



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: NATALIE RAQUEL SANTAMARIA GUAYASAMIN

**TEMA: “ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN
NUCLEAR DE LA A-DISTROBREVINA EN LAS CÉLULAS
NEURONALES N1E115”**

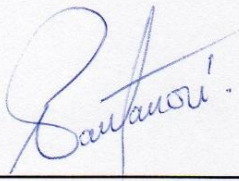
DIRECTOR: DRA. THELVIA RAMOS GOMEZ.

CODIRECTOR: DR. BULMARO CISNEROS VEGA.

SANGOLQUÍ, ABRIL 2015

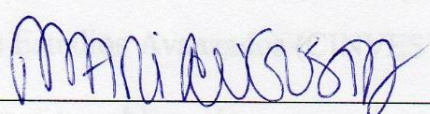
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:



Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

COORDINADORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA



Dra. María Augusta Chávez

Lugar y fecha: Sangolquí, 28 de Abril 2015

CERTIFICADO

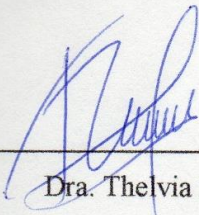
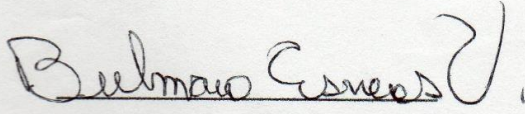
Dra. Thelvia I. Ramos, MSc. y Dr. Bulmaro Cisneros Vega certifican:

Que el trabajo titulado “**Análisis de la distribución y función nuclear de la α -Distrobrevina en las células neuronales N1E115**” realizado por la Srta. Natalie Raquel Santamaría Guayasamín, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas y financiada por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), se deja en libertad del autor y del CINVESTAV, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto, el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a Natalie Raquel Santamaría Guayasamín que lo entregue a Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, Abril 2015

 Dra. Thelvia Ramos	 Dr. Bulmaro Cisneros Vega
DIRECTOR	CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

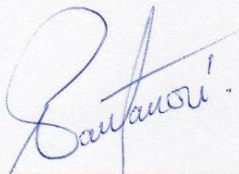
DECLARO QUE:

El proyecto de grado denominado **Análisis de la distribución y función nuclear de la α -Distrobrevina en las células neuronales N1E115**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan en el cuerpo de la tesis cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consecuentemente este trabajo es mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Abril 2015




Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

AUTORIZACIÓN

Yo, Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

No autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE la publicación del presente trabajo denominado **Análisis de la distribución y función nuclear de la α -Distrobrevina en las células neuronales N1E115** en la biblioteca virtual de la Institución, debido a que este trabajo investigativo es propiedad del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Sangolquí, Abril 2015



Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

DEDICATORIA

A mi madre, Morayma. Porque tus consejos y enseñanzas son el pilar fundamental para que alcance mis sueños. Te amo mamá.

A mi padre, Gustavo. Porque tu tenacidad y confianza me inspiran cada día a ser una mejor persona. Eres el mejor papá del mundo.

A mi hermano, Alejandro. Porque tu cariño y ocurrencias alegran cada uno de mis días. No te cambio por ningún otro hermano en el mundo.

Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Bulmaro Cisneros, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y permitirme conocer y disfrutar de la vida en el mundo de la investigación.

A la Dra. Thelvia Ramos, por siempre estar dispuesta a ayudarme y brindar su tiempo para cumplir esta meta. Gracias por sus consejos.

A mis padres, su apoyo incondicional me ha levantado y enseñado que ningún sueño es demasiado grande. Mamá gracias por luchar cada día, por ser mi amiga y demostrarme que el amor de una madre puede superar todos los obstáculos. Papá, me has convertido en una gran persona. Gracias por tu cariño, mimos y consejos para la niña de tus ojos.

A mi hermano Alejandro, por confiar y cuidar siempre de mí. Siempre serás mi pequeño.

A mis abuelos por su amor y cariño único. Su apoyo a lo largo de toda mi vida ha sido fundamental.

A toda mi familia, por su soporte y amor.

A mis grandes amigos: Emilia, por ser más que amiga, una hermana. Paúl, Carlos y Estefanía gracias por sus consejos, ayuda y amistad durante tantos años.

A los chicos competencias, por que hicieron de la vida universitaria una experiencia inolvidable.

A mis compañeros de laboratorio: Juan de Dios, Nelly, Elizabeth, Gris, Viri, Marco, José, Wendy, Chio y Pablo. Por las vivencias, ocurrencias, enseñanzas y cariño que me brindaron. A Ricardo, por tu amistad, paciencia, apoyo, confianza y enseñanzas. Todos hicieron de mi estadía una de las mejores experiencias de mi vida.

A Ruth, Ari, Pau, Kike, Sandy, Alex, Mauricio y Salma por su amistad, risas, afecto y momentos maravillosos. Los llevaré siempre en mi corazón.

Antonio, Mar, Eli y a toda su familia. Por confiar en una completa extraña y brindarme aliento, cariño y apoyo. No sé qué habría hecho sin su ayuda.

A Dios, por permitirme cumplir mis sueños y metas y compartir grandes experiencias con tantas personas maravillosas.

Natalie Raquel Santamaría Guayasamín

CONTENIDO

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICADO.....	iii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iv
AUTORIZACIÓN	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
CONTENIDO.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT	xix
1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del Problema	1
1.2 Justificación.....	3
1.3 Objetivos de la Investigación	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos Particulares.....	5
1.4 Marco Teórico	5
1.4.1 Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC).....	5
1.4.2 La familia de las Distrobrevinas.....	6
1.4.2.1 La familia de la α -Distrobrevina.....	7
1.4.2.1.1 La α -Distrobrevina 1	9
1.4.2.1.2 La α -Distrobrevina 2	10

	x
1.4.2.1.2.1 La α -Distrobrevina 2A.....	10
1.4.2.1.2.2 La α -Distrobrevina 2B.....	11
1.4.2.1.3 Las α -Distrobrevinas 3 y 4	11
1.4.2.2 La β -Distrobrevina.....	12
1.4.3 El núcleo.....	12
1.4.3.1 Cuerpos nucleares.....	13
1.4.3.1.1 El nucléolo.....	13
1.4.3.1.1.1 Proteínas Nucleolares	14
1.4.3.1.1.1.1 Nopp 140	16
1.4.3.1.1.1.2 B23/nucleofosmina.....	16
1.4.3.1.2 Los cuerpos de Cajal	16
1.4.3.1.2.1 Coilina	17
1.5 Hipótesis	17
2. CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	18
2.1 Participantes	18
2.2 Zona de estudio.....	18
2.3 Período de Investigación	18
2.4 Modelo de estudio	18
2.5 Cultivo celular	18
2.6 Extracción de RNA.....	19
2.7 Análisis de integridad de RNA.....	19
2.8 Síntesis de cDNA	19
2.9 Amplificación de isoformas de α -DB mediante PCR punto final.....	19
2.10 Secuenciación de amplificadoss.....	20
2.11 PCR-Tiempo real para isoformas de α -DB.	20
2.13 Detección por inmunofluorescencia indirecta.....	21
2.14 Aislamiento de DNA de plásmido.....	22

	xi
2.14.1 Transformación bacteriana	22
2.14.2 Obtención de DNA plasmídico a mediana escala (Miniprep y Midiprep)	22
2.15 Transfección	22
2.16 Inmunodetección en fase sólida.....	22
2.16.1 Extracción de proteínas totales	22
2.16.2 Cuantificación de Proteínas	23
2.16.3 Electroforesis e inmunodetección de proteínas en fase sólida	23
2.16.4 Densitometrías	24
2.17 Análisis estadísticos.....	25
3. CAPITULO IV: RESULTADOS	26
3.1 Identificación de las isoformas de la α -DB que se expresan en las células N1E115.	26
3.2 Distribución subcelular de la α -DB en las células N1E115.	32
3.3 Identificación de la función de la α -DB en el nucléolo y los cuerpos de Cajal.	33
4. CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	37
5. CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES.....	40
6. CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	41
7. CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Anticuerpos primarios utilizados en el trabajo.	24
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Esquema del Complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina (DAPC).....	6
Figura2. Representación esquemática de la familia de las distrobrevinas y sus dominios proteínicos.	8
Figura3. Organización genómica del gen DTNA.	9
Figura4. Representación esquemática de las isoformas de la α -DB2..	11
Figura5. Diagrama esquemático de la arquitectura nuclear.....	13
Figura6. Modelo de la biogénesis ribosomal..	15
Figura7. Diagrama del nucléolo y de diferentes proteínas nucleolares.	14
Figura8. Expresión de la α -DB en las células N1E115.....	27
Figura9. Amplificaciones mediante PCR punto final de los RNAs mensajeros de α -DB2A y α -DB2B.....	28
Figura10. Expresión de los RNAs mensajeros de α -DB2A y α -DB2B en cerebro de ratón.....	29
Figura11. Corrimiento electroforético del RNA total.....	30
Figura12. Curvas de disociación de los productos de amplificación de los RNA mensajeros de GAPDH, α -DB2A y α -DB2B en las células N1E115.....	31
Figura13. Gráficos de los productos de amplificación de los RNA mensajeros de α -DB2A en cerebro de ratón y en las células N1E115.....	31
Figura14. Localización de α DB2 en las células N1E115.....	32
Figura15. Colocalización de α DB2 con marcadores nucleolares y de cuerpos de Cajal en las células N1E115.....	33
Figura16. Disminución de los niveles de α -DB2 mediante el empleo de un RNAi. .	35
Figura17. Cuerpos de Cajal presente en las células N1E115 que expresan un RNAi contra la α -DB2 o un RNAi control.	36

LISTADO DE ABREVIATURAS

3'-UTR: Región no traducida 3'.

5'-UTR: Región no traducida 5'.

AChR: Receptor Acetil Colina.

C2C12: Línea celular inmortalizada de mioblastos de ratón.

cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario. DNA de doble cadena sintetizado a partir de una cadena de RNA mensajero maduro.

Ct: Cycle threshold. Es la intersección entre la curva de amplificación y la línea base.

DAPC: Complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DFC: Componente Fibrilar Denso del nucléolo.

DMD: Distrofia Muscular de Duchenne.

DNA: Ácido Desoxirribonucleico.

DTNA: Gen de la distrobrevina alfa.

DTNB: Gen de la distrobrevina beta.

FC: Componente Fibrilar del nucléolo.

GC: Componente Granular del nucléolo.

HeLa: Línea celular de carcinoma epitelial de cérvix.

kDa: Kilo Dalton.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.

N1E115: Línea celular inmortalizada de neuroblastos de ratón.

NCVII: Enfermedad de la no compactación del ventrículo Izquierdo 1.

NMJ: Unión neuromuscular.

nNOS: Óxido Nítrico Sintetasa neuronal.

Nopp140: proteína chaperona nucleolar.

NOS: Óxido Nítrico Sintetasa.

Pb: Pares de bases.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

PC12: células de feocromocitoma de la glándula suprarrenal.

PCR punto final: Reacción en cadena de la polimerasa convencional.

PCR tiempo real: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

PFA: Paraformaldehído.

PMSF: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.

qPCR: PCR en tiempo real

rDNA: Ácido Desoxirribonucleico ribosomal.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNAi: Ácido ribonucleico interferente.

RNApolI: Polimerasa de RNA tipo I

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Retro-Transcripción.

Scrambled: RNA interferente control.

SDS-PAGE/WB: Método de transferencia de proteínas Western Blot empleando desnaturalización con SDS.

SFB: Suero Fetal Bovino

siRNA: Ácido ribonucleico de silenciamiento.

SMN1: Proteína de supervivencia neuronal 1.

snRNA: RNA pequeño nuclear.

snRNPs: Ribonucleoproteínas pequeñas nucleares.

sRNAs: RNAs pequeño.

Tm: Temperatura de melting.

Top 10: cepa de bacterias químicamente competentes *E.coli*.

U: unidad de actividad enzimática.

Vr1, Vr2 y Vr3: Regiones de splicing variable dentro del gen DTNA.

α -DB: alfa distrobrevina.

α -DB1: alfa distrobrevina completa.

α -DB2: alfa distrobrevina primera isoforma truncada.

α -DB2A: alfa distrobrevina primera isoforma truncada A.

α -DB2B: alfa distrobrevina primera isoforma truncada B.

RESUMEN

La α -Distrobrevina (α -DB) es una proteína perteneciente al complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC) que se localiza en la membrana plasmática, cuya alteración se ha visto que provoca enfermedades degenerativas que afectan a músculo esquelético, cardíaco y sistema nervioso. Estudios previos de nuestro grupo de investigación revelaron que la α -DB se localiza en el núcleo de varias líneas celulares (Hela, C2C12 y PC12) e interactúa con proteínas de la membrana nuclear; lo que sugiere que esta proteína participa también en funciones nucleares no determinadas aún. En este trabajo, se demuestra que la isoforma presente en las células N1E115 es la α -DB2, la cual se distribuye tanto en el citoplasma como en el núcleo, colocalizando con proteínas marcadoras de nucléolo (Nopp140 y B23) y de cuerpos de Cajal (coilina). Ensayos empleando un RNAi dirigido contra el RNA mensajero de la α -DB, mostraron reducción en la expresión de Nopp140 y la aparente reducción del número de los cuerpos de Cajal, sin afectar los niveles de coilina. Los datos obtenidos sugieren que la α -DB2 al localizarse en el nucléolo se encuentra relacionada con actividades y funciones estructurales que dirige la proteína B23 en este compartimento nuclear, por lo que su deficiencia altera rutas en las que se encuentra implicada la proteína Nopp140 y los cuerpos de Cajal.

Palabras clave: **α -DISTROBREVINA, CÉLULAS NEURONALES N1E115, NUCLÉOLO, NOPP140, B23, CUERPOS DE CAJAL, COILINA.**

ABSTRACT

α -dystrobrevin (α -DB) is a protein that belongs to the dystrophin associated protein complex (DAPC) which is located in the plasma membrane, whose alteration has been shown to provoke degenerative diseases that affect the skeletal muscle, the heart and the nervous system. Studies prior to our investigation revealed that the α -DB is located in the nucleus of various cell lines (HeLa, C2C12 y PC12) and interacts with the proteins of the nuclear membrane, suggesting that this protein also participates in nuclear functions that have yet to be determined. In this work we demonstrate that the isoform present in the cells N1E115 is the α -DB2, which is distributed both in the cytoplasm and the nucleus, co-localizes with the marker proteins of the nucleolus (Nopp140 and B23) and of Cajal bodies (coilin). Trials using RNAi directed against the RNA messenger of the α -DB, showed a decrease in the expression of Nopp140 and the apparent reduction of the number of Cajal bodies, without affecting the levels of coilin. The data suggests that when α -DB2 is present in the nucleolus it is found to be related to structural activities and functions which in this nuclear compartment are controlled by the protein B23, because its deficiency alters the routes involving the protein Nopp140 and the Cajal bodies.

Key words: **α -DISTROBREVIN, NEURONAL CELLS N1E115, NUCLEOLUS, NOPP140, B23, CAJAL BODIES, COILIN**

1. CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

El complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC) es una red de proteínas transmembranales y citoplasmáticas que permiten la unión de la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina, brindando soporte estructural y modulando la señalización de la membrana plasmática de las células musculares (Haenggi & Fritschy, 2006).

El DAPC posee una complejidad considerable, que se atribuye a la variable funcionalidad de las proteínas que lo forman (Rees, et al., 2007). La distrofina es la principal proteína dentro de este complejo, por lo que se ha visto que su alteración provoca la aparición de distrofias musculares, enfermedades que poseen una gran variedad de fenotipos clínicos y que se caracterizan por el debilitamiento progresivo de los músculos esqueléticos y cardíaco, degeneración del sistema nervioso y eventual muerte, presentándose con una incidencia mundial de 1 caso por cada 4000 nacidos vivos (Albrecht & Froehner, 2004; Reyes, 2013).

La distrobrevina (DB) al ser una proteína que forma parte de este complejo se ha visto involucrada de forma interesante con la aparición de este tipo de enfermedades. En el año de 1999 se realizó un análisis de la posible función de la DB en la distrofia muscular, en el cual se utilizaron ratones *knock out* para el gen de la α -DB (*adbm -/-*), la utrofina (*utrn -/-*) y la distrofina (*mdx*). En este estudio se logró determinar que a pesar de la ausencia de la α -DB, los ratones presentaron solamente una afección muscular leve, en comparación con los ratones *mdx* que presentan una mutación en el gen de la distrofina. Debido a esto, se realizó una triple comparación entre ratones *mdx*; *utrn -/-*, triples mutantes (*mdx*, *utrn -/-*, *adbm -/-*) y *mdx*; *adbm -/-*. Bajo este análisis se determinó que la α -DB no es esencial para la estructura del DAPC, y que su función está relacionada con la señalización celular (Grady et al., 1999); lo que apoya la hipótesis de que su papel en la célula muscular es similar al de la desmina, proteína del filamento intermedio cuya función está ligada al mantenimiento del aparato contráctil y la unión de láminas nucleares con estructuras citoplasmáticas en células musculares (Paulin & Li, 2004; Schreiber & Kennedy, 2013).

Hoshino et. al., reportó que en el proceso de regeneración de las células musculares afectadas por el veneno de la cobra, la producción de α -DB se realiza independientemente de la distrofina. En este estudio de 28 días de duración, se encontró a través de análisis de Western Blot de muestras de músculo tibial anterior de ratones que la α -DB es perceptible hasta después de los 5 días, mientras que la distrofina es detectada desde los 3 días de regeneración. Los picos de expresión máxima de cada una de estas proteínas se presentan en un diferente día del ciclo de regeneración, por lo que se piensa que cada proteína tiene una función diferente dentro de la célula muscular (Hoshino, et al., 2002).

Se ha encontrado una sola afección relacionada con el gen codificante de la distrobrevina, un daño en la no compactación del ventrículo izquierdo 1 (NCVI1), enfermedad causada por una alteración en la morfogénesis del miocardio: esta patología se caracteriza por presentar un ventrículo izquierdo hipertrófico con profundas trabeculaciones y pobre función sistólica (Ichida et al., 2001). La incidencia mundial de esta enfermedad es del 0.05%, con mayor ocurrencia en niños, constituyendo el 10% de los casos de cardiopatías pediátricas detectadas (Ganame, et al., 2006).

Estudios previos de nuestro grupo de investigación revelaron que la α -DB se localiza en el núcleo de varias líneas celulares, Hela, C2C12, NB4 y HL-60 (Fuentes-Mera et al., 2006; Gonzalez-Ramirez, et al., 2008; Kulyte et al., 2002; Villarreal-Silva, et al., 2010), lo que sugiere que esta proteína también participa en funciones nucleares no determinadas aún.

Así mismo, se estableció que el dominio ZZ de la α -DB funciona como señal de localización nuclear, la cual es reconocida por las importinas α 2/ β 1 para dirigir su importe nuclear. Además, la α -DB interactúa directamente con proteínas de la lámina nuclear para mantener la morfología nuclear (Aguilar et al., 2015).

Por otro lado, mediante ensayos de Western Blot utilizando una fracción de nucléolos de las células neuronales N1E115 se detectó la presencia de la α -DB2 en este compartimento nuclear (Hernández-Ibarra et al. datos bajo revisión). La α -DB2 es una isoforma de *splicing* alternativo de la α -DB (Pawlikowski & Maimone, 2008).

Por lo que es necesario analizar en detalle la localización nuclear de la α -DB2 y determinar su función en el núcleo de las células neuronales N1E115.

1.2 Justificación

La α -DB es una proteína perteneciente al complejo DAPC (Grady et al., 1999). El funcionamiento de este complejo está ligado directamente con la contracción y relajación de las células musculares, por lo que alteraciones en las proteínas que lo conforman producen diferentes tipos de distrofias musculares (Benson, et al., 2001).

Estudios previos han determinado que la función de la α -DB dentro del complejo DAPC se encuentra principalmente ligada con procesos de señalización y no con el soporte estructural del sarcolema (Hoshino et al., 2002), ya que la disminución o ausencia de esta proteína provoca solo una distrofia ligera en un modelo murino (Wallace & McNally, 2009). Probablemente la utrofina, proteína estructuralmente similar a distrofina, contrarreste la ausencia de la α -DB, manteniendo una estructura de membrana funcional (Grady et al., 1999).

Además de formar el complejo DAPC, la α -DB puede poseer otro tipo de actividades dentro de la célula muscular. Algunos trabajos sugieren que puede estar ligada a la producción de GMP y la función de la NOS (óxido nítrico sintetasa) o también podría participar en procesos nucleares, dada su localización en este organelo (Hoshino et al., 2002; Villarreal-Silva et al., 2010).

Trabajos recientes demostraron que α -DB se encuentra en el núcleo de mioblastos y neuroblastos del ratón (Aguilar et al., 2015; Hernández-Ibarra et al. datos bajo revisión). Mediante proteínas de fusión ligadas al C- terminal y N-terminal de la α -DB1, se logró determinar que el dominio ZZ es el responsable de llevar al núcleo a la proteína; este dominio proteico es compartido por todos los miembros de la familia de las distrobrevinas (Aguilar et al., 2015; Pawlikowski & Maimone, 2008).

Dentro de estos estudios, utilizando extractos nucleolares, se confirmó la presencia de la isoforma de α -DB 2 de aproximadamente 65kDa en este organelo nuclear. Por lo

que se cree podría estar relacionada con proteínas nucleolares como fibrilarina, Nopp140 y B23 (Hernández-Ibarra et al., datos bajo revisión).

Nopp 140 es una chaperona involucrada en procesos del nucléolo y cuerpos de Cajal y se ha observado que alteraciones en sus niveles generan estructuras nucleares irregulares y alteraciones en la transcripción del rDNA (Cui & Dimario, 2007; He & Dimario, 2011; Lee et al., 2014). Por su parte la coilina es una proteína marcadora de cuerpos de Cajal (Hebert, et al., 2001); estos cuerpos nucleares están relacionados con la biogénesis ribosomal y mantenimiento de los telómeros (Sleeman & Trinkle-Mulcahy, 2014). Los cuerpos de Cajal interactúan con el nucléolo mediante el tránsito de moléculas entre ambos compartimentos, incluyendo Nopp140, NAP57 y fibrilarina (Isaac, et al., 1998).

El nucléolo tiene como función principal la biogénesis ribosomal, pero recientemente se le ha atribuido su participación en el exporte nuclear, secuestro regulatorio de moléculas, modificación de sRNAs y control del envejecimiento (Boisvert, et al., 2007; Olson, et al., 2002). Se han identificado varios desordenes genéticos relacionados con proteínas nucleolares como son el Síndrome de Werner, el Síndrome de Bloom, la Diskeratosi congénita y varios tipos de cáncer. Además las infecciones virales afectan directamente la estructura nucleolar (Boisvert et al., 2007).

Tomando en cuenta todo lo antes mencionado, es importante establecer la relación de la α -DB2 con el nucléolo y los cuerpos de Cajal; ya que esto permitirá entender cuál es la función nuclear que desempeña esta proteína. El presente estudio ayudará a definir la función nuclear de la α -DB y su potencial relación con afecciones genéticas que afectan la estructura del núcleo/nuéclolo.

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Analizar la distribución y función nuclear de la α -Distrobrevina en las células neuronales N1E115.

1.3.2 Objetivos Particulares

- Identificar la isoforma de la α -Distrobrevina que se encuentra presente en las células N1E115.
- Analizar la distribución subcelular de la α -Distrobrevina en las células N1E115.
- Identificar la función de la α -Distrobrevina en el nucléolo y los cuerpos de Cajal.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC)

En la membrana del músculo esquelético y cardíaco de varias especies fue encontrado el Complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC) (Campbell & Kahl, 1989). La distrofina es el principal componente de esta agrupación, la cual se encuentra formando una elaborada red de glicoproteínas transmembranales y citoplasmáticas (Ambrose, et al., 1997; Ervasti & Campbell, 1991).

El DAPC desempeña un rol estructural en la unión del citoesqueleto de actina con la matriz extracelular, la estabilización del sarcolema durante los ciclos de relajación y la contracción y transmisión de fuerza generada en los sarcómeros (Nigro & Piluso, 2014). También existe evidencia que el DAPC está involucrado en la señalización celular a través de sus interacciones con la calmodulina, Grb2 y nNOS (Ehmsen, et al., 2002; Hoshino et al., 2002).

Este conjunto se encuentra estructuralmente organizado en tres subcomplejos proteínicos: el complejo distroglicano (α y β distroglicano) que se une a actina mediante su dominio WW, el complejo de proteínas transmembrana sarcoglicano/sarcospán (α , β , γ , δ sarcoglicano y sarcospán) y el complejo de proteínas citoplasmáticas (α , β distrobrevina, distrofina y α , β , γ sintrofinas) (Fuentes-Mera et al., 2006; Mizuno et al., 2001; Navakauskienė et al., 2012) (Figura 1).

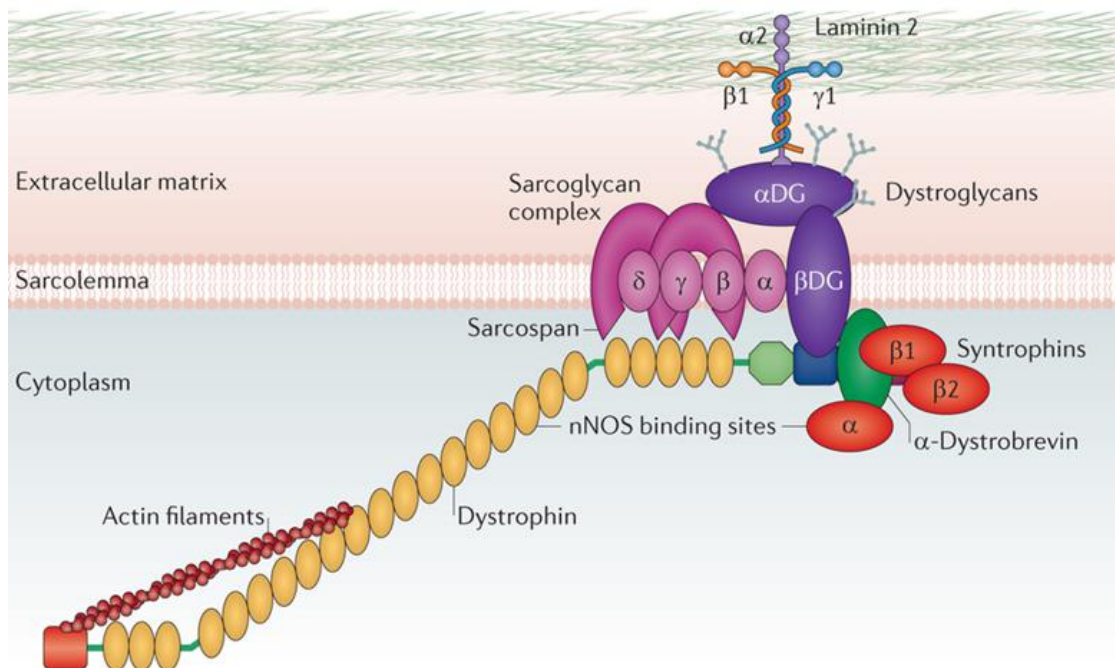


Figura 1. Esquema del Complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina (DAPC). En el gráfico se puede observar los tres subcomplejos que forman el DAPC en el sarcolema. (Fairclough, et al., 2013).

Mutaciones en proteínas que forman el DAPC provoca la inestabilidad del sarcolema, comprometiendo la función muscular y provocando su degeneración (Benson et al., 2001). De estas alteraciones, la más severa es la distrofia muscular de Duchenne (DMD), provocada por defectos en la distrofina (Peters et al., 1997; Rees et al., 2007). Por otro lado, alteraciones en las otras proteínas del complejo provocan ciertas deficiencias o distrofias; como es el caso de las distrobrevinas, cuya modificación se ha visto directamente asociada con una cardiomiopatía (NCVII) (Ervasti & Campbell, 1991).

1.4.2 La familia de las Distrobrevinas

Las distrobrevinas α y β son los ortólogos mamíferos de la proteína de 87kDa encontrada en el pez Torpedo, descrita por primera vez como una proteína relacionada a la distrofina que se asocia con los receptores de acetil colina (AChR); presentes en las membranas postsinápticas del órgano eléctrico del pez Torpedo (Ambrose, et al., 1997; Enigk & Maimone, 1999; Mizuno et al., 2001; Rees et al., 2007). Estas proteínas son producto de la transcripción de los genes DTNA y DTNB respectivamente y

poseen homología con la proteína de 87kDa del pez Torpedo en su secuencia rica en cisteínas y el dominio carboxilo terminal, el cual también es homólogo al dominio CRCT de la distrofina. Con base a lo anterior, se piensa que los dos genes de las distrobrevinas y el gen de la distrofina surgieron a partir de un evento de duplicación de un gen ancestral común (Holzfeind et al., 1999; Rees et al., 2007). (Figura2)

Los genes DTNA y DTNB producen proteínas con secuencias nucleotídicas diferentes, pero con organización proteínica similar, ya que presentan dominios similares y se relacionan e interactúan con las sintrofinas y el distroglicano en el DAPC (Peters et al., 1997).

Además de su función de andamiaje dentro del DAPC, se cree que las distrobrevinas podrían ser sustrato para la fosforilación de tirosinas o también formar parte de sistemas de señalización intracelular y organización celular, ya que se ha visto que ratones *knock out* para los genes de estas proteínas desarrollan solo una distrofia leve y no presentan alteraciones en el complejo del DAPC. También se ha observado un fenotipo semejante en distrofias con etiología desconocida; al menos un 10% de ellas no muestran alteraciones en las proteínas del complejo DAPC ni en las láminas nucleares pero si muestran alteraciones de uno o más componentes del subcomplejo de las distrobrevinas. Las distrobrevinas interactúan directamente con proteínas adaptadoras para sintrofinas y distrofinas, lo que provee una red de señalización que permite la regulación del óxido nítrico (Benson et al., 2001; Bragg, et al., 2011; Mizuno et al., 2001; Navakauskienė et al., 2012; Rees et al., 2007).

1.4.2.1 La familia de la α -Distrobrevina

Estas proteínas son codificadas por el gen DTNA, el cual se localiza en el cromosoma 18 del ratón y humano. El gen está organizado en 24 exones unidos por medio de intrones, componiendo así un tamaño de ~440Kb. Las regiones codificantes varían en su tamaño entre 9 a 214pb, excepto por los exones 11 y 18, los cuales contienen la región 3'-UTR (Región no traducida 3') para las isoformas 2 y 3 (Ambrose et al., 1997; Benson et al., 2001; Bragg et al., 2011; Rees et al., 2007).

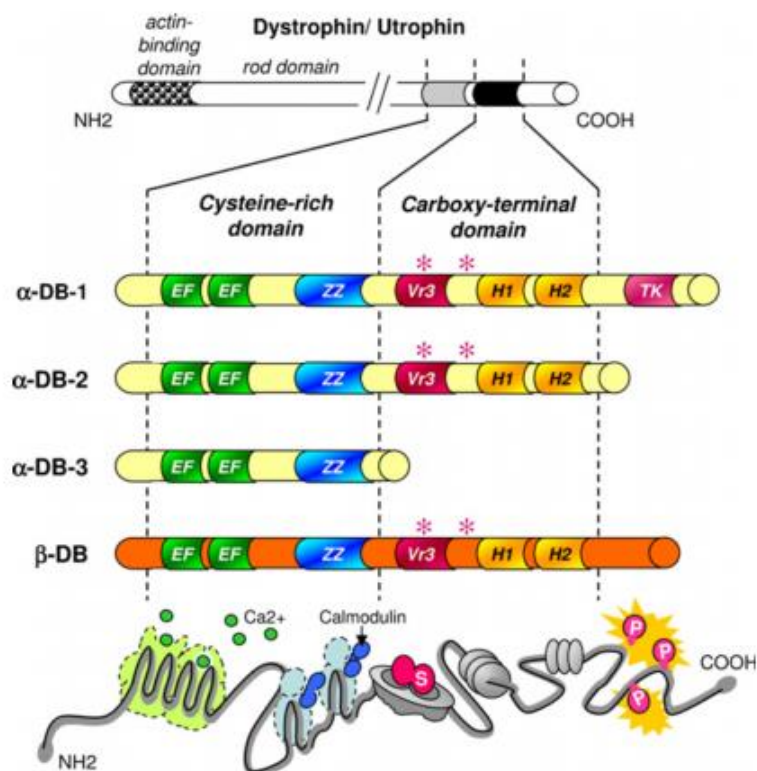


Figura2. Representación esquemática de la familia de las distrobrevinas y sus dominios proteínicos. Se observa la homología de las distrobrevinas con la secuencia rica en cisteínas y el dominio carboxilo terminal de la distrofina y la utrofina. El dominio rico en cisteínas posee dos subdominios; el EF (verde) que comprenden horquillas de α -hélices, y un dominio con dos dedos de zinc ZZ (azul). Dependiendo de la isoforma, el carboxilo terminal presenta regiones α -helicoidales de unión a sintrofinas (asteriscos) y motivos héptada leucino helicoidales que forman la región coiled coil (amarillo). Sólo una isoforma presenta sitio de fosforilación para tirosina (rosado) (Rees et al., 2007).

Las α -DBs se expresan abundantemente en el músculo esquelético y cardíaco, además del cerebro, incluyendo glía y neuronas (Benson et al., 2001; Bragg et al., 2011; Rees et al., 2007).

Existen 5 variantes de la α -DB, cuya principal diferencia radica en el dominio carboxilo terminal. Las isoformas son producidas por 3 promotores independientes y/o por el *splicing* alternativo de los exones 11, 18 y 24. Las regiones que permiten el empalme alterno se denominan Vr1, Vr2, Vr3. Las principales isoformas de esta

proteína son α -DB1, α -DB2 y α -DB3 (Ambrose et al., 1997; Ehmsen et al., 2002; Enigk & Maimone, 1999; Rees et al., 2007). (Figura3)

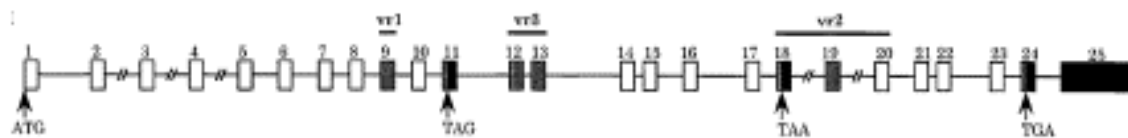


Figura3. Organización genómica del gen DTNA. Los recuadros representan a los exones numerados desde el extremo 5'. Los recuadros negros representan los exones que sufren splicing alternativo. Las flechas indican la metionina inicial en el exón 1 y los codones de paro en los exones 11, 18 y 24. (Ambrose et al., 1997)

La región variable Vr1 está presente en las isoformas encontradas en cerebro, mientras que la presencia de la región variable Vr2 genera dos isoformas adicionales. Finalmente la región Vr3 se encuentra en las isoformas expresadas en el músculo esquelético y cardíaco; la inclusión de esta región forma un puente de 57 aminoácidos extras que une los dominios ZZ y *coiled-coil*. El uso alternativo de múltiples promotores tejido específicos, localizados en la región 5'-UTR (Región no traducida 5') genera mayor variedad de isoformas (Ambrose et al., 1997; Enigk & Maimone, 1999; Holzfeind et al., 1999; Rees et al., 2007).

La función fisiológica de cada isoforma no se conoce: no obstante, es posible que cada isoforma tenga una localización subcelular precisa que defina las tareas que lleva a cabo. Estudios con ratones *knock out* de α -DB, mostraron afecciones leves en el músculo esquelético y cardíaco, pero se observó un desplazamiento de la nNOS desde el sarcolema hacia el sarcoplasma, lo que podría ser debido a la pérdida de la interacción entre la α -DB y sintrofinas. (Davies & Nowak, 2006; Enigk & Maimone, 1999)

1.4.2.1.1 La α -Distrobrevina 1

La proteína murina de ~78kDa tiene un carboxilo terminal único con dos tirosinas que pueden ser fosforiladas. La α -DB1 se expresa eficientemente en la región NMJ del músculo esquelético y en el cerebro en la región perivascular de los astrocitos del

cerebelo. Es posible que la función de la α -DB1 en estas regiones este modulada por la fosforilación (Benson et al., 2001; Blake, et al., 1996; Enigk & Maimone, 1999; Mizuno et al., 2001; Rees et al., 2007).

Los dominios de α -hélice y la región *coiled-coil*, regulan su interacción con la α -sintrofina y las distrofinas. A diferencia de otras isoformas que sólo se asocian con la distrofina, la α -DB1 interactúa con la utrofina (Enigk & Maimone, 1999; Mizuno et al., 2001).

1.4.2.1.2 La α -Distrobrevina 2

Esta variante de *splicing* no posee el carboxilo terminal de la isoforma 1, por lo que no es posible su fosforilación (Mizuno et al., 2001).

Se ha encontrado que se expresa específicamente en el sarcómero y las regiones sinápticas y postsinápticas de la NMJ del músculo esquelético; también se han identificado transcritos de 5 y 3.6 Kb que codifican para el C-terminal de esta isoforma en el cerebro (Ambrose et al., 1997; Rees et al., 2007).

En cerebro esta isoforma se localiza en las terminales axónicas de las células de la glía y en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica, dicha ubicación es dependiente de la α -sintrofina. Ratones *knock out* para el gen de las α -DB han revelado que la colocación de la α -sintrofina y la α -DB2 es mutuamente dependiente (Bragg et al., 2011).

1.4.2.1.2.1 La α -Distrobrevina 2A

Esta proteína fue la primera en ser detectada con el carboxilo terminal truncado. Tiene un peso molecular característico de 65kDa; contiene un dominio Z, dos regiones de α -hélices, el dominio *coiled-coil* y la región EF que comparte con la α -DB1 (Enigk & Maimone, 1999; Holzfeind et al., 1999).

1.4.2.1.2.2 La α -Distrobrevina 2B

Esta isoforma se detectó por medio del análisis de bibliotecas de cDNA producidas a partir de varios tejidos de ratón. La α -DB2B contiene 11 aminoácidos únicos en su extremo C-terminal, los cuales son codificados por el exón Z, situado en el extremo terminal 3' del gen. Así mismo, el RNA mensajero carece de los exones 9, 12 y 13 por lo que no contiene las regiones Vr1 y Vr3 (Enigk & Maimone, 1999). (Figura4)

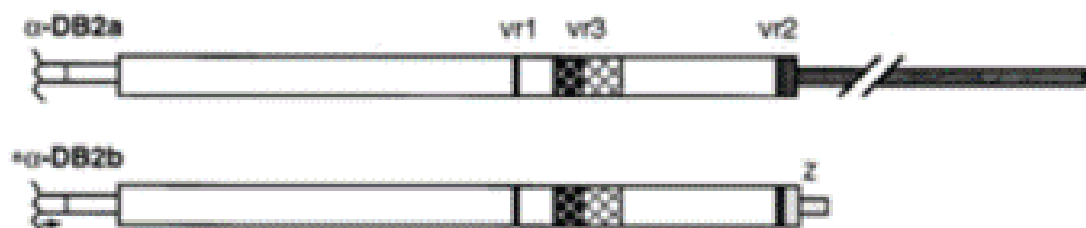


Figura4. Representación esquemática de las isoformas de la α -DB2. Se observan las 2 isoformas generadas por presencia/ausencia de las regiones variables vr1 (exón 9), vr2 (exón 18), and vr3 (exones 11, 12, 13). También se observa el exón Z, propio de la variante α -DB2B. Modificado de (Enigk & Maimone, 1999).

La α -DB2B se ha encontrado en el músculo esquelético, corazón y cerebro, presentándose al menos 3 variables de *splicing* en cada tejido (Enigk & Maimone, 1999).

1.4.2.1.3 Las α -Distrobrevinas 3 y 4

Ambas presentan un dominio C-terminal truncado que contiene solo el dominio ZZ, lo que las distingue de la α -DB2. Además se diferencian en que poseen una región 5'-UTR diferente a la de las variantes 1 y 2 (Holzfeind et al., 1999; Mizuno et al., 2001).

La localización de α -DB3 no se ha analizado, pero no presenta sitios de unión a la distrofina: no obstante su N-terminal podría unirse al complejo sarcospán/sarcoglicanos en la membrana plasmática (Rees et al., 2007).

1.4.2.2 La β -Distrobrevina

El gen DTNB murino mapea en el cromosoma 12, su tamaño es de ~130Kb y está formado por 21 exones. Este gen, al igual que el gen DTNA presenta *splicing* alternativo en al menos 4 sitios. (Rees et al., 2007)

A pesar de su alta homología con la α -DB, la β -Distrobrevina no se expresa en el músculo esquelético, pero si forma complejos DAPC en las neuronas, especialmente en la región postsináptica densa. Además, se expresa de forma abundante en el riñón, hígado y pulmones (Benson et al., 2001; Rees et al., 2007).

Por los hallazgos reportados en diferentes publicaciones, es claro que la α -DB se localiza en el núcleo de diferentes tipos celulares (C2C12, HL-60 y NB4) (Aguilar et al., 2015; Borutinskaite, et al., 2011; Martínez-Vieyra et al., 2013). Por lo tanto, es posible que esta proteína esté involucrada en procesos nucleares. A continuación se procederá a describir este organelo celular, sus compartimentos y proteínas distintivas.

1.4.3 El núcleo

El núcleo es el organelo encargado de contener la maquinaria genética de las células eucariotas. Está limitado por las membranas externa e interna y dentro se encuentra el material genético e infinidad de proteínas que permiten mantener la integridad genética y controlar la expresión de genes (Busch, 2012). Recientemente se demostró que la composición estructural del núcleo cambia con el desarrollo y con el tipo de tejido. (Burke & Stewart, 2014)

El contenido del núcleo no es uniforme, se divide en compartimentos no membranosos que realizan funciones específicas, llamados también cuerpos nucleares (Busch, 2012). (Figura5)

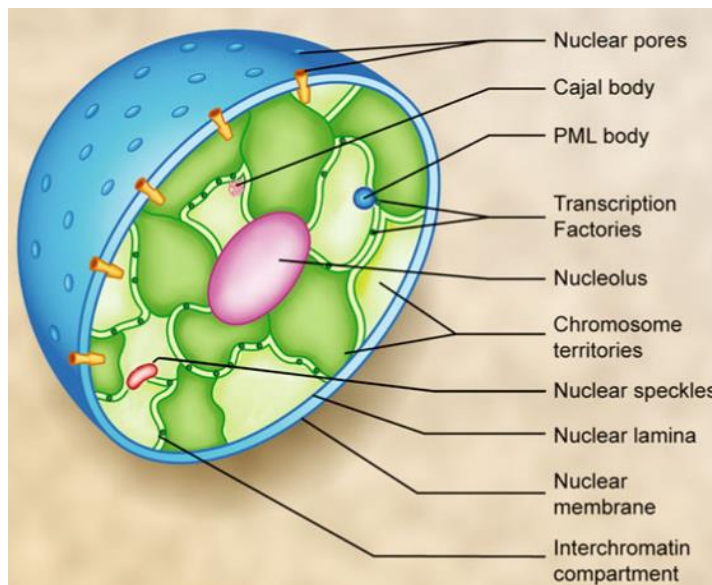


Figura5. Diagrama esquemático de la arquitectura nuclear. Se observan los diferentes compartimentos nucleares. El nucléolo, representado en color rosa, es el responsable de la transcripción del RNA ribosomal. También se esquematizan otros dominios especializados en procesos nucleares. [Agrupaciones de gránulos intercromatínicos (nuclear speckles), cuerpos PML, máquinas de transcripción y cuerpos de Cajal.] (O'Day & Catalano, 2013)

1.4.3.1 Cuerpos nucleares

Son suborganelos constituidos mayoritariamente por proteínas. Están formados por RNA y locus específicos de cromosomas (Busch, 2012), y se encuentran relacionados entre sí por interacciones débiles. La apariencia de los cuerpos nucleares es esférica, o algo irregular y al no encontrarse delimitados por membranas pueden intercambiar sus componentes moleculares entre ellos, lo que los hace altamente dinámicos (Machyna, et al., 2013).

1.4.3.1.1 El nucléolo

Es el compartimento que controla la biogénesis de las subunidades ribosomales en las células eucariotas. Poseen una alta plasticidad, se ensamblan en la etapa tardía de la mitosis para ser desensamblados al inicio de la mitosis (Busch, 2012).

Los nucléolos poseen tres subregiones: Centro fibrilar (FC), Componente fibrilar denso (DFC) y Componente granular (GC). La transcripción del rDNA ocurre en el borde entre el FC y DFC, ya que la región FC posee una alta concentración de subunidades de la RNA Polimerasa I (PolI); el procesamiento y modificación de los transcritos de preRNA ocurre en el DFC, y la mayoría de las proteínas se encuentran concentradas en GC, donde las subunidades ribosomales se ensamblan completamente (Boisvert et al., 2007) (Figura6).

Debido a su plasticidad, la composición de los nucléolos cambia bajo diferentes condiciones metabólicas o efectos externos, como sucede con el tratamiento con el antibiótico Actinomicina-D. (Boisvert et al., 2007) El nucléolo participa además en el transporte nuclear, secuestro regulatorio de moléculas, modificación de RNAs pequeños y control del envejecimiento (Olson et al., 2002).

1.4.3.1.1 Proteínas Nucleolares

El nucléolo es una estructura constituida alrededor de regiones organizadoras del nucléolo (NORs), en donde se agrupan proteínas que se localizan específicamente en los compartimentos nucleares y permiten la formación de esta estructura nucleolar (Figura7) (O'Day & Catalano, 2013).

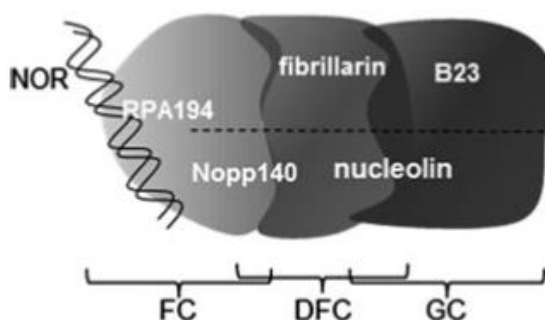


Figura6. Diagrama del nucléolo y de diferentes proteínas nucleolares. El esquema muestra la estructura nucleolar formada alrededor de un NOR, y las proteínas marcadoras específicas de cada componente nucleolar. (O'Day & Catalano, 2013)

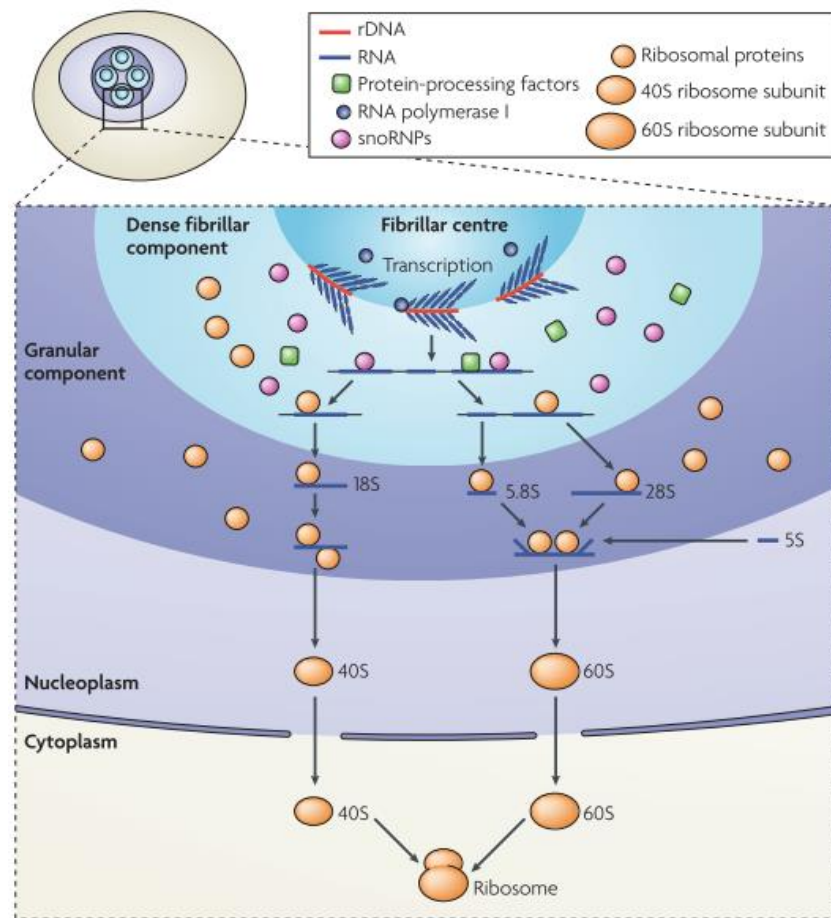


Figura7. Modelo de la biogénesis ribosomal. La transcripción del DNA ribosomal mediada por la RNAPolII ocurre en los FC. En la imagen se puede observar los diferentes pasos del procesamiento de los RNAs ribosomales y la conformación de las subunidades ribosomales funcionales (Boisvert et al., 2007).

El proteoma del nucléolo está altamente conservado entre especies y se ha determinado que aproximadamente un 30% de las proteínas nucleolares están relacionadas con la biogénesis ribosomal (Boisvert et al., 2007).

1.4.3.1.1.1 Nopp 140

La proteína Nopp140 pesa 130kDa y es generada por el gen NOLC1 (Sherman, 1998). Se encuentra localizada en el FC del nucléolo pero también se ha observado en pequeños espacios del DFC (O'Day & Catalano, 2013).

Aún no se conoce con exactitud la función de esta proteína, pero se piensa que actúa como una chaperona molecular y que está involucrada en el ensamblaje de nRNPs (Ribonucleoproteínas) y la biogénesis ribosomal (Isaac et al., 1998).

1.4.3.1.1.2 B23/nucleofosmina

Esta proteína está codificada en el gen NPM1 y tiene un peso molecular de 40kDa (Sheffield, 1944). La proteína B23/nucleofosmina se localiza en el GC nucleolar, donde participa en el ensamblaje de las nRNPs (O'Day & Catalano, 2013).

La B23/nucleofosmina funciona como chaperona nuclear y está implicada en el remodelamiento de la cromatina, la biogénesis ribosomal, la estabilidad genómica, la replicación centrosómica y la regulación de transcripcional (Sheffield, 1944).

1.4.3.1.2 Los cuerpos de Cajal

Estos cuerpos nucleares son esféricos y tienen un diámetro entre 0.5 y 1µm; la cantidad y tamaño de los cuerpos de Cajal depende del organismo, tipo de tejido, estado de desarrollo y diferenciación. (Machyna et al., 2013) Estas estructuras nucleares participan en la biogénesis de pequeñas ribonucleoproteínas (snRNPs), pequeños RNAs y en las modificaciones que sufren las ribonucleoproteínas de la telomerasa (Hebert, 2013; Morimoto & Boerkoel, 2013). El componente principal de los cuerpos de Cajal es la coilina, una proteína que contribuye con la biogénesis de RNA, las telomerasas y con el procesamiento de snRNA. (Morimoto & Boerkoel, 2013)

A pesar que no se ha descrito enfermedad alguna del humano con anomalías en los cuerpos de Cajal, se cree que daños en la función de estas estructuras podrían estar

relacionados con la atrofia músculo-espinal, enfermedad causada por la deficiencia de la proteína SMN1. (Morimoto & Boerkoel, 2013)

1.4.3.1.2.1 Coilina

La coilina, codificada por el gen COIL, tiene un peso de 80kDa. Se localiza mayoritariamente en el citoplasma celular y es además parte importante de la estructura de cuerpos de Cajal (Hebert, 2013).

Se ha revelado que la coilina posee actividad de RNAsa, además de actuar como unión entre el nucléolo y los cuerpos de Cajal (M D Hebert et al., 2001).

1.5 Hipótesis

La α -distrobrevina es necesaria para mantener la estructura y plasticidad de los nucléolos y los cuerpos de Cajal.

2. CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El presente estudio fue financiado por el Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), con el fin de analizar la relación funcional de la α -DB2 con proteínas nucleolares en las células N1E115, mediante técnicas de biología celular y molecular, con el objetivo de relacionarla con padecimientos genéticos que afectan la estructura del núcleo/nucleolo.

El trabajo se llevó a cabo en el departamento de Genética y Biología Molecular I, bajo la asesoría del Dr. Bulmaro Cisneros Vega, investigador titular del CINVESTAV.

2.2 Zona de estudio

Todos los procedimientos se desarrollaron dentro del laboratorio 12 del departamento de Genética y Biología Molecular I del CINVESTAV, ubicado en México Distrito Federal.

2.3 Período de Investigación

La investigación se realizó entre el mes de Enero de 2014 y Enero de 2015.

2.4 Modelo de estudio

Se emplearon las líneas celulares N1E115, C2C12 y HeLa, derivadas de un neuroblastoma murino, de mioblastos murinos y de un adenocarcinoma humano respectivamente. (ATCC, 2014a, 2014b)

2.5 Cultivo celular

El mantenimiento y propagación de las células se realizó en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés) con 10 % (v/v) de suero fetal bovino, 25U/ml de penicilina y 25 μ g/ml de estreptomicina a 37°C/5%CO₂.

2.6 Extracción de RNA

Las células N1E115 crecidas hasta una confluencia del 70-80% se lisaron para la posterior extracción de RNA total, utilizando el reactivo comercial TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA) bajo las recomendaciones del proveedor.

2.7 Análisis de integridad de RNA

Se cuantificó la concentración del RNA total (ng/μl) en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA), midiendo la absorbancia a 260/280nm. Enseguida se verificó la integridad del RNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% 30 minutos a 90 Voltios, utilizando la solución tampón TAE 1X.

2.8 Síntesis de cDNA

Una vez comprobada la integridad del RNA extraído de células N1E115, se procedió a la síntesis de cDNA, utilizando una alícuota de 1000-2000ng/μl de RNA total, 25μg Oligo t y 200U de la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA). Las reacciones se incubaron a 70°C por 4 minutos, a 37°C durante 70 minutos y a 94°C por 6 minutos.

2.9 Amplificación de isoformas de α-DB mediante PCR punto final

Utilizando cDNA de las células N1E115 y de cerebro de ratón (control), se llevaron a cabo las reacciones de la PCR. Se preparó una mezcla de reacción en 25μl que contenía 1X de la solución tampón para PCR (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA), 1.5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA), 0.4mM de dNTP's, 1μM de los oligos Forward y Reverse, 1U de la enzima Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA. USA), 2.5μl de cDNA y agua ultrapura estéril.

Las secuencias de los oligonucleótidos fue la siguiente: α-DB2A/B forward 5'-GTCCCTCCTCAGGAAGT-3', reverse α-DB2A 5'-

CCACTGTTAGTTAAGACCTGC-3' y reverse α -DB2B 5'-TCATGTTCTCTCCTCAAGG-3' (Enigk & Maimone, 1999). Las condiciones de la reacción de PCR punto final fueron las siguientes: 94°C durante 5 minutos para denaturación, seguido de 29 ciclos de amplificación (94°C 30 segundos, 53°C 30 segundos, 72°C 30 segundos) y 7 minutos de elongación a 72°C. Como control de la reacción se llevó a cabo la amplificación del RNA mensajero de la enzima GAPDH, empleando los siguientes oligonucleótidos específicos: forward GAPDH 5'-TGAAGTTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3', reverse GAPDH 5'-CCATGCCAGTGAGCTTCCCGT-3'

Los amplicones obtenidos se corrieron en un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 90 Voltios con la solución tampón TAE 1X.

2.10 Secuenciación de amplificados

Los productos de amplificación de la PCR punto final se purificaron mediante etanol/EDTA y se separaron por electroforesis capilar en el ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer). Se secuenciaron utilizando el kit BigDye Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Amersham Life Science, Inc. OH, USA).

2.11 PCR-Tiempo real para isoformas de α -DB.

Se implementó un ensayo de PCR-Tiempo real cualitativo para la detección de isoformas de la α -DB que se expresan en células N1E115. Para esto se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos para cada isoforma de la α -DB 2. Se empleó un oligo forward (5'-CAGACAGCGAAAGGATGAG-3') que hibrida con el cDNA de ambas isoformas, α -DB 2A y 2B (oligos reverse 5'-CCACTGTTAGTTAAGACCTGC-3' y 5'-TCATGTTCTCTCCTCAAGG-3' respectivamente)(Enigk & Maimone, 1999). Para la α -DB1, usada como control, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: forward 5'-GCGAAAGGATGAGCTAGAACAG-3' reverse 5'-GGCAGATGCTGAACGGATG3' y para GAPDH los siguientes oligos: forward 5'-CTTGGGCTACTGAGGACC-3' reverse 5'-CTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3' (Villarreal-Silva et al., 2010). La reacción de qPCR se probó empleando cDNA de

cerebro de ratón, y se obtuvieron curvas de disociación consistentes con la amplificación de un solo producto de amplificación.

La detección cualitativa se realizó mediante la utilización del colorante SYBR Green del kit StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Las reacciones fueron ajustadas usando 7.5µl de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X, 1.5µl cDNA, 100nM de los oligos Forward and Reverse en un volumen final de 15µl por pozo. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Las condiciones del termociclador fueron las indicadas por el proveedor, y la temperatura de alineamiento se ajustó a los requerimientos de cada par de oligonucleótidos.

La eficiencia de los pares de iniciadores se determinó mediante diluciones seriales del cDNA control, utilizando la pendiente del gráfico Ct (umbral) vs. Log dilución de cDNA. Véase Anexo1.

2.13 Detección por inmunofluorescencia indirecta

La localización subcelular de proteínas en las células N1E115 se llevó a cabo con células hasta un ~60% de confluencia sobre cubreobjetos previamente preparados con colágeno (1:100). Las preparaciones se lavaron con una solución amortiguadora salina (PBS) y se fijaron con Paraformaldehído 4% (PFA). Después se permeabilizaron con Tritón (0.2%) y se bloquearon con una solución de Gelatina (0.5%) y Suero Fetal Bovino (SFB 1%). Posteriormente se colocaron 50µl de anticuerpo primario a las concentraciones mostradas en la Tabla1 y la señal específica se reveló mediante la utilización de un anticuerpo secundario especie-específico acoplado a un fluorocromo [FITC-conjugado (verde) y TRITC-conjugado (rojo)]. La contratinción de núcleos se realizó con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI por sus siglas en inglés). Las preparaciones se montaron y sellaron con VectaShield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) para su posterior análisis en el microscopio confocal Nikon Eclipse Ti-E (Nikon Corporation. Tokyo, Japón), usando el objetivo de inmersión 60x. La toma de imágenes se realizó con el programa NIS-Elements.

2.14 Aislamiento de DNA de plásmido

2.14.1 Transformación bacteriana

Los vectores de expresión utilizados en este estudio se propagaron en bacterias. Se prepararon cultivos bacterianos de células competentes (TOP 10) en medio Luria-Bertani (LB) líquido sin antibiótico y se transformaron con DNA de plásmido (100-150ng) mediante el método de shock térmico. Posteriormente, las bacterias transformadas se sembraron en cajas de LB con 100 µg/ml de ampicilina.

2.14.2 Obtención de DNA plasmídico a mediana escala (Miniprep y Midiprep)

El DNA de plásmido se aisló mediante el uso del kit comercial PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation, Madison, USA) y QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden, Germany).

2.15 Transfección

Las células N1E115 deficientes en la expresión de la α -DB se obtuvieron mediante el método de transfección con liposomas catiónicos. Para esto se empleó el reactivo denominado Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA), El DNA de plásmido se mezcló previamente con la Lipofectamina 2000 y esta mezcla se agregó a las células cultivadas sobre cajas Petri con medio de cultivo DMEM sin suero a una confluencia celular del 75-80%. Las células se analizaron 24 horas post transfección mediante microscopía de epifluorescencia y confocal.

2.16 Inmunodetección en fase sólida

2.16.1 Extracción de proteínas totales

Para analizar la presencia de la α -DB en las líneas celulares N1E115, HeLa y C2C12 se llevó a cabo una extracción de proteínas. Las células cultivadas a una confluencia ~90-100% se lavaron con PBS y se resuspendieron en la solución tampón de lisis (Tris HCl pH 8 50mM, NaCl 150mM, Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo [PMSF por sus siglas en inglés] 1mM) adicionada con Tritón X-100 1%, Complete 1X, NaF

25mM y Na_3MO_4 10mM. Fue necesario añadir un paso extra de sonicación para las células HeLa y C2C12.

2.16.2 Cuantificación de Proteínas

Las proteínas se cuantificaron empleando el método de Bradford, para lo cual, se realizó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); se determinó la absorbancia a 595nm generada por el reactivo de Bradford (Bio-Rad). Las muestras se mezclaron con el reactivo de Bradford y la concentración de proteínas se determinó a partir de la interpolación de la absorbancia. Los extractos proteínicos se conservaron a -20°C hasta su uso.

2.16.3 Electroforesis e inmunodetección de proteínas en fase sólida

A los extractos proteínicos se les añadió la solución amortiguadora Lamlli (SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004% y Tris-HCl pH 6.8 0.125M). Después, se separaron las proteínas mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10%, con una corriente de 20mA. Los geles se tiñeron con Azul de Coomasie para verificar la integridad de las proteínas

Para la inmunodetección en fase sólida, las proteínas se electrotrasfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando una corriente de 20V durante 1 hora. Posteriormente, la membrana se tiñó con Rojo de Ponceau para verificar la efectividad de la transferencia. Enseguida, se bloqueó la membrana con una solución de leche descremada al 15% en TBST (Tris 25mM, NaCl 140mM, KCL 3mM, Tween-20 0.05%) con la finalidad de evitar uniones inespecíficas. Finalmente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (ver Tabla1). Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la membrana con TBST y se incubó con un anticuerpo secundario y la señal se reveló mediante el sistema ECL.

Los anticuerpos primarios usados para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta e inmunodetección en fase sólida se enlistan en la Tabla 1.

Tabla1. Anticuerpos primarios utilizados en el trabajo. Western Blot (WB), Inmunofluorescencia (IF). Elaborado por: Santamaría 2015

Anticuerpo	Origen	Método aplicado
ABN61Millipore	Conejo	WB (1:1000)
610766 BD Transduction Laboratories	Ratón	WB(1:1000), IF(1:20)
Anti- p80-coilin Antibody H-300 Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Conejo	WB(1:500), IF(1:25)
Anti-Nopp140 Antibody H-300 Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Conejo	IF(1:30)
Anti-actin Antibody Dr. Manuel Hernández, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN)	Conejo	WB (1:500)

2.16.4 Densitometrías

Las cantidades relativas de proteína encontradas mediante los ensayos de inmunodetección en fase sólida se determinaron utilizando el programa de cómputo Image Lab™ (Bio-Rad), y las gráficas se diseñaron con el programa GraphPad Prism 5 para Windows, Version 5.0a (GraphPad Software Inc).

2.17 Análisis estadísticos

Para determinar si el promedio de cuerpos de Cajal presentes por célula, se realizó una prueba de t no pareada utilizando el programa de cómputo GraphPad Prism 5 para Windows, Version 6.0a (GraphPad Software Inc).

3. CAPITULO IV: RESULTADOS

Este estudio fue realizado con el objetivo de buscar la funcionalidad de la α -DB en el núcleo de las células N1E115. El mismo fue asesorado por el Dr. Bulmaro Cisneros líder de esta investigación.

La línea celular empleada es de origen neuronal, y fue seleccionada como modelo de estudio, porque publicaciones han mostrado evidencias de la interacción de la α -DB con las proteínas DAMAGE y Disbindina, las cuales se relacionan con afecciones neurológicas como la esquizofrenia y la bipolaridad (Albrecht & Froehner, 2004; Benson et al., 2001).

Además, ensayos de inmunodetección en fase sólida con anticuerpos anti α -DB, mostraron por primera vez en lisados de nucléolo de células N1E115, una banda de ~65kDa (Hernández-Ibarra et al. datos bajo revisión), por lo que fue necesario identificar a que isoforma de la familia de las α -DBs corresponde la señal detectada.

3.1 Identificación de las isoformas de la α -DB que se expresan en las células N1E115.

Con la finalidad de analizar la expresión de la α -DB en las células N1E115 se llevaron a cabo ensayos de inmunodetección en fase sólida. Se emplearon las células C2C12 y HeLa como controles del experimento. Se obtuvieron diferentes lisados celulares y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida. La integridad de los extractos proteicos se confirmó mediante tinción de los geles con azul de Coomassie (Figura8A). Seguido, se electro-transfirieron los extractos proteicos a una membrana de nitrocelosa y se incubaron utilizando un anticuerpo anti α -DB, el que reveló una banda de ~65kDa en el extracto de las células N1E115, correspondiente al peso de la isoforma α -DB2 (Blake et al., 1996); mientras que, en los lisados de las células C2C12 y HeLa se detectaron bandas de ~87kDa y ~65kDa, pesos de la α -DB1 y α -DB2 respectivamente (Blake et al., 1996) (Figura8B).

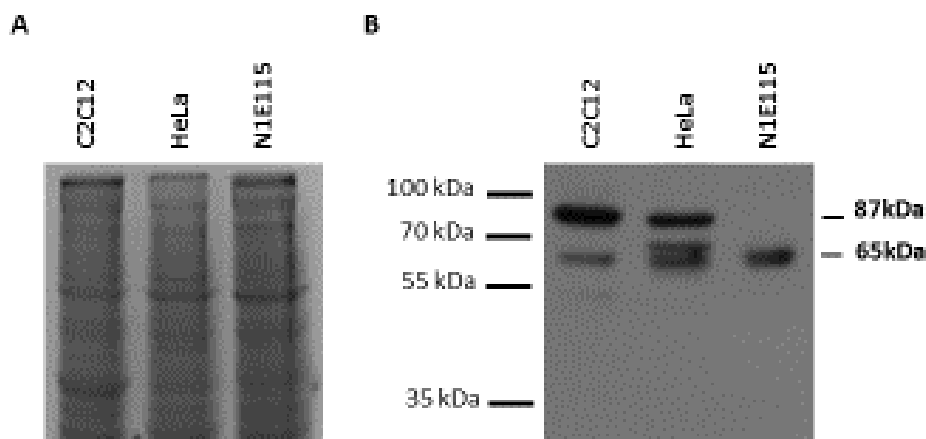


Figura 8. Expresión de la α -DB en las células N1E115. A) Gel de proteínas de las células C2C12, HeLa y N1E115 teñido con Azul de Coomassie. B) Inmunodetección de la α -DB, utilizando el anticuerpo ABN61. Elaborado por: Santamaría 2015

Debido a que no detectamos bandas con pesos diferentes a ~ 65 kDa en el extracto de proteínas de las células N1E115, es la proteína α -DB2, la isoforma correspondiente al peso molecular detectado en el ensayo de inmunodetección en fase sólida (Pawlikowski & Maimone, 2008).

Enigk & Maimone señalan que existen dos variables de *splicing* de la α -DB2, la α -DB2A y la α -DB2B, que son generadas por el *splicing* alternativo de las regiones variables 1 y 3 del gen DTNA. Sus pesos difieren entre sí por menos de 1 kDa, por lo que mediante el método de inmunodetección en fase sólida es imposible diferenciar una de la otra (Enigk & Maimone, 1999).

Por consecuencia, para detectar la isoforma específica de la α -DB2 presente en las células N1E115, se diseñaron pares de oligos específicos dirigidos a la región 3' terminal que codifica para el dominio carboxilo terminal de la proteína (ver secuencias en materiales y métodos). La estandarización de la amplificación de los oligonucleótidos se realizó empleando cDNA de cerebro de ratón como control, porque anteriormente fueron detectadas en este tejido las variantes de *splicing* de la α -DB2 (Enigk & Maimone, 1999).

Empleando la muestra de cerebro de ratón se esperaba detectar los amplicones de 493pb para la α -DB2A y de 662pb para la α -DB2B, pero a diferencia de lo previsto, el amplicón de la α -DB2B mostró un peso de ~500pb (Figura9). Además, los amplicones obtenidos fueron secuenciados, con esto se corroboró que los oligonucleótidos amplificaron las secuencias de las variantes de *splicing* para las que fueron diseñados. También se amplificó simultáneamente el RNA mensajero de actina como control para validar la pureza del cDNA utilizado.

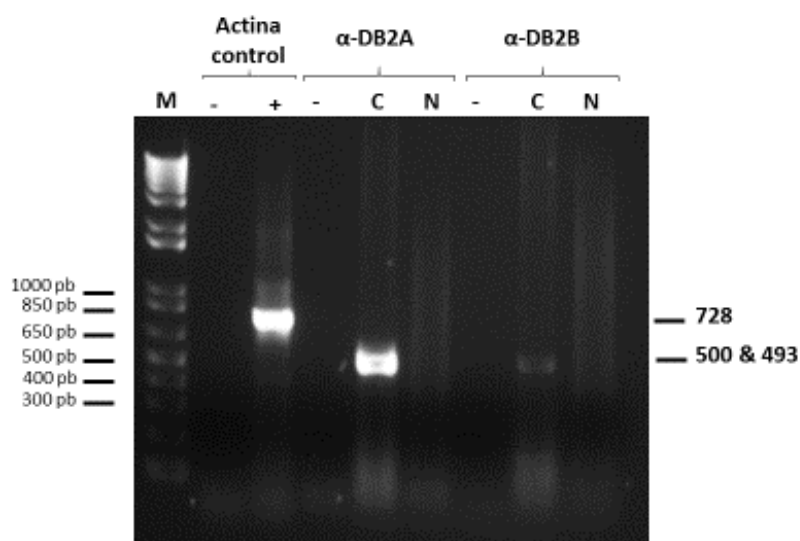


Figura9. Amplificaciones mediante PCR punto final de los RNAs mensajeros de α -DB2A y α -DB2B. En los carriles correspondientes al RNA mensajero de las células N1E115 no se observa la amplificación de la α -DB2A ni de la α -DB2B. M: marcador de tamaño, C: cerebro de ratón, N: N1E115. Elaborado por: Santamaría 2015

Una vez probados los oligos en el cDNA control y ajustadas las condiciones de la PCR punto final, se amplificó el cDNA de células N1E115. Esta amplificación no detectó bandas visibles a pesar de variarse, la temperatura de alineamiento, los ciclos de amplificación y la concentración de $MgCl_2$ (Bartlett, et al., 2003).

Debido a que no logramos la detección de amplicones mediante el método de PCR punto final, decidimos emplear un ensayo de PCR-Tiempo real, el cual tiene una sensibilidad para detectar menos de 5 copias del transcrito de interés (Valasek & Repa, 2005; Wong & Medrano, 2005).

Para esto, se diseñaron nuevos pares de oligos específicos que cumplieran con las necesidades de la técnica de PCR-Tiempo real, y la amplificación se verificó mediante PCR punto final, utilizando cDNA de cerebro de ratón como control. Se detectaron los amplicones esperados para los oligos de GAPDH (149pb), α -DB1 (195pb), α -DB2A (160pb) y α -DB2B (159pb). Se utilizó α -DB1 como control de amplificación de la PCR punto final (Figura10).

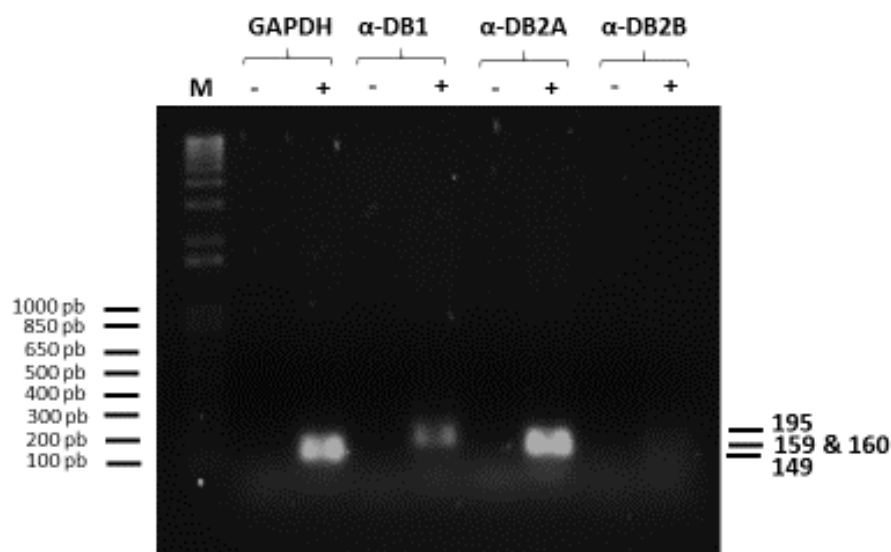


Figura10. Expresión de los RNAs mensajeros de α -DB2A y α -DB2B en cerebro de ratón. Una muestra de cDNA de cerebro de ratón se amplificó mediante PCR punto final utilizando los oligos específicos para α -DB2A, α -DB2B y GAPDH del PCR-Tiempo real. M: marcador de tamaño. El signo – indica el control negativo de amplificación para cada par de oligos. Elaborado por: Santamaría 2015

Una vez probados los oligos para el PCR-Tiempo real, se obtuvo el RNA total de células N1E115 y de cerebro de ratón mediante la reacción de RT-PCR. En la Figura11 se observa el patrón electroforético del RNA total de las células N1E115. La visualización de las bandas correspondientes a los RNAs ribosomales 28S y 18S indica la ausencia de degradación de la muestra del RNA total.

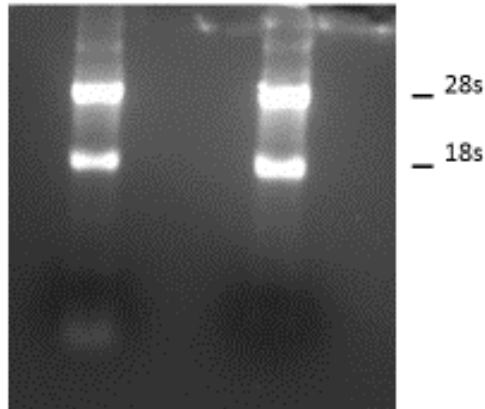


Figura11. Corrimiento electroforético del RNA total. Se observan los RNAs ribosomales 28S y 18S, lo que indica que el RNA extraído está íntegro. Elaborado por: Santamaría 2015.

A continuación, se estandarizó las condiciones del método de PCR en tiempo real con el cDNA control. Se constató la producción de una sola curva de disociación para cada producto amplicón, lo que indica la especificidad de los oligos (Broeders et al., 2014). Se emplearon 5 diluciones seriales de cDNA control, con las que se determinó la eficiencia de cada par de oligos, las mismas que cumplieron con el requisito de encontrarse entre el 100-110%, significando una amplificación correcta de cada par de oligos (Huggett, et al., 2005) (Anexo2). Se usó GAPDH como gen de expresión constitutiva (control de la reacción de RT-PCR).

Cuando se sometió a prueba el cDNA de células N1E115, se obtuvo una sola curva de curva de disociación de los productos de amplificación de GAPDH, α -DB2A y α -DB2B (Temperaturas de disociación: GAPDH: 81°C, α -DB2A: 73°C y α -DB2B: 72.77°C), expresando la especificidad de las reacciones (Figura12).

Además, se observó que el producto de PCR en tiempo real para la α -DB2B obtenido de las células N1E115 mostró una temperatura de disociación $\sim 7^\circ$ menor a la que se encontró en el cerebro de ratón. Por otro lado, el análisis de las amplificaciones arrojadas por el equipo para cada uno de los genes, indicó que no fue posible amplificar el RNA mensajero de la α -DB2A (Figura13) (Anexo3, Anexo4, Anexo5).

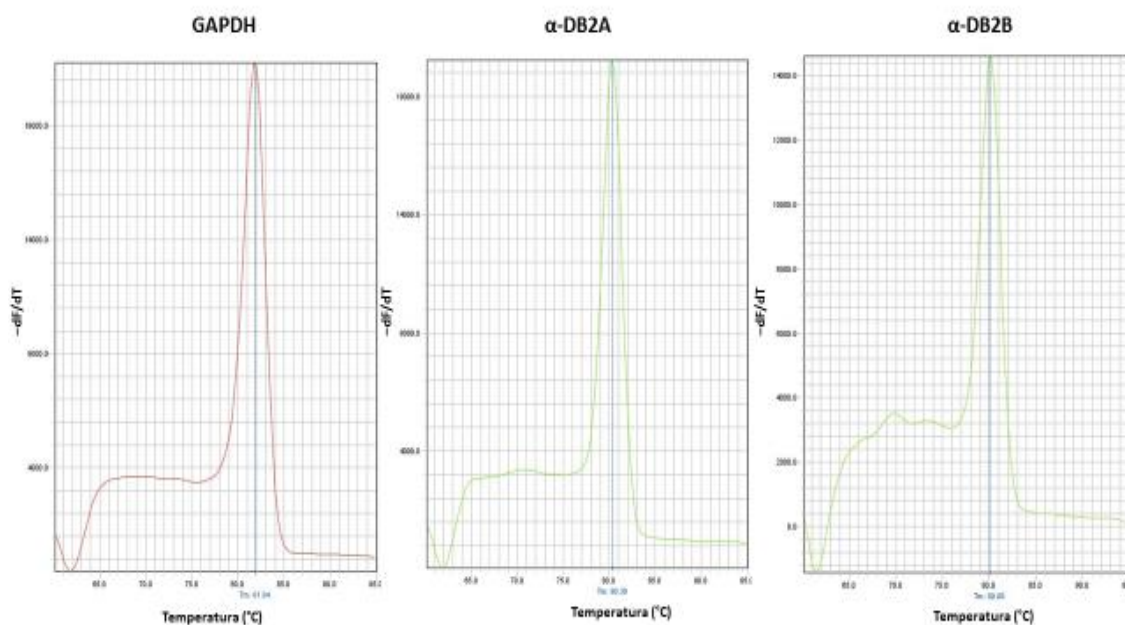


Figura12. Curvas de disociación de los productos de amplificación de los RNA mensajeros de GAPDH, α -DB2A y α -DB2B en las células N1E115. $-dF/dT$: diferencial de fluorescencia con respecto al tiempo. Elaborado por: Santamaría 2015.

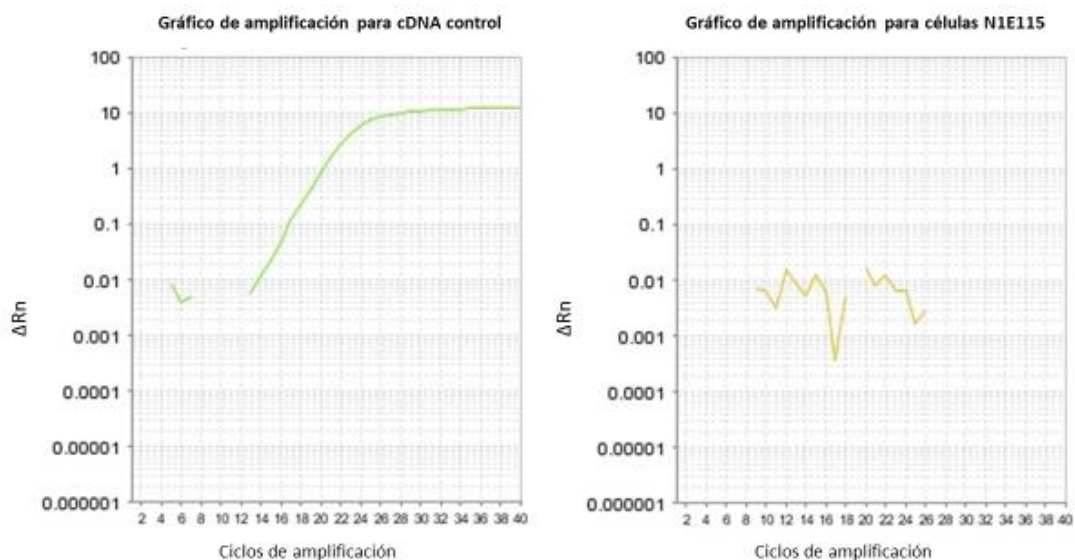


Figura13. Gráficos de los productos de amplificación de los RNA mensajeros de α -DB2A en cerebro de ratón y en las células N1E115. No se observa amplificación utilizando el cDNA de las células N1E115. ΔRn : diferencial de la intensidad del fluorocromo notificador. Elaborado por: Santamaría 2015.

3.2 Distribución subcelular de la α -DB en las células N1E115.

Una vez determinada la isoforma de α -DB presente en las células N1E115, se examinó la localización celular de la proteína α -DB2. Para esto se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo anti- α -DB (610766) y un anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde), además se contra tiñeron los núcleos con DAPI (azul). Con esto se determinó que la α -DB2 se distribuye homogéneamente en el citoplasma y núcleo, mostrando un patrón de tinción granular. De manera interesante, dentro del núcleo se tiñeron unas estructuras que semejan los nucléolos (cuerpos grandes) y los cuerpos de Cajal (cuerpos pequeños). (Figura14)

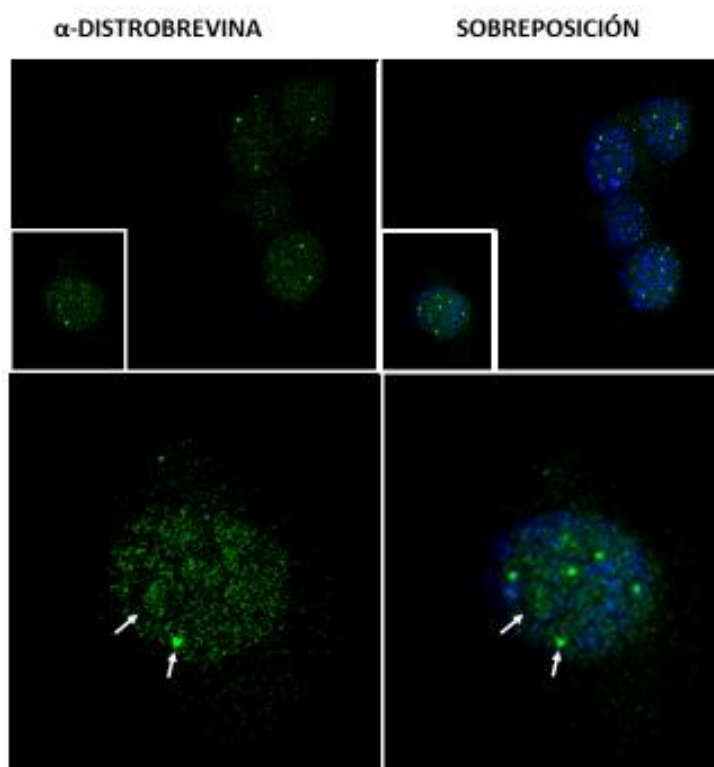


Figura14. Localización de α DB2 en las células N1E115. Las flechas denotan cuerpos nucleares teñidos intensamente. La sobreposición de los campos muestra la máxima proyección. Elaborado por: Santamaría 2015

Con la finalidad de definir si la α -DB2 se localizaba en realidad en los nucléolos y cuerpos de Cajal, se llevaron a cabo ensayos de colocalización con los marcadores de cuerpos nucleolares: Nopp 140 (componente fibrilar denso), B23 (componente granular) y marcador de cuerpos de Cajal: coilina. La Figura15 muestra que la α -DB2

[marcada por un anticuerpo monoclonal para anti- α -DB (610766) y un anticuerpo secundario conjugado FITC (verde)] colocaliza con las proteínas analizadas Nopp140, B23 y coilina [teñidas con anticuerpos primarios específicos (ver materiales y métodos) y con anticuerpos secundarios conjugados TRITC (rojo)], lo que indica que estas proteínas se encuentran en el mismo espacio celular.

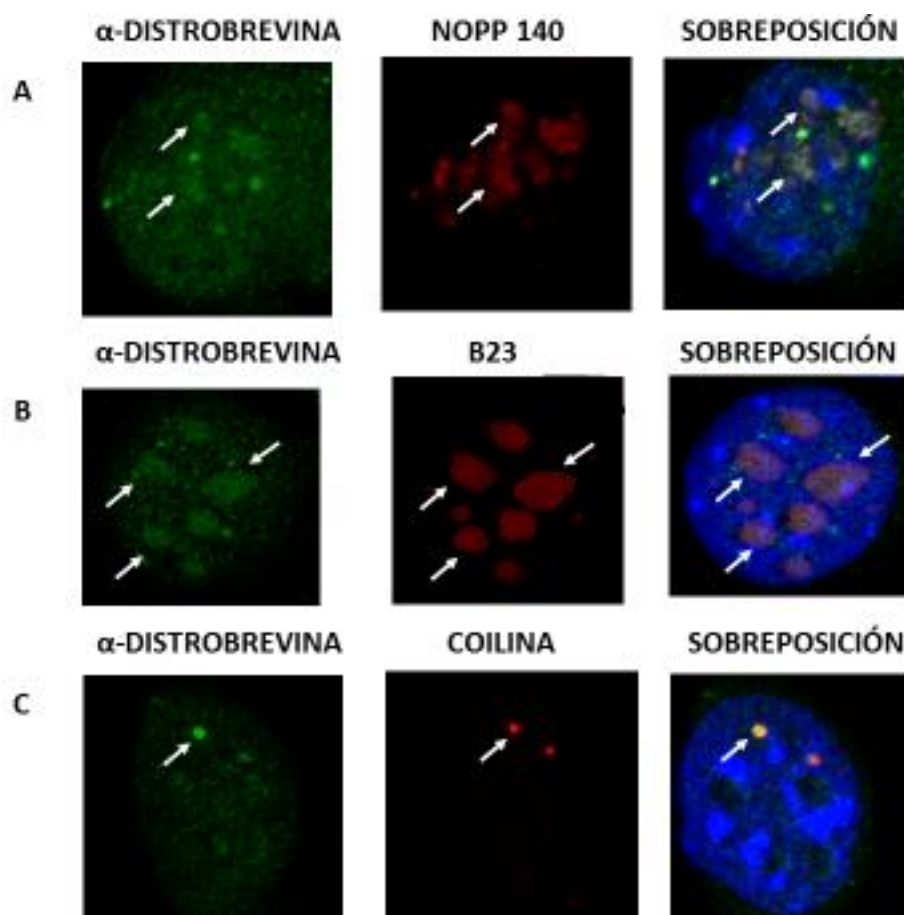


Figura15. Colocalización de α DB2 con marcadores nucleolares y de cuerpos de Cajal en las células N1E115. Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). A) Nopp 140, B) B23, C) Coilina. Las flechas indican la colocalización. Elaborado por: Santamaría 2015.

3.3 Identificación de la función de la α -DB en el nucléolo y los cuerpos de Cajal.

Observada la colocalización de α -DB2 con proteínas marcadoras de cuerpos nucleares, se decidió indagar su funcionalidad mediante la tecnología de RNA anti sentido, utilizando un RNA de interferencia (RNAi) específico para la α -DB (Anexo6).

La utilización de esta metodología permite determinar las consecuencias del silenciamiento de la expresión de la proteína de interés sobre las funciones celulares. (DiNatale & Perdew, 2010; McEwan, 2009)

Por esto, las células N1E115 se transfectaron de forma estable con un vector que expresa un RNAi dirigido específicamente para el RNA mensajero de la α -DB de ratón y RNAi control (scrambled, del inglés enredado). Con este tratamiento se logró una disminución en los niveles de la proteína de ~80% (Figura16B) y como consecuencia secundaria observamos una reducción en las cantidades de la proteína nucleolar Nopp140 (~30%) (Figura16C) (Hernández-Ibarra et al. datos bajo revisión).

Debido a que las inmunofluorescencias indirectas revelaron que la α -DB2 posee una fuerte colocalización con la proteína marcadora de cuerpos de Cajal: coilina, se analizó si la deficiencia de la α -DB2 tiene un efecto sobre los niveles de esta última proteína; encontramos que sólo hay una ligera disminución de la expresión de coilina (~10%) en las células deficientes en α -DB2. (Figura16E)

Así mismo, se realizaron ensayos de fluorescencia sobre células N1E115 deficientes de α -DB2. Las células se cultivaron sobre cubreobjetos y se sometieron a inmunotinción con un anticuerpo primario dirigido contra la coilina (ver materiales y métodos) y un anticuerpo secundario conjugado FITC (verde); las células transfectadas expresan la proteína mCherry (rojo). Utilizando un microscopio de epifluorescencia, se determinó que las células transfectadas con el RNAi para α -DB2 no mostraron cambio aparente en la inmunotinción de coilina con relación a las células transfectadas con el RNAi control (Figura17A). Por esto, se contó el número de cuerpos de Cajal promedio por células y se realizó una prueba de *t* simple; y se reveló que el número promedio de los cuerpos de Cajal encontrados en las células N1E115 transfectadas con el RNAi control es significativamente mayor ($p=0.044$) que el promedio de cuerpos de Cajal presentes en las células que expresan el RNAi contra la α -DB2. (Figura17B)

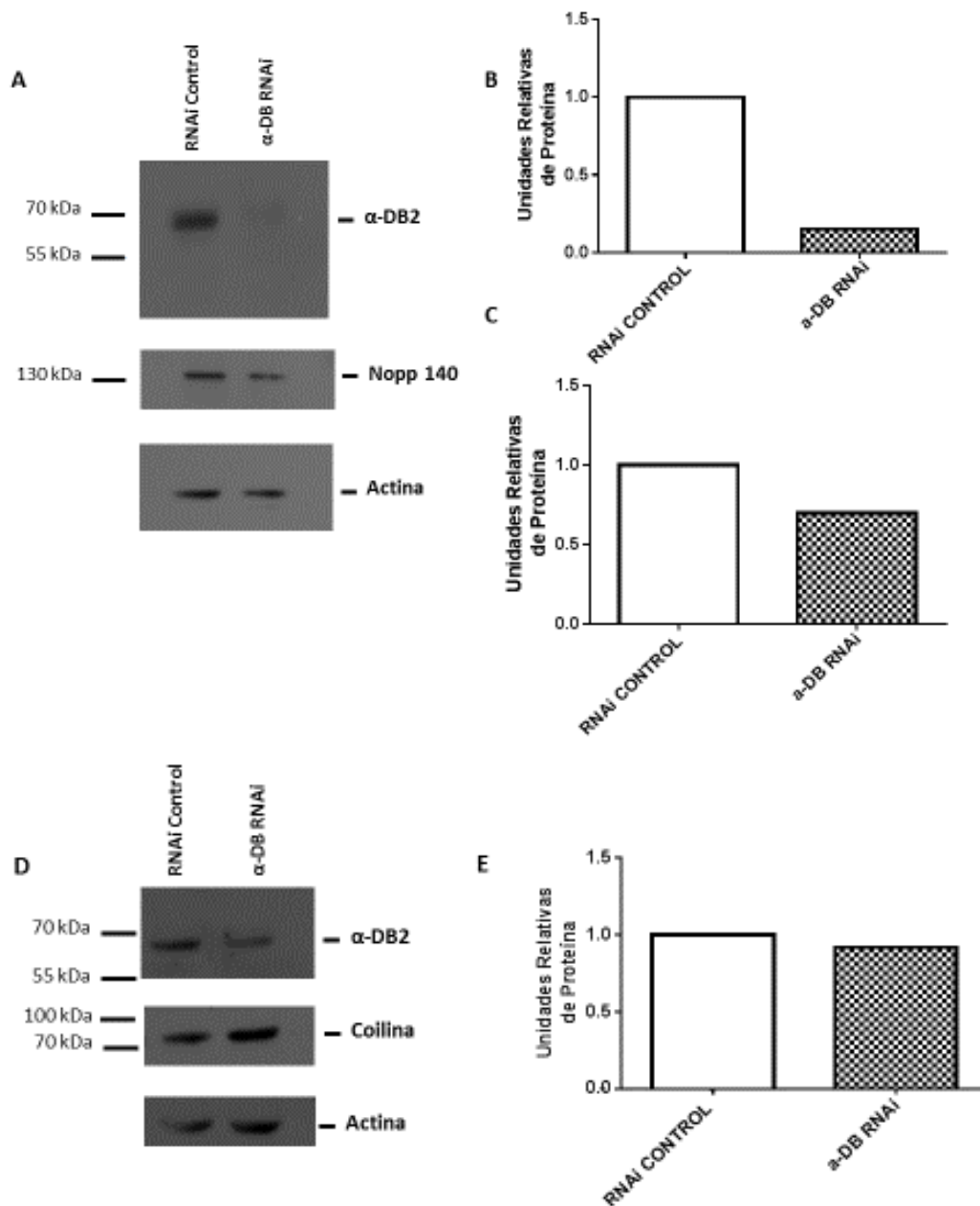


Figura 16. Disminución de los niveles de α -DB2 mediante el empleo de un RNAi. A) Inmunodetección en fase sólida de lisados de células transfectadas establemente con un RNAi control o con un RNAi específico para la α -DB2. Las membranas se incubaron con anticuerpos específicos contra α -DB, Nopp 140 o Actina (control de carga). B) Análisis densitométrico que muestra la disminución de α -DB2. C) Análisis densitométrico para cuantificar los niveles de Nopp140. D) Extractos de proteínas de células que expresan el interferente contra α -DB2 se sometieron a inmunodetección en fase sólida empleando anticuerpos específicos contra α -DB, coilina o Actina (control de carga). E) Análisis densitométrico para la cuantificar los niveles de coilina. Elaborado por: Santamaría 2015

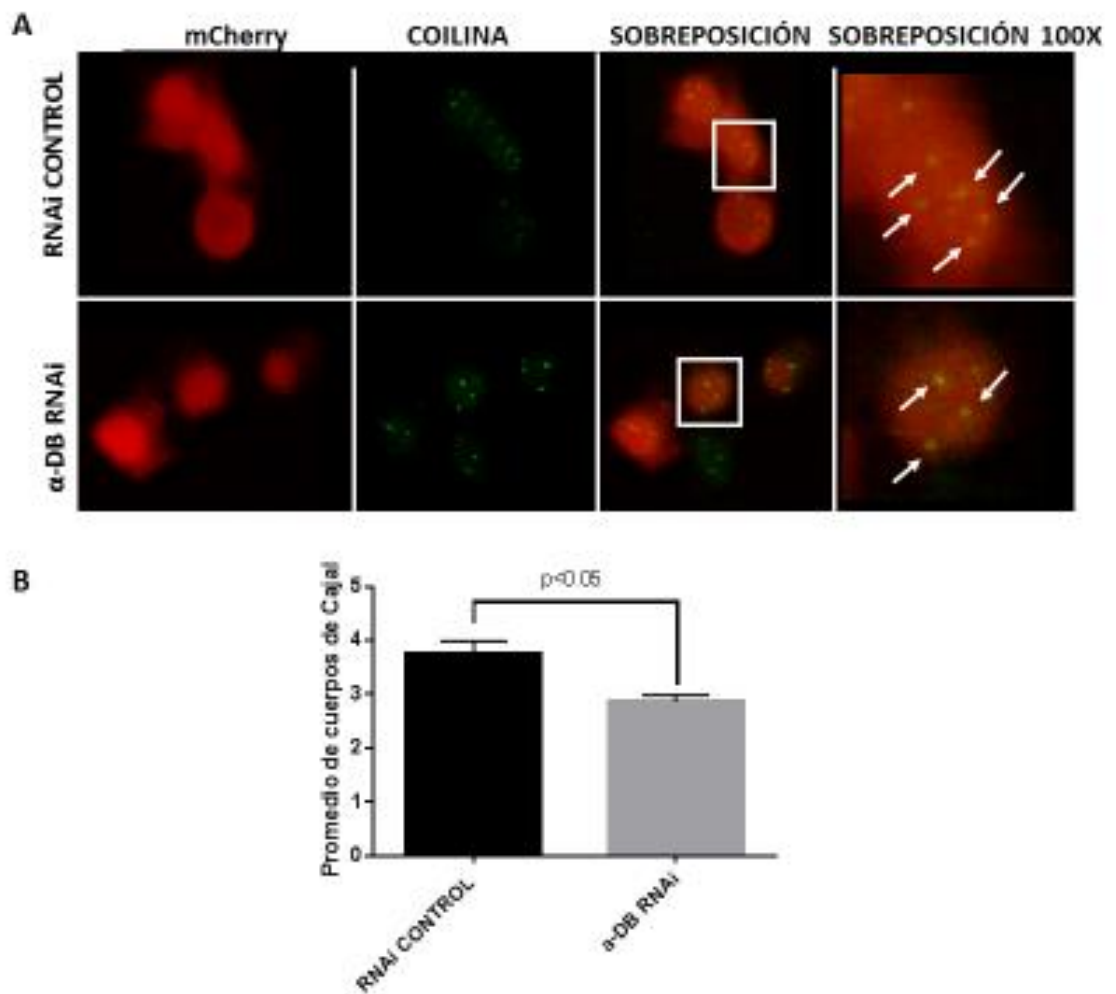


Figura17. Cuerpos de Cajal presente en las células N1E115 que expresan un RNAi contra la α -DB2 o un RNAi control. A) Las flechas indican los cuerpos de Cajal. B) Prueba de t para el número de cuerpos de Cajal. Las células transfectadas con el RNAi control muestran un mayor número de cuerpos de Cajal que las células que expresan el RNAi contra la α -DB2. ($p < 0.05$). Elaborado por: Santamaría 2015

4. CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

La α -DB es una proteína citoplasmática que forman parte del complejo DAPC; este complejo proteico le confiere estabilidad al sarcolema durante la contracción muscular y permite la comunicación entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina.

De manera inesperada, estudios recientes revelaron la presencia de la α -DB en el núcleo de diferentes líneas celulares, incluyendo las células Hela, C2C12 y N1E115 (Aguilar et al., 2015; Borutinskaite et al., 2012; Hernández-Ibarra, et. al datos bajo revisión); lo que sugiere que esta proteína lleva a cabo alguna función nuclear no identificada a la fecha. Como un primer paso para identificar la participación de la α -DB en algún proceso nuclear decidimos analizar en detalle su localización sub-nuclear; tomando en consideración que el núcleo está organizado en dominios que llevan a cabo funciones definidas, la asociación de la α -DB con alguno de ellos nos permitirá inferir y caracterizar posteriormente su función nuclear. Elegimos las células neuronales N1E115 como modelo de estudio, porque estudios previos han relacionado la α -DB con proteínas neuronales implicadas en trastornos neurológicos, incluyendo la esquizofrenia y la bipolaridad (Albrecht & Froehner, 2004; Benson et al., 2001).

Existen diferentes isoformas de *splicing* de la α -DB, por lo que fue necesario llevar a cabo ensayos de Western Blot y PCR en tiempo real para definir que las células N1E115 expresan solamente la isoforma α -DB2, variante previamente descrita (Blake et al., 1996; Ceccarini, et al., 2002; Enigk & Maimone, 1999; Pawlikowski & Maimone, 2008). Sin embargo, encontramos una baja expresión del RNA mensajero de α -DB2 en las células N1E115 en comparación con el cerebro de ratón, lo que pudo deberse a que utilizamos células indiferenciadas, ya que se ha reportado que los niveles de la α -DB2 se incrementan durante la diferenciación neuronal (Ceccarini et al., 2002; Kulyte et al., 2002; Rees et al., 2007).

Mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta localizamos la α -DB2 en el núcleo y citoplasma de las células N1E115. Otras proteínas del complejo DAPC con las que se asocia la α -DB se han encontrado también en el núcleo, incluyendo la Dp71 en las células PC12 y el β -dístroglicano y la nNOS en las células HeLa (Aguilar et al.,

2015; Borutinskaite et al., 2011; Fuentes-Mera et al., 2006; Martínez-Vieyra et al., 2013), incluso se ha demostrado que estas proteínas forman un complejo DAPC nuclear para llevar a cabo funciones diferentes a las que realizan en el citoplasma (Ambrose, et. al., 1997; Benson et al., 2001; Rees et al., 2007). Por ejemplo, los miembros del DAPC se asocian con proteínas de la envoltura nuclear para modular la arquitectura nuclear en las células HeLa (Fuentes-Mera et al., 2006; Villarreal-Silva et al., 2010).

Nuestro laboratorio demostró recientemente que la isoforma α -DB1 se transporta al núcleo mediante la acción de las importinas $\alpha 2/\beta 1$, las cuales se unen al dominio ZZ de la α -DB1 para importarla al compartimento nuclear (Aguilar et al., 2015). Debido a que la α -DB2 posee también el dominio ZZ, presumimos que se transporta al núcleo mediante el mismo sistema de importinas.

De manera interesante, la α -DB2 se localiza preferencialmente en los nucléolos, en donde colocaliza con las proteínas nucleolares Nopp140 y B23. No se conoce mucho del tráfico de proteínas hacia el nucléolo pero se piensa que las señales de localización nuclear (NLS) podrían funcionar también como señales de localización nucleolar (NORs). Este es el caso de la histona H2B, la cual se acumula en los nucléolos gracias a una región rica en residuos básicos que actúa como NLS y NORs (O'Day & Catalano, 2013). La permanencia de la α -DB2 en el nucléolo podría necesitar su interacción con DNA, RNA o proteínas nucleolares como Nopp140 y B23 (O'Day & Catalano, 2013). A este respecto, nuestro grupo reveló mediante ensayos de inmunoprecipitación que la α -DB2 interacciona con B23, lo que implica que la α -DB2 podría ser transportada al nucléolo mediante su unión con B23 e incluso participar en las funciones que lleva a cabo esta última proteína, incluyendo la regulación de la transcripción, la estabilidad genómica, y la biogénesis ribosomal (Sheffield, 1944). La proteína PNRC (proteína correguladora rica en prolinas de los receptores nucleares) es un ejemplo de una molécula que llega al nucléolo mediante su asociación con B23 (Wang, et. al., 2011).

El nucléolo posee una gran variedad de proteínas que se acumulan en ese organelo sin necesidad de membranas lipídicas circundantes, lo que permite el tráfico libre de

moléculas entre el nucléolo y los otros cuerpos nucleares. Un ejemplo es la proteína Nopp140, la cual viaja entre los cuerpos de Cajal y los nucléolos gracias que no se une a su densa carga eléctrica que adquiere cuando se fosforila y a las agrupaciones de aminoácidos básicos que presenta (Isaac et al., 1998). Considerando que la α -DB2 se localiza tanto en el nucléolo como en los cuerpos de Cajal es plausible proponer que se transporta entre estos dos organelos nucleares para actuar como chaperona de las RNPs. En apoyo a la idea de que la localización nucleolar de la α -DB2 es fisiológicamente relevante, observamos que la disminución de los niveles de la α -DB2 mediante el uso de RNA interferente específico, provocó una disminución en los niveles de Nopp140, lo que sugiere que la α -DB2 se requiere para mantener la estabilidad y funcionalidad de esta proteína nucleolar.

Finalmente, es importante comentar que las células N1E115 que presentan bajos niveles de la α -DB2 tienen también un número menor de cuerpos de Cajal, en comparación con las células control, lo que indica la α -DB2 participa en el ensamblaje y/o funcionamiento de los cuerpos de Cajal. Estos cuerpos nucleares están involucrados en el control del estrés celular y la maduración de snRNPs (Hebert et al., 2001; Sleeman, et. al., 2001).

En conclusión, en concordancia con lo propuesto en la hipótesis y lo encontrado en las evidencias experimentales de este trabajo, se señala que es la isoforma α -DB2 la que se expresa en las células N1E115. Así mismo, se encontró que esta proteína se localiza en el nucléolo, en donde interacciona con la proteína B23 y regula indirectamente los niveles de Nopp140, lo que sugiere que α -DB2 está relacionada con las funciones y actividades de estas proteínas nucleolares. Además, se demostró que, a pesar que α -DB2 colocaliza con coilina, proteína marcadora de cuerpos de Cajal, no se alteran los niveles de esta proteína cuando se emplea un RNAi específico para α -DB, pero sí se muestra una disminución significativa en el número de cuerpos de Cajal, apuntando a que α -DB2 está relacionada con la biogénesis y formación de estos suborganelos nucleares.

5. CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

- Las células N1E115 expresan la proteína α -DB2.
- La α -DB2 se distribuye en el citoplasma y núcleo, colocalizando con las proteínas nucleolares Nopp140, B23 y la proteína marcadora de cuerpos de Cajal colina.
- La colocalización de α -DB2 con proteínas marcadores nucleolares sugiere que podría estar involucrada con la estructura y funcionamiento del nucléolo.
- La disminución de Nopp140 en las células N1E115 que expresan el RNAi dirigido contra la α -DB indica una posible relación funcional entre estas la α -DB y Nopp140.
- La α -DB2 se encuentra relacionada directamente con funciones de la proteína B23.
- La α -DB2 no afecta los niveles de colina pero podría estar implicada en las funciones de los cuerpos de Cajal.

6. CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Secuenciar los productos de α -DB2B obtenidos por PCR tiempo real con cDNA de células de cerebro de ratón y N1E115 para determinar las isoformas de splicing de α -DB2.
- Clonar la proteína α -DB2 en un vector de expresión, para analizar la localización y transporte de la proteína exógena.
- Mediante ensayos de inmunoprecipitación demostrar si la α -DB2 interacciona con coilina.

7. CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, A., Wagstaff, K., Suarez-Sanchez, R., Zinker, S., Jans, D., & Cisneros, B. (2015). Nuclear localization of the dystrophin-associated protein α -dystrobrevin through importin α 2/ β 1 is critical for interaction with the nuclear lamina/maintenance of nuclear integrity. *FASEB*. doi:10.1096/fj.14-257147
- Albrecht, D. E., & Froehner, S. C. (2004). DAMAGE, a Novel α -Dystrobrevin-associated MAGE Protein in Dystrophin Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7014–7023. doi:10.1074/jbc.M312205200
- Ambrose, H. J., Blake, D. J., Nawrotzki, R. a, & Davies, K. E. (1997). Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics*, 39(3), 359–369.
- ATCC, A. T. C. C. (2014a). HeLa (ATCC ® CRMCL2™). *CRMCL2, HeLa*, 1–3. Retrieved from www.atcc.org
- ATCC, A. T. C. C. (2014b). N1e115 (atcc ® crl 2263™). *CRL-2263, N1E-115*, 3–5. Retrieved from www.atcc.org
- Bartlett, J. M. S., Bartlett, J. M. S., Stirling, D., & Stirling, D. (2003). *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 226).
- Benson, M. a, Newey, S. E., Martin-Rendon, E., Hawkes, R., & Blake, D. J. (2001). Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 24232–24241. doi:10.1074/jbc.M010418200
- Blake, D. J., Nawrotzki, R., Peters, M. F., Froehner, S. C., & Davies, K. E. (1996). Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87-kDa postsynaptic protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7802–7810. doi:10.1074/jbc.271.13.7802
- Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., & Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(7), 574–85. doi:10.1038/nrm2184
- Borutinskaite, V. V., Magnusson, K. E., & Navakauskiene, R. (2011). α -Dystrobrevin distribution and association with other proteins in human promyelocytic NB4 cells treated for granulocytic differentiation. *Molecular Biology Reports*, 38(5), 3001–3011.
- Borutinskaite, V. V., Magnusson, K. E., & Navakauskiene, R. (2012). Histone deacetylase inhibitor BML-210 induces growth inhibition and apoptosis and regulates HDAC and DAPC complex expression levels in cervical cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 1–8. doi:10.1007/s11033-012-1892-5

- Bragg, A. D., Das, S. S., & Froehner C., S. (2011). Dystrophin-Associated Protein Scaffolding in Brain Requires α - Dystrobrevin, *21*(10), 695–699. doi:10.1097/WNR.0b013e32833b0a3b.Dystrophin-Associated
- Broeders, S., Huber, I., Grohmann, L., Berben, G., Taverniers, I., Mazzara, M., ... Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, *37*(2), 115–126. doi:10.1016/j.tifs.2014.03.008
- Burke, B., & Stewart, C. L. (2014). Chapter One – Functional Architecture of the Cell's Nucleus in Development, Aging, and Disease. *Current Topics in Developmental Biology*, *109*, 1–52.
- Busch, H. (2012). *The Cell Nucleus, Volume 2*. Elsevier. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=xN3VDD7oMK8C&pgis=1>
- Campbell, K. P., & Kahl, S. D. (1989). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*, *338*(6212), 259–262. doi:10.1038/338259a0
- Ceccarini, M., Macioce, P., Panetta, B., & Petrucci, T. C. (2002). Expression of dystrophin-associated proteins during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Neuromuscular Disorders*, *12*, 36–48. doi:10.1016/S0960-8966(01)00230-9
- Cui, Z., & Dimario, P. J. (2007). RNAi Knockdown of Nopp140 Induces Minute -like Phenotypes in Drosophila, *18*(June), 2179–2191. doi:10.1091/mbc.E07
- Davies, K. E., & Nowak, K. J. (2006). Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(10), 762–73. doi:10.1038/nrm2024
- DiNatale, B. C., & Perdew, G. H. (2010). Protein function analysis: Rapid, cell-based SiRNA-mediated ablation of endogenous expression with simultaneous ectopic replacement. *Cytotechnology*, *62*, 95–100. doi:10.1007/s10616-010-9270-4
- Ehmsen, J., Poon, E., & Davies, K. (2002). The dystrophin- complex The Dystrophin-Associated Protein Comple ex, *2002*, 2801–2803.
- Enigk, R. E., & Maimone, M. M. (1999). Differential expression and developmental regulation of a novel alpha-dystrobrevin isoform in muscle. *Gene*, *238*(2), 479–488.
- Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1991). Membrane O rganization of the Dystrophin- G lycoprotein, *66*(Figure 1).
- Fairclough, R. J., Wood, M. J., & Davies, K. E. (2013). Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nature Reviews. Genetics*, *14*(6), 373–8. doi:10.1038/nrg3460

- Fuentes-Mera, L., Rodríguez-Muñoz, R., González-Ramírez, R., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2006). Characterization of a novel Dp71 dystrophin-associated protein complex (DAPC) present in the nucleus of HeLa cells: members of the nuclear DAPC associate with the nuclear matrix. *Experimental Cell Research*, *312*(16), 3023–35. doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.002
- Ganame, J., Ayres, N. A., & Pignatelli, R. H. (2006). Left Ventricular Noncompaction , a Recently Recognized Form of Cardiomyopathy, *J*, 119–124.
- Gonzalez-Ramirez, R., Morales-Lazaro, S. L., Tapia-Ramirez, V., Mornet, D., & Cisneros, B. (2008). Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cells: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, *105*(3), 735–745. doi:10.1002/jcb.21870
- Grady, R. M., Grange, R. W., Lau, K. S., Maimone, M. M., Nichol, M. C., Stull, J. T., & Sanes, J. R. (1999). Role for α -dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies, *J*(August), 215–220.
- Haenggi, T., & Fritschy, J.-M. (2006). Role of dystrophin and utrophin for assembly and function of the dystrophin glycoprotein complex in non-muscle tissue. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *63*(14), 1614–31. doi:10.1007/s00018-005-5461-0
- He, F., & Dimario, P. (2011). Structure and Function of Nopp140 and Treacle. In M. O. J. Olson (Ed.), *The Nucleolus* (pp. 253–278). New York, NY: Springer New York. doi:10.1007/978-1-4614-0514-6
- Hebert, M. D. (2013). Signals controlling Cajal body assembly and function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(7), 1314–7. doi:10.1016/j.biocel.2013.03.019
- Hebert, M. D., Szymczyk, P. W., Shpargel, K. B., & Matera, a G. (2001). Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Genes & Development*, *15*(20), 2720–9. doi:10.1101/gad.908401
- Hernández-Ibarra, J. A., Laredo-Cisneros, M. S., Santamaría-Guayasamín, N., Mondragón-González, R., & Cisneros, B. Localization of α -Dystrobrevin in Cajal Bodies and Nucleoli: a New Role for α -Dystrobrevin in the Structure/Stability of the Nucleolus. *Datos Bajo Revisión*.
- Holzfeind, P. J., Ambrose, H. J., Newey, S. E., Nawrotzki, R. a., Blake, D. J., & Davies, K. E. (1999). Tissue-selective Expression of α -Dystrobrevin Is Determined by Multiple Promoters. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(10), 6250–6258. doi:10.1074/jbc.274.10.6250
- Hoshino, S., Ohkoshi, N., Ishii, A., & Shoji, S. (2002). The expression of alpha-dystrobrevin and dystrophin during skeletal muscle regeneration. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *23*(2), 131–138.

- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, a. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, 6(4), 279–84. doi:10.1038/sj.gene.6364190
- Ichida, F., Tsubata, S., Bowles, K. R., Haneda, N., Uese, K., Miyawaki, T., ... Towbin, J. a. (2001). Novel Gene Mutations in Patients With Left Ventricular Noncompaction or Barth Syndrome. *Circulation*, 103(9), 1256–1263. doi:10.1161/01.CIR.103.9.1256
- Isaac, C., Yang, Y., & Meier, U. T. (1998). Nopp140 Functions as a Molecular Link Between the Nucleolus and the Coiled Bodies, 142(2), 319–329.
- Kulyte, A., Navakauskiene, R., Treigyte, G., Gineitis, A., Bergman, T., & Magnusson, K.-E. (2002). Characterization of human alpha-dystrobrevin isoforms in HL-60 human promyelocytic leukemia cells undergoing granulocytic differentiation. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4195–4205. doi:10.1091/mbc.E02
- Lee, C.-C., Tsai, Y.-T., Kao, C.-W., Lee, L.-W., Lai, H.-J., Ma, T.-H., ... Lo, S. J. (2014). Mutation of a Nopp140 gene *dao-5* alters rDNA transcription and increases germ cell apoptosis in *C. elegans*. *Cell Death & Disease*, 5, e1158. doi:10.1038/cddis.2014.114
- Machyna, M., Heyn, P., & Neugebauer, K. M. (2013). Cajal bodies: where form meets function. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 4(1), 17–34. doi:10.1002/wrna.1139
- Martínez-Vieyra, I. a., Vásquez-Limeta, A., González-Ramírez, R., Morales-Lázaro, S. L., Mondragón, M., Mondragón, R., ... Cisneros, B. (2013). A role for β -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833, 698–711. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.11.019
- McEwan, I. J. (2009). *The Nuclear Receptor Superfamily: Methods and Protocols*.
- Mizuno, Y., Thompson, T. G., Guyon, J. R., Lidov, H. G., Brosius, M., Imamura, M., ... Kunkel, L. M. (2001). Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11), 6156–6161.
- Morimoto, M., & Boerkoel, C. F. (2013). The role of nuclear bodies in gene expression and disease. *Biology*, 2(3), 976–1033. doi:10.3390/biology2030976
- Navakauskienė, R., Treigyte, G., Borutinskaitė, V.-V., Matuzevičius, D., Navakauskas, D., & Magnusson, K.-E. (2012). Alpha-Dystrobrevin and its associated proteins in human promyelocytic leukemia cells induced to apoptosis. *Journal of Proteomics*, 75(11), 3291–303. doi:10.1016/j.jpro.2012.03.041
- Nigro, V., & Piluso, G. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Spectrum of muscular dystrophies associated with sarcolemmal-protein genetic defects ☆.

- O'Day, D., & Catalano, A. (2013). *Proteins of the Nucleolus Regulation, Translocation, & Biomedical Functions*. Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-007-5818-6
- Olson, M. J., Hingorani, K., & Szebeni, A. (2002). Conventional and Nonconventional Roles of the Nucleolus, 219.
- Paulin, D., & Li, Z. (2004). Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Experimental Cell Research*, 301(1), 1–7. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.004
- Pawlikowski, B. T., & Maimone, M. M. (2008). alpha-Dystrobrevin isoforms differ in their colocalization with and stabilization of agrin-induced acetylcholine receptor clusters. *Neuroscience*, 154(2), 582–94. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.052
- Peters, M. F., O'Brien, K. F., Sadoulet-Puccio, H. M., Kunkel, L. M., Adams, M. E., & Froehner, S. C. (1997). -Dystrobrevin, a New Member of the Dystrophin Family: IDENTIFICATION, CLONING, AND PROTEIN ASSOCIATIONS. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31561–31569. doi:10.1074/jbc.272.50.31561
- Rees, M. L. J., Lien, C. F., & Gerecki, D. C. (2007). Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues. *Neuromuscular Disorders*, 17(2), 123–134. doi:10.1016/j.nmd.2006.11.003
- Reyes, J. (2013). CINVESTAV analiza la distrofia muscular de Duchenne. *Alianzatex, MTI Texcoco*. Retrieved from <http://www.alianzatex.com/nota.php?nota=N0025162>
- Schreiber, K. H., & Kennedy, B. K. (2013). When lamins go bad: Nuclear structure and disease. *Cell*, 152(6), 1365–1375. doi:10.1016/j.cell.2013.02.015
- Sheffield, F. M. L. (1944). The Nucleolus. *Nature*, 153, 687–688. doi:10.1038/153687a0
- Sherman, P. M. (1998). OMIM ENTRY-602394 NUCLEOLAR AND COILED-BODY PHOSPHOPROTEIN 1; NOLC1. Retrieved March 13, 2015, from <http://www.omim.org/entry/602394?search=nolc1&highlight=nolc1>
- Sleeman, J. E., Ajuh, P., & Lamond, a I. (2001). snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 24), 4407–4419.
- Sleeman, J. E., & Trinkle-Mulcahy, L. (2014). Nuclear bodies: new insights into assembly/dynamics and disease relevance. *Current Opinion in Cell Biology*, 28(Figure 1), 76–83. doi:10.1016/j.ceb.2014.03.004
- Valasek, M. a, & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29, 151–159. doi:10.1152/advan.00019.2005

- Villarreal-Silva, M., Suarez-Sanchez, R., Rodriguez-Muñoz, R., Mornet, D., & Cisneros, B. (2010). Dystrophin Dp71 is critical for stability of the DAPs in the nucleus of PC12 cells. *Neurochemical Research*, 35(3), 366–373. doi:10.1007/s11064-009-0064-z
- Wallace, G. Q., & McNally, E. M. (2009). Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and repair in the muscular dystrophies. *Annual Review of Physiology*, 71, 37–57. doi:10.1146/annurev.physiol.010908.163216
- Wang, Y., Chen, B., Li, Y., Zhou, D., & Chen, S. (2011). PNR1 accumulates in the nucleolus by interaction with B23/nucleophosmin via its nucleolar localization sequence. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1813(1), 109–119. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.017
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation, 39(1), 1–11.