K., Wollman R. and McNally E. 1998. γ Sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *Journal Cell Biology*. 142:1279-1287.

- Holt K., Crosbie R., Venzke D. and Campbell K. 2000. Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide. *FEBS letters*. 468:79-83.

- Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M. and Eck, M. J. (2000). Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nature: Structural and Molecular Biology* 7: 634-638.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O., Ervasti J. M., Leveille C. J., Slaughter C. A., Sernett S. W. and Campbell K. P. 1992. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 355: 696-702.
- Ishikawa S., 2004. ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to B-dystroglycan. *Human molecular genetics* 13(7): pp. 693-702
- Jung D., Yang B., Meyer J., Chamberlain J. and Campbell K. 1995. Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 27305-27310.
- Koenig M and Kunkel L. 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *Journal of Biological Chemistry*. 265: 4560-4566.
- Koenig M, Hoffman E P, Bertelson C J, Monaco A P, Feener C, Kunkel L M. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene. *Cell*. 50: 509-517.
- Kramarcy N., Vidal S., Froehner S. and Salock S. 1994. Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian Mr 58,000 dystrophin associated protein (syntrophin). *Journal of Biological Chemistry*. 269:2870-2876.
- Lederfein D., Levy Z., Augier N., Mornet D., Morris G., Fuchs O., Yaffe D. and Nudel U. 1993. *Human Molecular Genetics*. 2:1883-1888.

- Lenk, U; Hanke, R; Thiele, H; Speer, A. 1993. Point mutations at the carboxi terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Human Molecular Genetics*. 2: 1877-1881.
- Lim E., Duclos F., Broux O., Bourg N., Sunada Y., Allamand V., Meyer J., Richard L., Moomaw C., Slaughter C., Tome F., Fardeau M., Jackson C., Beckman J. and Campbell K. 1995. Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature genetics*. 11: 257-265.
- Lim L. and Campbell K. 1998. The sarcoglycan complex in Limb-girdle muscular dystrophy. *Current Opinion in Neurology*. 11:443-452.
- Lupas A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends in biological sciences*. 21: 375-382.
- Márquez F., Cisneros B., García F., Ceja V., Velásquez F., Depardon F., Cervantes A., Rendón A. Mornet D., Rosas-Vargas H. Mustre M. and Montañez C. 2003. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*. 118:957-966.
- Matsumura K., Ervasti J., Ohlendieck K., Kahl S. and Campbell K. 1992. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in *mdx* mouse muscle. *Nature* 360: 588-591.
- Matsumura K., Saito F., Yamada H., Hase A., Sunada Y and Shimizu T. 1999. Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cellular and Molecular Biology*. 45: 751-762.
- Mizuno Y., Noguchi S., Yamamoto H., Yoshida M., Suzuki A., Hagiwara Y., Hayashi Y., Arahata K., Nonaka I., Hirai S. and Ozawa E. 1994. Selective defect of sarcoglycan complex in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 203: 979-983.

- Nigro V., Piluso G., Belsito A., Politano L., Puca A., Papparella S., Rossi E., Viglietto G., Esposito M., Abbondanza C., Medici N., Molinar A., Nigro G. And Puca G. 1996. Identification a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Human Molecular Genetics*. 5: 1179-1186.
- Noguchi S., Mc Nally E., Othmane K., Hagiwara Y., Mizuno Y., Yoshida M., Yamamoto H., Bonneman C., Gussoni E., Denton P., Middleton L., Hentati F., Ben Hamida M., Nonaka I., Vancej., Kunkel L. and Ozawa E. 1995. Mutation in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*. 270: 819-822
- Oudet C., Hanaver A., Clemens P., Caskey T. and Mendell J. 1992. Two hotspots of recombination in the DMD gene correlate with deletion prone regions. *Human Molecular Genetics*. 1:599-603.
- Peters M., Kramarcy N., Sealock R. and Froenher S. 1994. Beta 2-syntrophin-localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreports*. 5: 1577-1580.
- Pillers D., Busman D., Wilber R., Salesman D., Mozzarella M., Powell B., Murphy W., West all C., Pantone C., Becker L., Orton R. and Ray P. 1993. Dystrophic expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature Genetics*. 4: 82-86.
- Ponting C., Blake D., Davies K., y Winder J. 1996. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends in Biochemical Sciences*_ 21(1): pp11-13
- Rapaport D., Pasgos-Buenos M. Brendao L., Love D., Vainzof M. and Zatz M. 1991. Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a en Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Medical Genetics*.39: 437-441.

- Rentschler S, Linn H, Deininger K, Bedford M, Espanel X, y Sudol M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biological chemistry*. 380, pp. 431-442
- Rita Barresi, Steven A. Moore, Catherine A. Stolle, Jerry R. Mendell, and Kevin P. Campbell. 2000. Expression of γ -Sarcoglycan in Smooth Muscle and Its Interaction with the Smooth Muscle Sarcoglycan-Sarcospan Complex. *Journal of Biological Chemistry*., 275: 38554-38560.
- Roberds S., Leturcq F., Allamand V., Piccolo F., Jeanpierre M., Anderson R., Lim L., Lee J., Tome F., Fardeau M., Beckmann J., Kaplan J. and Campbell K. 1994. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*. 78: 625-633.
- Roberts R., Coffey A., Bobrow M. and Bentley D. 1993. Determination of the exon structure of the distal portion of the dystrophin gene by vectorette PCR. *Genomics*. 13:942-950.
- Sadoulet-Puccio H., Khurana T., Cohen J. And Kunkel L. 1996. Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Human Molecular Genetics*. 5: 489-496.
- Sadoulet-Puccio H., Rajala M. and Kunkel L. 1997. Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94:12413-12418.
- Sewry C., Taylor J., Anderson L., Ozawa E., Pogue R., Piccolo F., Bushby K., Dubowitz V. and Muntoni F. 1996. Abnormalities in α -, β - and γ -sarcoglycan in patients with limb-girdle muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders*. 6: 467-474.

- Schubert D, Klier FG (1977) Storage and release of acetylcholine by a clonal cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 74:5184–5188.
- Shultz J., Hoffmuller U., Krause G., Ashhurst j., Macias M., Schmieder P., Schneider-Mergener J. and Oschkinat H. 1998. Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nature Structural Biology*. 5:19-24.
- Suzuki A., Yoshida M y Ozawa E. 1995. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *Journal of Cell Biology*. 128: 373-381.
- Tinsley J., Blake D. y Davies K. 1993. Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Human Molecular Genetics* 2: 521-524
- Tinsley J., Blake D., Zuelig R. y Davies K. 1994. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 8307-8313.
- Tochio H., Zhang Q., Mandal P., Li M., y Zhang M. 1999. Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nature Structural Biology*. 6:417-421.
- Yang B., Jung D., Rafael J., Chamberlain J. y Campbell K. 1995. Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 4975-4978.