



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**CONSTRUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Dp71 CON
FUSIONES EN EL CARBOXILO TERMINAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A
MARQUEZ MEJÍA JANETTE**

**ASESORA: DRA. SILVIA CECILIA IRENE MONTAÑEZ OJEDA
COASESORA: M. EN C. ANDREA BECERRIL OSNAYA**



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
EXAMENES PROFESIONALES

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
**Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**
Construcción de proteínas recombinantes Dp71 con fusiones en el carboxilo terminal.

Que presenta la pasante: **Janette Márquez Mejía**
Con número de cuenta: **09922173-9** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de septiembre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er SUPLENTE	QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
2do SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda y con el apoyo del donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 127600.

Gracias al Eterno por concederme la vida para permitirme llegar a este momento tan importante y lograr esta meta en mi vida.

A mis padres y hermanos:

Alfonso Márquez y Gloria Mejía, por su apoyo incondicional, toda su dedicación, entrega, y sus dignos ejemplos de superación, pero sobre todo por su amor que me han dado.

Alberto y Lizbeth Márquez por su compañía, apoyo y amor.

A mi esposo e hija:

Mario Rivera, por permanecer a mi lado, creer en mí, alentarme y apoyarme. Por su paciencia y amor incondicional.

A mi princesa Hannah, que alegra cada uno de mis días y me alienta a no caer y seguir cumpliendo mis metas.

A mis amig@s:

Isis Servin, Elsa Salazar, Alfonso Alvarado, Sra. Verónica López por sus palabras de aliento y por su sincera amistad.

A mis compañeros de la Facultad: Guadalupe, Alicia, Mario, Evelina, Celeste, Karina, Vero, y en general, a mis compañeros de la Generación 29.

A Margarita y Miguel por su cariño, confianza y respaldo.

A mis asesores:

Dra. Silvia Cecilia Irene Montañez Ojeda; por la oportunidad de participar en un gran equipo de trabajo. Por su paciencia, asesoría y confianza en mí.

Al Dr. Jorge, Biol. Alejandra, Dr. Francisco Depardón †, M en C. Alejandro, Dr. Victor y al Sr. Adalberto por su asistencia técnica y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la M. en C. Andrea Becerril Osnaya, por su apoyo y asesoría.

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Abreviaturas	iv
Resumen	v
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	1
1.2 El Gen DMD	2
1.2.1 Promotores tejido-específicos e isoformas de la distrofina	2
1.2.2 Mutaciones del gen DMD	3
1.3 Distrofina	4
1.3.1 Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC)	5
1.3.1.1 Distroglicanos	5
1.3.1.2 Subcomplejo sarcoglicano-sarcospan	6
1.3.1.3 Proteínas citoesqueléticas asociadas	7
1.4 Dp71	8
1.5 Dp40	12
1.6 Antecedentes directos	12
1.7 Justificación	15
II. OBJETIVOS	
2.1 General	16
2.2 Particulares	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> DH5 α	17
3.2 Transformación bacteriana	17
3.3 Extracción de DNA plasmídico por método alcalino	17
3.3.1 Extracción fenólica	18
3.3.2 Obtención de plásmidos por el Kit QIAprep spin Miniprep (QIAGEN)	19
3.4 Amplificación por PCR	19
3.4.1 Purificación de productos de PCR	20
3.5 Clonación en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO	21
3.6 Restricción enzimática	21
3.7 Secuenciación	22
IV. RESULTADOS	
4.1 Construcciones teóricas del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO con los insertos de las isoformas de rDp71 y rDp40	23
4.2 Preparación de células competentes y transformación con los diferentes plásmidos pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e y pPROEX-1/rDp40	26
4.3 Extracción de los plásmidos pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e, y pPROEX-1/rDp40	26

4.4	Diseño de oligos y amplificación por PCR de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40	27
4.5	Clonación de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40 en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO	32
4.6	Caracterización de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ_{78-79} y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por PCR, restricción enzimática y secuenciación	35
V.	DISCUSIÓN	55
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	BIBLIOGRAFÍA	62

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Oligos utilizados para la amplificación por PCR.
- Tabla 2.** Oligos utilizados para la secuenciación automática.
- Tabla 3.** Concentración y purezas de los plásmidos pPROEX-1/Dp71 y pPROEX-1/Dp40.
- Tabla 4.** Determinación de la concentración de los productos de PCR obtenidos.
- Tabla 5.** Obtención de bacterias transformantes.
- Tabla 6.** Cuantificación de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/Isoformas rDp71 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40.
- Tabla 7.** Fragmentos de restricción teóricos de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ_{78-79} y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 digeridos con *Pst*I.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Clasificación de las isoformas de Dp71.
- Figura 2.** Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a.
- Figura 3.** Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab.
- Figura 4.** Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e.
- Figura 5.** Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ.
- Figura 6.** Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40.
- Figura 7.** Extracción de plásmidos pPROEX-1/rDp71a y pPROEX-1/rDp71ab.
- Figura 8.** Extracción de plásmidos pPROEX-1/rDp71e y pPROEX-1/rDp40.
- Figura 9.** Estandarización de la reacción de PCR de las isoformas pPROEX-1/Dp71 y de la pPROEX-1/Dp40.
- Figura 10.** Productos de PCR de las isoformas pPROEX-1/Dp71 y de la pPROEX-1/Dp40 obtenidos con 75 mM de MgCl₂ y purificados.
- Figura 11.** Productos de PCR de las isoformas pPROEX-1/Dp71 y de la pPROEX-1/Dp40.
- Figura 12.** Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40.
- Figura 13.** Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ.
- Figura 14.** Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e.
- Figura 15.** Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab.
- Figura 16.** Plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2.
- Figura 17.** Plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a (1.5 y 1.6), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab (3 y 4), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e (4.6 y 4.8), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 (1.1 y 1.2).
- Figura 18.** Caracterización de los plásmidos recombinantes (maxiprep) pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por PCR.
- Figura 19.** Caracterización de los plásmidos recombinantes (miniprep) pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-

TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por PCR.

- Figura 20.** Digestión enzimática teórica de los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 con *PstI* y *HindIII*.
- Figura 21.** Caracterización de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por restricción enzimática.
- Figura 22.** Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab.
- Figura 23.** Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab.
- Figura 24.** Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e.
- Figura 25.** Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e.
- Figura 26.** Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ.
- Figura 27.** Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ.
- Figura 28.** Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40.
- Figura 29.** Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40.

ABREVIATURAS

°C:	Grados centígrados
μl:	Microlitros
Amp:	Ampicilina
ASB:	Albumina sérica bovina
CaCL₂:	Cloruro de calcio
cDNA:	DNA complementario
C-terminal:	Carboxilo terminal
DAPC:	Complejo de proteínas asociado a distrofina
DG:	Distroglicano
DMB:	Distrofia muscular de Becker
DMD:	Distrofia Muscular de Duchenne
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs:	Deoxinucleótidos trifosfato
Dp:	Distrofina
EDTA:	Ácido etilendiamino tetracético
g:	Gramos
HCl:	Ácido clorhídrico
Kb:	Kilo bases
KCl:	Cloruro de potasio
kDa:	Kilo Daltones
M:	Molar
m:	Minutos
MgCl₂:	Cloruro de magnesio
MgSO₄:	Sulfato de magnesio
mL:	Mililitro
mM:	Milimolar
MnCL₂:	Cloruro de manganeso
mRNA:	RNA mensajero
ng:	Nanogramos
NGF:	Factor de crecimiento neural
NLS:	Señal de localización nuclear
nNOS:	Óxido nítrico sintasa
N-terminal:	Amino terminal
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
rDp40:	Distrofina Dp40 cuyo origen es de rata
rDp71:	Distrofina Dp71 cuyo origen es de rata
rpm:	Revoluciones por minuto
s:	Segundos
SG:	Sarcoglicano
TBE:	Tris-Borato-EDTA
Ufc:	Unidad formadora de colonia
WW:	Dominio rico en triptófano
ZZ:	Motivo dedos de zinc

RESUMEN

La Distrofia Muscular de Duchenne es un desorden recesivo ligado al cromosoma X que afecta principalmente músculo esquelético y cardíaco; así como algunos otros tejidos incluyendo cerebro y retina. Este padecimiento es causado por mutaciones en el gen DMD que resultan en la pérdida o en la expresión de formas mutantes de esta proteína. Se estima que el gen DMD tiene un tamaño de 3000 Kb e incluye 79 exones. La transcripción del gen está regulada de una manera tejido específica por al menos ocho promotores diferentes. El producto de este gen es conocido como distrofina y tiene un peso molecular de 427 kDa. La Distrofina está compuesta por cuatro dominios diferentes: 1) N-terminal de unión a actina, 2) central o similar a espectrina, 3) rico en cisteínas y que contiene a su vez un dominio WW que interactúa con β -dystroglicano y 4) C-terminal que contiene múltiples dominios que interactúan con proteínas integrales y periféricas de membrana, entre ellos motivos de unión a proteínas "coiled coil" que muestran interacción con sintrofinas, distrobrevinas y otras proteínas asociadas a distrofina.

La Dp71 es una glicoproteína que se expresa en una gran variedad de tejidos no musculares incluyendo cerebro, a partir del gen DMD. Dp71 es requerida para el anclaje y la organización de las DAPC en el cerebro y las mutaciones en el C-terminal de la distrofina pueden afectar la expresión de esta distrofina, lo cual se ha asociado con retardo mental en los pacientes DMD. El mRNA de Dp71 contiene 4.8 Kb y los transcritos de Dp71 sufren procesamiento alternativo hacia la región 3' en los exones 71, 71-74 y 78. La delección del exón 71 no cambia el marco de lectura; sin embargo la pérdida del exón 78 resulta en la sustitución de los últimos 13 aminoácidos hidrofílicos de la distrofina con 31 aminoácidos que le confieren propiedades hidrofóbicas a la Dp71. Esta isoforma Dp71 carente del exón 78 se ha denominado Dp71f y presentan una localización citoplasmática; mientras que la isoforma que presenta este exón se ha denominado Dp71d y muestran una localización predominantemente nuclear.

Se han construido vectores que generan isoformas de proteínas Dp71 recombinantes fusionadas con banderas en el extremo N-terminal con el fin de estudiar su localización subcelular. En este contexto el objetivo de este trabajo fue obtener proteínas Dp71 recombinantes fusionadas con el epítipo V5 en el carboxilo terminal. Para esto primeramente se obtuvo DNA plasmídico por el método alcalino de los siguientes plásmidos pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e, pPROEX-1/rDp40. Después se diseñaron los oligos 5' y 3' para amplificar el DNA de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ y se estandarizó la técnica de PCR. Una vez obtenidos los productos de PCR se purificaron y se clonaron en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO. El DNA de cada candidato se verificó por PCR, restricción enzimática y posteriormente por secuenciación automática de los extremos 5' y 3'. Al realizar la reacción de PCR se obtuvo un fragmento de alrededor de 1800 pb para las isoformas Dp71, mientras que para Dp40 se observó un fragmento de menor tamaño (~1000 pb). Para la clonación de los fragmentos de PCR en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO se realizaron diversos ensayos de ligación y transformación para incrementar el número de candidatos, sin embargo la eficiencia de transformación en todos los ensayos fue menor a lo requerido (1×10^3 ufc/ μ g). Las clonas obtenidas después de la reacción de ligación se analizaron por PCR, por restricción enzimática con la enzima *Pst*I y *Hind*III y finalmente por secuenciación, donde pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3 y 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 mostraron la secuencia nucleotídica de Dp71 y Dp40 respectivamente en los extremos 5' y 3', cumpliéndose así el objetivo propuesto.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

La Distrofia Muscular de Duchenne es un desorden recesivo ligado al cromosoma X afecta principalmente músculo esquelético y cardíaco; así como algunos otros tejidos incluyendo cerebro y retina (Austin *et al.*, 1995). Este padecimiento afecta aproximadamente 1 en 3500 niños (Hoffman *et al.*, 1987 y Koenig *et al.*, 1987) y es causado por mutaciones en el gen DMD, el cual codifica para una proteína llamada distrofina. La distrofina se localiza en el sarcolema del músculo esquelético normal, pero está ausente en el músculo de los pacientes DMD; mientras en la distrofia muscular de Becker (DMB), que corresponde a la forma menos severa, se presentan niveles menores de distrofina, isoformas de menor tamaño o ambas situaciones (Campbell, 1995).

Los pacientes afectados con DMD son diagnosticados entre los 3 y 5 años de edad cuando presentan niveles elevados de la isoforma muscular de creatin cinasa en suero, decremento en la habilidad física motriz (caídas frecuentes, dificultad al subir escaleras, correr y saltar) y pseudohipertrofia en los músculos de la pantorrilla (O'Brien *et al.*, 2001); el padecimiento se caracteriza por ciclos repetidos de necrosis y regeneración del músculo esquelético, que producen fibrosis y pérdida del músculo (Emery, 1993). Dado que la pérdida de músculo es muy severa, estos pacientes son confinados a una silla de ruedas alrededor de los 12 años y mueren alrededor de la segunda o tercera década de vida por falla cardíaca o respiratoria (O'Brien *et al.*, 2001).

Además de los problemas musculares, los pacientes con DMD muestran anormalidades en su comportamiento tales como; autismo y déficit de atención (Ahn *et al.*, 1995), retraso mental (Rapaport *et al.*, 1991), déficit cognoscitivo (O'Brien *et al.*, 2001) y un coeficiente intelectual (I.Q.) por debajo de lo normal (Bresolin *et al.*, 1994).

1.2 El Gen DMD.

El locus del gen está localizado en la banda Xp21 (Koenig *et al.*, 1987). El gen DMD es el gen humano con mayor longitud dentro de los que se han caracterizado y se estima su tamaño alrededor de 3000 kb (Nishio *et al.*, 1994), su cDNA de longitud completa en músculo esquelético es de 14 kb (Koenig *et al.*, 1987). El gen está compuesto de 79 exones e intrones de varios cientos de kb en longitud, los exones codificantes conforman solo el 0.06 % de la secuencia de este gen (Ahn *et al.*, 1993). El producto de longitud completa del gen es una proteína de 427 kDa llamada Distrofina la cual se encuentra en todos los tipos de células musculares y se localiza en la cara citoplasmática del sarcolema particularmente dentro de los costámeros (Ervasti *et al.*, 2006).

1.2.1 Promotores tejido-específicos e isoformas de la distrofina.

En el gen de la distrofina humana se han encontrado ocho promotores diferentes que regulan la transcripción de este de una manera tejido específica; 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 (M), cerebral (B), de purkinje (P) y linfocítica (L); se ha propuesto que el promotor que codifica para esta última no tiene una función biológicamente significativa, ya que la cantidad de distrofina que se expresa en linfocitos de sangre periférica es insignificante comparada con la de músculo esquelético (Greenberg *et al.*, 1996). Hacia la región 3' se encuentran cuatro promotores internos que dan lugar a transcritos de menor tamaño y codifican para isoformas con el extremo carboxilo terminal trunco, dichos promotores son; el de retina (R), el de cerebro-3 (B3), el de células Schwann (S) y el general (G). Cada uno de estos promotores transcribe un primer exón único que presenta procesamiento alternativo dentro de los exones 20, 45, 56 y 63 respectivamente, para generar productos proteicos de 260 kDa (Dp260), 140 kDa (Dp140), 116 kDa (Dp116) y 71 kDa (Dp71), estas isoformas se llamaron también apo-distrofinas. Dp260 se expresa de manera abundante pero no exclusiva en retina (Byers *et al.*, 1993). Dp140 se encuentra en sistema nervioso central; pero también ha sido implicada en el desarrollo del riñón (Durbeej *et al.*, 1997), mientras que la isoforma Dp116 se expresa primordialmente en el

sistema nervioso periférico y central (Ambrose *et al.*, 1997 y Rapaport *et al.*, 1993). Dp71 es detectada en muchos tejidos no musculares incluyendo cerebro, riñón, hígado y pulmón (Blake *et al.*, 2002).

1.2.2 Mutaciones del gen DMD.

La frecuencia de la DMD tiene relación con una elevada tasa de nuevas mutaciones (1×10^4), lo que ha llevado a la caracterización de cientos de mutaciones independientes. Las mutaciones en el gen DMD generalmente resultan en la ausencia o niveles reducidos de la proteína distrofina (Blake *et al.*, 2002). Cerca del 65 % de los casos son causados por deleciones, mientras que del 5-10 % son duplicaciones; el 30 % de los individuos afectados presentan pequeñas mutaciones (mutaciones puntuales o pequeñas deleciones/inserciones) (Sitnik *et al.*, 1997). La mayoría de estas deleciones se localizan en dos regiones “hot spots”. La primera de estas comprende los exones 45-53 y remueven parte del dominio central de la distrofina; las eliminaciones en este extremo son resultado de una recombinación meiótica que se produce en el exón 44 (Oudet *et al.*, 1992). Mientras que la segunda región comprende del exón 2 al 20 y remueve parte o todo el sitio de unión a actina y una parte del dominio central. Muchos puntos de ruptura también ocurren en esta región comprendiendo desde el intrón 1 hasta el 7 (Abbs *et al.* 1992, y Blake *et al.*, 2002).

Después de la caracterización de muchas de estas mutaciones se ha visto que el tamaño y la posición de la deleción dentro del gen DMD frecuentemente no se correlaciona en forma directa con el fenotipo clínico observado. Esto se debe a que si una deleción conduce a la expresión de un transcrito truncado en una región interna, sin cambio del marco de lectura normal, entonces podría generarse una versión más pequeña pero funcional de la distrofina, causando un fenotipo DMB. Por otra parte si la deleción creara un cambio en el marco de lectura traduccional, entonces la terminación prematura de la traducción resultara en la síntesis de una proteína trunca. Este argumento está asociado con los niveles muy bajos de expresión de la distrofina en un fenotipo DMD debido a mutaciones en el mRNA o la inestabilidad de la proteína (Blake *et al.*, 2002).

1.3 Distrofina.

La Distrofina es un miembro de la superfamilia de las espectrinas, que incluyen proteínas como α -actinina, utrofina y espectrinas. Esta proteína está compuesta por cuatro dominios diferentes: el dominio amino terminal es similar en secuencia y función a la familia de las proteínas de unión a actina, incluyendo β -espectrina y α -actinina (Ahn *et al.*, 1993 y Hemmings, 1992), consta de 220 aminoácidos y esta región se une a filamentos de actina del citoesqueleto con una marcada preferencia para formas no musculares de actina (Roberts, 2001). Un dominio central compuesto de 24 repetidos de triple hélice similar a espectrina interrumpidos por cuatro regiones bisagra ricas en prolina que en conjunto le confieren cierto grado de flexibilidad a la distrofina (Culligan, 2002 y Blake, 2002). La región rica en cisteína contiene un dominio WW compuesto por 40 aminoácidos que modula la unión a moléculas de señalización, reguladoras y a sustratos ricos en prolina; esta región media la interacción con el β -dístroglicano mediante las regiones ricas en prolina. El dominio rico en cisteína contiene dos motivos EF que son similares a los de α -actinina y pueden unir calcio intracelular (Ervasti, 2006 y Blake, 2002), un dominio ZZ que contiene un número de residuos de cisteína conservados que forman sitios para unión de metales catiónicos divalentes tales como el Zn^{2+} ; este dominio es similar a los dedos de zinc, en la distrofina este dominio se une a calmodulina de manera calcio dependiente (Anderson, 1996 y Blake, 2002) y no se requiere para la unión de β -dístroglicano (Rentschler, 1999). El carboxilo terminal de la distrofina contiene múltiples dominios que interactúan con proteínas integrales y periféricas de membrana, entre ellos motivos de unión a proteínas "coiled coil" que muestran interacción con sintrofinas, distrobrevinas y otras proteínas asociadas a distrofina (Crawford, 2000 y Blake, 2002).

Todos los miembros de la familia de proteínas: distrofinas y distrobrevinas, parecen estar asociados a la membrana, la distrofina en vertebrados está localizada en la membrana plasmática de células del músculo liso, cardíaco y esquelético (Zubrzycka-Gaarn, 1988) y en un grupo de sinapsis en el sistema nervioso central.

Su distribución subcelular indica que lleva a cabo diferentes funciones dentro del citoesqueleto: i) Estabilidad de la membrana: la distrofina puede estabilizar la membrana durante los repetidos ciclos de contracción, ii) Fuerza de transducción: la distrofina puede unir la fuerza contráctil producida en un dominio intracelular a un medio extracelular, iii) Organización de membranas especializadas: particularmente en tejidos no contráctiles, la distrofina aparece en ciertas membranas especializadas, donde puede organizar la topología de dicha membrana o mantener la concentración local de los componentes membranales (Ahn *et al.*, 1993).

1.3.1 Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC).

En el músculo esquelético y cardíaco la distrofina se asocia con varias proteínas para formar parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC). El DAPC juega un papel estructural en la unión del citoesqueleto de actina a la matriz extracelular, estabilizando el sarcolema durante los repetidos ciclos de contracción y relajación, y transmitiendo la fuerza generada en los sarcómeros del músculo a la matriz extracelular (Petrof *et al.*, 1993). Así mismo el DAPC está involucrado en vías de señalización que incluyen calmodulina, Grb2 y nNOS (Rando, 2001). Las proteínas que lo conforman se organizan estructuralmente en tres subcomplejos distintos: 1) los distroglicanos (DGs; subunidades α y β), 2) el subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (sarcoglicanos (SGs): subunidades α , β , γ , ϵ , δ , ζ y sarcospan (SSPN)) y 3) distrofina y otras proteínas citoesqueléticas asociadas; distrobrevinas (subunidades α y β) y sintrofinas (subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$; en neuronas se han identificado las subunidades $\gamma 1$ y $\gamma 2$) (Yoshida *et al.*, 1994 y Ervasti *et al.*, 1990). Recientemente se ha asociado a otras proteínas con el DAPC, estas incluyen nNOS (Brenman *et al.*, 1996) y caveolina-3 (Song *et al.*, 1996).

1.3.1.1 Distroglicanos.

Los distroglicanos conforman un subcomplejo de proteínas sintetizadas a partir de un solo gen, el transcrito de este gen codifica para un polipéptido de 160 kDa modificado post-traduccionalmente para generar α y β distroglicano, los cuales son glicosilados antes de ser seleccionados para su localización extracelular ó transmembranal. Estas

proteínas constituyen una parte medular del DAPC estableciendo un vínculo transmembranal entre la laminina-2 y la distrofina (Ehmsen *et al.*, 2002 y Ibraghimov-Beskrounige *et al.*, 1992). En el músculo, el α -dístroglicano tiene un peso molecular de 156 kDa y su localización es extracelular, mientras que el β -dístroglicano se localiza transmembranalmente con un peso molecular de 43 kDa. El α -dístroglicano se une a los dominios G de la cadena α -2 de la laminina-1, también muestra afinidad a proteínas del tipo de proteoglicano como agrina y perlecan (Henry y Campbell, 1999). El β -dístroglicano en su extremo carboxilo terminal contiene varios residuos de prolina requeridos para la unión a la región rica en cisteína con la distrofina; específicamente con los dominios WW y EF (Jung *et al.*, 1995 y Rentschler *et al.*, 1999). El carboxilo terminal del β -dístroglicano también funciona como adaptador de la proteína Grb2 (Yang *et al.*, 1995).

1.3.1.2 Subcomplejo sarcoglicano-sarcospan.

En el músculo esquelético y cardíaco este subcomplejo está formado por cinco glicoproteínas transmembranales: α (50 kDa), β (43 kDa), γ (35 kDa), δ (35 kDa) y ϵ 50 (kDa) y la proteína sarcospan (25 kDa) (Chan *et al.*, 1998). α -SG y ϵ -SG son proteínas transmembranales glicosiladas tipo I (presentan su extremo amino terminal hacia la parte extracelular); la primera se encuentra en músculo estriado, mientras que ϵ -SG se expresa ampliamente tanto en células no musculares como musculares (Imamura *et al.*, 2000). Los sarcoglicanos γ , δ , y ζ son proteínas transmembranales glicosiladas tipo II (presentan el extremo amino terminal hacia la parte intracelular) y son expresados en músculo liso (Fort *et al.*, 2005). La distrofina y γ -SG interactúan directamente; mientras que δ -SG interacciona con el complejo dístroglicano (Chan *et al.*, 1998).

Mutaciones en los genes humanos α -, β -, γ - y δ -sarcoglicano causan distrofias musculares tipo “limb girdle” (LGMD) tipo 2D, 2E, 2C y 2F, respectivamente (Bushby, 1999).

La proteína sarcospan se considera un componente integral del DAPC, posee cuatro dominios transmembranales y un “loop” extracelular, los extremos N- y C-terminal están

localizados intracelularmente. Esta proteína se expresa predominantemente en músculo esquelético y cardíaco (Crosbie *et al.*, 1997).

1.3.1.3 Proteínas citoesqueléticas asociadas.

*Sintrofina*s. Esta familia de proteínas se compone de cinco miembros; tres de ellas de 58 kDa: α -sintrofina, β_1 - y β_2 -sintrofina, y las dos restantes de entre 58-60 kDa; γ_1 - y γ_2 -sintrofina. Los tres primeros miembros se localizan en el sarcolema, fibras musculares y uniones neuromusculares respectivamente; mientras que las γ -sintrofina se localizan específicamente en cerebro. Estructuralmente las sintrofina poseen dos dominios PH (de homología con plectrina), un dominio PDZ y un dominio C-terminal altamente conservado (Ahn *et al.*, 1995). Dada su estructura estas proteínas pueden funcionar como moduladores en el reclutamiento y señalización de proteínas al sarcolema y al DAPC, vinculando interacciones con canales de sodio en músculo esquelético, nNOS, cinasa serina/treonina, MAST205 y la cinasa-3 proteína de stress activada (Rando, 2001).

Las sintrofina se unen directamente al dominio C-terminal de la distrofina, en la región codificada por los exones 71 al 74 (Ahn *et al.*, 1996). Estas proteínas se unen a secuencias homólogas de utrofina, distrobrevina y proteínas relacionadas con distrofina (DRP) (Ahn *et al.*, 1995). En el cerebro γ_1 - y γ_2 -sintrofina pueden unirse a las isoformas de distrofina Dp71 y Dp140 (Wilson *et al.*, 1999).

*Distrobrevina*s. Estas proteínas pertenecen a la familia de las distrofina, en vertebrados se expresan dos de estas proteínas; α - y β -distrobrevina con una masa de 87 y 62 kDa respectivamente (Peters *et al.*, 1997). Por procesamiento alternativo se producen cinco isoformas de α -distrobrevina que difieren en su extremo carboxilo terminal y carecen de los dominios WW (Ehmsen *et al.*, 2002 y Peters *et al.*, 1997). Solo 3 de las isoformas se localizan en músculo; así α -distrobrevina-1 y -2 están concentradas en uniones neuromusculares (Nawrotzki *et al.*, 1998). Ambas isoformas también se localizan en el sarcolema siendo más abundante α -distrobrevina-2 (Blake *et al.*, 2002). α -distrobrevina-3 se localiza en músculo esquelético y cardíaco. Las

distrobrevinas α están asociadas con el complejo sarcoglicano mediante su extremo N-terminal, el cual es común en todas las isoformas; se unen a distrofina mediante motivos “coiled-coil” y en ausencia de la región C-terminal de esta proteína las distrobrevinas junto con las sintrofinas se unen al DAPC (Crawford *et al.*, 2000). Así mismo la α -distrobrevina-1 posee tirosinas que pueden ser fosforiladas (Blake *et al.*, 2002). En lo que se refiere a β -distrobrevina, es muy similar a α -distrobrevina-1, pero carece de los sitios de fosforilación de tirosina; se expresa en tejidos no musculares como neuronas, en la región del hipocampo y en células epiteliales (Kachinsky *et al.*, 1999 y Peters *et al.*, 1997). β -distrobrevina forma complejos específicos con Dp140, Dp71 y utrofina (Culligan *et al.*, 2002).

1.4 Dp71.

La Dp71 fue inicialmente identificada y clonada a partir de células de fluido amniótico (Austin *et al.*, 1995). Esta isoforma se expresa en muchos tejidos no musculares incluyendo hígado, retina, riñón, pulmón, testículo y es el principal producto del gen DMD expresado en cerebro, neuronas y en cultivos de células gliales. Es relativamente abundante en células madre embrionarias (Rapaport *et al.*, 1992; Rapaport *et al.*, 1993). El dominio C-terminal y la región rica en cisteína de la distrofina están presentes en esta proteína, mientras que carece de la región similar a espectrina y del extremo N-terminal, en lugar de este posee un extremo N-terminal específico de 7 aminoácidos (Rapaport *et al.*, 1992) (fig. 1). Se ha encontrado que la Dp71 está asociada con la membrana de las células HepG2, HeLa (Rapaport *et al.*, 1993) y astrocitos así mismo se ha mostrado la asociación de Dp71 con proteínas del DAPC tales como β -distroglicano (Austin *et al.*, 1995), β -distrobrevina (Blake *et al.*, 1998) y sintrofina (Kramarcy *et al.*, 1994). Estas observaciones sugieren que Dp71 está involucrada en el anclaje y/o organización de componentes específicos de la membrana, sin embargo no puede sustituir funcionalmente a la distrofina de longitud completa (Cox *et al.*, 1994).

La expresión de esta isoforma es regulada por un promotor tipo “housekeeping” localizado en el intrón 62 de este gen, dicho promotor no posee caja TATA, tiene un alto contenido de GC y sitios potenciales de unión a Sp1 y Sp3 (Lederfein *et al.*, 1993). El

mRNA de Dp71 contiene 4.8 Kb, los transcritos de Dp71 sufren procesamiento alternativo hacia la región 3' en los exones 71, 71-74 y 78 originando variantes de esta proteína (fig. 1). Mientras la delección del exón 71 no cambia el marco de lectura; la pérdida del exón 78 resulta en la sustitución de los últimos 13 aminoácidos hidrofílicos de la distrofina con 31 aminoácidos que le confieren propiedades hidrofóbicas a la Dp71 (Lederfein *et al.*, 1992 y Rapaport *et al.*, 1992 y Austin *et al.*, 1995). Así la isoforma Dp71 que carece del exón 78 se ha denominado Dp71f; mientras que la isoforma que presenta este exón se ha denominado Dp71d (fig. 1).

Clasificación de la isoformas de Dp71

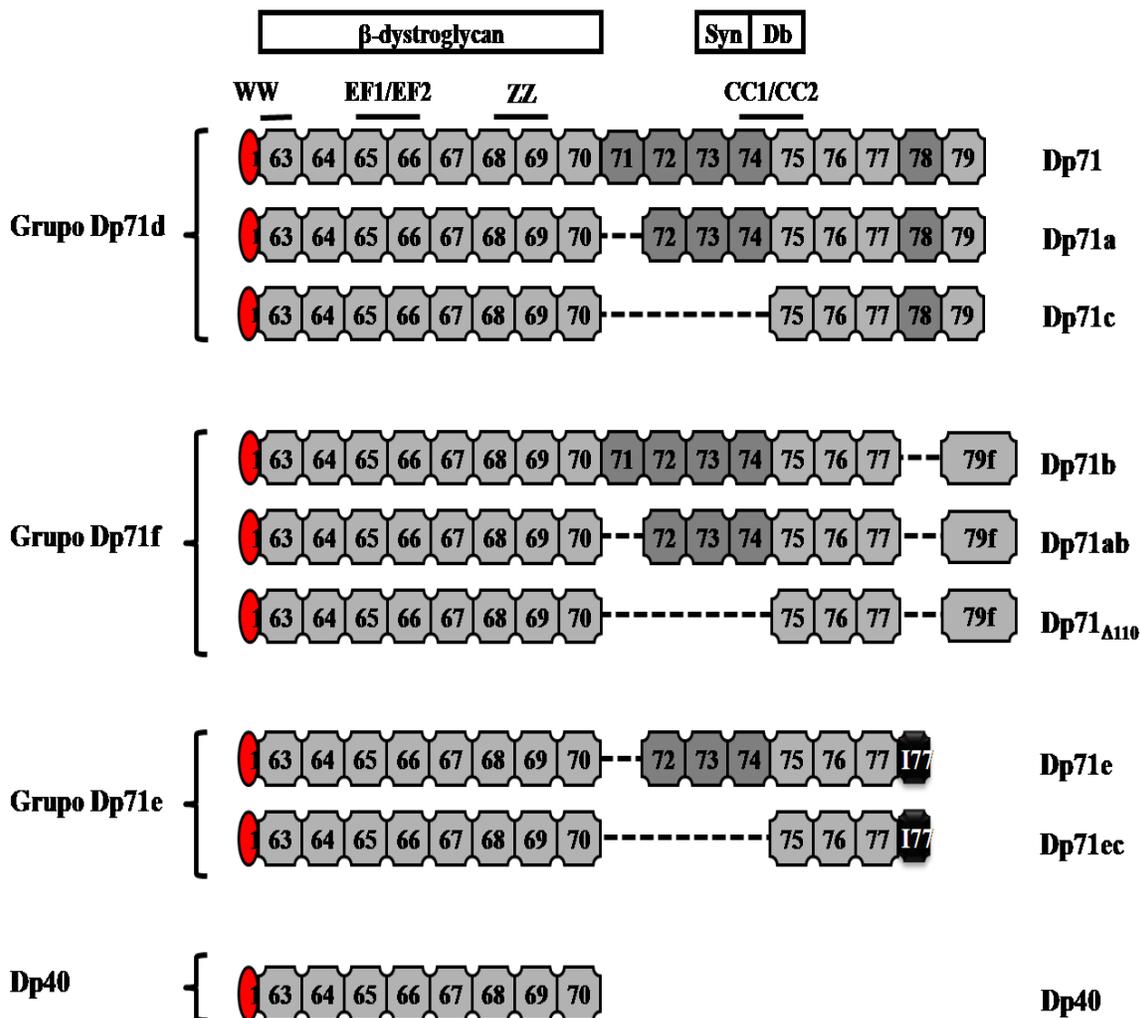


Figura 1. Clasificación de las isoformas de Dp71. Las proteínas Dp71 que sufren o no procesamiento alternativo hacia los exones 71-74 y conservan el exón 78 intacto pertenecen al grupo Dp71d (Dp71, Dp71a y Dp71c); mientras que las Dp71 que carecen del exón 78 se han clasificado en el grupo Dp71f (Dp71b, Dp71ab y Dp71 Δ 110). El grupo Dp71e se encuentran proteínas Dp71 que poseen una secuencia única que evita la traducción de los exones 78 y 79, generando un nuevo carboxilo terminal (Dp71e y Dp71ec). La Dp40 comparte los exones 63 al 70 de la Dp71 de longitud completa. Se indican los sitios de interacción con el DAPC; dominio rico en triptófano (WW), dominio EF1/EF2 y motivo dedos de zinc (ZZ) con β -dístroglicano (β -dystroglycan), motivos de unión a proteínas “coiled coil” (CC1/CC2) con sintrofina (syn) y distrobrevina (Db). La línea discontinua indica la pérdida de exones (modificado de Aragón, 2011).

Un estudio en ratones transgénicos *mdx* ha demostrado que la secuencia de la distrofina que es necesaria para la localización en el sarcolema y la asociación con el DAPC *in vivo* está contenida dentro de los transcritos de la Dp71, pero la restauración de este complejo no es suficiente para prevenir la distrofia muscular (Cox *et al.*, 1994).

Se ha sugerido que la ausencia o la estructura alterada de Dp71, es responsable de las alteraciones mentales observadas en cerca del 30 % de los pacientes con DMD (Emery, 1987). Las dos isoformas de Dp71 están presentes en el núcleo de las neuronas y en astrocitos en cultivo. Sin embargo Dp71d es la isoforma más abundante en el cerebro y en neuronas del hipocampo en cultivo, aunque presenta una concentración moderada en astrocitos. Dicha isoforma se ha visto también asociada con neurofilamentos citoplasmáticos, su ausencia o cambios estructurales en los pacientes DMD puede inducir alteraciones en su distribución subcelular e interacciones con neurofilamentos, lo cual ha sido reportado por Torelli en 1992. Este tipo de cambios podría contribuir a las alteraciones en las funciones cognitivas observadas en estos pacientes; así mismo en este estudio se plantea que en neuronas la distrofina puede participar en diferentes vías de señalización y que la alteración de Dp71 puede modificar la función de dichas vías en los pacientes DMD lo cual conlleva a una disfunción cerebral (Aleman *et al.* 2001).

Otro fenotipo observado en los pacientes DMD es una fisiología retinal anormal, en la retina normal o sana Dp71 exhibe el mismo patrón de distribución que corresponde a canales rectificadores entrantes de potasio (Kir), especialmente Kir4.1 y a las proteínas capaces de transportar agua; acuoporina-4 (AQP-4). La inactivación de Dp71 altera la distribución de Kir4.1 y de AQP4 en células de gliales de Müller, la ubicación incorrecta aumenta la vulnerabilidad de las células nerviosas de la retina produciendo isquemia transitoria que se asocia con la muerte de las neuronas. Por lo tanto Dp71 y DAPC controlan la expresión y distribución subcelular de canales de agua y potasio (K⁺), que son esenciales para la homeostasis de agua retinal y el mantenimiento de la barrera sangre-retina (BRB por sus siglas en inglés) (Sene *et al.*, 2009).

1.5 Dp40.

Esta proteína denominada también apo-distrofina-3 fue inicialmente descrita por Tinsley y cols (1993) en una línea celular de schwannoma de rata y diversos tejidos humanos; hígado, pulmón, cerebro, músculo, a diferencia de otros transcritos del gen DMD se expresa durante el desarrollo embrionario. El mRNA de Dp40 contiene 2.2 Kb, comparte los primeros 340 aminoácidos tanto con la Dp71 como con la distrofina de longitud completa. La Dp40 comprende la parte distal del dominio central, el dominio rico en cisteínas y los primeros 48 aminoácidos del carboxilo terminal.

1.6 Antecedentes directos.

Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que las células PC12 expresan a la Dp71 y no otras formas de distrofina (Rosas-Vargas *et al.*, 2000 y Marquez *et al.*, 2003).

Marquez y cols (2003) demostraron que en células PC12 se expresan al menos dos isoformas de Dp71, y estas muestran a lo largo de la diferenciación neuronal, una regulación y distribución subcelular diferente. Se demostró que durante el proceso de diferenciación se presenta un incremento de nueve veces en la cantidad de proteína de Dp71f en extractos totales mientras que la Dp71d se incremento hasta siete veces en extractos nucleares. Este incremento en los niveles de proteína es similar al que presentan otras proteínas asociadas con la diferenciación, como es el caso de las MAP 2, por lo que se puede sugerir que Dp71 tiene una función importante durante la diferenciación en la línea celular PC12 (Marquez *et al.*, 2003 y Acosta *et al.*, 2004).

Estudios posteriores han demostrado que estas células producen cuatro isoformas de Dp71; la que carece del exón 71 y cuenta con el exón 78 denominada Dp71a (número de acceso Gen Bank AY326947), una segunda isoforma Dp71 que se ha denominado Dp71c, presenta el exón 78 pero carece de los exones 72 al 74 (AY326949); ambas proteínas fueron previamente conocidas como Dp71d, Dp71ab pierde el exón 78 por procesamiento alternativo, anteriormente conocida como Dp71f (AY326948) y Dp71e la

cual tiene una secuencia única que codifica para 10 aminoácidos de carácter hidrofílico y evita la traducción de los exones 78 y 79 (JF510048) (Saint Martin *et al.*, 2012).

En el laboratorio se construyeron las isoformas recombinantes Xpress-rDp71a Xpress-rDp71c, Myc-rDp71a, Myc-rDp71c, HA-rDp71a, HA-rDp71c; que permiten que las isoformas se expresen como proteínas de fusión, con el epítotope o bandera Xpress (8 aa), el epítotope myc (13 aa) y el epítotope HA (10 aa) unidos a la región amino terminal, esto permite su reconocimiento mediante el uso de anticuerpo(s) dirigidos específicamente hacia esta bandera. En este mismo trabajo se encontró que en células PC12, la Dp71d endógena se encuentra en la periferia de la célula y un poco en el citoplasma; así mismo se determinó que la proteína Dp71a-Xpress se localiza principalmente en la periferia celular, pero también se observó en citoplasma y núcleo (Martínez Herrera, 2004).

Por otra parte Santos Coy en el 2008 observó que en células PC12 no diferenciadas Dp40 se concentra en el núcleo, mientras que en células diferenciadas con factor de crecimiento neural (NGF) por sus siglas en inglés) la mayor parte de la señal se observa en el citoplasma.

Se han estudiado las diferentes isoformas y se observó que la Dp71ab forma un complejo con β -dístroglicano, α -sintrofina, β -dístrobrevina y α , β y γ -sarcoglicanos en las células PC12 indiferenciadas. Mientras que en células PC12 diferenciadas la composición del complejo cambia, ya que Dp71ab se asocia solamente con β -dístroglicano, α -sintrofina, β -dístrobrevina y δ -sarcoglicano. Así mismo la óxido nítrico sintasa (nNOS) se asocia con el complejo Dp71 ab/DAPC durante el tratamiento con NGF, sugiriendo la posibilidad que la Dp71ab pueda estar involucrado en eventos de transducción de señales durante la diferenciación neuronal (Romo-Yanez *et al.*, 2007 y Villareal *et al.*, 2010).

Saint Martin y cols en el 2011 reportaron una nueva isoforma de Dp71 con un carboxilo terminal diferente a las isoformas previamente reportadas, llamada Dp71e, la cual se

expresa en células PC12 no diferenciadas y durante la diferenciación inducida por NGF. También se encontró que esta isoforma es expresada en órganos de rata y en líneas celulares humanas.

Para estudiar el papel de los dominios Dp71 se generó una mutante *in vitro* que carece de los exones 78 y 79 denominada Dp71 Δ_{78-79} . Se logró la transfección estable de las células PC12 con la distrofina mutante y se observó que el proceso de diferenciación fue más eficiente basado en el porcentaje y longitud de neuritas. En cuanto a su localización subcelular Dp71 Δ_{78-79} fue localizada en la periferia de la célula (Aragon *et al.*, 2011).

1.7 Justificación.

Dado que se ha demostrado que las células PC12 expresan varias isoformas de Dp71 (rDp71a, rDp71c, rDp71ab y rDp71e) y que su localización subcelular es diferente, además de que no existen anticuerpos específicos para cada una, se han generado proteínas Dp71 recombinantes con epítopes o banderas diferentes en el extremo amino terminal, para su estudio. Con el objeto de verificar que la localización subcelular de las proteínas no sea un artefacto generado por la bandera añadida en el extremo amino terminal y considerando que la localización de las isoformas Dp71 en las células puede cambiar su función, este trabajo tiene como objetivo realizar las construcciones de los plásmidos que generarán proteínas recombinantes rDp71a-V5, rDp71ab-V5, rDp71 Δ_{78-79} -V5, rDp71e-V5 y rDp40-V5 cuyo epítipo o bandera V5 se encuentre fusionado en el extremo carboxilo. Será posible determinar si la localización subcelular se ve afectada por la posición de la bandera y así corroborar la localización de las isoformas Dp71 con banderas en el N-terminal.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Clonar la secuencia de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40 en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO para obtener proteínas con el epítoto V5 fusionado en el carboxilo terminal.

2.2 Objetivos particulares.

- Obtener vectores pcDNA3.1D/V5.His-TOPO que expresen proteínas recombinantes de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40.
- Caracterizar los vectores recombinantes construidos por PCR, restricción enzimática y secuenciación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5α.

Se inoculó una colonia de células DH5α en 4 ml de medio SOB, las células se incubaron toda la noche a 37 °C en agitación. Posteriormente se inocularon 500 µl de este precultivo en 50 ml de medio SOB complementado con MgSO₄ 10 mM, y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 0.6 a 550 nm. El cultivo se transfirió a un tubo Falcon estéril y se colocó en hielo por 10 min, después se centrifugó a 8000 rpm por 8 min a 4 °C, retirándose el sobrenadante por decantación, para resuspender en 16 ml del buffer RF1 (KAc 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM, glicerol al 15 % y pH final de 5.8) a 4 °C con pipeteo suave colocando 15' en hielo. La muestra se centrifugó a 6000 rpm por 10 min a 4 °C retirándose el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 2 ml de RF2 (MOPS 10 mM, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glicerol al 15 % y pH final de 6.5) a 4 °C, con pipeteo suave incubando 15 min en hielo. Se distribuyó el volumen total en alícuotas de 400 µl, las cuales se congelaron utilizando nitrógeno líquido para posteriormente almacenar las muestras a -70 °C.

3.2 Transformación bacteriana.

Las alícuotas conservadas a -70 °C se colocaron en hielo, una vez descongelada la muestra se añadieron 2 µl del vector, se agitó en vórtex por unos segundos y se incubó en hielo por 20 min. Se colocó la mezcla a 42 °C por 90 s y posteriormente en hielo 5 min para ocasionar un choque térmico. Se añadieron al tubo 800 µl de medio SOC (SOB + 1/50v de glucosa 20 % + 1/100v MgSO₄ 1M) y se incubó a 37 °C con agitación durante 50 min. Las células fueron espatuladas en cajas con LB-amp (100 mg/ml), para la selección de las transformantes las cajas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

3.3 Extracción de DNA plasmídico por el método alcalino.

Se sembró un precultivo con una colonia de la bacteria transformante en 3 ml de medio LB-amp (100 mg/ml) el cual se incubó a 37 °C toda la noche. Posteriormente se tomó 1 ml de este precultivo el cual se inoculó en 50 ml de medio LB-amp incubándose a 37 °C por 12 horas con agitación vigorosa. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 8000 rpm por 5 min a 4 °C, se desechó el sobrenadante por decantación, la pastilla se

resuspendió en 1 ml de la Solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH = 8.0) preenfriada, más 50 µl de RNasa 10mg/ml; la suspensión se colocó en hielo durante 5 min, se agregaron 2.5 ml de la Solución II (NaOH 200 mM, SDS 1 %) recién preparada y se agitó por inversión suave de 4 a 6 veces para posteriormente incubarse en hielo durante 5 min. Se añadieron 1.75 ml de la Solución III (acetato de amonio 7.5 M) preenfriada, se agitó por inversión suave y se colocó en hielo por 10 min, después se centrifugó a 11000 rpm por 20 min a 4 °C. Posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se agregaron 0.6 volúmenes de 2-propanol mezclando por inversión y se precipitó a temperatura ambiente durante 20-30 min. Después se centrifugó a 11000 rpm por 15 min a 16 °C y se resuspendió la pastilla en 500 µl de TE (Tris 10 mM pH = 8.0, EDTA, 0.1 mM) y se transfirió a tubo eppendorf.

3.3.1. Extracción fenólica.

Se agregó un volumen de fenol al tubo que contenía el plásmido extraído y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 10,000 rpm por 3 min a 4 °C, se extrajo y transfirió a otro tubo la fase acuosa y se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, se extrajo y transfirió la fase acuosa a otro tubo añadiendo un volumen de una mezcla de cloroformo-isoamílico (24:1) mezclando por inversión y centrifugando en las condiciones anteriores, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio; considerando que si el volumen es mayor a 400 µl se tiene que dividir en 2 tubos.

Se agregó ½ volumen de acetato de amonio y 2 volúmenes de etanol al 100 % y se colocó en hielo seco durante 20 min, después se centrifugó a 11,000 rpm por 20 min a 4 °C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con etanol al 70 % usando 200 µl en cada uno y teniendo precaución de no resuspender la pastilla y se centrifugó a 11000 rpm por 3 min a 4 °C entre cada lavado. Después se colocó en el evaporador durante tres min, para secar ligeramente y se resuspendió en 300 µl de agua mili Q. Se cuantificó por espectrofotometría y se verificó la integridad del DNA por electroforesis en geles de agarosa – TBE al 1 %.

3.3.2 Obtención de plásmidos por el Kit QIAprep spin Miniprep (QIAGEN).

Se realizó un cultivo de toda la noche en 5 ml de medio LB-amp (100 mg/ml) colocando una colonia de la bacteria transformante deseada. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 90 s en una microcentrífuga. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla de células bacterianas en 250 µl del Buffer P1 (Tris-HCl 50 mM pH = 8.8, EDTA 10mM, RNAsa 100 µg/ml) se añadieron 250 µl del buffer P2 (NaOH 200mM, SDS 1 %) y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Posteriormente se añadieron 350 µl del Buffer N3 (QIAGEN) y se mezcló nuevamente por inversión de 4 a 6 veces. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min y se aplicó el sobrenadante a las columnas provistas en el kit, se centrifugó por 30-60 s; después se limpió la columna añadiendo 0.5 ml del Buffer PB (QIAGEN), se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente y se desechó el líquido contenido en el tubo colector. Se realizó un segundo lavado de la columna añadiendo 0.75 ml del Buffer PE (QIAGEN) y centrifugando durante 30-60 s, se centrifugó un min más para remover cualquier residuo del buffer. Para eluir el DNA se colocó la columna en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, y se agregaron 50 µl del buffer EB (Tris-HCl 10 mM pH = 8.5) en el centro de la columna, se dejó reposar 10 min y por último se centrifugó 1 min.

3.4 Amplificación por PCR.

El diseño de los oligos se realizó utilizando los programas DNACLUB y OLIGO.

Tabla 1. Oligos utilizados para la amplificación por PCR.

Nombre	Isoforma	Secuencia	Longitud en bases
TIDV5	Dp40 y Dp71 5'	CACCATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	29
1DV5A	Dp71a 3'	CATTGTGTCCTCTCTCATTGGCTTTCCAG	29
1DV5AB	Dp71ab 3'	TTCTGCTCCTTCTTCATCTATCATGACTG	29
1DV5E	Dp71e 3'	ATAATAGAGAGAGGAAGAGGCAGATAGAT	29
1DV540	Dp40 3'	CGTTTCCATGTTGTCCCCCTCTAAC	25
1DV5D78	Dp71Δ 3'	TCTTGAAGTAGGGAAGGAGTTGTTGAGTT	29

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (GeneAmp PCR system 2400) con oligonucleótido 200 ng, dNTPs 10 mM, Taq polimerasa advantage 1.5 unidades (Invitrogen) en una solución amortiguadora que contiene MgCl₂ 1.5 mM, KCl

50 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 8.4) bajo las siguientes condiciones: 94 °C/1 min, 35 ciclos: 94 °C/30 s, 68 °C/3 min, 70 °C/10 min. Los productos de PCR se cuantificaron por espectrofotometría y se analizaron en un gel de agarosa-TBE al 1 % teñido con bromuro de etidio.

La verificación de los candidatos se realizó por PCR de colonia preparando la mezcla de reacción como se describe anteriormente, las colonias de los candidatos sembrados 24 horas antes se agregó con palillo estéril previamente a adicionar la Taq polimerasa (Invitrogen). Se trabajó bajo las mismas condiciones: 94 °C/1 min, 35 ciclos: 94 °C/30 s, 68 °C/3 min, 70 °C/10 min.

3.4.1 Purificación de productos de PCR.

Se utilizó el Kit MARLIGEN (Biosciences), primeramente se realizó el corte del área del gel que contenía el DNA con una navaja limpia, posteriormente se pesó el fragmento en una balanza analítica. Si el peso resultaba menor o igual a 400 mg se colocaba en tubos eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 30 µl de Buffer de Solubilización de Gel (L1) por cada 10 mg de gel. Posteriormente se incubó a 50 °C durante 15 min, mezclando cada 3 min para asegurar la disolución del gel. Después el fragmento se disolvió y se incubó durante 5 min más.

Posteriormente se colocó una columna dentro del tubo de lavado de 2 ml y se pipeteó la mezcla anterior dentro de la columna y se centrifugó a $\geq 12\ 000$ x g durante 1 min desechando lo que queda en el tubo de lavado. En este punto se puede realizar un lavado opcional de la columna, colocándola en otro tubo de lavado y añadiendo 500 µl del buffer L1, se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a $\geq 12\ 000$ x g durante 1 min, desechando lo que quedó en el tubo de lavado. Después se colocó la columna en un nuevo tubo de lavado y se añadieron 700 µl del buffer de lavado (L2) incubando durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a $\geq 12\ 000$ x g durante 1 min desechando lo recolectado en el tubo de lavado, nuevamente se volvió a centrifugar 1 min para remover el buffer residual. Para realizar la elución del DNA se colocó la columna dentro de un tubo de 1.5 ml y se añadieron 50 µl de buffer TE caliente directamente en el centro de la columna, se incubó 5 min a temperatura

ambiente y se centrifugó a $\geq 12\ 000 \times g$ durante 5 min. Los productos de PCR purificados se analizaron en un gel de agarosa-TBE al 1 % teñido con bromuro de etidio.

3.5 Clonación en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO.

Una vez obtenidos los productos de PCR correspondientes a las isoformas rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ y rDp40 se colocaron de 5 a 10 ng de cada uno con 15 a 20 ng del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO, para llevar a cabo la reacción de clonación mediante el sistema TOPO® (Invitrogen), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Producto de PCR	0.5 a 4.0 μ l
Solución salina	1 μ l
Agua estéril	Añadir para tener un volumen de 5 μ l
Vector TOPO	1 μ l
Volumen final	6 μ l

Se mezcló la reacción y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente.

Posteriormente se realizó la transformación de células competentes previamente preparadas con dicha reacción de clonación, las colonias transformantes fueron verificadas por medio de un PCR de colonia.

3.6 Restricción enzimática.

Las clonas positivas del pcDNA3.1D/V5.His-TOPO se sometieron a un análisis de restricción enzimática y de secuenciación.

Para el análisis de restricción se utilizaron 200 ng del plásmido y 20 unidades de *HindIII* en buffer de restricción (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y Ditiotritol 1 mM pH 7.9), conjuntamente se realizó un análisis con la endonucleasa *PstI* utilizando 100 unidades de ésta, y entre 5 y 8 μ g de plásmido en el buffer de restricción (Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM y Ditiotritol 1 mM pH 7.9) y albúmina sérica bovina (ASB 15 μ g). Las reacciones se incubaron a 37 °C toda la noche. Todas las reacciones se analizaron en geles de agarosa-TBE al 1 % teñido con bromuro de etidio.

3.7 Secuenciación.

Los candidatos de la restricción que fueron positivos se analizaron por medio de secuenciación automática de los extremos 5' y 3' utilizando los juegos de oligonucleótidos mostrados en la tabla 2.

Para llevar a cabo la reacción de secuenciación, se utilizó el kit Dye Deoxy Terminator cycle sequencing (Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos; 94 °C/5 min, 94 °C/30 s, 55 °C/20 s, 60 °C/4 min, 60 °C/5 min. La lectura de la secuencia del producto amplificado se realizó en el secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

Tabla No 2. Oligos utilizados para la secuenciación automática.

Nombre	Secuencia	Extremo a Secuenciar	
		5'	3'
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Dp71ab3 Dp71ab4 Dp40	
T1DV5	CACCATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	Dp71Δ Dp71e	
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG		Dp71ab3 Dp71ab4 Dp71Δ Dp71e

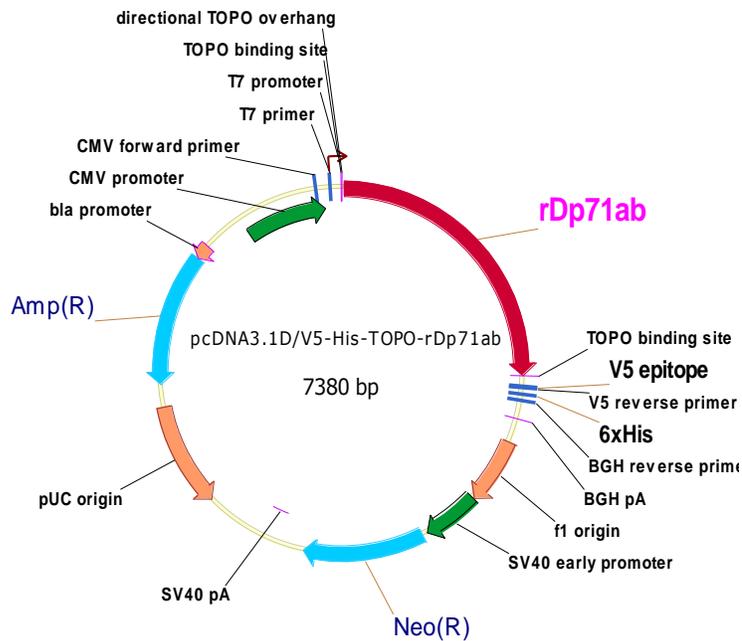


Figura 3. Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab. Se muestra el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO con el inserto de rDp71ab (rojo), el extremo amino se localiza hacia el promotor T7 y el extremo carboxilo se localiza antes del epítipo V5. El plásmido pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/rDp71ab presenta un tamaño total de 7380 pb.

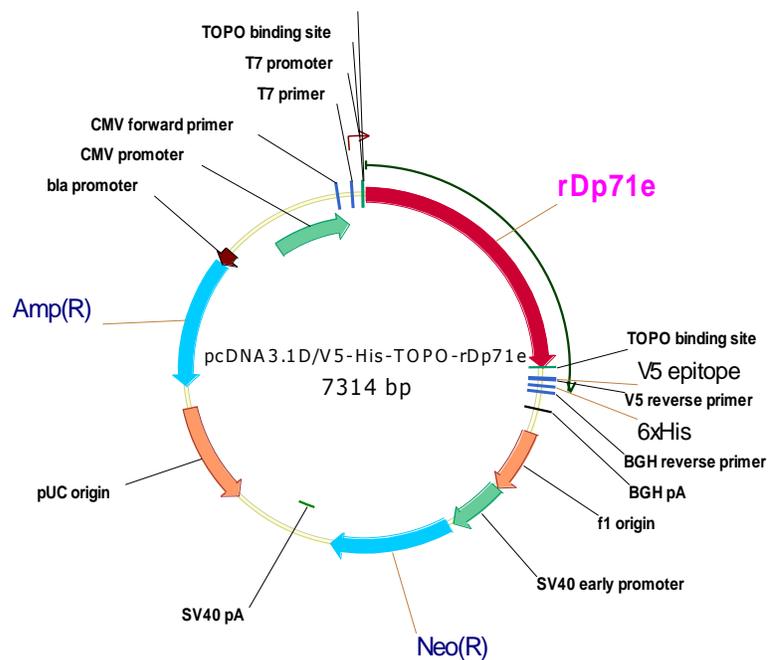


Figura 4. Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e. Se muestra el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO con el inserto de rDp71e (rojo), el extremo amino se localiza hacia el promotor T7 y el extremo carboxilo se localiza antes del epítipo V5. El plásmido pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/rDp71e presenta un tamaño total de 7314 pb.

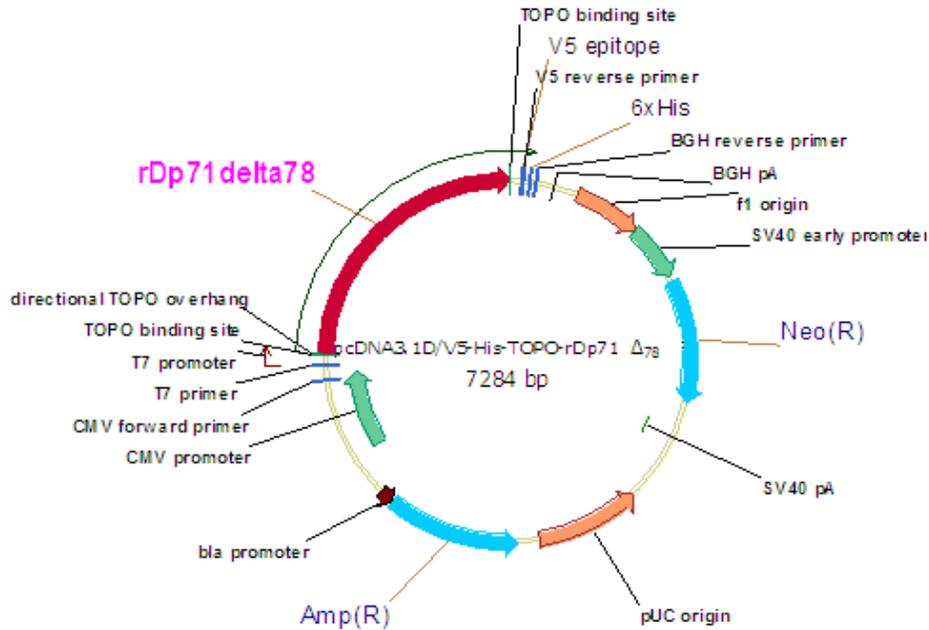


Figura 5. Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ. Se muestra el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO con el inserto de rDp71Δ₇₈₋₇₉ (rojo), el extremo amino se localiza hacia el promotor T7 y el extremo carboxilo se localiza antes del epítipo V5. El plásmido pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/rDp71Δ presenta un tamaño total de 7284 pb.

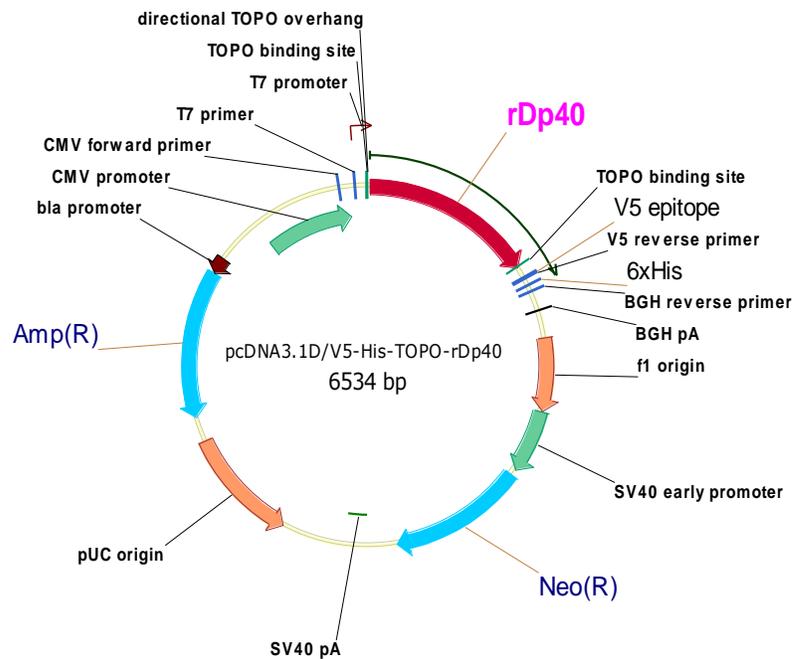


Figura 6. Construcción del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40. Se muestra el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO con el inserto de rDp40 (rojo), el extremo amino se localiza hacia el promotor T7 y el extremo carboxilo se localiza antes del epítipo V5. El plásmido pcDNA3.1D/V5-His-TOPO/rDp40 presenta un tamaño total de 6534 pb.

4.2 Preparación de células competentes y transformación con los diferentes plásmidos pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e y pPROEX-1/rDp40.

Una vez que se obtuvieron las células competentes se procedió a realizar la transformación con cada uno de los siguientes plásmidos: pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e, y pPROEX-1/rDp40 para obtener transformantes para cada una de las isoformas de la Dp71 y de la Dp40.

Las células bacterianas transformadas se sembraron en medio LB-amp, ya que el plásmido pPROEX-1 con cada uno de los insertos de las isoformas posee un gen de resistencia a amp. En este experimento se obtuvieron eficiencias de transformación entre $\sim 10^5$ y 10^6 ufc/ μ g de plásmido.

4.3 Extracción de los plásmidos pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e y pPROEX-1/rDp40.

Las bacterias transformadas con cada uno de los plásmidos mencionados en la sección anterior se crecieron para proceder a la extracción de los mismos. Una vez extraídos los plásmidos pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e, y pPROEX-1/rDp40 se examinó su pureza y concentración por medio de un espectrofotómetro utilizando como blanco 100 μ l de TE y realizando una dilución 1:50 de cada plásmido (tabla 2). Posteriormente se observó la integridad estructural de cada uno por medio de electroforesis en gel de agarosa (fig. 7 y 8)

Tabla 3. Concentración y purezas de los plásmidos pPROEX-1/Dp71 y pPROEX-1/Dp40.

Plásmido recombinante	Concentración	Relación 260/280
pPROEX-1/rDp71a	474 ng/ μ l	1.86
pPROEX-1/rDp71ab	309 ng/ μ l	2.01
pPROEX-1/rDp71e	508 ng/ μ l	1.96
pPROEX-1/rDp40	323 ng/ μ l	1.91

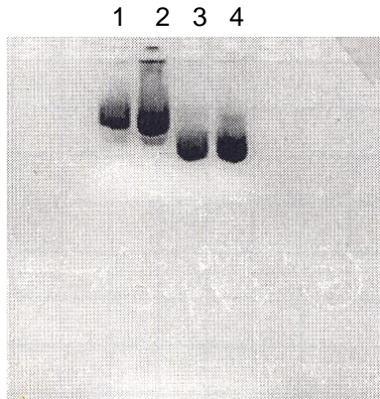


Figura 7. Extracción de plásmidos pPROEX-1/rDp71a y pPROEX-1/rDp71ab. El DNA de los plásmidos se obtuvo por el método alcalino descrito en materiales y métodos. Los plásmidos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 2: plásmido pPROEX-1/rDp71a 2 y 4 μ l respectivamente, carriles 3 y 4: plásmido pPROEX-1/rDp71ab utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2.

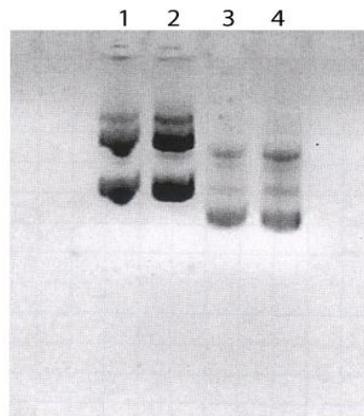


Figura 8. Extracción de plásmidos pPROEX-1/rDp71e y pPROEX-1/rDp40. El DNA de los plásmidos se obtuvo por el método alcalino descrito en materiales y métodos. Los plásmidos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 2: plásmido pPROEX-1/rDp71e 2 y 4 μ l respectivamente, carriles 3 y 4: plásmido pPROEX-1/rDp40 utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2.

4.4 Diseño de oligos y amplificación por PCR de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ ₇₈₋₇₉ y rDp40.

El DNA purificado se utilizó para analizar las secuencias de las isoformas rDp71a, rDp71ab y rDp71e previamente reportadas en el GenBank (NCBI) después de diseñar los pares de oligos para amplificar cada isoforma (véase materiales y métodos). El primer oligo contiene el sitio AUG, complementario al primer exón de la rDp71 y se utilizó para todas las isoformas; el segundo oligo omite la secuencia del codón de paro en cada proteína (isoformas rDp71 y rDp40). En la rDp71a y rDp71ab el oligo 3' es

complementario a la parte final del exón 79 antes del codón de paro UAG y UAA respectivamente, no se utilizó el mismo oligo para las dos isoformas, porque la rDp71ab pierde el exón 78, modificando el marco de lectura, reemplazando los últimos 13 aminoácidos por 31 aminoácidos nuevos. En la rDp71e este oligo es complementario con la secuencia de la región “e”, para la rDp71 Δ_{78-79} , el oligo 3' complementa con la parte final del exón 77 de la rDp71; en la Dp40 se utilizó la secuencia de la Dp71, ya que comparten los exones 63 al 70 y se agregó una base al final del exón 70 (G) que corresponde a la primera base del intrón 70, la cual completa el triplete que codifica para treonina (ACG) antes del codón de paro (UGA) (tabla 1).

Los oligos diseñados tienen temperaturas óptimas de alineamiento teóricas entre 56 – 60 °C y porcentajes de GC menores al 50 %, condiciones que permitieron amplificar la secuencia del cDNA de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e y rDp71 Δ_{78-79} , y rDp40 a partir de los vectores recombinantes pPROEX-1/rDp71a, pPROEX-1/rDp71ab, pPROEX-1/rDp71e, y pPROEX-1/rDp40; para su posterior clonación en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO. Así mismo cabe mencionar que para la isoforma rDp71 Δ_{78-79} se utilizó como molde el plásmido pPROEX-1/rDp71ab, ya que comparten los exones 63-70 y del 72-77, ambas isoformas carecen del exón 71 (fig. 1). Una vez sintetizados los oligonucleótidos se resuspendieron en agua milliQ y se ajustaron a una concentración de 200 ng/ μ l. Se realizó la estandarización de la reacción de PCR modificando la concentración de Mg^{2+} , probando tres concentraciones: 50, 75 y 100 mM. En las dos últimas concentraciones se observaron los amplificadores de las isoformas rDp71 y la rDp40 con sus tamaños esperados ~1800 y ~1000 respectivamente, aunque con 100 mM se observaron bandas inespecíficas de mayor tamaño que el fragmento esperado (fig. 9). Por lo anterior se decidió utilizar la concentración de 75 mM de $MgCl_2$ para las siguientes reacciones de PCR, donde disminuye la intensidad de las bandas inespecíficas que se observa con la concentración más alta de $MgCl_2$.

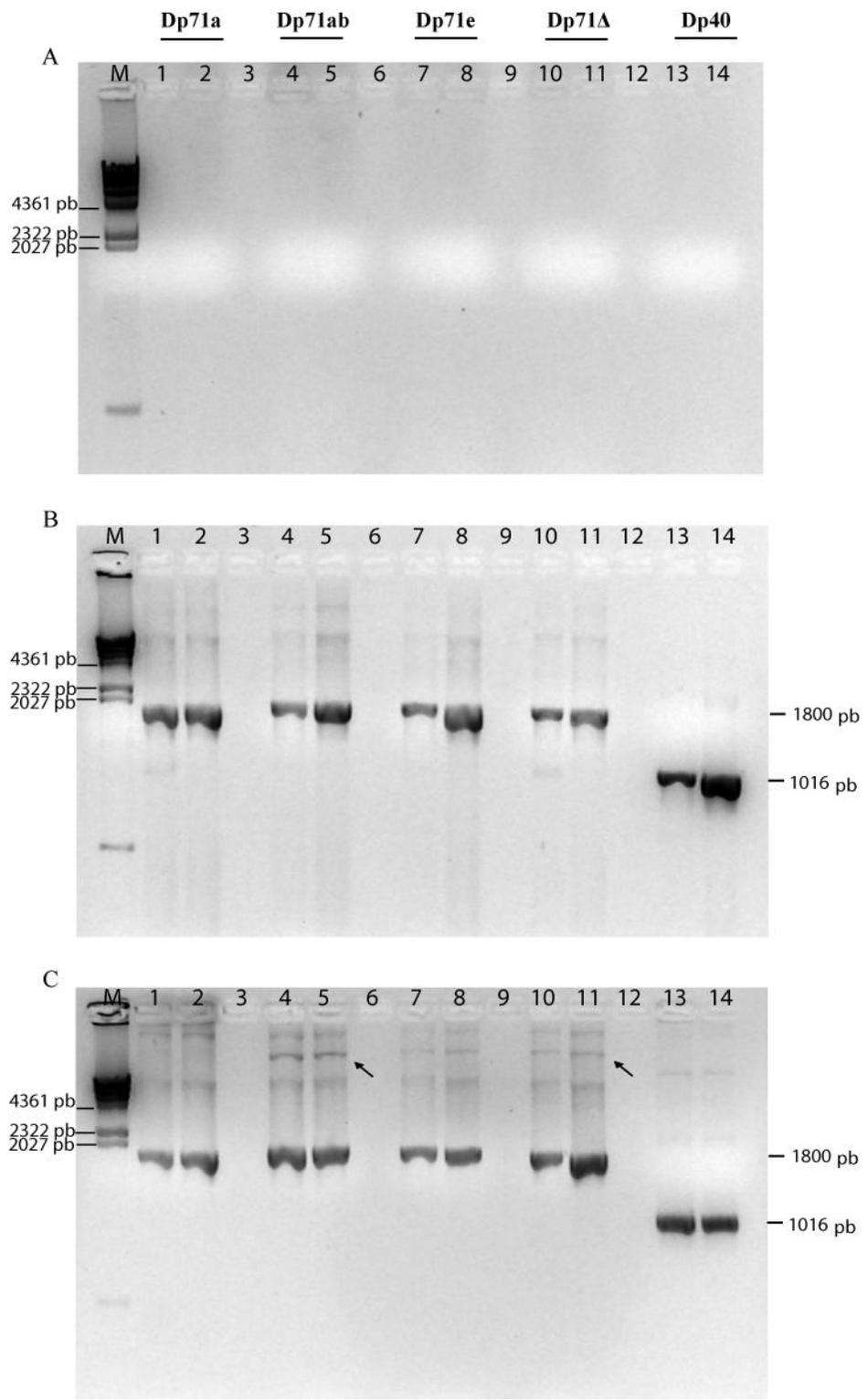


Figura 9. Estandarización de la reacción de PCR de las isoformas pPROEX-1/Dp71 y de la pPROEX-1/Dp40. Para la Dp71a se utilizó como molde pPROEX-1/rDP71a, y el siguiente par de oligos: oligo 5'-3' T1DV5 y oligo 3'-5' 1DV5AB. El oligo T1DV5 se utilizó para el extremo 5'-3' de todas las isoformas Dp71 y la Dp40. Dp71ab: molde pPROEX-1/rDp71ab y el oligo 3'-5' 1DV5AB; Dp71e: molde pPROEX-1/rDp71e y el oligo 3'-5' 1DV5E; Dp71 Δ_{78-79} molde pPROEX-1/rDp71ab y el oligo 3'-5' 1DV5D78; mientras que para la Dp40 se utilizó la construcción pPROEX-1/rDp40 y el oligo 3'-5' 1DV540, las secuencias de los oligos se muestran en la sección de materiales y métodos. A. Productos de PCR utilizando 50 mM de MgCl₂. Se muestran los fragmentos generados en las reacciones de PCR para amplificar el fragmento rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ y rDp40, corridas en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 2: productos de PCR de rDp71a, 2 y 5 μ l respectivamente, carriles 4 y 5: productos de PCR de rDp71ab, carriles 7 y 8: productos de PCR de rDp71e, carriles 10 y 11: productos de PCR de rDp71 Δ_{78-79} y carriles 13 y 14: productos de PCR de rDp40 utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2. M: marcador de peso molecular λ -Hind III, 5 μ l, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases B. Productos de PCR utilizando 75 mM de MgCl₂. Carriles 1 y 2: productos de PCR de rDp71a, 2 y 5 μ l respectivamente, carriles 4 y 5: productos de PCR de rDp71ab, carriles 7 y 8: productos de PCR de rDp71e, carriles 10 y 11: productos de PCR de rDp71 Δ_{78-79} el tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb. Y carriles 13 y 14: productos de PCR de rDp40 utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2, el tamaño esperado es de 1016 pb. M: marcador de peso molecular λ -Hind III, 5 μ l, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases. C. Productos de PCR utilizando 100 mM de MgCl₂. Carriles 1 y 2: productos de PCR de rDp71a, 2 y 5 μ l respectivamente, carriles 4 y 5: productos de PCR de rDp71ab, carriles 7 y 8: productos de PCR de rDp71e, carriles 10 y 11: productos de PCR de rDp71 Δ_{78-79} el tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb. Y carriles 13 y 14: productos de PCR de rDp40 utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2, el tamaño esperado es de 1016 pb. M: marcador de peso molecular λ -Hind III, 5 μ l, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases. Las flechas negras indican las bandas inespecíficas que se observan con la concentración 100 mM de MgCl₂.

Como siguiente paso se procedió a purificar los amplificadores obtenidos a partir del gel de agarosa, para remover componentes de la reacción de PCR como: oligos, sales, enzimas, colorantes y otras impurezas que afecten los experimentos posteriores (fig. 10). Después se reamplificó el cDNA de cada isoforma (rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} , y rDp40) a partir de los productos purificados utilizando en la reacción de PCR una Taq DNA polimerasa (Advantage) que produce mejores rendimientos, disminuye los errores y tiene mayor fidelidad que una Taq DNA polimerasa común; para utilizar los productos de PCR obtenidos de las isoformas rDp71 y la rDp40 en la reacción de clonación en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO. Los productos amplificados fueron cuantificados realizando una dilución 1:50; utilizando como blanco TE (tabla 4) y posteriormente se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa donde se observan las bandas de las isoformas rDp71 y la rDp40 en sus tamaños esperados ~1800 y ~1000 pb respectivamente; también se observa una reducción de las bandas inespecíficas que se observaron en experimentos anteriores (fig. 11). A

continuación cada producto de PCR se diluyó para tener 5 ng/μl, para utilizarse posteriormente en la clonación.

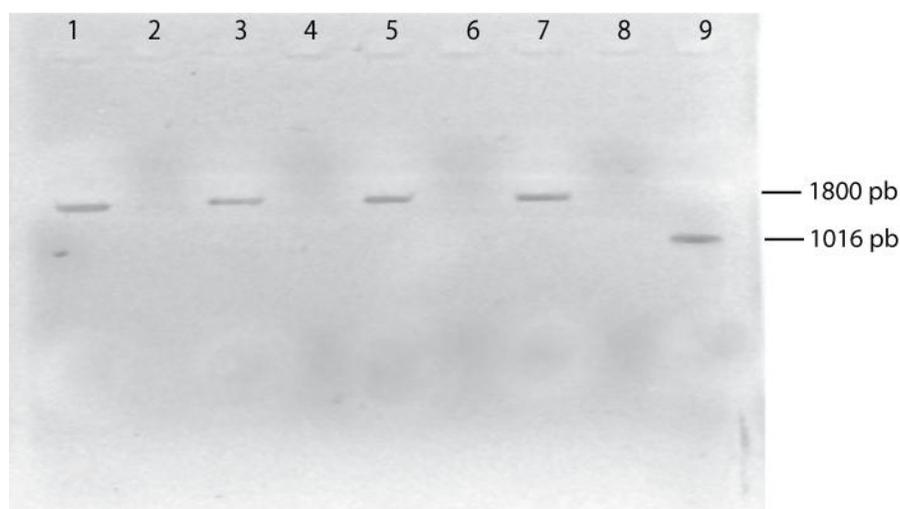


Figura 10. Productos de PCR de las isoformas pPROEX-1/Dp71 y pPROEX-1/Dp40 obtenidos con 75 mM de MgCl₂ y purificados. Para la purificación de los fragmentos de PCR se utilizó el kit Marligen (Bioscience). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio, en cada carril se corrió la decima parte del volumen total eluido, carril 1: producto de PCR de rDp71a, carril 3: producto de PCR de rDp71ab, carril 5: producto de PCR de rDp71e, carril 7: producto de PCR de rDp71Δ₇₈₋₇₉ y carril 9: producto de PCR de rDp40.

Tabla 4. Determinación de la concentración de los productos de PCR obtenidos.

Producto de PCR	Concentración
rDp71a	0.0446 ug/μl
rDp71ab	0.0794 ug/μl
rDp71e	0.0452 ug/μl
rDp71Δ ₇₈₋₇₉	0.0261 ug/μl
rDp40	0.0475 ug/μl

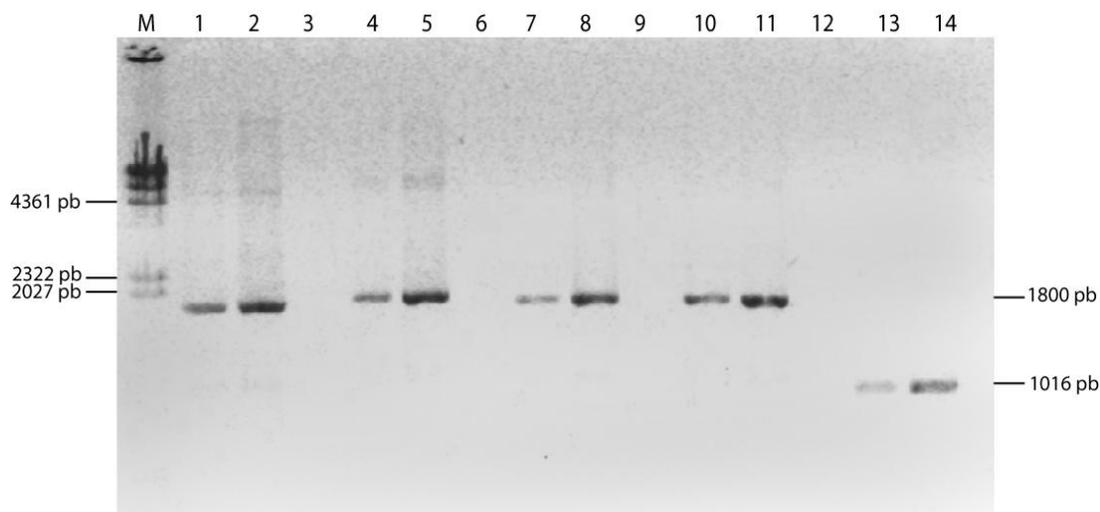


Figura 11. Productos de PCR de las isoformas pPROEX-1/Dp71 y pPROEX-1/Dp40. La reacción de PCR se realizó utilizando la Taq pol advantage o de alta fidelidad, descrita en materiales y métodos. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 2: productos de PCR de rDp71a, 1 y 3 μ l respectivamente, carriles 4 y 5: productos de PCR de rDp71ab, carriles 7 y 8: productos de PCR de rDp71e, carriles 10 y 11: productos de PCR de rDp71 Δ_{78-79} el tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb. Y carriles 13 y 14: productos de PCR de rDp40 utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2, el tamaño esperado es de 1016 pb. M: marcador de peso molecular λ -Hind III, 3 μ l, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

4.5 Clonación de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40 en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO.

Se llevó a cabo la clonación de los fragmentos de PCR correspondientes a cada una de las isoformas de rDp71 y rDp40 utilizando el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO, de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos y posteriormente se realizó la transformación de las células competentes *E. coli* DH5 α con los plásmidos recombinantes correspondientes. La división de las células en cultivo genera al replicar su genoma, copias del DNA recombinante incorporado. Debido a que el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO posee un gen de resistencia a amp, se utilizó este antibiótico para seleccionar a las bacterias transformadas.

En el primer ensayo se utilizaron 2 μ l de la reacción de clonación (ver materiales y métodos) para transformar bacterias *E. coli* competentes, como control se utilizaron 5 μ l de DNA circular del plásmido PUC19 (50 pg) provisto en el kit pcDNA3.1D/V5.His-TOPO. En este experimento no se obtuvieron colonias transformantes (tabla 5), al no

observar crecimiento en las cajas con amp se sembró el resto de la reacción de transformación para la isoforma rDp71a; previamente el tubo se centrifugó a 8000 rpm durante 2 min, se retiró la mayor parte del sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 50 μ l de medio SOC y se espatuló en una caja con medio LB-Amp. Las células se encontraban en estado competente ya que la eficiencia de transformación del DNA circular control fue de 2×10^6 ufc/ μ g.

Se prepararon nuevamente células DH5 α competentes y se verificó su capacidad de incorporar DNA utilizando el DNA circular del plásmido PUC19, obteniendo una eficiencia de transformación de 3.5×10^6 ufc/ μ g. Posteriormente se realizó la transformación de células DH5 α con el resto de la reacción de la primera clonación de la isoforma rDp71a (4 μ l) y se disminuyó el volumen de las células competentes a 100 μ l. Se espatularon cajas con 100 y 200 μ l, obteniéndose un mayor número de ufc. Este procedimiento se realizó con el resto de reacción de ligación para las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40, se centrifugó toda la mezcla de transformación y se resuspendió en 100 μ l para espatular todo el volumen, los resultados obtenidos se resumen en la tabla 5. En este ensayo se observó un incremento en la eficiencia de transformación cuando se utilizó el plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO con la isoforma rDp71a, sin embargo la eficiencia de transformación está por debajo de lo esperado (1×10^3 ufc/ μ g). Por lo anterior se realizó una nueva reacción de clonación utilizando 2 μ l del producto de PCR sin diluir para la reacción de clonación y se utilizó todo el volumen de dicha reacción para transformar células DH5 α primeramente se probaron la rDp71ab y rDp71 Δ_{78-79} . Con el objeto de, sembrar todo el volumen se espatularon 2 cajas para cada isoforma con 200 μ l, como segundo paso se realizó el experimento para rDp71e en donde se sembraron 100 μ l (tabla 5). Debido a que la eficiencia de transformación de este ensayo fue menor a 1×10^3 ufc/ μ g se realizó un cuarto ensayo donde se adicionaron 3 μ l del producto de PCR sin diluir para la reacción de clonación y se utilizó para la transformación de células DH5 α toda la mezcla de clonación (6 μ l) (tabla 5). Aunque el número de colonias obtenido fue mayor al ensayo anterior la eficiencia de transformación fue de nuevo muy baja ($<1 \times 10^3$ ufc/ μ g). Por último se decidió realizar el ensayo aumentando la cantidad de producto de PCR sin diluir a 4 μ l para la reacción de

clonación y transformando células DH5 α con toda la mezcla de clonación (6 μ l), esto solo se realizó para la isoforma rDp71ab.

Tabla 5. Obtención de bacterias transformantes.

Ensayos de Clonación	Isoforma	Ufc
1 Producto. PCR dil. 5ng 2 ul mezcla de clonación DNA control: PUC19	Dp71a	-
	Dp71ab	-
	Dp71e	-
	Dp71 Δ	-
	Dp40	1
2 4 ul mezcla de clonación DNA control: PUC19	Dp71a	16
	Dp71ab	-
	Dp71e	1
	Dp71 Δ	-
	Dp40	2
3 2 μ l producto PCR sin diluir 5 μ l mezcla de clonación DNA control: pPROEX-1/rDp40	Dp71ab	5
	Dp71 Δ	2
	Dp71e	1
4 3 μ l producto PCR sin diluir 5 μ l mezcla de clonación DNA control:pPROEX-1/rDp71a	Dp71ab	5
	Dp71 Δ	5
	Dp71e	9
5 4 μ l producto PCR sin diluir 6 μ l mezcla de clonación DNA control: pPROEX-1/rDp71ab	Dp71ab	7

En resumen, las eficiencias de transformación de las células DH5 α fueron menores a lo aceptable ($<1 \times 10^3$ ufc/ μ g), así mismo la cantidad limitante del vector impidió realizar más ensayos para mejorar la eficiencia de transformación y/o descartar algún problema técnico con el vector comercial. Se lograron obtener las siguientes ufc de los plásmidos recombinantes: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a = 16 ufc, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab = 17 ufc, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e = 11 ufc, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ = 7 ufc y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 = 3 ufc, los cuales fueron caracterizados por PCR, restricción enzimática y secuenciación.

4.6 Caracterización de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ_{78-79} y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por PCR, restricción enzimática y secuenciación.

Como primer paso en la caracterización de los candidatos de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ_{78-79} y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 se realizó una reacción de PCR de las colonias transformadas con los plásmidos recombinantes mencionados anteriormente para detectar los insertos de rDp71 y rDp40 respectivamente. En este sistema (Directional TOPO cloning), los productos de la reacción de PCR se clonan en forma orientada por la adición de cuatro bases que están presentes en el “forward primer” (CACC); el vector posee 4 bases de cadena sencilla (GTGG) que son complementarias al extremo 5' del producto de la reacción de PCR, estabilizando y orientando en dirección correcta la ligación del producto de la reacción de PCR, por lo anterior el amplificado esperado en el gel de agarosa, indicó una orientación correcta del cDNA de interés en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO. Primeramente se analizaron los productos de PCR en un gel de agarosa de 7 candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a (rDp71a 1.8, rDp71a 2.1, rDp71a 2.2, rDp71a 2.3, rDp71a 2.4, rDp71a 2.5 y rDp71a 2.6), 2 candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e (rDp71e 1.1 y rDp71e 2.1) y 2 candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 (rDp40 1.1 y rDp40 1.2), en donde se observó que solo los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 muestran el fragmento esperado

de alrededor de 1000 pb y que es comparable con el producto amplificado a partir de colonias transformadas con pPROEX-1/rDp40 utilizado como control (fig. 12). Seguidamente se analizaron 5 candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab (rDp71ab 4.1, rDp71ab 4.2, rDp71ab 4.3, rDp71ab 4.4, rDp71ab 4.5), 5 candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ (rDp71Δ 4.1, rDp71Δ 4.2, rDp71Δ 4.3, rDp71Δ 4.4, rDp71Δ 4.5) y el candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6; en gel de agarosa se observaron dos fragmentos de alrededor de 1800 pb en los carriles correspondientes a los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6 (fig. 13). Hasta ahora se contaban con 4 candidatos positivos correspondientes a las isoformas; pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 (rDp40 1.1 y rDp40 1.2), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6. Por lo tanto se realizó la misma caracterización para 9 candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e (rDp71e 4.1, rDp71e 4.2, rDp71e 4.3, rDp71e 4.4, rDp71e 4.5, rDp71e 4.6, rDp71e 4.7, rDp71e 4.8 y rDp71e 4.9); encontrando un fragmento de un tamaño superior a 1800 pb para los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.6 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8 (fig. 14), que se verificó nuevamente en experimentos posteriores. Finalmente se analizaron los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab (rDp71ab 3.1, rDp71ab 3.2, rDp71ab 3, rDp71ab 4, rDp71ab 1.2, rDp71ab 1.4, rDp71ab 1.5, y rDp71ab 1.6); encontrando el fragmento del tamaño esperado para los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 1.5; aunque la banda de este último se observó de menor intensidad con respecto a los otros dos candidatos (fig. 15), por lo que se decidió seguir con el análisis de los primeros dos candidatos.

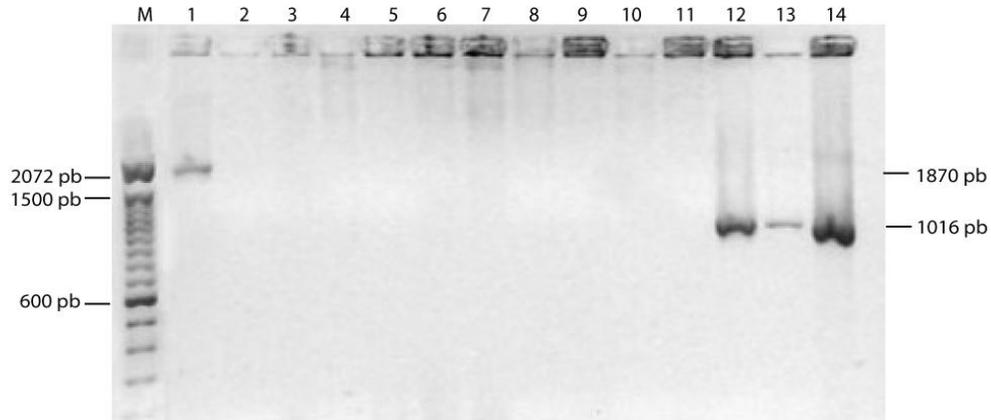


Figura 12. Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: pPROEX-1/rDp71ab (1870 pb), 5 μ l, carril 2: vacío, carril 3: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a2.1, carril 4: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a2.2, carril 5: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a2.3, carril 6: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a2.4, carril 7: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a2.5, carril 8: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a2.6, carril 9: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.8, carril 10: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e2.1, carril 11: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e1.1. En el carril 12: control de rDp40, carriles 13 y 14: candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 y 1.2 respectivamente, utilizando el mismo volumen del carril 1. El tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb, mientras que para la Dp40 se espera un tamaño alrededor de 1016 pb M: marcador de peso molecular 100 pb los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

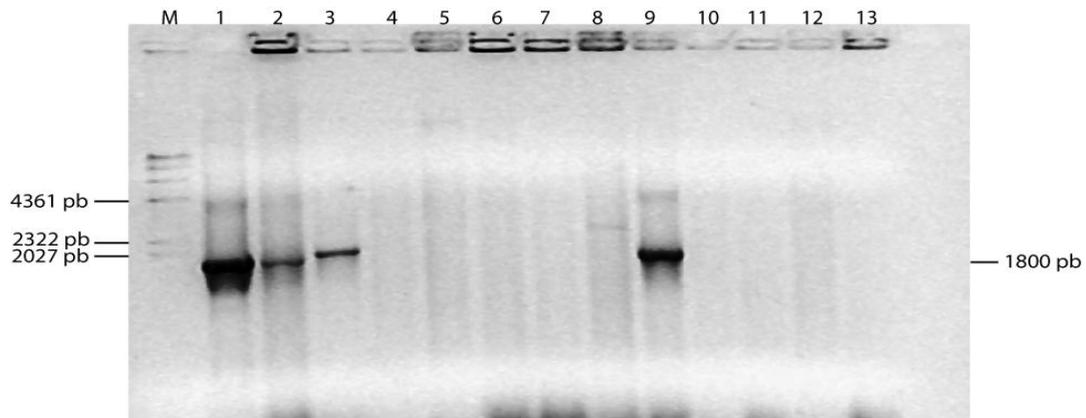


Figura 13. Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ . Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: pPROEX-1/ rDp71a, 5 μ l, carril 2: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.6, carril 3: pPROEX-1/rDp71ab, carril 4: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4.1, carril 5: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4.2, carril 6: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4.3, carril 7: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4.4, carril 8: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4.5, carril 9: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1, carril 10: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.2, carril 11: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.3, carril 12: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.4, carril 13: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.5; utilizando el mismo volumen del carril 1. El tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb, M: marcador de peso molecular λ -Hind III, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

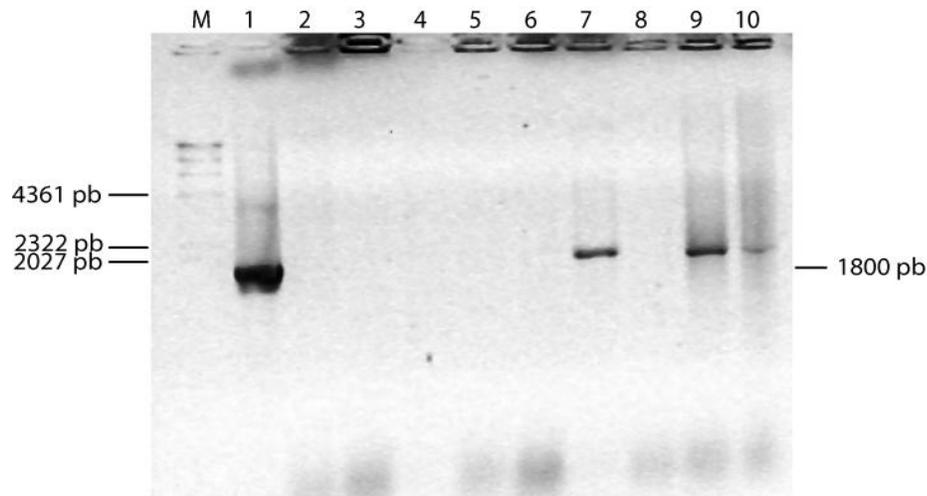


Figura 14. Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: pPROEX-1/rDp71a, 5µl, carril 2: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.1, carril 3: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.2, carril 4: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.3, carril 5: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.4, carril 6: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.5, carril 7: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.6, carril 8: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.7, carril 9: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8, carril 10: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.9; utilizando el mismo volumen del carril 1. El tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb, M: marcador de peso molecular λ-Hind III, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

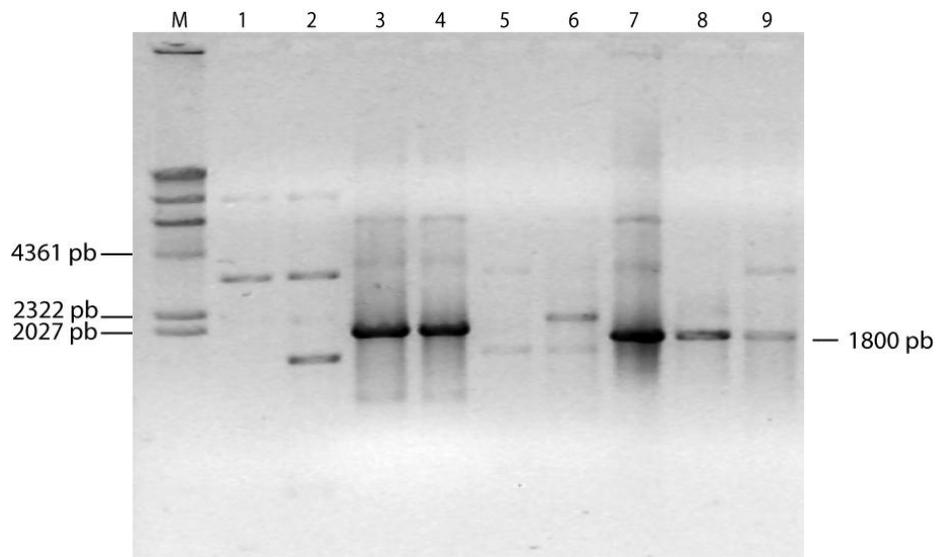


Figura 15. Productos del PCR de las colonias transformadas con los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab. Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3.1, cargando 5 µl, carril 2: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3.2, carril 3: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3, carril 4: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4, carril 5: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 1.2, carril 6: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab1.4, carril 7: pPROEX-1/rDp71ab, carril 8: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab1.5, carril 9: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 1.6, utilizando el mismo volumen del carril 1. El tamaño esperado de las isoformas Dp71ab es alrededor de 1800 pb, M: marcador de peso molecular 100 pb, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

Una vez analizadas las colonias bacterianas que fueron transformadas, se realizó la propagación de las colonias recombinantes en medio líquido para posteriormente extraer los plásmidos recombinantes por los métodos de maxiprep (método alcalino) para los candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2 (fig. 16) y miniprep (kit QIAprep Spin Miniprep) para pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.5, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.6, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2 (fig. 17). Una vez obtenidos los plásmidos por el método maxiprep, se cuantificaron y se analizó la relación 260/280 que indica la pureza de los mismos, los resultados se muestran en la tabla 6.

Como siguiente paso se analizaron nuevamente los plásmidos obtenidos por el método maxiprep mediante PCR (fig. 18), en donde se observan las bandas esperadas de alrededor de 1800 pb de los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1, en cuanto al pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6 se observó una banda correspondiente al tamaño pero de intensidad menor comparada con la de rDp71e y rDp71Δ₇₈₋₇₉; la isoforma rDp40 1.2 generó una banda de menor tamaño (1016 pb.), con respecto a las rDp71. En cuanto a la caracterización de los plásmidos recombinantes obtenidos por el método miniprep (fig. 19) se encontró el mismo patrón que la figura anterior donde, los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 muestran un fragmento de 1800 pb, y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 uno de 1016 pb.

De acuerdo a los resultados de la caracterización por PCR los plásmidos seleccionados para el análisis por digestión enzimática fueron ocho en total: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.5, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4,

pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2.

Tabla No. 6 Cuantificación de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/Isoformas rDp71 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40.

	Concentración	260/280
pcDNA3.1D/V5.His-TOPOrDp71a 1.6	600 ng/μl	2.0
pcDNA3.1D/V5.His-TOPOrDp71e 4.8	300 ng/μl	2.0
pcDNA3.1D/V5.His-TOPOrDp71Δ 4.1	400 ng/μl	2.0
pcDNA3.1D/V5.His-TOPOrDp40 1.2	500 ng/μl	2.0

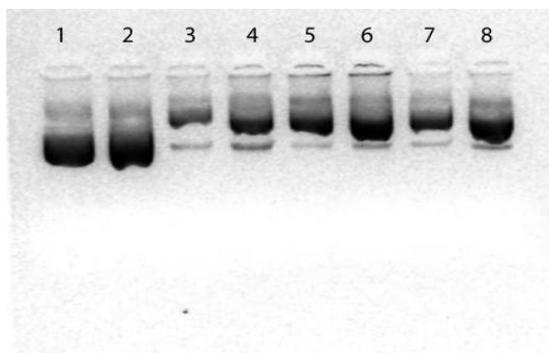


Figura 16. Plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2. El DNA de los plásmidos se obtuvo por el método maxiprep (método alcalino) descrito en materiales y métodos. Los plásmidos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carriles 1 y 2: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.6, 2 y 4 μl respectivamente, carriles 3 y 4: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8, carriles 5 y 6: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ4.1 y carriles 7 y 8: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2, utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2.

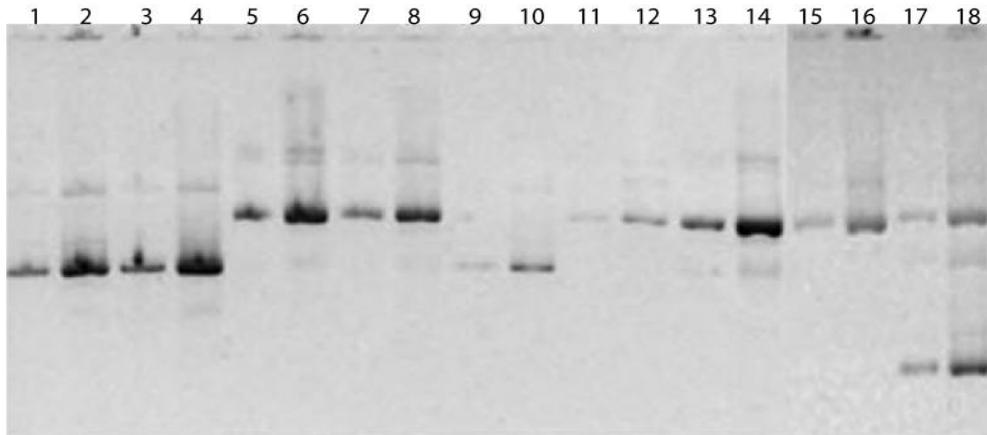


Figura 17. Plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a (1.5 y 1.6), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab (3 y 4), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e (4.6 y 4.8), pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 (1.1 y 1.2). El DNA de los plásmidos se obtuvo por el método miniprep descrito en materiales y métodos. Los plásmidos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1 y 2: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.5, 2 y 8 μl respectivamente, carril 3 y 4: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6, carril 5 y 6: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3, carril 7 y 8: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4, carril 9 y 10: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.6, carril 11 y 12: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8, carril 13 y 14: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1, carril 15 y 16: plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 y en el carril 17 y 18: se muestra el plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2, utilizando los mismos volúmenes que en los carriles 1 y 2.

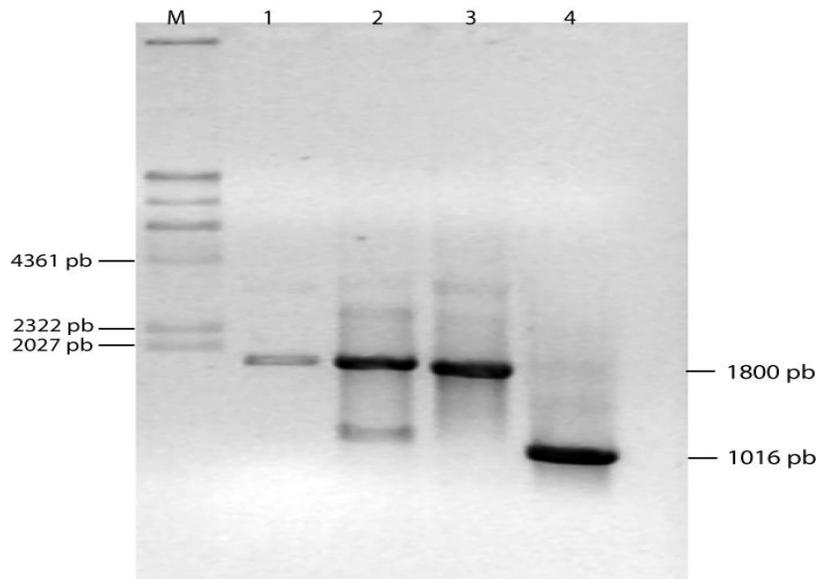


Figura 18. Caracterización de los plásmidos recombinantes (maxiprep) pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por PCR. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.6; carril 2: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8, carril 3: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ4.1; el tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb, y en el carril 4: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.2 con un tamaño de 1016 pb. M: marcador de peso molecular λ-Hind III, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

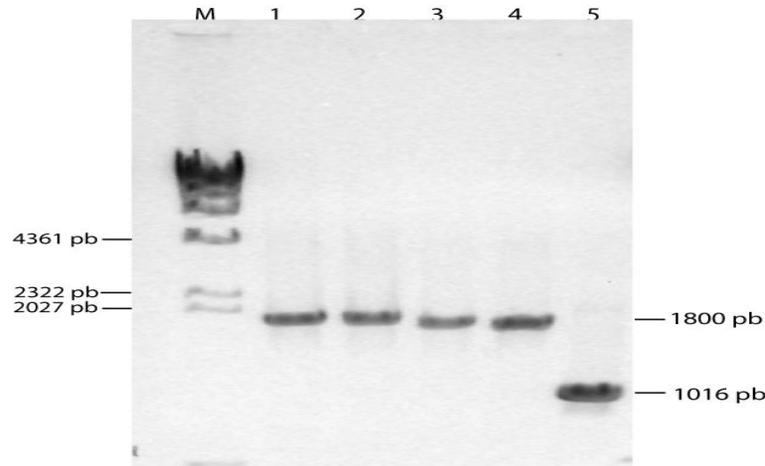


Figura 19. Caracterización de los plásmidos recombinantes (miniprep) pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por PCR. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio. Carril 1: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3, carril 2: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4, carril 3: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8, carril 4: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ4.1 el tamaño esperado de las isoformas Dp71 es alrededor de 1800 pb y en el carril 5: candidato pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1; con un tamaño de 1016 pb. M: marcador de peso molecular λ-Hind III, los números a la izquierda indican el tamaño en pares de bases.

Posteriormente se diseñó una estrategia para verificar a los plásmidos aislados utilizando digestión enzimática, los cortes teóricos se realizaron en el programa VECTOR NT utilizando las enzimas *Pst*I que realiza 4 cortes en las isoformas de rDp71 y 3 en la rDp40; mientras que la enzima *Hind*III lineariza el plásmido (fig. 20). La tabla 10 muestra los tamaños de los fragmentos esperados que van desde 4296 pb hasta 178 pb. Los plásmidos candidatos fueron analizados por restricción con las enzimas mencionadas y posteriormente se analizaron los fragmentos generados en geles de agarosa al 1 % (fig. 21). En el panel A los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.5 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a 1.6 digeridos con la enzima *Pst*I muestran solo 2 bandas de las 3 que esperábamos ver; mientras que pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4 muestran los tres fragmentos de los tamaños esperados. La digestión con *Hind*III para los primeros plásmidos no mostró el resultado esperado, pero en el caso del plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4 se observó una sola banda que corresponde al plásmido linearizado, respecto a pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3 donde la digestión fue parcial, ya que

se observó un fragmento similar al del plásmido anterior, pero adicionalmente se observó un patrón similar al del plásmido sin restringir. En el panel B se descartó la digestión con la enzima *HindIII*, debido a los resultados obtenidos en el panel A, que indicaron una disminución en su actividad; así la digestión del plásmido pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 con la enzima *PstI* generó los tres fragmentos esperados, para este último el fragmento de menor tamaño fue de 800 pb. Con este resultado se decidió secuenciar los cinco plásmidos que mostraron el patrón de digestión esperado (pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1)

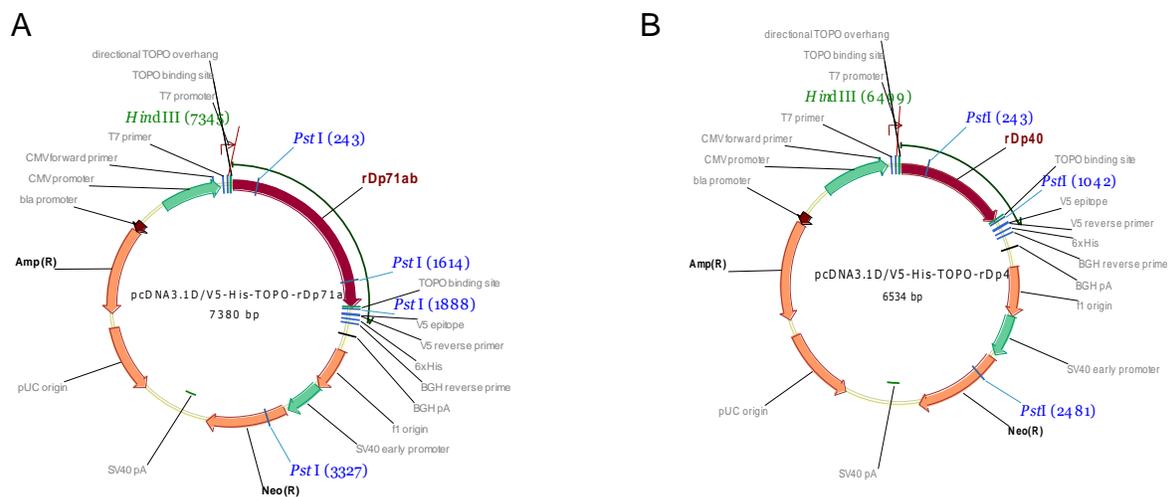


Figura 20. Digestión enzimática teórica de los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 con *PstI* y *HindIII*. Se observan los 4 sitios de corte de la enzima *PstI* (azul) en el caso de las isoformas Dp71 y 3 sitios para la Dp40; mientras que para la enzima *HindIII* (verde) solo observamos un sitio de corte que lineariza los plásmidos.

Tabla 7. Fragmentos de restricción teóricos de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ₇₈₋₇₉ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 digeridos con *Pst*I.

rDp71a (pb)	rDp71ab (pb)	rDp71e (pb)	rDp71Δ ₇₈₋₇₉ (pb)	rDp40 (pb)
4296	4296	4296	4296	4296
1439	1439	1439	1439	1439
1371	1371	1371	1371	799
220	274	208	178	

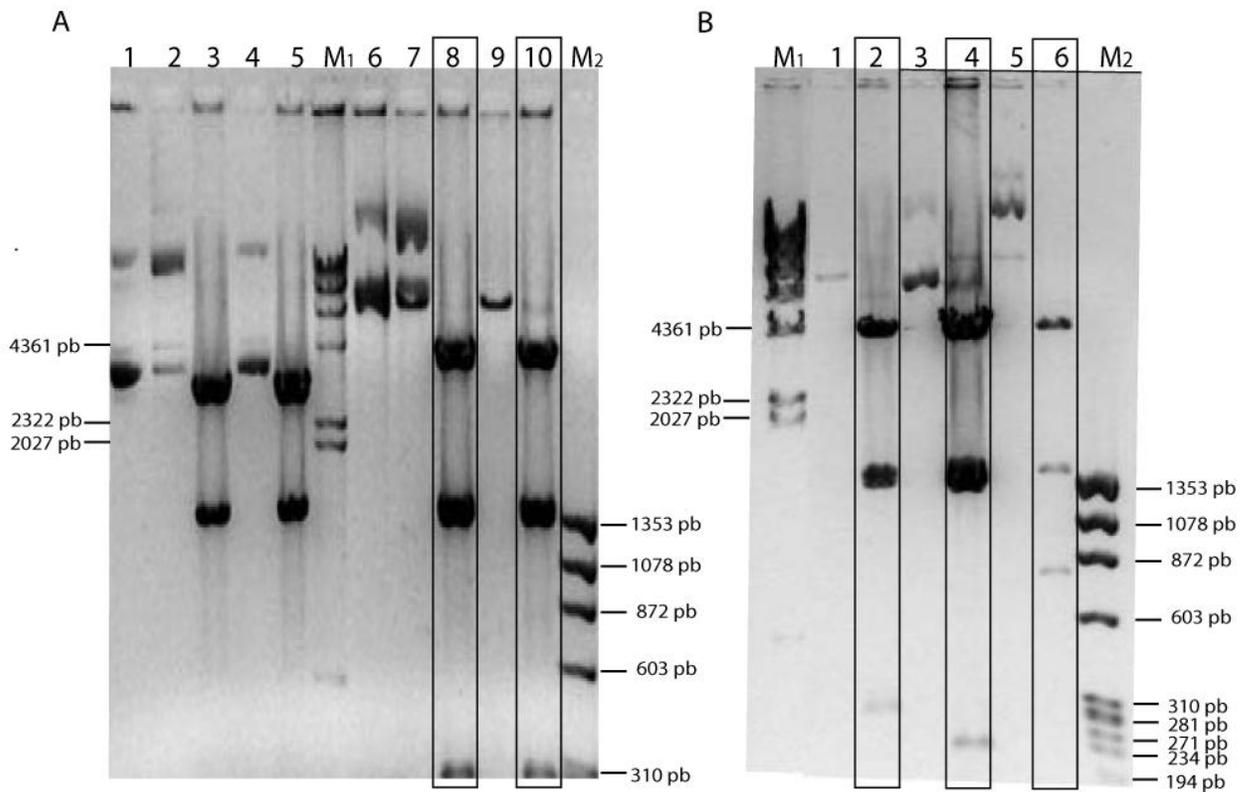
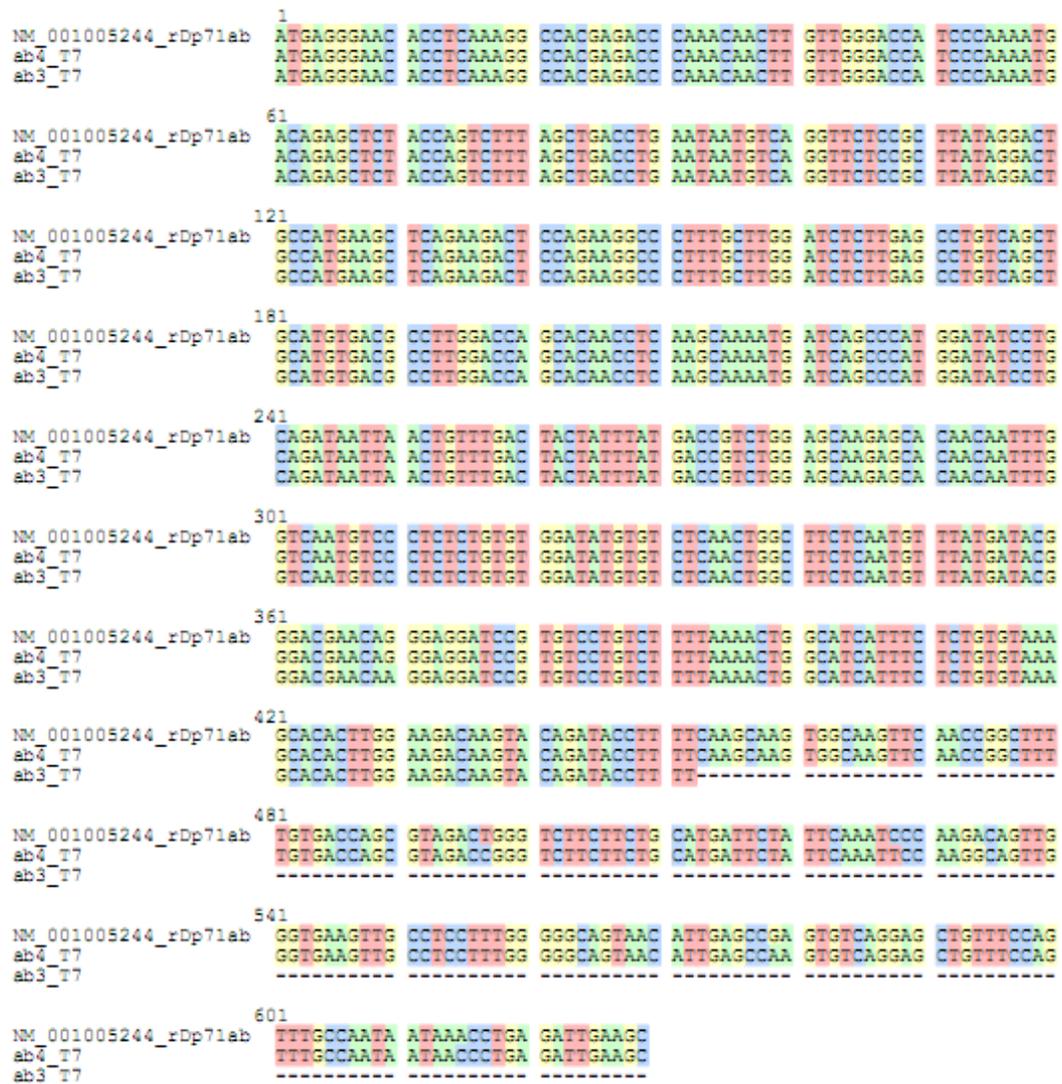


Figura 21. Caracterización de los plásmidos recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 por restricción enzimática. El DNA de los plásmidos candidatos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *PstI*: los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio. El corte con *HindIII* lineariza a los plásmido; mientras que la enzima *PstI* genera 4 fragmentos para las isoformas Dp71, 2 de estos fragmentos muestran un tamaño muy aproximado por lo que se ven como una banda en el gel, por lo tanto en los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/Dp71 se observaron 3 fragmentos después de la digestión: 4296, 1439-1371 y uno de alrededor de 200 pb; para el pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/Dp40 se observaron tres fragmentos, los dos primeros corresponden con los fragmentos de mayor tamaño del pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/Dp71 y el tercero es de 799 pb. A. Carril 1: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.5 sin restringir, carril 2: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.5 restringido con *HindIII*, carril 3: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.5 restringido con *PstI*, carril 4: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.6 restringido con *HindIII*, carril 5: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71a1.6 restringido con *PstI*, carril 6: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3 sin restringir, carril 7: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3 restringido con *Hind III*, carril 8: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3 restringido con *PstI*, carril 9: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4 restringido con *HindIII*, carril 10: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4 restringido con *PstI*, las construcciones correctas son: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4 (recuadro negro), M₁: Marcador λHindIII, M₂: Marcador φ174, los números a la izquierda y derecha de cada figura indican el tamaño en pares de bases. B. Carril 1: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8 sin restringir, carril 2: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8 restringido con *PstI*, carril 3: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ4.1 sin restringir, carril 4: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ4.1 restringido con *PstI*, carril 5: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 sin restringir, carril 6: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/ rDp40 1.1 restringido con *PstI*, las construcciones correctas son: pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 (recuadro negro), M₁: Marcador λ Hind III, M₂: Marcador φ174, los números a la izquierda y derecha de cada figura indican el tamaño en pares de bases.

Una vez caracterizados por PCR y por restricción enzimática, los plásmidos pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3 y 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1, se secuenciaron según lo descrito en materiales y métodos. La estrategia fue secuenciar el extremo 5' donde se encuentra el ATG y el extremo 3' del cDNA de cada isoforma utilizando los iniciadores provistos en el kit del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO para secuenciación; así para el extremo 5' se utilizó el oligo T7, excepto para la isoforma rDp71e y la mutante rDp71Δ₇₈₋₇₉ en la cual se empleó el oligo T1DV5 (véase materiales métodos); para secuenciar el extremo 3'. Se utilizó el oligo denominado BGH, este es complementario a una región del vector localizada después del epítipo V5 y del tag de histidinas, que se encuentran al final del C-terminal de la proteína recombinante (fig. 2-6).

Una vez obtenidos los cromatogramas se analizaron y se realizaron alineamientos con las secuencias reportadas en el GenBank, utilizando el programa CLUSTALX2. Para la isoforma Dp71ab se comparó la secuencia obtenida con la reportada NM_00100524, que corresponde a la Dp71 isoforma ab de rata. Esta isoforma carece de exones 71 y 78 por lo que pertenece a la familia Dp71f (fig. 1). Primeramente se secuenció pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3 en la que se leyeron un total de 802 pb, menos del 50 % de la longitud total de la rDp71ab, posteriormente se secuenció, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, en donde fue posible leer más del 50 % de la secuencia de rDp71ab; al analizar los alineamientos, no se encontraron cambios en la secuencia obtenida respecto a la reportada para la Dp71 isoforma ab de rata por lo que se determinó que las construcciones pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4 son correctas (fig. 22 y 23).

A



B

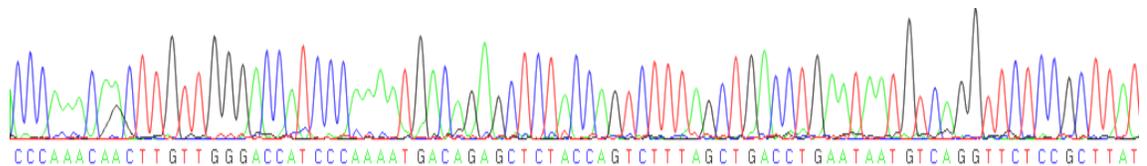
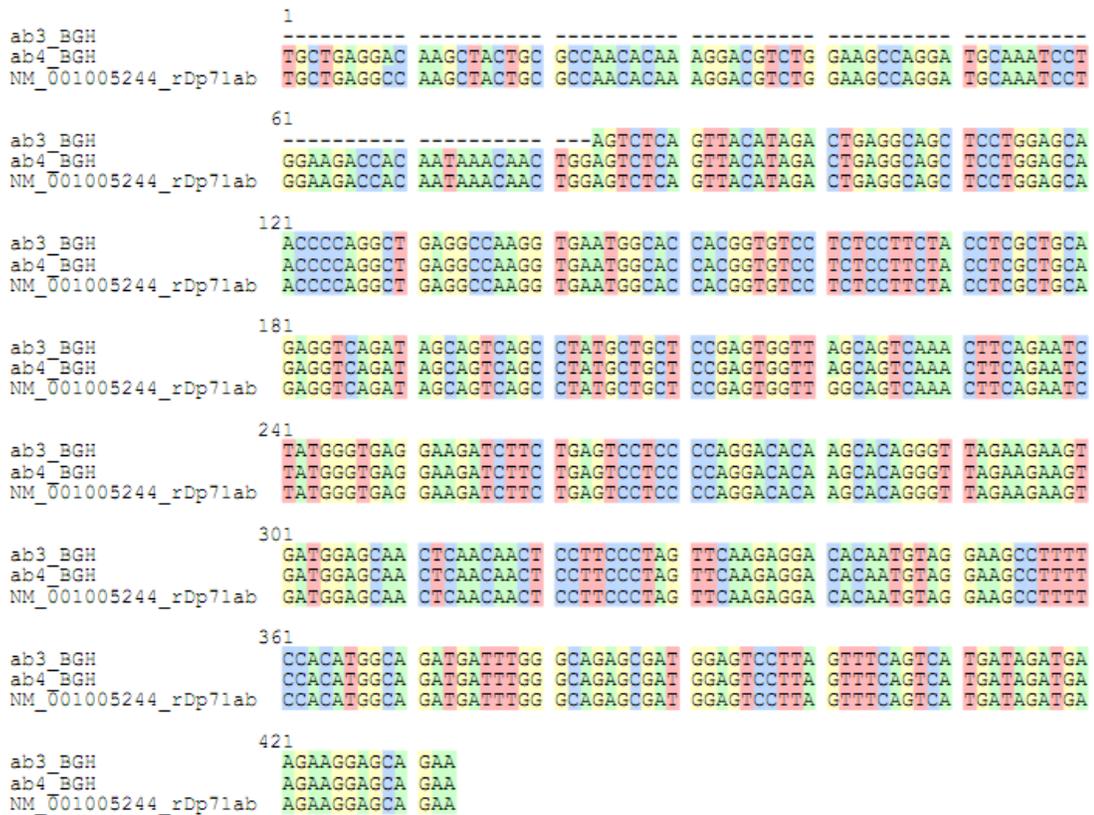


Figura 22. Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 5' de las construcciones pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3 (ab3_T7) con una lectura de 452 pb, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4 (ab4_T7) con una lectura de 628 pb y la secuencia del GenBank que corresponde a la Dp71 isoforma ab de rata (NM_001005244_rDp71ab) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo); la raya discontinua indica los nucleótidos no leídos durante la secuenciación. No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

A



B

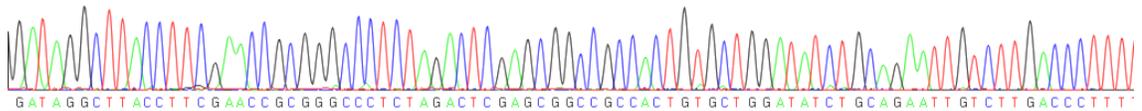
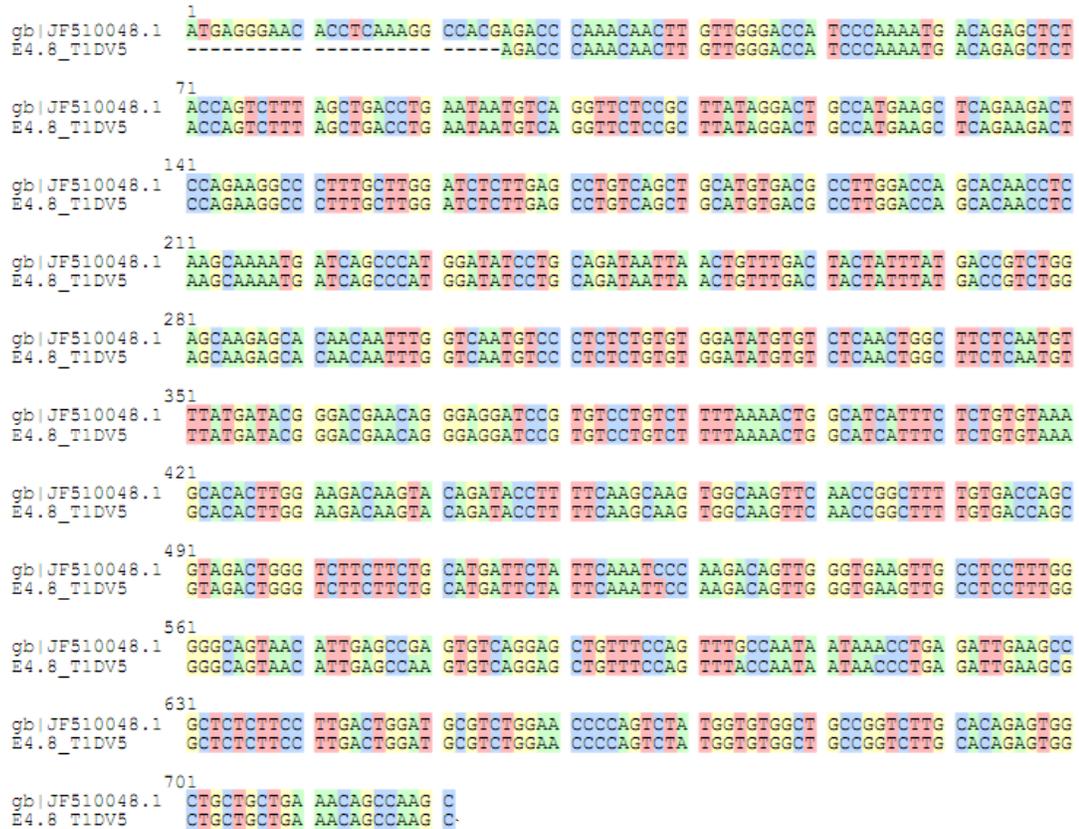


Figura 23. Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 3' de las construcciones pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab3 (ab3_T7) con una lectura de 350 pb, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab4 (ab4_T7) con una lectura de 433 pb y la secuencia del GenBank que corresponde a la Dp71 isoforma ab de rata (NM_001005244_rDp71ab) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo); la raya discontinua indica los nucleótidos no leídos durante la secuenciación. No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

Posteriormente se analizó la secuencia de pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8; el alineamiento se realizó con la secuencia reportada JF510048.1 correspondiente a la Dp71 isoforma e de rata. Esta isoforma posee una secuencia denominada “e” que codifica para un único C-terminal que no permite la traducción de los exones 78 y 79 (fig. 1). Se alcanzó una lectura total de 1154 pb cubriendo un 60 % de la longitud total

de la isoforma rDp71e. Al analizar los alineamientos no se encontraron cambios en la secuencia obtenida, por lo que se determinó que la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8 es correcta (fig. 24 y 25).

A



B

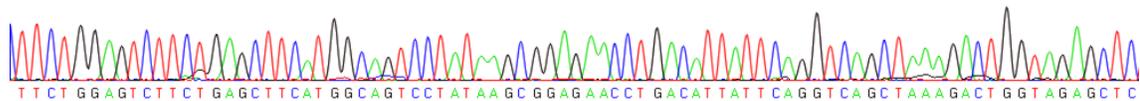


Figura 24. Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 5' de la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8 (E4.8_T1DV5) con una lectura de 696 pb, y la secuencia del GenBank que corresponde a la Dp71 isoforma e de rata (gb | JF510048.1) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo); la raya discontinua indica los nucleótidos no leídos durante la secuenciación. No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

A



B

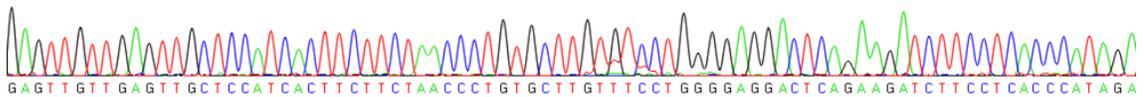
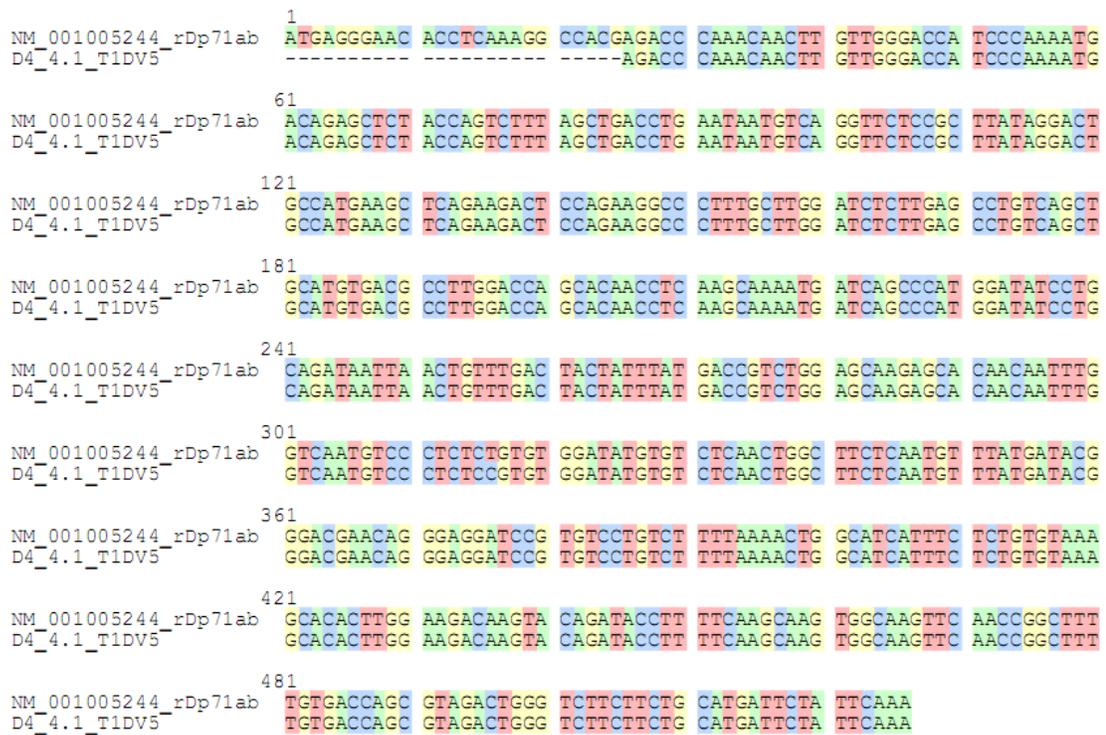


Figura 25. Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 3' de la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8 (e4.8_BGH) con una lectura de 434 pb, y la secuencia del GenBank que corresponde a la Dp71 isoforma e de rata (gb | JF510048.1) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo); se indica la región “e” (recuadros negros). No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

La Dp71 Δ_{78-79} es una proteína mutante que carece de los exones 78 y 79; con el objeto de determinar la secuencia obtenida de la pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1 se utilizo para el extremo 5' la secuencia reportada NM_00100524 que corresponde a la Dp71 isoforma ab de rata y para el extremo 3' la secuencia AY326947 correspondiente a la Dp71 variante a de rata ya que esta última pierde el exón 71 al igual que la Dp71 Δ_{78-79} pero tiene el 78 y 79. Con esta reacción fue posible leer un total de 941 pb cubriendo un 50 % de la secuencia de la mutante Dp71 Δ_{78-79} . Al analizar los alineamientos no se encontraron cambios en la secuencia obtenida, por lo que se determinó que la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1 es correcta (fig. 26 y 27).

A



B

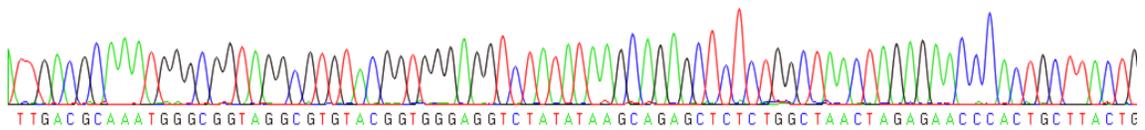
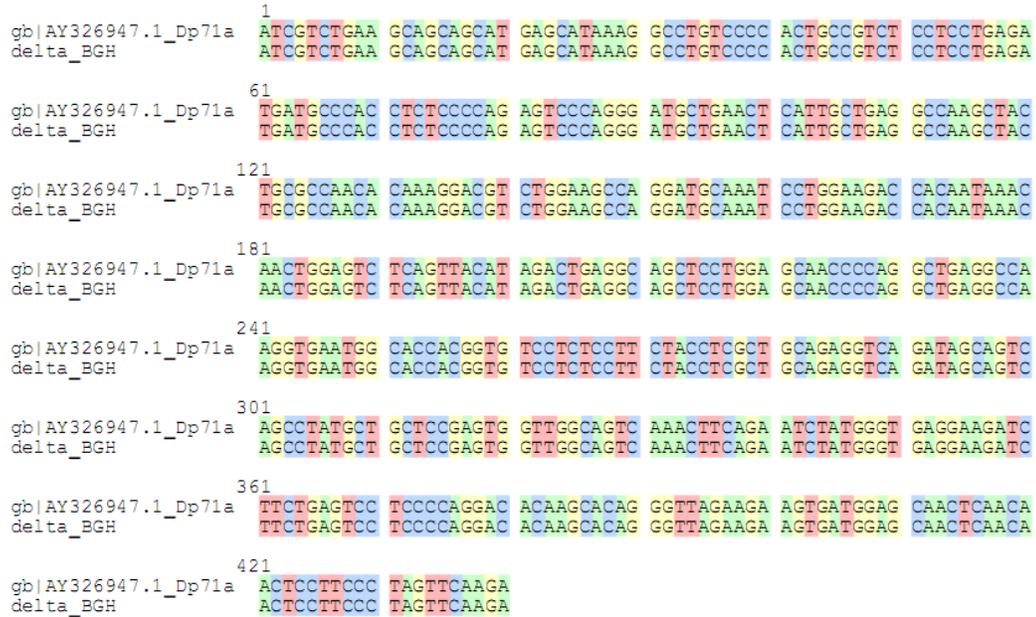


Figura 26. Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 5' de la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 (D4_4.1_T1DV5) con una lectura de 501 pb y la secuencia del GenBank que corresponde a la Dp71 isoforma ab de rata (NM_001005244_rDp71ab) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo); la raya discontinua indica los nucleótidos no leídos durante la secuenciación. No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

A



B

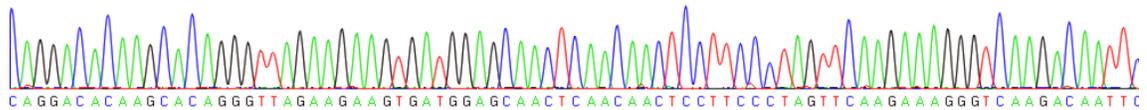
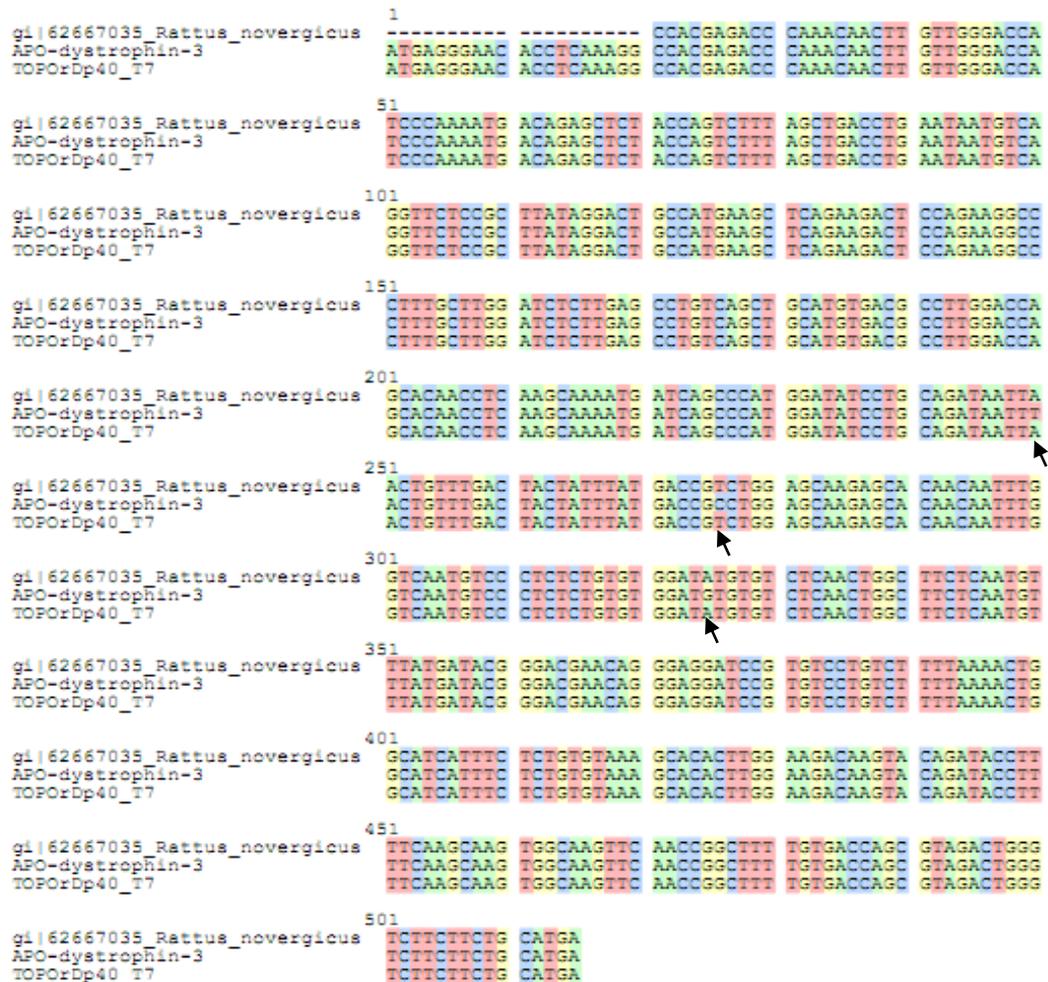


Figura 27. Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 3' de la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 (delta_BGH) con una lectura de 440 pb, y la secuencia del GenBank que corresponde a la Dp71 isoforma a de rata (gb | AY326947.1_Dp71a) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adenina (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo). No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

La rDp40 comparte los exones 63-70 con la rDp71, por lo tanto el análisis de la secuencia del pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 se realizó empleando la secuencia genómica de rata correspondiente al gen *dmd* NW_048042.2 (*Rattus norvegicus* strain BN/SsNHsdMCW chromosome X genomic scaffold, RGSC_v3.4), donde se identificaron y utilizaron los exones del 63-70 para el alineamiento, adicionalmente se empleó la secuencia reportada por Tinsley y cols (1993) llamada apo-distrofina-3 (X69767.1) correspondiente a la Dp40, cuyo origen es de rata. En esta reacción de secuenciación fue posible leer un total de 905 pb cubriendo cerca del 90 % de la secuencia completa

de la rDp40. Al analizar los alineamientos se observó que la secuencia obtenida (delta_BGH) con respecto a la Dp71 no muestra cambios de base; mientras que el alineamiento con la secuencia de Tinsley (APO-dystrophin-3) revela 3 cambios hacia el extremo 5'. La base 250 que corresponde a una timina es sustituida por una adenina, el segundo cambio implica la base 275 (C/T); y un tercer cambio donde la base 325 (G/A), estos cambios ya han sido reportado previamente por Santos-Coy en el 2008 y solo el segundo cambio provoca una sustitución de una tirosina por asparagina, aunque los dos aminoácidos poseen la misma polaridad.

A



B

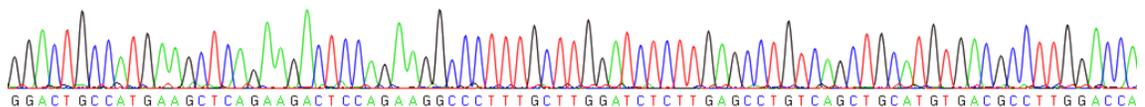
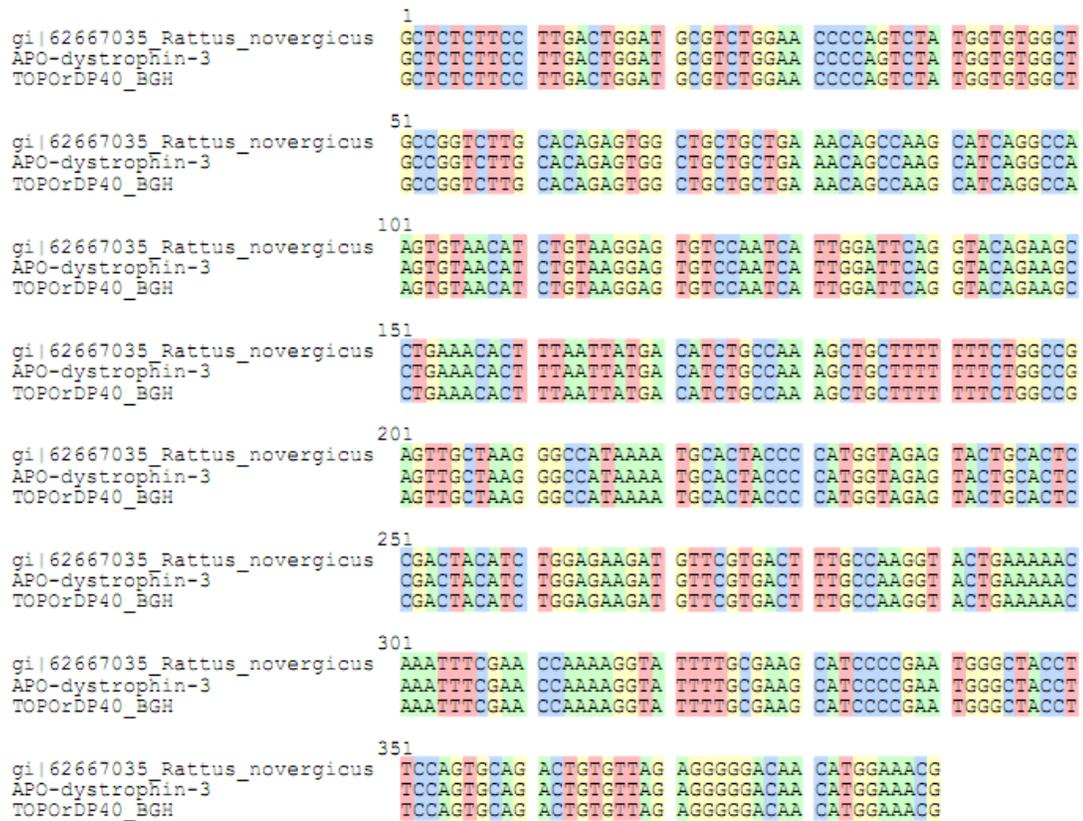


Figura 28. Secuenciación del extremo 5' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 5' de la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 (TOPOrDp40_T7) con una lectura de 515 pb, la secuencia genómica de la Dp71 (gi|62667035_Rattus_novergicus), y la secuencia reportada por Tinsley y cols (X69767.1) (APO-dystrophin-3) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adeninas (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo); las flechas negras indica tres cambios de la secuencia de Tinsley con la secuencia genómica de la Dp71 (gi|62667035:Rattus_novergicus) y la secuencia pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 (TOPOrDp40_T7); la raya discontinua indica los nucleótidos no leídos durante la secuenciación. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

A



B

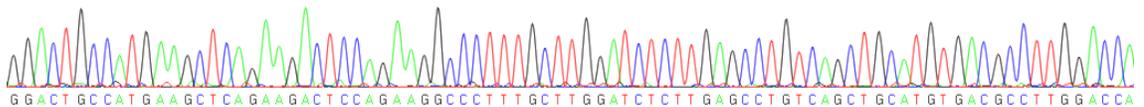


Figura 29. Secuenciación del extremo 3' de la isoforma pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40. A. Se observa el alineamiento de la secuencia obtenida del extremo 3' de la construcción pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 (TOPOrDp40_T7) con una lectura de 390 pb, la secuencia genómica de la Dp71 (gi|62667035_Rattus_novergicus), y la secuencia reportada por Tinsley y cols. (X69767.1) (APO-dystrophin-3) realizado en el programa ClustalX2 y editado en el software Seaview, para la identificación de cada nucleótido, adeninas (verde), citosina (azul), guanina (amarillo) y timina (rojo). No se encontraron cambios en la región secuenciada. B. Cromatograma obtenido en la secuenciación utilizando el equipo automatizado ABI PRISM 310 (Perkin Elmer).

V. DISCUSIÓN

La distrofina Dp71 es una proteína que se expresa en una gran variedad de tejidos no musculares incluyendo cerebro. Su expresión es regulada en forma temprana durante la embriogénesis lo cual sugiere una importante función biológica. En el sistema nervioso esta proteína tiene una función fundamental: a) la expresión de Dp71 ocurre en paralelo con el desarrollo del cerebro, b) Dp71 es requerida para el anclaje y la organización de las DAPC en el cerebro y c) las mutaciones en el C-terminal de la distrofina pueden afectar la expresión de Dp71 lo cual se ha asociado con retardo mental (Moizard *et al.*, 2000).

Los transcritos de Dp71 pueden experimentar procesamiento alternativo en los exones 71 y/o 78. La delección del exón 71 no modifica el marco de lectura de la proteína, generando productos proteicos con el exón 78 intacto que son llamados Dp71d. Así mismo la pérdida del exón 78 cambia de marco de lectura; que resulta en el reemplazamiento de por lo menos 13 aminoácidos hidrofílicos de la distrofina con 31 aminoácidos hidrofóbicos en la Dp71 (Lederfein *et al.*, 1992), esta proteína se denomina Dp71f, y existen 2 variantes: Dp71b (exón 71 presente) y Dp71ab (exón 71 ausente). La Dp71c pierde los exones 71-74 que son importantes para la unión con sintrofina. Recientemente se ha descrito una nueva isoforma llamada Dp71e cuyo transcrito experimenta eventos de procesamiento alternativo en el exón 77, generando un codón de paro que impide la traducción de los exones 78 y 79. Esta isoforma posee un extremo carboxilo terminal nuevo compuesto de una región de 10 aminoácidos de carácter hidrofílico denominada “región e”. Saint-Martin y cols en el 2011 reportaron transcritos que corresponden a Dp71e presentes en varios tejidos de rata, incluyendo cerebro, corazón, pulmón, testículos, páncreas, riñón, intestino, hígado y ojo; sin embargo el músculo esquelético no expresa este transcrito e interesantemente la expresión de la proteína solo se encontró en corazón y pulmón.

Alemán y cols en el 2001, utilizando anticuerpos para cada isoforma encontraron que la Dp71d y Dp71f están presentes en extractos nucleares obtenidos de neuronas de hipocampo. Análisis realizados por inmunofluorescencia y microscopia confocal

confirmaron este hallazgo: Dp71d se observa prominentemente en gránulos nucleares en astrocitos del prosencéfalo, mientras que la Dp71f se observó exclusivamente en neuronas.

En cuanto a su localización subcelular, las isoformas Dp71f se encontraron exclusivamente en citoplasma; mientras que Dp71d presentan una localización predominantemente nuclear en las líneas celulares HeLa, C2C12, N1E-115 (Gonzalez *et al.*, 2000) y PC12 (Marquez *et al.*, 2003). Esta última ha sido ampliamente utilizada para estudiar la expresión de las variantes Dp71 durante el proceso de diferenciación. En células PC12 no diferenciadas se ha reportado la Dp71 variante ab en citoplasma y periferia celular, mientras que en células diferenciadas con NGF se localiza en citoplasma, siendo más abundante en la periferia de las células, varicosidades y conos de crecimiento (Marquez *et al.*, 2003 y Romo-Yanez *et al.*, 2007). Por otra parte se ha analizado la expresión de la Dp40, la cual se concentra en el núcleo en células PC12 no diferenciadas, mientras que en células diferenciadas con NGF la mayor parte de la señal de Dp40 se localiza en el citoplasma (Santos Coy, 2008). Tozawa, y cols. En el 2012, determinaron por fraccionamiento celular que Dp40 es expresada en cerebro y enriquecida en la fracción vesículas sinápticas, además de su interacción con proteínas presinápticas, incluyendo sintaxina 1A y SNAP25, lo que podría sugerir un papel en funciones presinápticas. Así mismo se ha reportado que las células PC12 expresan la Dp71e y su expresión incrementa durante el proceso de diferenciación inducido por NGF. También se ha analizado la mutante denominada Dp71 Δ_{78-79} que carece de los exones 78-79 y al sobreexpresar esta proteína en células PC12 se observó una diferenciación más eficiente; por lo que los exones 78 y 79 probablemente no son requeridos para dicha función. En cuanto a la localización, Dp71 Δ_{78-79} ésta se localiza en la periferia de la célula (Aragon *et al.*, 2011)

En el laboratorio se cuenta con algunas construcciones que generan proteínas recombinantes que tienen diferentes banderas fusionada en el extremo N-terminal, Xpress-rDp71a, Xpress-rDp71c, Xpress-Dp71 Δ_{78-79} , Myc-rDp71a, Myc-rDp71c, HA-rDp71a, HA-rDp71c; existen anticuerpos específicos para la detección de cada bandera

por lo que es posible determinar mediante inmunofluorescencia y microscopia confocal su localización subcelular. Estudios previos han observado a la proteína recombinante Xpress-Dp71 Δ_{78-79} localizada en la periferia celular en la línea celular PC12; así mismo la proteína recombinante Xpress-Dp71a, expresada transitoriamente en células PC12, se localiza principalmente en la periferia celular, pero también se presente en citoplasma y núcleo de dichas células (Aragon *et al.*, 2011), sugiriendo que los exones 78 y 79 podrían participar en la regulación de la localización nuclear y citoplasmática, así mismo la secuencia de aminoácidos generada cuando el exón 78 sufre procesamiento alternativo también podría participar en controlar la localización de la Dp71ab en el citoplasma y en la periferia celular como se ha descrito anteriormente (Marquez *et al.*, 2003 y Romo-Yanez *et al.*, 2007).

El carboxilo terminal de la Dp71 contiene múltiples dominios que interactúan con proteínas integrales y periféricas de membrana plasmática. Existe evidencia que soporta la idea de la importancia del C-terminal en la localización de las variantes Dp71, por lo que es fundamental la construcción de proteínas recombinantes con una bandera en el C-terminal para analizar si la bandera puede afectar su distribución y función, con respecto a las proteínas recombinantes con banderas en el N-terminal.

En el desarrollo de este trabajo, primeramente se realizó una búsqueda de vectores que permitieran la obtención de proteínas con banderas en el C-terminal, una vez encontrado el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO se procedió a extraer el cDNA de las isoformas rDp71a, rDp71ab, rDp71e, rDp71 Δ_{78-79} y rDp40 a partir de vectores pPROEX-1 que contenían a cada isoforma y que previamente se habían caracterizado por secuenciación, seguidamente se realizó el diseño de oligos para la reacción de PCR, donde era importante la eliminación del codón de paro del oligo 3' de cada isoforma Dp71 y de la Dp40, para garantizar la obtención de proteínas recombinantes Dp71 y Dp40 fusionadas con la bandera en el extremo C-terminal. Posteriormente se llevó a cabo la estandarización de la PCR, ya que la concentración de Mg²⁺, puede tener un efecto sobre la especificidad como en el rendimiento, cuando es insuficiente se tiene rendimientos muy bajos o nulos, esto fue observado utilizando 50 mM de MgCl₂, donde

no obtuvimos amplificadas (fig. 9, A). Por el contrario cuando está en exceso el $MgCl_2$, se obtienen amplificaciones inespecíficas (fig. 9, C). Por lo anterior se decidió trabajar con la concentración de 75 mM de $MgCl_2$ en las reacciones de PCR subsecuentes; estos amplificadas se purificaron y nuevamente se amplificaron empleando una Taq DNA polimerasa que produce mejores rendimientos, disminuye los errores y tiene mayor fidelidad que una Taq DNA polimerasa común, ya que es importante obtener las proteínas con la secuencia original, es decir sin cambios que pudieran afectar el marco de lectura y para eliminar los artefactos propios de la reacción de PCR.

Existen diversas publicaciones donde se utiliza el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO para clonación, por lo que consideramos que el sistema que utiliza el vector para clonar el DNA es eficiente., Este sistema utiliza la propiedad de la Topoisomerasa I del virus de *Vaccinia* para unir el DNA., Este sistema tiene la utilidad de no requerir enzimas de restricción y de ligación para la clonación.

Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO, posteriormente se transformaron células *E. coli* DH5 α competentes y se sembraron en placa sólida, para seleccionar posibles candidatos que incorporaron el DNA recombinante con éxito. Las eficiencias de transformación en los diferentes ensayos con distintas mezclas de clonación fueron menores a lo mínimo aceptable, 1×10^{-3} ufc/ μ g de DNA; cabe mencionar que se siguieron las indicaciones del fabricante donde sugería utilizar 5-10 ng de producto de PCR de 2 kb, adicionalmente se ampliaron los tiempos de incubación a 30 min, ya que sugerían 5 min. También se concentró la mezcla de clonación para espatular todo el volumen y así aumentar las eficiencias de transformación; pero nuestros resultados no fueron lo esperado, una limitante es la cantidad de vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO, ya que al tener que realizar 5 construcciones diferentes se tiene que optimizar el uso para las diferentes mezclas de clonación. Por otra parte al utilizar las células *E. coli* competentes (One Shot TOP 10) que contenía el kit del vector pcDNA3.1D/V5.His-TOPO, con el DNA control pUC19, no obtuvimos transformantes; en contraste con las células DH5 α químicamente competentes que se prepararon en el laboratorio, donde obtuvimos eficiencias de

transformación de 1×10^{-6} ufc/ μ g de DNA; por lo que no se descarta que el almacenaje o transporte del kit probablemente fue incorrecto. A pesar de las dificultades se lograron obtener las siguientes transformantes:

pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1, las cuales fueron verificadas por PCR, restricción enzimática y secuenciación.

Se analizaron por secuenciación los extremos del cDNA de las variantes Dp71 (pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1) y de la Dp40 (pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1), con esto se verificó la correcta orientación del DNA de interés en el vector; hacia el extremo 5' se encontró la secuencia complementaria con el sitio de inicio de la traducción y el primer exón de las proteínas Dp71 y Dp40 que corresponde al exón 63 de la distrofina de longitud completa, hasta el exón 67-68. En cuanto al extremo 3', para las Dp71ab, se secuenció parte del exón 75, exón 76, 77 y la secuencia del exón 79 que pertenece al marco de lectura abierto. En la Dp71e identificamos parte del exón 75, el exón 76, 77 y la región "e" que pertenece al intrón 77, para la Dp71 Δ_{78-79} se secuenció parte del exón 75, el exón 76 y 77. Para la Dp40 se observó parte de la secuencia del exón 68, exón 69 y 70, donde las dos últimas bases AC completan el triplete ACG con una base del intrón 70 antes del codón de paro. En cuanto a la cobertura de la lectura de secuenciación, podemos decir que fue buena, ya que se alcanzó un 50 % o más para las isoformas Dp71, mientras que para la Dp40 fue posible leer un 90 %, esta última (pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1) mostró cambios hacia el extremo 5' en el exón 65 respecto a la secuencia de Tinsley, cuyo origen es de rata, pero no específica de que tejido. Nuestra secuencia se obtuvo a partir de la línea celular PC12, derivada de un feocromocitoma de medula adrenal de rata; aunque estos cambios han sido encontrados en trabajos previos (Santos-Coy, 2008) lo que sugeriría que en la línea celular PC12 la secuencia de la Dp40 incluye estos cambios o que son generados por la Taq polimerasa. Además el alineamiento de pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1 con la secuencia de la Dp71 no

exhibe cambios (fig. 28 y 29) y dado que la Dp40 comparte los exones 63-70 con la Dp71, definimos que la secuencia es correcta; aunque posteriormente sería necesario secuenciar en doble cadena y la longitud completa de la secuencia codificante de cada isoforma Dp71 y de la Dp40, para descartar cambios hacia la parte central y para verificar nuevamente los extremos.

Considerando todo lo anterior, se determinó que las construcciones pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71 Δ 4.1 y de la Dp40 (pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1) son correctas y se verificó la identidad de la secuencia codificante de la Dp71 variantes ab, e, Δ_{78-79} y de la Dp40. Estas construcciones van a ser utilizadas en estudios posteriores, en los que se tendrá la oportunidad de evaluar la localización de las isoformas con diferentes epítopes localizados en el extremo amino y/o carboxilo y así descartar, la posibilidad de que la localización subcelular de las proteínas sea un artefacto generado por la bandera añadida.

VI. CONCLUSIONES

- Se construyeron los vectores recombinantes pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 3, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71ab 4, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71e 4.8, pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp71Δ 4.1 y pcDNA3.1D/V5.His-TOPO/rDp40 1.1, los cuales contienen las secuencias de las isoformas de Dp71 y Dp40 fusionadas a la bandera V5.
- Cada vector recombinante se caracterizó por PCR, restricción enzimática y secuenciación y se determinó que contienen la secuencia de cDNA de las proteínas Dp71ab, Dp71e, Dp71Δ y Dp40 respectivamente.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abbs S. and Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene. *J Medical Genetics* 29: 194-196. 1993.

Acosta R., Montanez C., Fuentes-Mera L., Gonzalez E., Gomez P., Quintero-Mora L., Dominique M., Alvarez-Salas L. and Cisneros B. Dystrophin 71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research* 296: 265-275. 2004.

Ahn A. and Kunkel L. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nature genetics* 3: 283-290. 1993.

Ahn A. and Kunkel L. Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 128: 363-371. 1995.

Ahn A., Freener C., Gussoni E., Yoshida M., Ozawa E. and Kunkel L. The three human syntrophin genes are expressed in diversified tissues, have distinct chromosomal locations and each bind to dystrophin and its relatives. *The JBC*. 271: 2724-2730. 1996.

Aleman V., Osorio B., Chavez O., Rendon A., Mornet D and Martinez Dalila. Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol* 115: 243-254. 2001.

Ambrose H., Blake D., Nawrotzki R. and Davies K. Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics* 39 (3): 359-69. 1997.

Anderson J., Rogers R. and Jarrett H. Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 271: 6605–6610. 1996.

Aragón J. Participación de la distrofina Dp71 Δ_{78-79} en la estimulación de la diferenciación neural de las células PC12. Tesis de doctorado. Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN. 2011.

Aragon J., Romo-Yanez J., Martinez-Herrera A., Ceja V., Rendon A. and Montanez C. Characterization of Dp71 Δ_{78-79} , a novel dystrophin mutant that stimulates PC12 cell differentiation. *J Neurochem* 119: 697–707. 2011.

Austin R., Howard P., DiSouza V., Klamut H. and Ray P. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Human Mol. Genetics*. 4: 1475-1483. 1995

Blake D., Weir A., Newey S. and Davies K. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82: 291-329. 2002.

Brenman J., Chao D., Gee S., Mc Gee A., Craven S., Santillano D., Wu Z., Huang F., Xia H., Peters M., Froenner S. and Brecht D. Interaction of nitric-oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha-1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84: 757-767. 1996.

Bresolin N., Castelli E., Comi G., Felisari G., Bardoni A., Perani D., Gras F., Turconi A., Mazzucheli F. And Gallot D. Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular disorders*. 4: 359-369. 1994.

Bushby K. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet* 8: 1875–1882. 1999.

Byers T., Lidov H. and Kunkel L. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet* 4: 77-81. 1993.

Calderilla-Barbosa L., Ortega A. and Cisneros B. Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells. *J Neurochem* 98: 713–722. 2006

Campbell K. Three Muscular Dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80 (5): 675-679. 1995.

Chan Y., Bonnemann C., Lidov H. and Kunkel L. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 143: 2033–2044. 1998.

Cohen C. and Parry D. α -Helical coiled coils: more facts and better predictions. *Science* 263, 488–489. 1994.

Cox G., Sunada Y., Campbell K. and Chamberlain J. Dp71 can restore the dystrophin-associated glycoprotein complex in muscle but fails to prevent dystrophy. *Nature genetics* 8: 333-339. 1994.

Crawford G., Faulkner J., Crosbie R., Campbell K., Froehner S. and Chamberlain J. Assembly of the Dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J of Cell Biology* 150: 1399-1409. 2000.

Crosbie R., Heighway J., Venzke D., Lee J. and Campbell K. Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272: 31221–31224. 1997.

Culligan K. and Ohlendieck K. Diversity of the brain Dystrophin-glycoprotein complex. *Journal biomed Biotech* 2: 31-36. 2002.

Durbeej M., Jung D., Hjalt T., Campbell K. and Ekblom P. Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol* 181: 156–167. 1997.

Ehmsen J., Poon E. and Davies K. The dystrophin-associated protein complex. *J of Cell Science* 115: 2801-2803. 2002.

Emery A. Duchenne muscular dystrophy. Oxford University Press, Oxford. 1987.

Emery A. Duchenne muscular dystrophy-Meryon's disease. *Neuromuscul Disord.* 3 (4): 263-6. 1993.

Ervasti J., Ohlendieck K., Kahl S., Gaver M. and Campbell K. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345: 315–319. 1990.

Ervasti J. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1772: 108-117. 2006.

Fabrizio E., Nudel U., Hugon G., Robert A., Pons F. and Mornet D. Characterization and localization of a 77 kDa protein related to the dystrophin gene family. *Biochem J* 299: 359–365. 1994.

Fort P., Estrada FJ., Bordais A., Mornet D., Sahel JA., Picaud S., Vargas HR., Coral-Vazquez RM. and Rendon A. The sarcoglycan-sarcospan complex localization in mouse retina is independent from dystrophins. *Neurosci Res* 53 (1): 25-33. 2005.

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

Gonzalez E., Montanez C., Ray P., Howard P., Garcia-Sierra F., Mornet D. and Cisneros B. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS letters* 482: 209-214. 2000.

Hemmings L., Kuhlman P. and Critchley D. Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *J. Cell Biol* 116: 1369-1380. 1992.

Henry M. and Campbell K. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11: 602–607. 1999.

Hoffman E., Brown R. and Kunkel L. Dystrophin: The protein product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus. *Cell Press*. 51: 919-928. 1987.

Ibraghimov-Beskrouvnaga O., Evarst J., Laveille C., Slaughter C., Sernett S. and Campbell K. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355: 696-702. 1992.

Imamura M., Araishi K., Noguchi S. and Ozawa E. A sarcoglycan–dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum. Mol. Genet.* 9: 3091–3100. 2000.

Jung D., Yang B., Meyer J., Chamberlain J. and Campbell K., Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on β -dystroglycan. *J. Biol. Chem* 270: 27305-27310. 1995.

Kachinsky A., Froehner S. and Milgram S. A PDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 145: 391-402, 1999.

Kramarcy NR., Vidal A., Froehner SC. and Sealock R. Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J. Biol. Chem* 269: 2870-2876. 1994.

Koenig M., Hoffman E., Bertelson C., Monaco E., Feener C. and Kunkel L. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA a preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50: 509-517. 1987.

Lara-Chacon B., de Leon MB., Leocadio D., Gomez P., Fuentes-Mera L., Martinez-Vieyra I., Ortega A., Jans DA. and Cisneros B. Characterization of an Importin alpha/beta-recognized nuclear localization signal in beta-dystroglycan. *J Cell Biochem* 110(3): 706–717. 2010.

Lederfein D., Levy Z., Augier N., Mornet D., Morris G., Fuchs O., Yaffe D. and Nudel U. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15; 89 (12): 5346-50. 1992.

Lederfein D., Levy Z., Augier N., Mornet D., Morris G., Fuchs O., Yaffe D. and Nudel U. A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum. Mol. Genet* 2: 1883-1888. 1993.

Marquez F., Cisneros B., Garcia F., Ceja V., Velasquez F., Depardon F. Cervantes A., Rendon A., Mornet D., Rosas-Vargas H., Mustre M. and Montanez C. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 118: 957-966. 2003.

Martínez Herrera A. Localización celular de las isoformas rDp71a y rDp71c en células PC12. Tesis de maestría. Departamento de Genética y Biología Molecular. CINVESTAV-IPN. 2004.

Moizard MP., Toutain A., Fournier D., Berret F., Raynaud M., Billard C., et al. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet* 8: 552–556. 2000.

Nawrotzki R., Loh N., Ruegg M., Davies K. and Blake D. Characterization of alpha-dystrobrevin in muscle. *J Cell Sci* 111: 2595–2605. 1998.

Nishio H., Takeshima Y., Narita N., Yanagawa H., Suzuki Y., Ishikawa Y., Ishikawa Y., Minami R. and Matsuo M. Identification a novel fist exon in the human dystrophin gene and of a new promoter located more than 500 kb upstream of the nearest known promoter. *J Clin. Invest* 94: 1037-1042. 1994.

Oudet C., Hanaver A., Clemens P., Caskey T. and Mendell J. Two hotspots of recombination in the DMD gene correlate with deletion prone regions. *Human Molecular Genetics* 1:599-603. 1992.

O'Brien K. and Kunkel L. Dystrophin and Muscular Dystrophy: Past, Present, and Future. *Molecular Genetics and Metabolism* 74: 75–88. 2001.

Peters M., O'Brien K., Sadoulet-Puccio H., Kunkel L., Adams M. and Froehner S. beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning and protein associations. *J Biol Chem* 272: 31561-31569. 1997.

Petrof B., Shrager J., Stedman H., Kelly A. and Sweeney H. Dystrophins protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Nat Acad Sci USA* 90: 3710-3714. 1993.

Rando T. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24: 1575-1594. 2001.

Rapaport D., Lederfein D., den Dunnen J., Grootsholten P., Van Ommen G., Fuchs O., Nudel U. and Yaffe D. Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation* 49 (3): 187-93. 1992.

Rapaport D., Greenberg Ds., Tal M., Yaffe D. and Nudel U. Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. *FEBS Lett.* 328 (1-2): 197-202. 1993.

Rentschler S., Linn H., Deininger K., Bedford M., Espanel X. and Sudol M. The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* 380: 431–442. 1999.

Roberts R. Dystrophins and Dystrobrevins. *Genome Biol* 2: 1-7. 2001.

Romo-Yanez J., Ceja V., Illaraza-Lomeli R., Coral-Vazquez R., Velazquez F., Mornet D., Rendon A. and Montanez C. Dp71ab/DAPs complex composition changes during the differentiation process in PC12 cells. *J Cell Biochem* 102(1): 82–97. 2007.

Rosas-Vargas H., Montanez C., Redon A., Mornet D., García F. and Cisneros B. Expression and localization of utrophin in differentiating PC12 cells. *Neuroreport* 11: 1–5. 2000.

Saint Martin A., Aragon J., Depardon-Benitez F., Sanchez-Trujillo A., Mendoza-Hernandez G., Ceja V. and Montanez C. Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. *FEBS J* 1:12. 2011.

Santos Coy A. Caracterización parcial de la proteína apo-distrofina 3 o Dp40 en la línea celular PC12. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.

Santos Coy A. Distribución de la distrofina Dp40 en células PC12. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN. 2008.

Sene A., Tadayoni R., Pannicke T., Wurm A., El Mathari B., Benard R., Roux MJ., Yaffe D., Mornet D., Reichenbach A., Sahel JA. and Rendon A. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PLoS One* 4(10): 7329. 2009.

Sitnik R., Campiotto S., Vainzof M., Pavanello R., Takata R., and Passos-Bueno M. Novel points in the dystrophin gene. *Hum Mutat* 10 (3): 217-22. 1997.

Song K., Schere P., Tang, Z., Okamoto T., Li S., Chafel, M., Chu C., Kohtz D. and Lisanti MP. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem* 271: 15160–15165. 1996.

Tadayoni R., Rendon A., Soria-Jasso LE. and Cisneros B. Dystrophin Dp71: The smallest but multifunctional product of the Duchenne Muscular Dystrophy gene. *Mol Neurobiol.* 2011.

Tinsley J.M., Blake D., Zuelig R. and Davies K. Apo-dystrophin-3: a 2.2 transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet.* 2:521-524. 1993.

Villarreal-Silva M., Suarez-Sanchez R., Rodriguez-Munoz R., Mornet D. and Cisneros B. Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochem Res* 35(3): 366–373. 2010.

Wilson J., Putt W., Jimenez C. and Edwards YH. Up71 and Up140, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1271–1278. 1999.

Yang B., Jung D., Motto D., Meyer J., Koretzky G. and Campbell K. Sh3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J. Biol Chem* 270: 11711–11714. 1995.

Yoshida M., Susuki A., Yamamoto H., Noguchi S., Mizuno Y. and Ozawa E. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by *n*-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* 222: 1055-1061. 1994.