



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS DEL POLITÉCNICO
NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**“ESTUDIO DE LAS MUTACIONES C272Y/E299del DE LA Dp71 EN
UN MODELO CELULAR NEURONAL”**

TESIS

Que presenta

M en C. CLAUDIA IVETTE RUGERIO MARTÍNEZ

Para obtener el título de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Directores de la tesis

DRA. MARIA DEL ROCIO SUÁREZ SÁNCHEZ

DR. BULMARO CISNEROS VEGA

Ciudad de México

Septiembre 2022

CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne	3
1.2 La Distrofina	4
1.2.1 Estructura de la distrofina	4
1.2.1.1 Dominio de unión a actina	4
1.2.1.2 Dominio central rod	5
1.2.1.3 Región rica en cisteínas	5
1.2.1.3 Región carboxiterminal	6
1.3 Complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC)	6
1.3.1 Distroglicano	7
1.3.2 Distrobrevinas	7
1.3.3 Sintrofinas	8
1.3.4 Sarcoglicanos	8
1.3.5 Sarcospan	8
1.4 Isoformas de la distrofina	9
1.5 La Dp71	11
1.5.1 Isoformas de la Dp71	13
1.5.2 La transportación nuclear de la Dp71.	15
1.5.3 Funciones de la Dp71	17
1.5.3.1 Adhesión celular	17
1.5.3.2 Homeostasis de iones y agua	18
1.5.3.3 Ciclo celular	19
1.5.3.4 Estabilidad de la morfología nuclear.	19
1.6 Dominios asociados a Lámina (LADs)	21
1.7 Complejo REST	22
2 ANTECEDENTES	25
2.1 Mutaciones en la Dp71 y déficit cognitivo	25
2.2 La asociación de la Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf	28
3 JUSTIFICACIÓN	30
4 HIPÓTESIS	31
5 OBJETIVO GENERAL	31

5.1 Objetivos específicos	31
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	32
7 MATERIAL Y MÉTODOS	34
8 RESULTADOS	39
8.1 Dp71-C272Y y Dp71-E299del forman agregados en células neuronales.	39
8.2 Análisis bioinformático de Dp71-C272Y y Dp71-E299del	42
8.3 Los agregados Dp71-C272Y y Dp71-E299del tienen una localización celular diferencial y causan alteraciones en la morfología celular y nuclear.	50
8.4 Dp71-C272Y/E299del causa la deslocalización subcelular de β - dístroglicano	54
8.5 Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la lámina nuclear.	56
8.7 La Dp71 participa en la regulación de la expresión de genes RE-1 a través de su asociación con Braf35.	62
8.8 La Dp71 regula la expresión de sinapsina.	67
9 DISCUSIÓN	69
10 CONCLUSIÓN	75
11 PERSPECTIVAS	77
12 BIBLIOGRAFÍA	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Complejo de proteínas asociadas a distrofina.	9
Figura 2. Las isoformas de la distrofina.	11
Figura 3. Regiones de la Dp71.	13
Figura 4. Isoformas de la Dp71 generadas por splicing alternativo.	14
Figura 5. Transporte nuclear de la Dp71.	17
Figura 6. Complejo REST.	24
Figura 7. Dp71-C272Y y Dp71-E299del provocan la agregación de Dp71 en líneas celulares neuronales.	41
Figura 8. Efectos de las mutaciones C272Y y E299del sobre la estructura de la Dp71.	43
Figura 9. Analisis Ramachandran de los modelos Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del.	45
Figura 10. Sobrelapamiento estructural de los modelos Dp71-C272Y y Dp71-E299del.	48
Figura 11. Análisis del efecto de la mutación Dp71-C272Y empleando el servidor DynaMut.	50
Figura 12. Efecto de los agregados Dp71-C272Y y Dp71-E299del sobre la morfología celular y nuclear.	54
Figura 13. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de β-distroglicano en líneas celulares neuronales.	55
Figura 14. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la lámina B1 en líneas celulares neuronales	57
Figura 15. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la lámina A/C en líneas celulares neuronales.	59
Figura 16. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la heterocromatina revelada por la marca epigenetica H3K4me2.	61
Figura 17. Dp71 se asocia con Braf35 y afecta su distribución.	64
Figura 18. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causa la deslocalización de iBraf ...	66
Figura 19. La Dp71 participa en la regulación de la expresión de sinapsina.	68

Figura 20. Modelo propuesto de los efectos de la expresión de la Dp71-C272Y.....	76
---	-----------

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Las isoformas Dp427 de acuerdo a su expresión tejido específica.	10
Tabla 2. Las isoformas de la distrofina codificadas a partir de promotores internos, de acuerdo a su expresión tejido específico.....	10
Tabla 3. Oligonúcleotidos empleados en este estudio.....	34
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para PCR punto final y tiempo real....	38
Tabla 5. Parámetros de los modelos estructurales de las proteínas Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del obtenidos en el servidor I-TASSER.....	44
Tabla 6. Analisis de las estructuras de las proteínas Dp71 y las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del mediante Ramachandran plots.....	46
Tabla 7. Indices obtenidos en el alineamiento estructural de los modelos estructurales de las proteínas Dp71 y las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del.	46

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez agradezco el apoyo que me brindo en los momentos alegres y adversos que enfrente en esta etapa. Le agradezco el abrirme las puertas al Laboratorio de Medicina Genómica del Instituto Nacional de Rehabilitación y todo el conocimiento que compartió amablemente conmigo. Además, le agradezco su paciencia para guiarme y enseñarme a conducirme con calma por la vida.

Al Dr. Oscar Hernandez Hernandez agradezco tambien todo el conocimiento que pacientemente compartio conmigo. A todas las personas que me apoyaron e impulsaron en el Laboratorio de Medicina Genomica, a la QFB. Mireya Murillo, IBT. Fabiola Borbolla, al M. en C. Luis Agonizantes, al M. en C. Daniel Celis y a Luz Mendez.

A mi increíble amigo el Dr. Sergio Rangel Guerrero agradezco su invaluable apoyo en este tiempo, Sergio es un hombre de mas interesante y un ser humano valioso, de quien es un gusto aprender y con quien siempre es grato conversar.

A mis amigos y a mi gran familia por el cariño y apoyo que me han dado.

Al Dr. Bulmaro Cisneros Vega por la oportunidad que me brindo al abrirme las puertas a su equipo, y a mis asesores de tesis, al Dr. Efrain Garrido Guerrero, al Dr. Jaime García Mena y al Dr. Guillermo Elizondo Azuela por el tiempo que dedicaron a este proyecto y por sus valiosas aportaciones, muchas gracias.

A todas las personas que me apoyaron e impulsaron, les agradezco enormemente y deseo que ese agradecimiento se torne en una bendición en sus vidas, muchas gracias.

Esta tesis fue financiada por CONACyT 179894.

DEDICATORIA

A Felipe Rugerio por darnos todo y lo mejor de el, a Angelica Martínez por el gran impulso que me ha dado y por ser una gran mamá, a mis hermanos Carla Monica y Luis Felipe por ser luz en mi vida.

Mis esfuerzos están dedicados a ti mi pequeño Ricardo Zayd:

Por siempre agradeceré que vinieras a llenar mi vida de magia, de alegría y paz. Llegaste en esta etapa de mi vida y revolucionaste mi mundo. Si algún día te encuentras con este escrito, quiero que sepas que te estoy escuchando reír a carcajadas y aplaudir, que no te gusta compartir la comida y no tienes problemas en compartir los juguetes, te gusta escuchar la numeración en inglés y en alemán, y dices “six” y “eight” claramente pero, no dices nada en español. A veces te gusta ver películas mientras vas y vienes por las recamaras, mientras rayas las paredes de aquí y de allá. Te gusta tu cabello largo y te encanta el agua, aunque te desagrada cuando lavo tu cabello y tu cara. Eres increíblemente dulce y tierno y estoy obsesionada contigo, hemos pasado algunos momentos complicados pero, con ayuda de Dios y de nuestra querida familia hemos salido adelante.

Eres el amor de mi vida, eres increíble así como eres y deseo enseñarte a ser tu mismo en todo momento, a amarte, aceptarte, comprenderte, creer en ti y respetarte, y con ese mismo respeto tratar a los demás. Cuando supe que estabas creciendo en mí, nunca imagine que sería contigo tan feliz, espero que mi felicidad se desborde en tu vida y a pesar de los momentos adversos sepas encontrar la mejor manera de seguir adelante, de agradecer, de disfrutar tu vida y de ser feliz, yo estare ahí siempre para ti, creando un espacio mejor para ti.

Ti amerò finché le stelle non brillano

RESUMEN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad neuromuscular causada por mutaciones en el gen *DMD* que provocan la ausencia de la distrofina. La Dp71 es la isoforma más abundante en el cerebro y se ha reportado que diversas mutaciones en la Dp71 se asocian con alteraciones cognitivas. La Dp71 se localiza en el citoplasma y en el núcleo, en donde cumple funciones estructurales al asociarse con β -dístroglicano, con proteínas de la lámina y de la envoltura nuclear. Interesantemente, se ha reportado la interacción *in vitro* de la Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf, que forman parte del complejo LSD-coREST y que regulan la expresión de genes neuronales específicos a través de mecanismos epigenéticos. Se sabe que la Dp71 participa en la diferenciación neuronal, sin embargo, se desconocen los procesos involucrados y los mecanismos que explican el desarrollo de las alteraciones cognitivas en los pacientes con DMD. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de la expresión de las mutaciones de C272Y y E299del de la Dp71 reportadas en pacientes con DMD en modelos celulares neuronales. Encontramos que dichas mutaciones provocan la formación de agregados de la Dp71, que se localizan en el núcleo y en el citoplasma. El análisis bioinformático indica que las mutaciones analizadas causan alteraciones estructurales en la Dp71, lo que podría explicar la formación de los agregados. Demostramos que las mutantes C272Y y E299del de la Dp71 causan la deslocalización de β -dístroglicano, lámina B1 y lámina A/C, y alteran el patrón de localización de la marca epigenética H3K9me2. Adicionalmente, comprobamos la interacción de la Dp71 con Braf35, con quien colocaliza durante la diferenciación neuronal, y encontramos que la expresión de las proteínas mutantes causa la deslocalización de Braf35 e iBraf. Finalmente, demostramos que la Dp71 tiene un papel en la regulación de la expresión de sinapsina, un gen responsivo a Braf35 e iBraf, ya que la mutación C272Y evitó el aumento en la expresión del transcrito de sinapsina ante un estímulo de diferenciación neuronal. En conjunto, estos hallazgos soportan la participación de la Dp71 en la regulación de genes neuronales y constituyen un avance en la comprensión de los mecanismos asociados a las alteraciones del sistema nervioso de los pacientes con DMD.

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease caused by mutations in the *DMD* gene that results in the lack of dystrophin. Dp71 is the major *DMD* gene product expressed in the brain and mutations are associated with cognitive impairment. Dp71 is localized in cytoplasm and nucleus, thus Dp71 has structural functions by associating with β -dystroglycan, proteins of nuclear lamina and nuclear envelope. Interestingly, *in vitro* assays demonstrates Dp71 interaction with Braf35 and iBraf proteins, members of LSD-coREST complex and that regulate the expression of specific neuronal genes through epigenetic mechanisms. Dp71 participates in neuronal differentiation, however, the processes involved and the mechanisms that explain the development of cognitive alterations in DMD patients are unknown. The aim of this study was to analyze the effects of the expression Dp71-C272Y and Dp71-E299del mutations reported in patients with DMD in neuronal cell models. We found that these mutations cause Dp71 aggregates, which are located in nucleus and cytoplasm. Bioinformatic analysis indicates that mutations analyzed cause structural alterations of Dp71, which could explain the formation of the aggregates. We show that Dp71 mutants cause delocalization of β -dystroglycan, lamina B1 and lamina A/C, and alter the localization pattern of the epigenetic mark, H3K9me2. Additionally, we verified the interaction of Dp71 with Braf35, with whom it colocalizes during neuronal differentiation, and that the expression of the mutant proteins causes the delocalization of Braf35 and iBraf. Finally, we show that Dp71 has a role in the regulation of synapsin expression, a gene responsive to Braf35 and iBraf, since the C272Y mutation prevented the increase of the expression of the synapsin transcript with a neuronal differentiation stimulus. Taken together, these findings support the involvement of Dp71 in the regulation of neuronal genes and constitute an advance in the understanding of the mechanisms associated with alterations in the nervous system of DMD patients.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es un desorden genético ligado al cromosoma X, caracterizado por degeneración muscular progresiva y presenta una incidencia de 1 por cada 5,000 varones nacidos vivos (Moat *et al.*, 2013). La debilidad muscular que es el principal síntoma de la DMD y aparece usualmente entre los 2 y 3 años, afectando músculos proximales y posteriormente, músculos distales. Usualmente, los músculos inferiores se ven afectados antes que los músculos superiores, causando dificultad para caminar, correr y saltar. La debilidad muscular progresiva afecta al corazón y los músculos respiratorios, causando la muerte por insuficiencia respiratoria o cardiomiopatía cerca de los 20 años (Birnkrant *et al.*, 2018). Alrededor de un tercio de los pacientes DMD presentan algún grado de discapacidad cognitiva principalmente en tres áreas: atención, aprendizaje verbal y memoria, e interacción emocional; además diversas investigaciones enfatizan la alta incidencia en pacientes con DMD de algunos desordenes neuropsiquiátricos como trastorno de espectro autista, déficit de atención, hiperactividad, desorden obsesivo compulsivo, depresión, ansiedad, entre otros (Hendriksen & Vles, 2008; Lee *et al.*, 2018).

La DMD es causada por mutaciones en el gen *DMD* que codifica para la proteína distrofina y que resultan en la ausencia parcial o total de esta proteína. Diversos reportes han analizado ampliamente las mutaciones en el gen *DMD*, y a la fecha se sabe que las mutaciones más frecuentes son grandes deleciones; sin embargo, también hay deleciones, inserciones y mutaciones cortas, incluyendo mutaciones puntuales (Cunniff *et al.*, 2009). En un estudio en una cohorte de 200 pacientes DMD en el que se analizó la frecuencia de los distintos tipos de mutaciones causantes de DMD, se reportó que las deleciones fueron las mutaciones más comunes (65.8%), seguidas de las duplicaciones (13.6%), mutaciones sin sentido (9.2%), microdeleciones/inserciones (4.9%) y mutaciones que afectan el proceso de *splicing* (3.8%) (Magri *et al.*, 2011). Por otra parte, en una cohorte de 93 pacientes DMD en los que no se encontraron grandes deleciones o inserciones, pero que por

inmunofluorescencia o *western blot* mostraron una expresión de distrofina menor al 3%, se reportó que el 73% de los pacientes presentaron pequeñas mutaciones, entre las que se encuentran, mutaciones sin sentido (36.5%), microdeleciones e inserciones (29%), y mutaciones en sitios de *splicing* (7.5%) (Birnkrant *et al.*, 2018).

En algunos casos, las mutaciones en el gen *DMD* provocan un fenotipo menos severo, clínicamente conocido como Distrofia Muscular de Becker. En estos casos, las mutaciones pueden generar formas truncas de la distrofina, parcialmente funcionales o expresadas en bajos niveles en comparación al músculo sano, pero en niveles más altos que en la DMD (Cunniff *et al.*, 2009), por lo que el fenotipo es menos severo.

1.2 La Distrofina

El gen *DMD* se localiza en el Xp21, es el gen más largo identificado a la fecha y corresponde al 0.1% del genoma humano. El gen *DMD* está formado por 79 exones y su gran tamaño se debe a la presencia de un gran número de intrones que representan el 99% de *locus* genómico. Este gen codifica para un transcrito de 14 kb (Gherardi *et al.*, 2017), y su traducción genera una proteína de 3,685 aminoácidos con un peso molecular de 427 kDa, llamada Dp427, la cual se localiza principalmente en los músculos cardíaco y esquelético, y en menor cantidad en el cerebro (Tadayoni *et al.*, 2012).

1.2.1 Estructura de la distrofina

La distrofina de longitud completa, Dp427 comprende principalmente 4 regiones:

1.2.1.1 Dominio de unión a actina

A través de distintos ensayos *in vitro* se demostró que los residuos 1-233 de distrofina permiten la unión con F-actina, a través de un dominio que es estructural y funcionalmente homólogo al dominio de unión de α -actinina, una proteína que pertenece a la superfamilia de espectrininas que contribuye a regular la longitud y tensión dentro de las fibras de estrés, y que en células no musculares se encuentra

a lo largo de los filamentos de actina (Hemmings *et al.*, 1992; Sjöblom *et al.*, 2008; Way *et al.*, 1992). La distrofina pertenece a la superfamilia de espectrinas y estas proteínas se caracterizan por su extremo N-terminal que corresponde a un dominio de unión de actina, compuesto de dos dominios homólogos de calponina y seguidos de múltiples repetidos tipo espectrina (Tadayoni *et al.*, 2012).

1.2.1.2 Dominio central rod

Está constituido por 24 unidades similares a la triple hélice de repetidos tipo espectrina, interrumpidas por cuatro regiones ricas en prolina. El amplio número de repetidos tipo espectrina le confiere longitud y flexibilidad a la estructura de la distrofina (Perronnet & Vaillend, 2010).

1.2.1.3 Región rica en cisteínas

Comprende del exón 63 al 69, e integra a su vez los dominios de unión a distroglicano: el dominio WW, dos motivos EF y el dominio ZZ.

El dominio WW es un dominio modular de 38 a 40 aminoácidos que contiene dos triptófanos altamente conservados espaciados por 20-22 aminoácidos. Este dominio media la unión con proteínas que tengan la secuencia consenso PPXY. En un estudio se demostró que 15 aminoácidos (KNMTPYRSPPPYVPP) que corresponden a los residuos 881-895 ubicados en el extremo c-terminal de β -distroglicano y que contienen la secuencia PPXY, son necesarios y suficientes para la asociación directa con distrofina (Jung *et al.*, 1995). Otro estudio reportó que los dominios WW y EF de distrofina se unen directamente al dominio c-terminal de β -distroglicano; de manera que, aunque la interacción ocurre inicialmente a través del dominio WW de distrofina, este no es suficiente para la unión estable con β -distroglicano, y es necesario el dominio EF para estabilizar la unión (Chung & Campanelli, 1999; Grabarek, 2006; Huang *et al.*, 2000; Rentschler *et al.*, 1999).

El dominio ZZ tiene dos regiones Cys-X₂-Cys que forman 2 nudillos característicos de los dedos de zinc en presencia de iones de Zn. Cada nudillo se coloca en un arreglo tetraédrico con cuatro ligandos de cisteína o histidina (Ponting *et al.*, 1996).

El dominio ZZ se localiza en los aminoácidos 3307-3354 y se ha reportado que también es necesario para la unión completa de distrofina con β -dystroglicano. Se ha reportado que los residuos 3326-3332 (YRSLKHF) y algunos residuos de cisteína, por ejemplo la cisteína 3340, forman parte crucial de la región de contacto entre las dos proteínas (Hnia *et al.*, 2007; Ishikawa-Sakurai *et al.*, 2004; Vulin *et al.*, 2014). Por otra parte, el dominio ZZ se une a calmodulina de manera dependiente de calcio. Esta proteína activa cinasas y fosfatasas e inhibe la unión de distrofina con F-actina, por lo que esta molécula podría modular la unión de distrofina al citoesqueleto (Anderson *et al.*, 1996).

1.2.1.3 Región carboxiterminal

Contiene una α -hélice, seguida por dos motivos ricos en leucina. Esta región contiene el sitio de unión con distrobrevina, sintrofina y otras proteínas asociadas a distrofina (Blake *et al.*, 2002).

En función de estos dominios, la distrofina se asocia con diversas proteínas formando el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), que es esencial para mantener la integridad de la membrana durante la contracción muscular y provee de un andamio para moléculas que participan en señalización. La disfunción o ausencia de distrofina promueve a su vez la desintegración de este complejo (Perronnet & Vaillend, 2010).

1.3 Complejo de proteínas asociado a distrofina (DAPC)

El complejo de proteínas asociado a distrofina está formado por un grupo de proteínas que une al citoesqueleto de actina con la matriz extracelular, ya que el complejo $\alpha\beta$ -dystroglicano se une a laminina con alta afinidad y distrofina se une con actina y filamentos intermedios del citoesqueleto (Matsumura & Campbell, 1994). En el músculo esquelético, este complejo se compone de las proteínas integrales de membrana, dystroglicano (α y β), sarcoglicanos (α , β , γ , δ) y sarcospan, y las proteínas citoplasmáticas, sintrofina y distrobrevina (Blake *et al.*, 2002) (Fig. 1).

1.3.1 Distroglicano

El gen *DAG1* que codifica para distroglicano, se compone de dos exones y produce un precursor proteico que es procesado por una proteasa que da lugar a las subunidades α y β -distroglicano. La subunidad α -distroglicano tiene una masa molecular de 156 kDa en músculo y 120 kDa en cerebro, se localiza en la matriz extracelular donde se asocia con β -distroglicano a través de interacciones covalentes. Por otra parte, β -distroglicano tiene una masa molecular de 46 kDa y presenta un dominio transmembranal que se inserta hacia la membrana plasmática con el C-terminal del lado del citoplasma (Matsumura & Campbell, 1994).

El β -distroglicano se une con distrofina a través de su dominio rico en prolina (PPXY), y se ha reportado que la fosforilación de los residuos de tirosina dentro y adyacente a este dominio evitan su interacción con distrofina (Ilsley *et al.*, 2001).

1.3.2 Distrobrevinas

Las distrobrevinas son proteínas de 87 a 94 kDa que se unen con distrofina directamente a través de sus dominios carboxilo terminal. α y β -distrobrevina son codificadas por los genes *DTNA* y *DTNB*, los cuales están localizados en los cromosomas 18 y 2, respectivamente (Blake *et al.*, 2002).

La α -distrobrevina se expresa en músculo cardíaco y esquelético, pulmón y cerebro. Por procesamiento alternativo se generan las isoformas de α -distrobrevina-1, -2 y -3, de las cuales solo α -distrobrevina-1 y -2 contienen dos sitios de unión a distrofina y sintrofina (Newey *et al.*, 2000). Un estudio en una cohorte de pacientes DMD reportó la reducción de α -distrobrevina 1 y 2 en el sarcolema en todas las fibras, mientras que se observó un incremento de α -distrobrevina 2 en el citoplasma (Compton *et al.*, 2005). Por su parte, β -distrobrevina se expresa en tejidos no musculares, como cerebro, pulmón, riñón e hígado; forma complejos específicos con la distrofina corta Dp71 y se asocia con diferentes sintrofinas (Blake *et al.*, 2002).

1.3.3 Sintrofinas

Son proteínas adaptadoras, tienen una masa molecular de 59 kDa y diversas isoformas, α , β 1, β 2, γ 1 y γ 2. Las sintrofinas están involucradas en funciones críticas del sistema nervioso central Debido a su interacción con diversas moléculas estructurales y de señalización a través del dominio PDZ, por ejemplo, nNOS, acuaporina 4 (AQP4), canales de sodio activados por voltaje y diversas cinasas. Un estudio en una cohorte de pacientes DMD reportó una desregulación de las sintrofinas, así como de sus proteínas de unión (Compton *et al.*, 2005).

1.3.4 Sarcoglicanos

Los sarcoglicanos (α , β , γ , y δ) son glicoproteínas transmembranales que forman un complejo que se une con distrofina, distroglicano, α -distrobrevina, sintrofina, la sintetasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) y sarcospan. Diversos estudios apuntan a que los sarcoglicanos podrían tener un rol en la transducción de señales intracelulares debido a que tienen sitios potenciales de fosforilación en su dominio citoplasmático y por su interacción con proteínas como nNOS; además podrían tener un rol en el mantenimiento de la estructura del DAPC (Ervasti, 2007; Sandonà & Betto, 2009).

1.3.5 Sarcospan

Es una proteína de 25 kDa que se expresa en muchos tejidos no musculares y es muy abundante en músculo esquelético. El Sarcospan es un importante regulador de la adhesión celular muscular y la regeneración. Un estudio en un modelo murino de DMD demostró que la sobreexpresión de sarcospan mejora la patología y restaura la unión de las células musculares con laminina. Por otra parte, sarcospan regula la glicosilación de α -distroglicano permitiendo una interacción fuerte entre α -distroglicano y laminina, y se une directamente a los sarcoglicanos, estabilizando el complejo que forman (Marshall & Crosbie-Watson, 2013). Se ha reportado en pacientes DMD, que la expresión de sarcospan se reduce en el músculo, sugiriendo que la localización membranal de sarcospan es dependiente de la expresión de distrofina (Crosbie *et al.*, 1997).

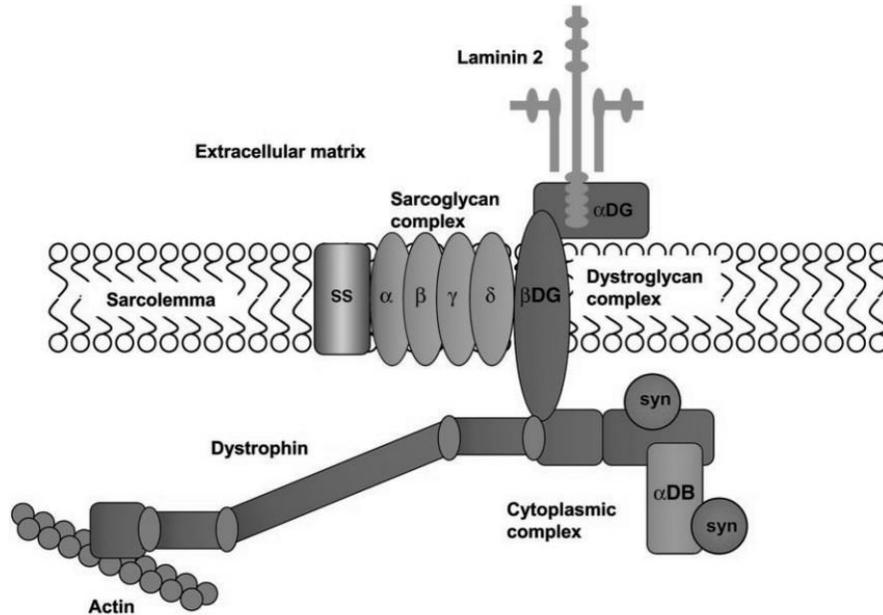


Figura 1. Complejo de proteínas asociadas a distrofina.

El α -DG es un receptor de ligandos de la matriz extracelular que se une a laminina-2 y a través de su dominio carboxilo terminal se une a β -DG. Por su parte, el extremo C-terminal de β -dístroglicano contiene varios residuos de prolina que permiten la unión directa con la región rica en cisteínas de distrofina. Adicionalmente, la región N-terminal de la distrofina de longitud completa tiene varios sitios de unión a F-actina, de esta manera el DAPC sirve de puente para conectar el citoesqueleto y la matriz extracelular garantizando la estabilidad de la membrana y diversas funciones en el músculo esquelético en las que se involucran las proteínas que forman este complejo (Blake *et al.*, 2002).

1.4 Isoformas de la distrofina

A la fecha se han descrito diversas isoformas de la distrofina por uso de promotor-tejido específico. Tres de estas isoformas comparten 78 exones y son distrofinas de longitud completa (Dp427), pero se transcriben a partir de promotores independientes ubicados en el primer exón, por lo que el primer exón de cada isoforma es único. Estas isoformas se han nombrado de acuerdo al sitio de mayor expresión de la proteína Dp427b, Dp427m y Dp427p (Gherardi *et al.*, 2017) (Tabla 1) (Fig. 2).

	Localización
Cerebro (b)	Neuronas corticales e hipocampo, músculo cardíaco y esquelético.
Musculo (m)	Músculo cardíaco y esquelético, y células gliales.
Células de Purkinje (p)	Neuronas cerebelares de Purkinje

Tabla 1. Las isoformas Dp427 de acuerdo a su expresión tejido específica.

Otras isoformas de la distrofina son codificadas a partir de promotores internos que generan distrofinas que difieren en estructura y patrones de expresión, y son nombradas de acuerdo a su masa molecular. Los promotores se localizan en el intrón 29 (Dp260), en el intrón 44 (Dp140), en el intrón 55 (Dp116) y en el intrón 62 (Dp71 y Dp40) (Perronnet & Vaillend, 2010) (Tabla 2) (Fig. 2).

	Localización
Dp260	Retina, cerebro y músculo cardíaco.
Dp116	Sistema nervioso central e hígado.
Dp140	Células Schwann.
Dp71	Tejidos no musculares incluidos el cerebro, hígado, riñones y pulmones
Dp40	Cuerpos celulares y distribuida en dendritas de neuronas del hipocampo

Tabla 2. Las isoformas de la distrofina codificadas a partir de promotores internos, de acuerdo a su expresión tejido específico.

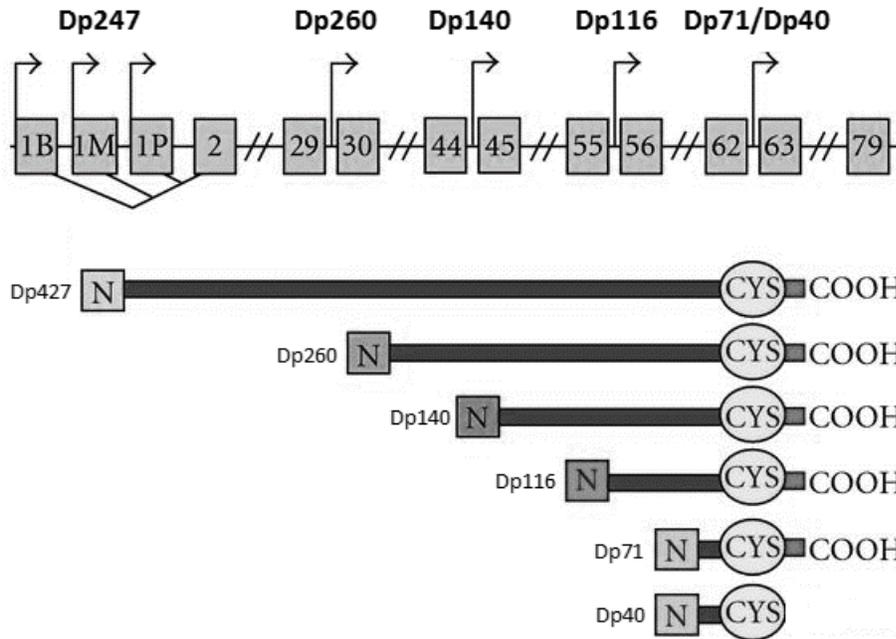


Figura 2. Las isoformas de la distrofina.

Se han identificado diversas isoformas de la distrofina y debido al uso de promotores internos, las distintas isoformas pueden carecer de algunos dominios de la distrofina de longitud completa, sin embargo, las isoformas conservan la región carboxilo terminal, que presenta un alto grado de conservación de nucleótidos y aminoácidos y contiene sitios de unión necesarios para que las isoformas de la distrofina se unan con diversas proteínas, por lo que se ha sugerido que esta región podría tener una relevancia funcional (Perronnet & Vaillend, 2010).

1.5 La Dp71

La distrofina Dp71 es una proteína de 71 kDa, que se expresa en una variedad de tejidos no musculares, incluyendo, hígado, testículos, pulmón, estómago y riñón (Lederfein *et al.*, 1992), y es la isoforma más abundante en el cerebro humano (Austin *et al.*, 2000). Recientemente, usando un sistema de *western blot* capilar altamente sensible, se reportó que aunque en cantidades mínimas, la Dp71 también puede expresarse en músculo esquelético de ratón y de humano (Kawaguchi *et al.*, 2018). La Dp71 constituye la distrofina más abundante en sistema nervioso central. Se expresa en células troncales embrionarias, en áreas de interacción epitelio-mesénquima, en el cerebro embrionario medio y posterior, en el cerebro perinatal correlacionando con estadios de diferenciación neural terminal, en el cerebro

anterior embrionario temprano continuando hasta la vida adulta, específicamente en la corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio, pituitaria y retina, y en regiones neocorticales asociadas con la continua neurogénesis y plasticidad sináptica (Mehler, 2000).

El promotor de la Dp71 se localiza entre los exones 62 y 63 del gen *DMD* y genera un transcrito de 6.5 kb. En mioblastos se demostró que el promotor de la Dp71 contiene 4 motivos de unión para Sp (Sp-A, Sp-B, Sp-C y Sp-D) y un único motivo de unión para AP2. El sitio Sp-A es el sitio de unión más importante, al que se asocian los factores de transcripción Sp1 y Sp3 para activar al promotor de la Dp71. Por otra parte, durante la diferenciación de miotubos, la disminución de la expresión de la Dp71 es causada por la escasez de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 (de León *et al.*, 2005). Adicionalmente, al inducir la diferenciación neuronal se observó el aumento de la Dp71, el cual es controlado por la actividad de los factores de transcripción Sp1 y AP2 α sobre el promotor de la Dp71. Por un lado, Sp1 mantiene sus niveles estables hacia la diferenciación y activa al promotor de la Dp71; mientras que, AP2 α actúa como represor al reclutar corepresores como núcleofosmina, y hacia la diferenciación disminuye su expresión por lo que su unión con el promotor de la Dp71 se pierde (Lázaro & Vega, 2007). Adicionalmente, se ha reportado que la expresión de la Dp71 en células PC12 es regulada postraduccionalmente, a través de la fosforilación de la Dp71 que conduce a su rápida degradación por el sistema de ubiquitin-proteosoma (Fujimoto *et al.*, 2017).

Debido a que la Dp71 es codificada a partir de un promotor interno, la proteína Dp71 carece del dominio N-terminal y del dominio completo de repetidos tipo espectrina presentes en la Dp427, pero mantiene el dominio rico en cisteínas y el dominio C-terminal, el cual es el dominio más conservado en las distrofinas (Lederfein *et al.*, 1992). El dominio N-terminal único de la Dp71 está constituido por 7 aminoácidos, y forma parte del motivo LKGHET, el cual ha demostrado ser necesario y suficiente para la asociación de la Dp71 con el citoesqueleto de actina (Howard *et al.*, 1998) (Fig. 3).

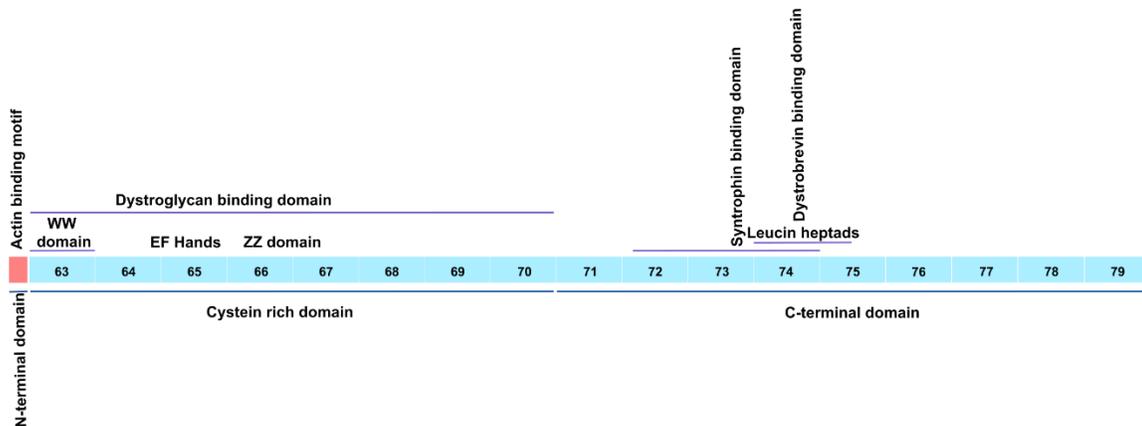


Figura 3. Regiones de la Dp71.

La distrofina Dp71 consta principalmente del dominio N-terminal, dominio rico en cisteínas y el dominio C-terminal que le permiten asociarse con diversas proteínas como actina, β -distroglicano, sintrofinas y distrobrevinas.

1.5.1 Isoformas de la Dp71

A la fecha se han descrito 14 isoformas de la Dp71 generadas por *splicing* alternativo, las cuales presentan diferencias en el dominio C-terminal. Las isoformas de la Dp71 reportadas a la fecha, se pueden clasificar en los grupos d, f, e y g, en función de los exones incluidos y los eliminados (Fig. 4).

Grupo d: Contiene los exones 78 y 79.

Grupo f: Carece del exón 78, lo que cambia el marco de lectura y genera un exón 79 alternativo que reemplaza los últimos 13 aminoácidos (RNTPGKPMREDTM) de la proteína, que dan lugar a un C-terminal hidrofílico, por 31 aminoácidos (HNVGSLFHMADDLGRAMESLVSM TDEEGAE) que dan lugar a un C-terminal hidrofóbico.

Grupo e: Contiene parte del intrón 77 y un codón de paro que evita la traducción de los exones 78 y 79. El C-terminal de esta isoforma es hidrofílico.

Grupo g: Carece de los exones 68-76 y el exón 78, siendo la isoforma más pequeña de solo 25kDa.

Adicionalmente, en los 4 grupos se pueden perder los exones 71, 72, 73 y 74 sin afectar el marco de lectura, pero afectando total o parcialmente el sitio de unión a sintrofina (Naidoo & Anthony, 2020; Tadayoni *et al.*, 2012).

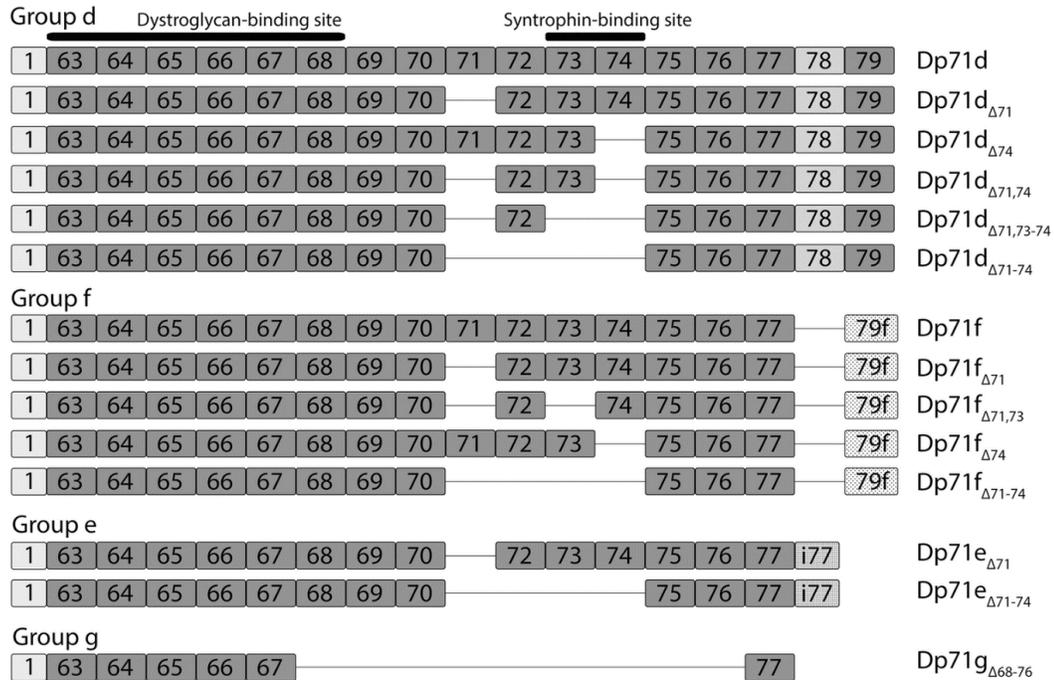


Figura 4. Isoformas de la Dp71 generadas por *splicing* alternativo.

Las isoformas de la Dp71 difieren en su extremo C-terminal, estas diferencias afectan el sitio de unión con sintrofina y su extremo C-terminal, que puede ser hidrofílico o hidrófobo de acuerdo a la presencia o ausencia del exón 78 (Naidoo & Anthony, 2020).

Interesantemente, se ha reportado que las isoformas de la Dp71 presentan diferencias en sus patrones de expresión, así como en su distribución subcelular. En cultivos primarios de neuronas del hipocampo se observó que la Dp71d es principalmente expresada en neuronas bipolares GABAérgicas, mientras que la Dp71f se expresa en neuronas multipolares glutamatérgicas; ambas isoformas se localizaron en el núcleo como gránulos tipo *speckles*, sin embargo, los niveles de expresión presentaron variaciones a lo largo del tiempo, sugiriendo que la Dp71 se asocia al proceso de diferenciación y la adquisición de características morfológicas y fisiológicas correspondientes (Rodríguez-Muñoz *et al.*, 2015a). En la línea celular HeLa, la Dp71f se detectó exclusivamente en la fracción citoplasmática, mientras

que, la Dp71d se detectó principalmente en la fracción nuclear (Fuentes-Mera *et al.*, 2006). Por otra parte, en la línea celular PC12 no diferenciada, la Dp71f presentó una señal difusa en el citoplasma, concentrándose en la periferia celular, mientras que la Dp71d presentó mayor acumulación en el núcleo y una ligera señal en el citoplasma, y durante la diferenciación a fenotipo neuronal, la Dp71f se relocalizó del citoplasma hacia la periferia celular y los procesos neuríticos, mientras que la Dp71d se concentró aún más en el núcleo (Acosta *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2003). De manera semejante, en la línea celular N1E-115 durante la diferenciación a fenotipo neuronal, la Dp71f se localizó en el citoplasma y se distribuyó a lo largo de los procesos neuríticos, además de que mostró un incremento de su expresión (Lázaro & Vega, 2007). Se ha sugerido que durante la diferenciación neuronal la Dp71f podría modular los cambios en las redes del citoesqueleto a través de su interacción con actina y β -dístroglicano, mientras que la Dp71d podría participar en la regulación de vías de señalización que conducen a la diferenciación debido a su asociación con la matriz nuclear, una estructura involucrada en el procesamiento de ARN y el remodelamiento de la cromatina (Acosta *et al.*, 2004). Un estudio reportó que la acumulación preferentemente nuclear de la Dp71d observada hacia la diferenciación es modulada por CaMKII que fosforila los residuos de serina y treonina (Calderilla-Barbosa *et al.*, 2006), lo que resulta interesante, ya que la fosforilación de las proteínas es uno de los principales mecanismos que controlan el transporte nuclear de proteínas.

1.5.2 La transportación nuclear de la Dp71.

La importación nuclear de las proteínas ocurre a través del complejo de poro nuclear, la importina α se une a la señal de localización nuclear (NLS) de la proteína cargo y a la importina β . Posteriormente, las importinas α/β se translocan al núcleo a través de su interacción con las nucleoporinas. En el núcleo, las importinas tienen una gran afinidad por RanGTP y su unión permite la liberación de la proteína cargo. Por otra parte, el exporte nuclear depende de la exportina CRM1, la cual se une a la proteína cargo a través del reconocimiento de una señal de exporte nuclear (NES) que contiene de 3 a 4 residuos hidrofóbicos seguidos de leucinas. El exporte nuclear

también requiere de la unión a RanGTP, la cual luego de la translocación al citoplasma a través del complejo de poro nuclear, es convertida a RanGDP permitiendo así la liberación de la proteína cargo (Pemberton & Paschal, 2005).

La Dp71 carece de una NLS clásica sin embargo, se demostró la existencia de una NLS no clásica que se localiza en el dominio ZZ de la Dp71 y que permite su interacción con el complejo de importinas IMP α 2/ β 1. Usando el dominio ZZ de la Dp71 fusionado a cuatro proteínas GFPs en tándem, se demostró que la sustitución de un residuo conservado de cisteína en el segundo dedo de zinc (C272A), y la sustitución de un residuo de cisteína en el primer dedo de zinc (C250A) en conjunto con la sustitución de un residuo de histidina en el segundo dedo de zinc (H263A) redujeron significativamente el importe nuclear de la Dp71, lo que revela la importancia del dominio ZZ en el importe nuclear. Adicionalmente, se reportó que la importación nuclear de la Dp71 requiere de la participación de dineína, uno de los motores moleculares que dirige el tráfico intracelular a través de los microtúbulos. Por otra parte, respecto a la exportación nuclear, se demostró que la Dp71 contiene una NES dependiente de CRM1 ubicada en el extremo C-terminal, entre los aminoácidos 505-515. De este modo la Dp71 tiene los elementos necesarios para transportarse del núcleo al citoplasma y viceversa (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a) (Fig 5).

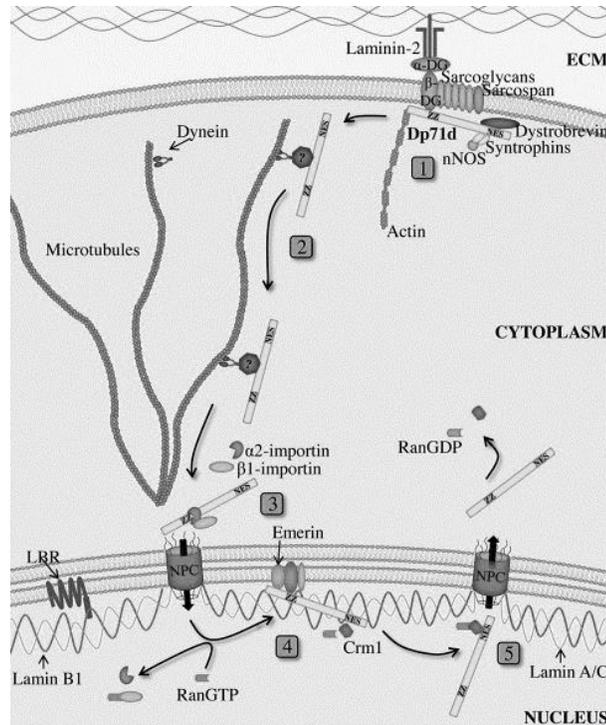


Figura 5. Transporte nuclear de la Dp71.

La Dp71 tiene una NLS en el dominio ZZ reconocida por las importinas IMP α 2/ β 1 y una NES reconocida por la exportina CRM1 que, de manera dependiente a cada señal le permite transportarse entre el núcleo y el citoplasma (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a).

1.5.3 Funciones de la Dp71 Debido a la localización tanto citoplasmática como nuclear de la Dp71 y a su interacción con diversas proteínas en estos compartimientos celulares, la Dp71 se ha asociado a diferentes funciones y procesos celulares incluidos la adhesión celular, homeostasis de iones y agua, progresión del ciclo celular y estabilidad nuclear.

1.5.3.1 Adhesión celular

Las integrinas son glicoproteínas transmembranales que median las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular y se componen de dos subunidades α y β . Cuando una integrina se une a su ligando en la matriz extracelular, el tallo de la subunidad β se une a diversas proteínas como talina, α -actinina, vinculina y filamina. A su vez estas proteínas se unen a actina, y de esta manera las integrinas interactúan con el citoesqueleto. Un estudio en el que se usaron células PC12 como un modelo de células neuronales, reportó que al reducir la expresión de la Dp71 e

inducir la diferenciación neuronal, disminuía la adhesión sobre laminina, colágeno y fibronectina, además de que las células presentaban una reducción de más del 50% del tamaño de las neuritas, y una morfología celular redondeada caracterizada por la falta de filopodía. Adicionalmente, en estas células se observó la reducción de la tinción de la integrina $\beta 1$, lo que en conjunto indica que la Dp71 es necesaria para la adhesión celular de $\beta 1$ -integrina al sustrato y la extensión de las neuritas (Enríquez-Aragón *et al.*, 2005). En un estudio adicional, se demostró que específicamente la isoforma Dp71f, forma parte de un complejo de adhesión compuesto por $\beta 1$ -integrina, talina, α -actinina, actina, FAK y paxilina, y que la ausencia de la Dp71f causa el decremento de este complejo de adhesión y la deficiente adhesión a laminina, sugiriendo que la Dp71f participa en el acoplamiento o estabiliza el complejo de adhesión $\beta 1$ -integrina (Cerna *et al.*, 2006).

1.5.3.2 Homeostasis de iones y agua

Kir4.1 es una proteína transmembrana tetramérica expresada en el sistema nervioso central, en células gliales incluyendo astrocitos en el cerebro y células de Muller en la retina. Este canal está involucrado en la regulación de la concentración extracelular de K^+ , siendo necesaria su distribución precisa en la membrana de las células gliales (Ohno *et al.*, 2018). Por su parte, la acuaporina-4 (AQP-4) es el principal canal de agua del sistema nervioso central y está involucrado en una amplia variedad de funciones cerebrales, incluyendo la función cognitiva normal, memoria espacial, migración de astrocitos, adhesión celular y regulación del espacio cerebral extracelular (Mader & Brimberg, 2019). Un estudio en células gliales de Muller reveló que Kir4.1, AQP4 y la Dp71 forman un complejo y tras la delección de la Dp71 se observó la localización difusa de Kir4.1 a lo largo de las células y la reducción de AQP4, demostrando que la Dp71 tiene un papel central en el andamiaje molecular responsable del anclaje de Kir4.1 y AQP4 (Fort *et al.*, 2008). Adicionalmente, en células troncales neurales adultas aisladas de ratones mdx se detectó la disminución de la Dp71, AQP4 y Kir4.1, sugiriendo también que la deficiencia de la Dp71 afecta el anclaje de AQP4 y Kir4.1 en la membrana celular (Annese *et al.*, 2016).

1.5.3.3 Ciclo celular

En un estudio en cultivos asincrónicos de células PC12 en las que se abatió la expresión de la Dp71, se analizó la progresión del ciclo celular y se observó un incremento de alrededor del 10% de células en la fase G0/G1 y una disminución de células en las fases S y G2/M. Al analizar cultivos sincrónicos en la fase G0/G1, se observó que, al liberar el bloqueo, las células deficientes de la Dp71 mostraron un retraso en la transición de la fase G0/G1 a S. Interesantemente, al inducir el arresto mitótico con nocodazol se observaron alteraciones morfológicas indicativas de apoptosis, sugiriendo que la ausencia de la Dp71 conduce a la muerte mitótica. Finalmente, al analizar el efecto de la ausencia de la Dp71 sobre los niveles de lámina B1, se observó una clara disminución de esta proteína crítica para la mitosis, indicando que la Dp71 podría ser importante para la estabilidad de lámina B1 (Villarreal-Silva *et al.*, 2011).

1.5.3.4 Estabilidad de la morfología nuclear.

La envoltura nuclear es esencial para el posicionamiento y estructura del núcleo dentro de las células y consiste de una membrana nuclear externa e interna que contienen el espacio perinuclear. Hacia la membrana nuclear interna se encuentra la lámina nuclear periférica, formada por filamentos de láminas que constituyen los elementos estructurales de la matriz nuclear o esqueleto nuclear, los cuales a su vez dan forma al núcleo, y entre muchas otras funciones, permiten la organización espacial de la cromatina (Hetzer, 2010). En diversos estudios se ha demostrado que la Dp71 es un elemento importante en el mantenimiento de la morfología nuclear ya que forma complejos con distintas proteínas, tales como miembros del complejo DAP nuclear, lámina B1 y emerina (Fuentes-Mera *et al.*, 2006; Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a; Villarreal-Silva *et al.*, 2011). En un estudio realizado en células HeLa, se reportó que la Dp71 forma un complejo integrado por β -dystroglicano, β -dystrobrevina, α 1-dystrobrevina y nNOS en el núcleo. Además, se demostró que la Dp71 y algunos miembros del complejo DAP son proteínas asociadas a la matriz nuclear, sugiriendo que estas proteínas podrían tener algún papel en las muchas funciones en las que la matriz nuclear está involucrada, tales como, la expresión

genética, diferenciación, ciclo celular y apoptosis, entre otras (Fuentes-Mera *et al.*, 2006). Otro estudio reportó que en la línea celular C2C12, la Dp71 forma un complejo en la envoltura nuclear integrado por α -sarcoglicano, α -distrobrevina, β -dístroglicano y α -sintrofina, sugiriendo que este complejo podría estar involucrado en funciones asociadas a la envoltura nuclear, como el mantenimiento de la estructura nuclear y la modulación de procesos nucleares (González-Ramírez *et al.*, 2008). Por otra parte, utilizando la línea celular PC12, también se encontró que la Dp71d forma un complejo nuclear con β -dístroglicano, β -distrobrevina y α 1-sintrofina, y que al abatir la expresión de la Dp71 empleando RNAs antisentido, las proteínas β -dístroglicano, β -distrobrevina, y proteínas de los complejos sarcoglicano y sintrofina disminuían significativamente, indicando que la Dp71 es crucial para la estabilización de este complejo en el núcleo (Villarreal-Silva *et al.*, 2010). Adicionalmente, también se ha demostrado la interacción directa de la Dp71 con la proteína de envoltura nuclear, emerina, que además mostró una disminución de sus niveles en células en las que la expresión de la Dp71 es parcialmente abatida. Interesantemente, las células con la expresión de la Dp71 disminuida presentaron una morfología nuclear aberrante, con invaginaciones de la envoltura nuclear (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a). En este mismo sentido, un estudio realizado en un modelo epitelial reportó que la Dp71 se asocia con proteínas de la matriz nuclear como lámina B1 y actina, las cuales cumplen múltiples funciones, incluyendo el mantenimiento de la estructura nuclear y la organización de la cromatina (Fuentes-Mera *et al.*, 2006). De hecho, en un estudio posterior se demostró que la Dp71 se une directamente a lámina B1 y que en células que tienen niveles disminuidos de la Dp71 por el uso de RNAs antisentido, los niveles de lámina B1 también están afectados (Villarreal-Silva *et al.*, 2011). En conjunto, lo anterior revela la importancia de la Dp71 en el mantenimiento de la estructura nuclear, y muy probablemente en el buen desarrollo de las funciones de las proteínas nucleares con las que se asocia, tales como lámina B1 y emerina, las cuales son proteínas clave de la lámina y envoltura nuclear, respectivamente.

1.6 Dominios asociados a Lámina (LADs)

La lámina nuclear está formada por una red de filamentos intermedios tipo V que provee soporte estructural al núcleo, regula la organización de la cromatina y la expresión genética, al redireccionar los genes hacia la lámina nuclear y reprimir su transcripción, y al servir como andamio para diversos factores de transcripción. Las láminas A y C (lámina A/C) se producen por *splicing* alternativo del gen *LMNA*, mientras que las láminas B1 y B2 son codificadas por los genes *LMNB1* y *LMNB2*, respectivamente (Worman, 2012).

En años recientes ha habido creciente información sobre la organización espacial y funcional de la cromatina, un ejemplo son los Dominios Asociados a Lámina (LADs), los cuales son regiones genómicas que están en estrecho contacto con la lámina nuclear. Se ha descrito que del 35 al 40% del genoma humano está organizado en aproximadamente 1,300 LADs de alrededor de 0.1-10Mb, y que la mayoría de los genes contenidos en estos dominios están transcripcionalmente inactivos o se expresan a muy bajos niveles (Briand & Collas, 2020; van Steensel & Belmont, 2017). Estas regiones están enriquecidas en modificaciones de histonas asociadas a heterocromatina constitutiva, como H3K9me2 y H3K9me3 o facultativa, como H3K27me3 (Guelen *et al.*, 2008).

Las modificaciones de histona H3K9me2 y H3K9me3 son marcas epigenéticas asociadas a la represión genética y son catalizadas por una familia de metiltransferasas que incluyen a SETDB1, GLP y G9a. La metiltransferasa G9a promueve la interacción entre los LADs y la lámina nuclear (Kind *et al.*, 2013) y se ha descrito que la inhibición de las metiltransferasas GLP/G9a provoca una disminución de la marca epigenética H3K9me2 y altera la expresión de cientos de genes debido a que el ambiente de la cromatina se vuelve más abierto (Yan *et al.*, 2020). Por otra parte, se ha descrito que la metiltransferasa G9a tiene un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de los patrones de expresión de genes específicos de ciertos linajes celulares. Durante el silenciamiento de genes neuronales en células no neuronales, G9a es reclutada por el complejo REST para

silenciar dichos genes a través de dominios ricos en H3K9me2 (Roopra *et al.*, 2004). Para reprimir la expresión de genes, el complejo REST además recluta a la demetilasa específica de lisina (LSD1) que cataliza la demetilación mono y dimetilada de H3K4, una marca de genes transcripcionalmente activos (Shi *et al.*, 2004) Interesantemente, LSD1 es parte del complejo represor REST, que se compone de REST, CoREST, BHC80 y BRAF35.

1.7 Complejo REST

REST es un represor transcripcional que reprime genes neuronales en tejidos no neuronales, a través del reconocimiento del elemento de respuesta a REST (RE-1). REST actúa como una proteína de andamiaje que permite el reclutamiento de distintos arreglos formados por factores transcripcionales y epigenéticos hacia regiones genómicas específicas. REST interacciona directamente con el cofactor epigenético CoREST, y a su vez este cofactor recluta a diversos factores regulatorios complementarios, que pueden incluir a las histonas desacetilasas HDAC1 y HDAC2, a la proteína de unión a metil-CpG 2, la histona demetilasa LSD1, BHC80, Braf35, iBraf, las histonas metiltransferasas G9a y SUV39 y componentes del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF, entre otros (Hakimi *et al.*, 2002; Qureshi *et al.*, 2010). (Fig. 6). En el caso de las células progenitoras neurales, al iniciar la diferenciación, los complejos represores de REST son sustituidos por nuevos complejos que permiten la expresión de los genes neuronales. Un estudio en la línea celular progenitora multipotente P19 describió que la expresión de la proteína iBraf abroga la represión mediada por REST para genes responsivos a RE-1 e induce la expresión de sinapsina y NeuroD2, un factor de transcripción asociado a la diferenciación neuronal (Mirza & Zahid, 2018; Ravanpay *et al.*, 2010; Wynder *et al.*, 2005). Por su parte, sinapsina en su estado desfosforilado se une a vesículas sinápticas en la superficie del citoplasma y al fosforilarse se disocia de las vesículas sinápticas y las movilizan permitiendo la exocitosis. Interesantemente, sinapsina esta involucrada en la sinaptogenesis y la plasticidad neuronal y se ha reportado que la alteración de las sinapsinas se asocia a diversos desordenes neurológicos como la enfermedad de Alzheimer's (Mirza & Zahid, 2018).

1.4.1.2 HMG20A/iBraf y HMG20B/Braf35

Las proteínas iBraf y Braf35 son claves en la regulación de genes neuronales, y funcionan en sentido contrario una de otra, por lo que en muchos casos muestran patrones de expresión diferencial. iBraf se expresa principalmente en neuronas maduras y es requerida para la inducción de fenotipos neuronales, mientras que, Braf35 restringe su expresión en poblaciones de células progenitoras para mantener la represión de genes específicos neuronales (Bianchi & Agresti, 2005). Se ha reportado que iBraf forma homodímeros y se asocia al complejo LSD1-CoREST de manera independiente a Braf35, involucrando su dominio coiled-coil y a través de la interacción con BHC80 (Rivero *et al.*, 2015). Adicionalmente, iBraf promueve el reclutamiento de la metiltransferasa MLL a las regiones promotoras de los genes neuronales, en donde MLL trimetila a la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3) y consecuentemente activa la transcripción para iniciar el programa de diferenciación (Wynder *et al.*, 2005) (Fig. 6). Por su parte, Braf35 es necesaria para la correcta localización de LSD1-CoREST en los genes blanco y, por lo tanto, para la correcta represión de genes neuronales, incluyendo subunidades α de los canales de sodio dependientes de voltaje SCN1A, SCN2A2 Y SCN3A, NeuroD2 y sinapsina (Ceballos-Chávez *et al.*, 2012). Adicionalmente, se reportó que la sumoilación de Braf35 es necesaria para su función de inhibición de la diferenciación neuronal, sin embargo, cuando está presente iBraf, estas dos proteínas forman heterodímeros, lo que impide la sumoilación de Braf35, impidiendo su interacción con el complejo LSD1-CoREST (Ceballos-Chávez *et al.*, 2012).

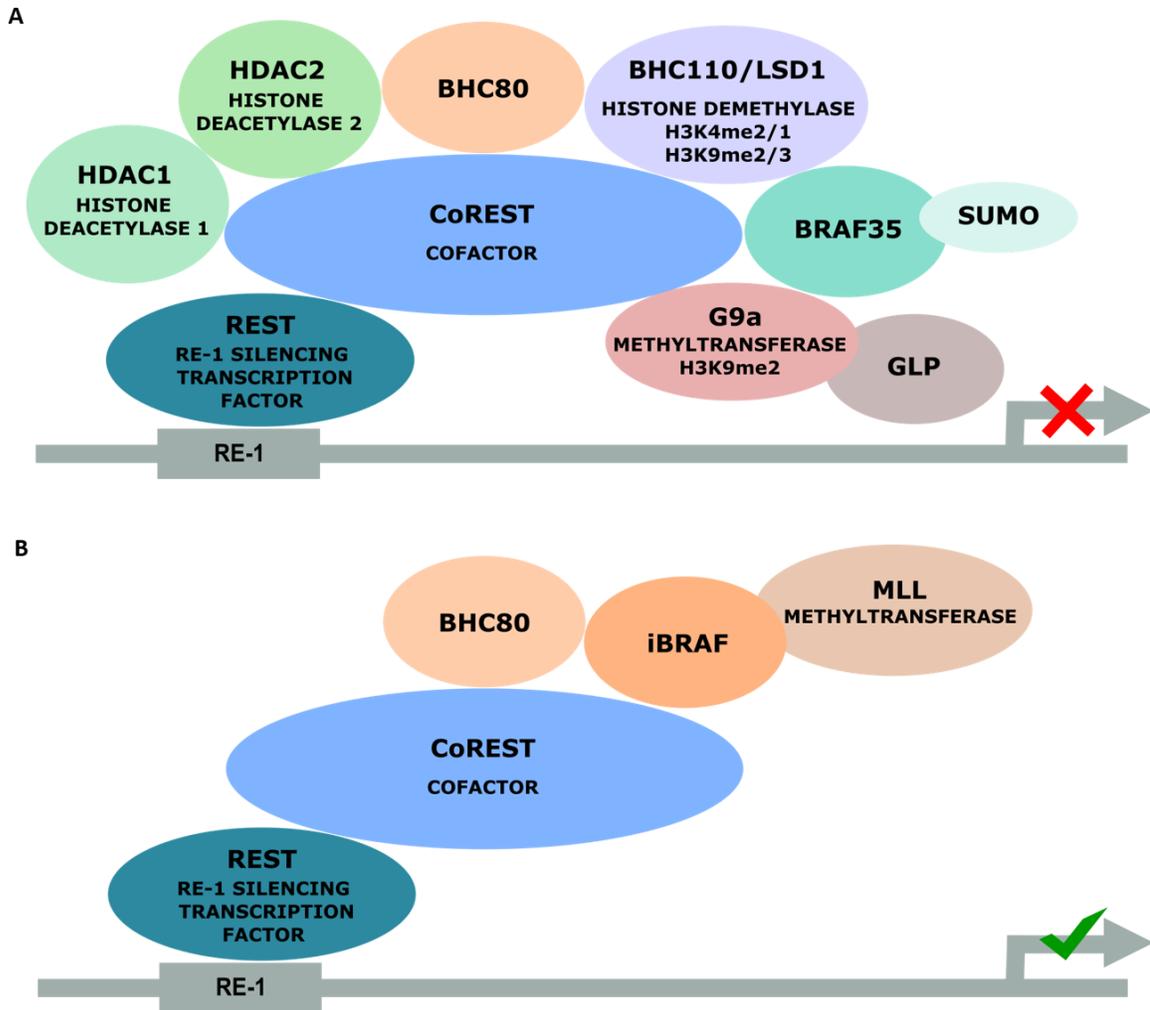


Figura 6. Complejo REST.

(A) Mediante interacciones con el elemento represor de 21pb (RE-1), REST regula la expresión de una amplia variedad de genes neuronales y recluta al co-represor CoREST, a este complejo se unen las remodeladoras de histonas HDAC1/2, la proteína de andamiaje BHC80 y Braf35. Braf35 se une covalentemente con el péptido SUMO y recluta a BHC110/LSD para reprimir genes neuronales específicos. Por su parte, REST recluta a enzimas silenciadoras de genes como la metiltransferasa G9a para silenciar efectivamente largas regiones de la cromatina, incluyendo genes que carecen de RE-1.

(B) iBraf se une a este complejo a través de la proteína BHC80, recluta a la metiltransferasa MLL y activa la transcripción genética que conduce a la diferenciación neuronal.

2 ANTECEDENTES

La principal característica fenotípica de los pacientes DMD es la debilidad muscular progresiva, sin embargo, una importante proporción de pacientes con DMD muestra alteraciones cognitivas. El gen *DMD* es uno de los genes ligado al cromosoma X que causa retraso mental, y este se caracteriza por el funcionamiento subóptimo del sistema nervioso central que resulta en limitaciones significativas en el funcionamiento intelectual y comportamiento adaptativo, que se expresan en las habilidades conceptuales, sociales y de adaptación práctica (Chiurazzi *et al.*, 2008). Se estimó que la prevalencia de la discapacidad intelectual diagnosticada en la infancia, del año 2014 al 2016, fue del 1.48% en niños y del 0.90% en niñas (Zablotsky *et al.*, 2017), mientras que en pacientes con DMD se presenta aproximadamente en el 20% de los casos (Banihani *et al.*, 2015).

2.1 Mutaciones en la Dp71 y déficit cognitivo

Se ha reportado que las mutaciones en las regiones distales del gen DMD están asociadas con el déficit cognitivo. En diversos estudios realizados en pacientes con DMD se observó una correlación del genotipo con el fenotipo, indicando que pacientes con DMD y con mutaciones que afectan a las isoformas cortas de la distrofina, principalmente a la Dp71, tenían un menor coeficiente intelectual que los pacientes con mutaciones en la parte proximal (Desguerre *et al.*, 2009; Magri *et al.*, 2011; Milic Rasic *et al.*, 2015; Taylor *et al.*, 2010). En un estudio usando una cohorte de 49 pacientes con DMD, se analizó la presencia de deleciones o duplicaciones a lo largo de todo el gen. Los pacientes que obtuvieron menores puntuaciones en el coeficiente intelectual, memoria verbal y habilidad lectora, presentaron mutaciones en la parte distal del gen que afectaron a las isoformas Dp140 y Dp71, las cuales se expresan en el sistema nervioso. Adicionalmente, se reportó que la ausencia o alteración en los niveles del transcrito de la Dp71 en estos pacientes, correlacionó con la deficiencia mental severa acompañada de problemas psiquiátricos y de comportamiento (Moizard *et al.*, 1998).

En una cohorte de 20 pacientes DMD/BMD en la que se analizaron mutaciones en el gen *DMD* de los exones 60 al 79, se identificaron dos mutaciones puntuales que correlacionaron con déficit cognitivo (Tuffery *et al.*, 1995). Adicionalmente, en una cohorte de 26 pacientes DMD/BMD sin deleciones identificadas, se encontraron 7 pacientes con mutaciones puntuales entre los exones 65-74, de los cuales 5 pacientes fueron diagnosticados con retraso mental (Lenk *et al.*, 1993). En otro estudio realizado en una cohorte de 12 pacientes con DMD sin deleciones detectadas, se analizaron mutaciones en el transcrito de la Dp71 y se reportaron 5 mutaciones puntuales que provocaron la terminación temprana de la traducción. Interesantemente, los pacientes con estas mutaciones fueron diagnosticados con retraso mental severo, sugiriendo que la ausencia o disminución de la Dp71 está asociada al fenotipo cognitivo en la DMD (Moizard *et al.*, 1998). Fortaleciendo esta idea, un estudio comparativo de datos clínicos, cognitivos, moleculares y de expresión en 81 pacientes DMD, reportó que una mayor proporción de los pacientes con afectación en la Dp71 presentaron retraso mental severo, mientras que, los pacientes que no presentan afectación en la Dp71 presentaron coeficientes intelectuales normales o en el límite. Además, un subgrupo de 9 de los pacientes con severo retraso mental, evidenció la presencia de transcritos de Dp71 no funcionales con la consecuente ausencia de la proteína en las células analizadas (Daoud *et al.*, 2009).

Por otra parte, un estudio realizado en una cohorte de 103 pacientes DMD demostró que en estos pacientes el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) se presenta más frecuentemente en asociación con mutaciones que afectan la expresión de la Dp140 y de la Dp71 (Pane *et al.*, 2012). Adicionalmente, en un estudio que analizó el fenotipo neuropsiquiátrico en 130 pacientes DMD, se encontró que el 64% de los pacientes con mutaciones que afectan a la Dp71 presentaron discapacidad cognitiva, mientras que para los pacientes con mutaciones en la Dp427 y en Dp260, Dp140 y Dp116 el déficit cognitivo fue encontrado solo en el 25 y 15% respectivamente. Además, también se describió que una alta proporción de pacientes DMD con mutaciones que afectan a la Dp71

padecen trastornos del neurodesarrollo como desorden del espectro autista, problemas de atención e hiperactividad (Ricotti *et al.*, 2016).

A pesar de que esta amplia variedad de estudios ha correlacionado diversas mutaciones que afectan a la Dp71 con retraso mental, a la fecha se desconoce como las alteraciones en esta isoforma desencadenan los problemas cognitivos. Recientemente un estudio analizó células troncales pluripotentes (hiPCS) diferenciadas a neuronas, de un paciente DMD con discapacidad intelectual media. Este trabajo reportó que el cambio de base en el intrón 70, que podría tener un impacto en el proceso de *splicing*, provoca la disminución de la expresión de la distrofina Dp71, tanto en hiPCS como en sus derivados neuronales. Interesantemente, también se observó un aumento en los niveles de calcio citoplasmático, acoplado con una mayor expresión de la bomba de calcio SERCA2, lo que podría indicar que al igual que en las células musculares, el calcio intracelular podría tener un papel importante en el desarrollo de la patología a nivel de sistema nervioso (Ruggieri, Viggiano, *et al.*, 2019).

El COOH-terminal de distrofina presenta un alto grado de conservación de nucleótidos y aminoácidos y se ha descrito que las deleciones genómicas en esta región correlacionan con la severidad de la enfermedad, por lo que algunos estudios han destacado la importancia de la región rica en cisteínas (Bies *et al.*, 1992). Interesantemente, en un paciente DMD se reportó una mutación localizada en la región rica en cisteínas, específicamente en el dominio ZZ, el cual está involucrado en la unión de Dp71 a β -dístroglicano y en la importación nuclear. Esta mutación provoca la sustitución de un residuo conservado de cisteína por un residuo de tirosina en la posición 3340 de la distrofina (272 de la Dp71), el cual está involucrado en el acoplamiento de zinc en el dominio ZZ. El paciente reportado con esta mutación mostró el fenotipo muscular clásico de DMD, además de retraso mental y ausencia de ondas b en un electroretinograma. En biopsias musculares se observaron cantidades residuales de Dp427 y niveles reducidos de β -dístroglicano. Estos hallazgos indicaron que las funciones de la distrofina en el sistema nervioso central dependen en cierta medida de la presencia de esta cisteína (Flanigan *et al.*,

2009; Lenk *et al.*, 1993). Por otra parte, un estudio en el que se empleó un plásmido que codificaba para la región carboxilo terminal de la distrofina (a partir del dominio WW completo) permitió confirmar que la sustitución C272Y abate la unión de las distrofinas con β -dístroglicano (Fujimoto *et al.*, 2020; Ishikawa-Sakurai *et al.*, 2004; Vulin *et al.*, 2014). Otra mutación corta reportada en pacientes DMD en el dominio ZZ, corresponde a una delección de un codón para un aminoácido altamente conservado, el ácido glutámico en la posición 3367 (299 de la Dp71). A pesar de que el paciente con esta mutación presentó un fenotipo DMD, el análisis de las biopsias musculares mostró niveles y localización de la distrofina Dp427 disminuidos solo parcialmente, lo que sugiere que la mutación E3367del es suficiente para comprometer la función de la distrofina (Becker *et al.*, 2003; Juan-Mateu *et al.*, 2015).

De acuerdo a lo antes descrito, a la fecha existe evidencia de que mutaciones en la Dp71 están asociadas con la presencia de déficit cognitivo en los pacientes DMD, sin embargo, el papel de la Dp71 en el desarrollo de este déficit aún no ha sido dilucidado, ni el papel que juegan las mutaciones en la Dp71 sobre las funciones de esta proteína.

2.2 La asociación de la Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf

Recientemente, un estudio reportó que β -dístrobrevina, una proteína del DAPC se asocia con las proteínas HMG20A/iBraf y HMG20B/Braf35, las cuales como se mencionó previamente participan en la regulación de la expresión de genes neuronales. Interesantemente, se encontró que β -dístrobrevina forma parte de un complejo proteico que se une a RE-1, y de esta manera β -dístrobrevina tiene un papel en la represión de la transcripción de genes neuronales. Adicionalmente, debido a que β -dístrobrevina tiene una alta homología con la Dp71, evaluaron también la posible asociación de Dp71 a estas proteínas. En un estudio de interacción con proteínas purificadas, se confirmó la asociación de la Dp71 con las proteínas iBraf y Braf35 (Artegiani *et al.*, 2010a). Lo anterior resulta muy interesante, ya que en diversos estudios se ha evidenciado la importancia de la Dp71 en el correcto desarrollo de la diferenciación neuronal. Se ha demostrado que la Dp71 es

esencial para el crecimiento de las neuritas, ya que, al disminuir la expresión de Dp71 (48%) e inducir la diferenciación, se observaron procesos neuríticos cortos que no pudieron alargarse incluso aumentando el estímulo (Acosta *et al.*, 2004). Adicionalmente, en modelos neuronales sometidos a estímulos de diferenciación, los niveles de la Dp71 incrementaron como consecuencia de la regulación a nivel transcripcional (Villarreal-Silva *et al.*, 2011) y sus isoformas presentaron una relocalización subcelular diferencial; mientras que, la Dp71f se relocalizó de citoplasma a extensiones neuríticas, la Dp71d se concentró casi en su totalidad en el núcleo, sugiriendo papeles específicos en el proceso de diferenciación (Lázaro & Vega, 2007). Lo anterior revela que la Dp71 tiene un papel importante en el desarrollo y función neuronal, sin embargo, a la fecha no se conoce el mecanismo preciso. De esta manera, la evidencia sobre la asociación de la Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf, sugiere que la Dp71 podría jugar un papel importante en la regulación de la transcripción de genes asociados a la diferenciación neuronal a través de su participación con estos complejos remodeladores de cromatina.

En este trabajo se analizará el efecto de las mutaciones que afectan al extremo carboxilo terminal de las distrofinas, particularmente el dominio ZZ, y que han sido reportadas en pacientes DMD, sobre las funciones de la Dp71, incluyendo la asociación y el papel de Dp71 sobre las funciones de las proteínas Braf35 e iBraf. Los resultados de este estudio aportarán nueva información acerca de la relevancia de las funciones de la Dp71 en el sistema nervioso central, y de este modo, contribuirán a la comprensión de los mecanismos que conducen al desarrollo de problemas cognitivos en los pacientes DMD que presentan mutaciones que afectan a la isoforma Dp71.

3 JUSTIFICACIÓN

La degeneración muscular progresiva es el fenotipo principal de la DMD, sin embargo, existe cada vez más evidencia de la importancia de los problemas cognitivos que se presentan en los pacientes, principalmente en aquellos con mutaciones que afectan la región codificante del carboxilo terminal de las distrofinas. El mecanismo molecular que lleva al desarrollo de los problemas cognitivos en estos pacientes, así como la participación de la distrofina Dp71 en el desarrollo del fenotipo DMD no han sido completamente esclarecidos. Por esta razón, en este proyecto se plantea analizar el efecto de dos mutaciones que afectan al extremo carboxilo de las distrofinas y que han sido reportadas en pacientes DMD, en las funciones de la Dp71 en un modelo celular neuronal, y particularmente, en sus funciones asociadas a las proteínas Braf35 e iBraf, las cuales regulan genes neuronales específicos. Esto aportará información sobre la relevancia de las funciones de la Dp71 en el sistema nervioso central y contribuirán a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de problemas cognitivos en los pacientes con DMD con mutaciones que afectan a la isoforma Dp71.

4 HIPÓTESIS

Las mutaciones Dp71-C272Y/E299del causan un efecto en las funciones de la Dp71.

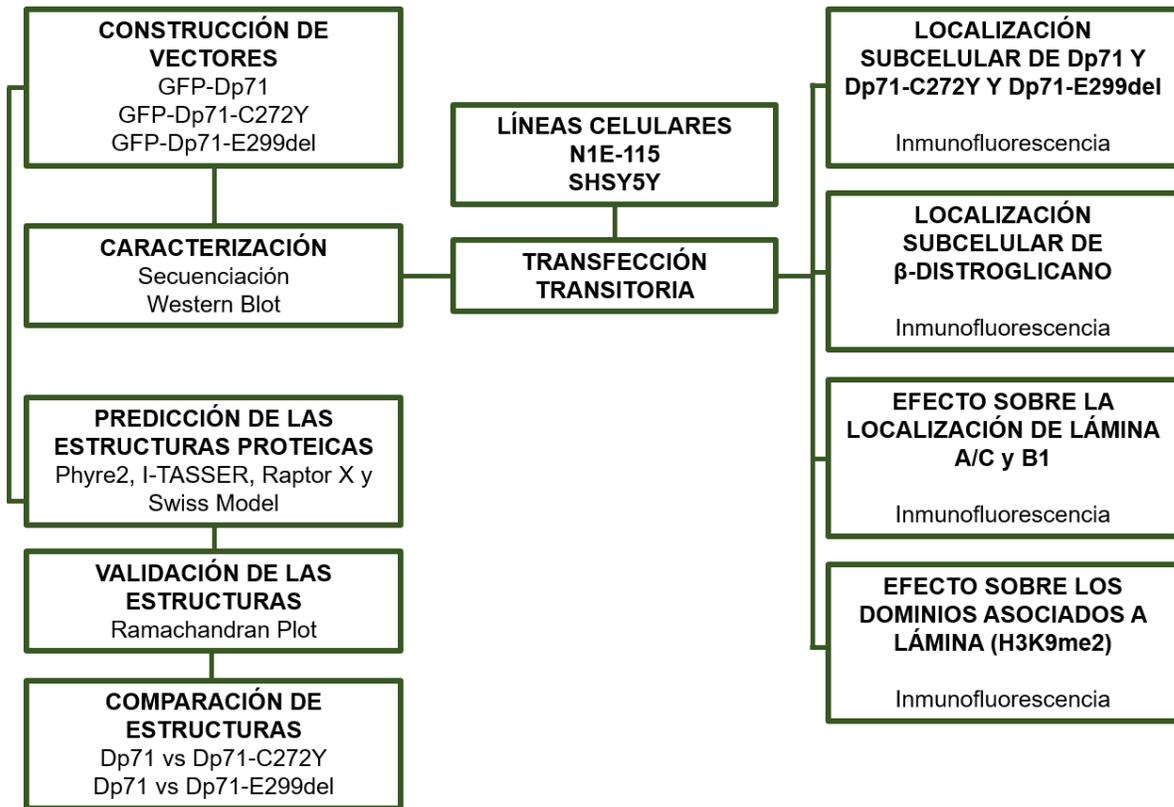
5 OBJETIVO GENERAL

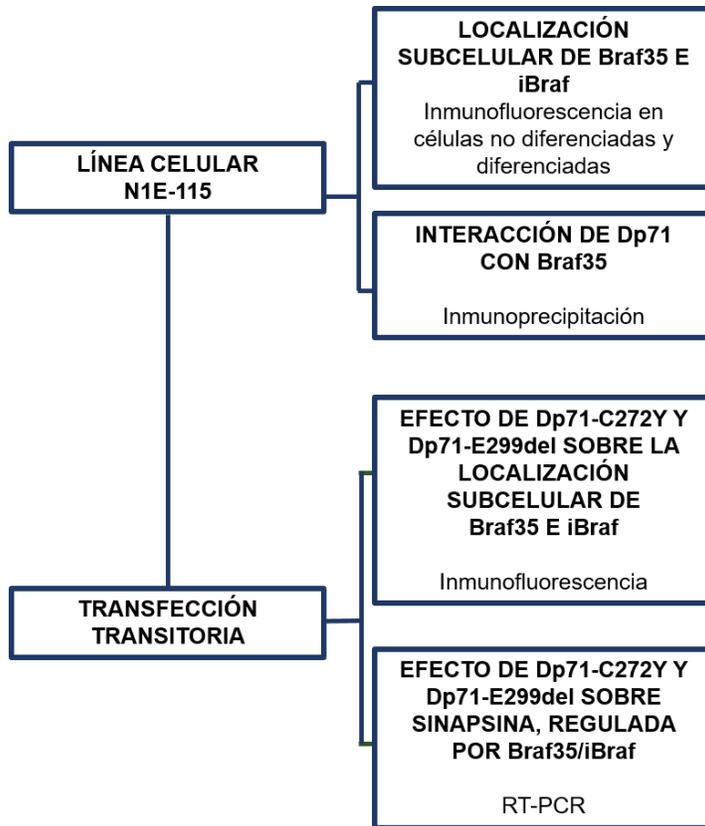
Estudiar el efecto de las mutaciones Dp71-C272Y/E299del en la función de la Dp71 en un modelo celular neuronal.

5.1 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de las mutaciones puntuales Dp71-C272Y/E299del en la localización subcelular de la Dp71.
2. Estudiar el impacto de las mutaciones puntuales Dp71-C272Y/E299del en la localización subcelular de β -dístroglicano.
3. Analizar el efecto de las mutaciones puntuales Dp71-C272Y/E299del en la localización subcelular de las láminas A/C y B1.
4. Determinar el efecto de las mutaciones puntuales Dp71-C272Y/E299del en los dominios asociados a lámina (LADs) a través del análisis de la marca epigenética H3K9me2.
5. Evaluar la asociación de la Dp71 con Braf35 y el efecto de las mutaciones Dp71-C272Y/E299del en la regulación de sinapsina.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cultivo celular

Las líneas celulares HeLa y N1E-115 se cultivaron en el medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina/estreptomicina, mientras que la línea celular SHSY5Y se cultivó en el medio EMEM/F12 suplementado con 10% de SFB y penicilina/estreptomicina.

7.2 Construcción de plásmidos

Se realizaron ensayos de mutagénesis dirigida usando como molde al plásmido pEGFP-N1/Dp71 (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a). Las mutaciones de interés se obtuvieron empleando los siguientes oligonucleótidos:

	Oligos	Tamaño (pb)
Dp71-C272Y	Forward: 5'- AC ATC TGC CAA AGC TAC TTT TTT TCT GGT CG -3' Reverse: 5'- CG ACC AGA AAA AAA GTA GCT TTG GCA GAT GT -3'	31
Dp71-E299del	Forward: 5'- T CCG ACT ACA TCA GGA GAT GTT CGA GAC TTT GCC-3' Reverse: 5'- GGC AAA GTC TCG AAC ATC TCC TGA TGT AGT CGG A-3'	34

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Las mutaciones en la Dp71 fueron generadas por mutagénesis sitio dirigida usando el vector pGFP-Dp71 como base.

Las mutaciones en los plásmidos fueron verificadas, en primer lugar, por secuenciación. Posteriormente, los vectores fueron transfectados en las células N1E-115 por 24 horas para confirmar la expresión de las proteínas a través de western blot, usando un anticuerpo anti-GFP.

7.3 Análisis bioinformático

Las secuencias de la Dp71 (NCBI Reference Sequence: NP_004008.1), Dp71-C272Y y Dp71-E299del fueron ingresadas a distintos servidores, de los cuales los modelos elegidos para este estudio fueron los modelos que predijo I-TASSER. Para analizar cambios que las mutaciones C272Y y E299del pudieran causar en el modelo de la Dp71, cada estructura fue analizada empleando Chimera. Posteriormente, empleando la misma herramienta se realizó un solapamiento de las estructuras Dp71 vs Dp71-C272Y y Dp71 vs Dp71-E299del. Adicionalmente, se analizó el efecto de la mutación C272Y sobre la estructura de la Dp71 empleando el servidor DynaMut y los resultados obtenidos fueron analizados en PyMOL.

7.4 Diferenciación neuronal

Las células N1E-115 fueron sembradas en placas de cultivo o cubreobjetos al 50% de confluencia. A las 24 horas se cambió el medio de cultivo suplementado con SFB al 2% y DMSO al 1.25%. Se realizaron cambios de medio cada tercer día y hasta el 5° día, según lo sugerido en la literatura (Clejan *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 2005).

7.5 Transfección

Las células N1E-115 ó SHSY5Y fueron sembradas al 70-80% de confluencia. A las 24 horas posteriores se realizó la transfección usando lipofectamina 2000 ó lipofectamina 3000 (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), de acuerdo a las especificaciones sugeridas por el fabricante y tras 24 horas las células fueron lisadas o fijadas.

7.6 Inmunofluorescencia

Las células SHSY5Y y N1E-115 se cultivaron en cubreobjetos por 24 horas, posteriormente, fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS a temperatura ambiente por 10 minutos y permeabilizadas con tritón X-100 0.2% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con gelatina 0.5% y SFB 1.5% en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos

primarios y secundarios se diluyeron en PBS con BSA 3%. Los anticuerpos primarios se incubaron toda la noche a 4° Celsius, mientras que los anticuerpos secundarios se incubaron por 1 hora a la misma temperatura. Las preparaciones fueron montadas con VectaShield con DAPI (Vector Laboratories Inc. Burlingame, CA, USA). Las imágenes fueron obtenidas por microscopía confocal y analizadas usando el programa ImageJ. Para los análisis de cuantificación de células con señales anormales, se cuantificaron 100 células, derivadas de 3 ensayos independientes. La significancia estadística fue determinada aplicando un análisis de ANOVA y los datos fueron graficados usando el software GraphPad Prism 6.

7.7 Western blot

Para la extracción de proteínas, las células fueron lisadas con el buffer de triple detergente (50mM Tris CL pH 8.8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 100 µg/ml PMSF, complete Roche 1X, 1% NP40, 0.5% deoxicolato de sodio). Cada muestra fue sonicada con 3 pulsos de 10 segundos a 10% de amplitud y cuantificada usando el kit DC BioRad Protein Assay. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en un gel SDS-poliacrilamida al 10%, y transferidas a 10 V por 30 minutos a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante toda la noche a 4 °C. Las membranas fueron lavadas 3 veces en TBS-T 1X por 10 minutos, e incubadas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente en leche descremada al 3% por 1 hora. Las membranas fueron lavadas nuevamente en TBS-T 1X y reveladas usando el sistema de quimioluminiscencia Western Lightning Plus-ECL de Perkin Elmer.

7.8 Inmunoprecipitación

Los extractos proteicos totales se preclarificaron previamente con perlas de proteína G-agarosa recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) Durante 2 horas a 4 °C; luego, las perlas se retiraron por centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos y los extractos pretratados se incubaron durante la noche a 4 °C con el anticuerpo

inmunoprecipitante apropiado. Se realizaron incubaciones paralelas con un anticuerpo IgG₀ irrelevante. Posteriormente, se agregaron 15 µl de proteína G-agarosa y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los inmunocomplejos se recogieron por centrifugación durante 5 minutos a 2 500 rpm y se lavaron tres veces en Buffer de lavado (Tris.HCl 50 mM [pH 8,0], NaCl 150 mM, PMSF 0,5 mM, y Triton X-100 0.5%,). Las proteínas precipitadas se separaron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante Western Blot. Por otra parte, para los ensayos de interacción con las proteínas de fusión GFP, las inmunoprecipitaciones se realizaron utilizando el sistema de perlas GFP-Trap® (Chromotek, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.9 Extracción de RNA

La extracción total de RNA de las células N1E-115 no diferenciadas e inducidas a diferenciación con un tratamiento con DMSO por 3 días se llevó a cabo con TRIzol (Cat. 5596018, Ambion) y siguiendo las especificaciones del proveedor. Con la finalidad de eliminar el DNA residual se adiciono DNasa (RQ1 Rnase-Free Dnase Cat. M6101, Promega). El RNA fue cuantificado en el Nanodrop 2000 y su calidad e integridad fueron evaluadas en un gel de agarosa al 1%.

7.10 RT-PCR

Para obtener el cDNA se usó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Cat. 4368814, Applied Biosystems) de acuerdo a las condiciones sugeridas por el proveedor. La calidad del cDNA fue comprobada al evaluar la expresión del gen *TBP* y la transfección fue comprobada por la expresión de un amplicón de la fusión GFP-Dp71 por PCR punto final. Las reacciones se incubaron en el termociclador con las siguientes condiciones: 90 °C por 5 minutos 32 ciclos de 94 °C por 30 minutos, el alineamiento se llevó a cabo a 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, finalmente un ciclo de 72 °C por 10 minutos.

La expresión del gen sinapsina (*SYN1*) se evaluó por PCR tiempo real, la mezcla de reacción se preparó con 5 uL de Power Up SYBR Green (Cat. A25742, Applied

Bioystems), 0.5 mM de los oligonucleótidos, más 100 ng de cDNA en un volumen final de 10 uL. En paralelo, se evaluó la expresión del gen B-actin como control endógeno. Las reacciones se incubaron en el termociclador con las siguientes condiciones: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos, y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 55 °C por 15 segundos y 72 °C por 1 minuto.

	Oligonucleótidos
TBP	Forward: 5'-AAATGGTGTGCACAGGAG-3' Reverse: 5'-CTGGGTTTGATCATTCTGTA-3'
GFP-Dp71	Forward: 5'-CTCCCCAGGACACAAGCA-3' Reverse: 5'-CGCCCTTGCTCACCATGGT-3'
SYN1	Forward: 5'-AGCTCAACAAATCCCAGTCT-3' Reverse: 5'-CGGATGGTCTCAGCTTTCA-3'
β -ACTIN	Forward: 5'-CGTGACAACGGCTCCGGCAT-3' Reverse: 5'-TCTCAACATGATCTGGGTCATCTT-3'

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para PCR punto final y tiempo real

8 RESULTADOS

8.1 Dp71-C272Y y Dp71-E299del forman agregados en células neuronales.

Con la finalidad de determinar el efecto de las mutaciones puntuales C272Y y E299del de la Dp71 sobre las funciones nucleares de Dp71, el primer paso fue obtener vectores que permitieran la expresión de las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del (en colaboración con el QF Daniel Ramos) (Fig 7A). El vector pEGFP-N1/Dp71 contiene el promotor constitutivo de citomegalovirus y permite la expresión de la proteína reportera GFP fusionada al extremo N-terminal de Dp71. Usando la técnica de mutagénesis sitio dirigida sobre este vector, se sustituyó guanina por adenina para generar el cambio del codón TGC al codón TAC y así, sustituir a la cisteína del aminoácido 272 de Dp71 por tirosina (Dp71-C272Y). Por otra parte, usando la misma técnica, se eliminó el triplete AGA para eliminar al ácido glutámico de la posición 299 de Dp71 (Dp71-E299del). Para confirmar las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del, los vectores fueron secuenciados y analizados por alineamiento múltiple empleando el software MEGA-X (Fig 7B), lo que permitió confirmar los cambios de bases esperados.

Para verificar que estos vectores fueran capaces de expresar a las proteínas de fusión GFP-Dp71 WT y las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del, se realizó una transfección transitoria de los vectores pEGFP-N1, pEGFP-N1/Dp71, pEGFP/Dp71-C272Y y pEGFP/Dp71-E299del en la línea celular N1E-115. Tras 24 horas de incubación con los complejos lipídicos, las células se lisaron y los extractos proteicos se analizaron en ensayos de western blot. Usando un anticuerpo anti-GFP se observó la expresión de las proteínas Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del en los pesos moleculares esperados, así como la señal correspondiente a actina, como control de carga (Fig 7C). Con la finalidad de determinar si la presencia de las mutaciones puntuales C272Y y E299del afectan la localización subcelular normal de la Dp71, se realizaron transfecciones transitorias con los vectores previamente descritos, en dos líneas celulares neuronales (N1E-115 y SHSY5Y) (Fig. 7D Y 7E) y una línea celular epitelial (HeLa) (Fig. 7F). A las 24 horas post-transfección, las

células se fijaron y se realizó una tinción con DAPI para marcar el núcleo celular. Las imágenes que se muestran corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal. De acuerdo a lo esperado, la proteína GFP muestra una localización tanto nuclear como citoplasmática, mientras que la fusión GFP-Dp71 se observa claramente en el citoplasma, y en menor cantidad en el núcleo. Interesantemente, en las células que expresaron a las formas mutantes de Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del, se observó la formación de agregados localizados en el núcleo y en el citoplasma, tanto en las líneas celulares neuronales N1E-115 y SHSY5Y (Fig 7D y 7E), como en la línea epitelial HeLa (Fig 7F). Se realizó una cuantificación de las células transfectadas que presentaron agregados, y se encontró que más del 50% de las células transfectadas con las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E229del presentaban agregados. El análisis ANOVA reveló que existe diferencia estadísticamente significativa en el número de células con agregados cuando se expresan las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del, en comparación con las que expresan a la Dp71, en todas las líneas celulares (Fig. 7D-7F).

(A) Representación esquemática de la Dp71 fusionada a la proteína reportera GFP, que muestra la ubicación de las mutaciones C272Y y E299del. Los diferentes dominios están codificados por colores y etiquetados: WW, dominio WW; EF, dominio de manos EF; ZZ, dominio ZZ; SBD, dominio de unión a sintrofina; DBD, dominio de unión a distrobrevina. (B) El alineamiento múltiple de secuencias confirma el cambio de base que permite la sustitución de cisteína por tirosina en el aminoácido 272 de Dp71, y la eliminación del triplete AGA para eliminar el ácido glutámico correspondiente al aminoácido 299 de Dp71. (C) Las células N1E-115 fueron transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente, los extractos totales se analizaron por *western blot* empleado un anticuerpo específico para GFP que revela la expresión de Dp71-C272Y y Dp71-E299del, y se reveló actina, como control de carga. Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal en las que se observa la señal fluorescente de GFP y se observa la formación de agregados cuando se expresan las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del, en comparación con la señal difusa de Dp71 en células SHSY5Y (D), N1E-115 (E) y HeLa (F). El análisis cuantitativo se realizó empleando el software GnapPrism 6 y el porcentaje de células con agregados Dp71 vs Dp71-C272Y y Dp71 vs Dp71-E299del muestra diferencias significativas indicadas por los valores de p obtenidas mediante el análisis ANOVA (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). Barra de escala: D-F, 10 μ m.

8.2 Análisis bioinformático de Dp71-C272Y y Dp71-E299del

Debido a que la estructura de la Dp71 no ha sido cristalizada y con la finalidad de conocer el posible efecto de las modificaciones C272Y y de E299del sobre la estructura de la Dp71, lo que podría explicar la formación de agregados tipo homodímero, se ingresó la secuencia de aminoácidos de la Dp71 (NP_004006.1) y de las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del a los servidores PHYRE2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>), I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>), RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/>) y SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Los modelos que presentaron mayor calidad estereoquímica fueron seleccionados con el análisis estructural de enlaces psi-phi empleando la plataforma Ramachandran plot (<https://zlab.umassmed.edu/bu/rama/>) como se describe más adelante. Con base en estos datos, los modelos predictivos de mayor calidad fueron obtenidos en el servidor I-TASSER (Fig 8). Esta herramienta bioinformática identifica en la librería PDB estructuras homologas usando LOMETS (Local Meta-Threading Server), que es un algoritmo que consiste de múltiples programas individuales de enhebrado

para construir la topología completa de los modelos. Las estructuras de regiones no alineadas son creadas desde el inicio basadas en simulaciones de Monte Carlo de intercambio de réplicas. A continuación las estructuras son reensambladas buscando las conformaciones de energía libre mas bajas y finalmente, los modelos son refinados por diversos algoritmos (Yang & Zhang, 2015).

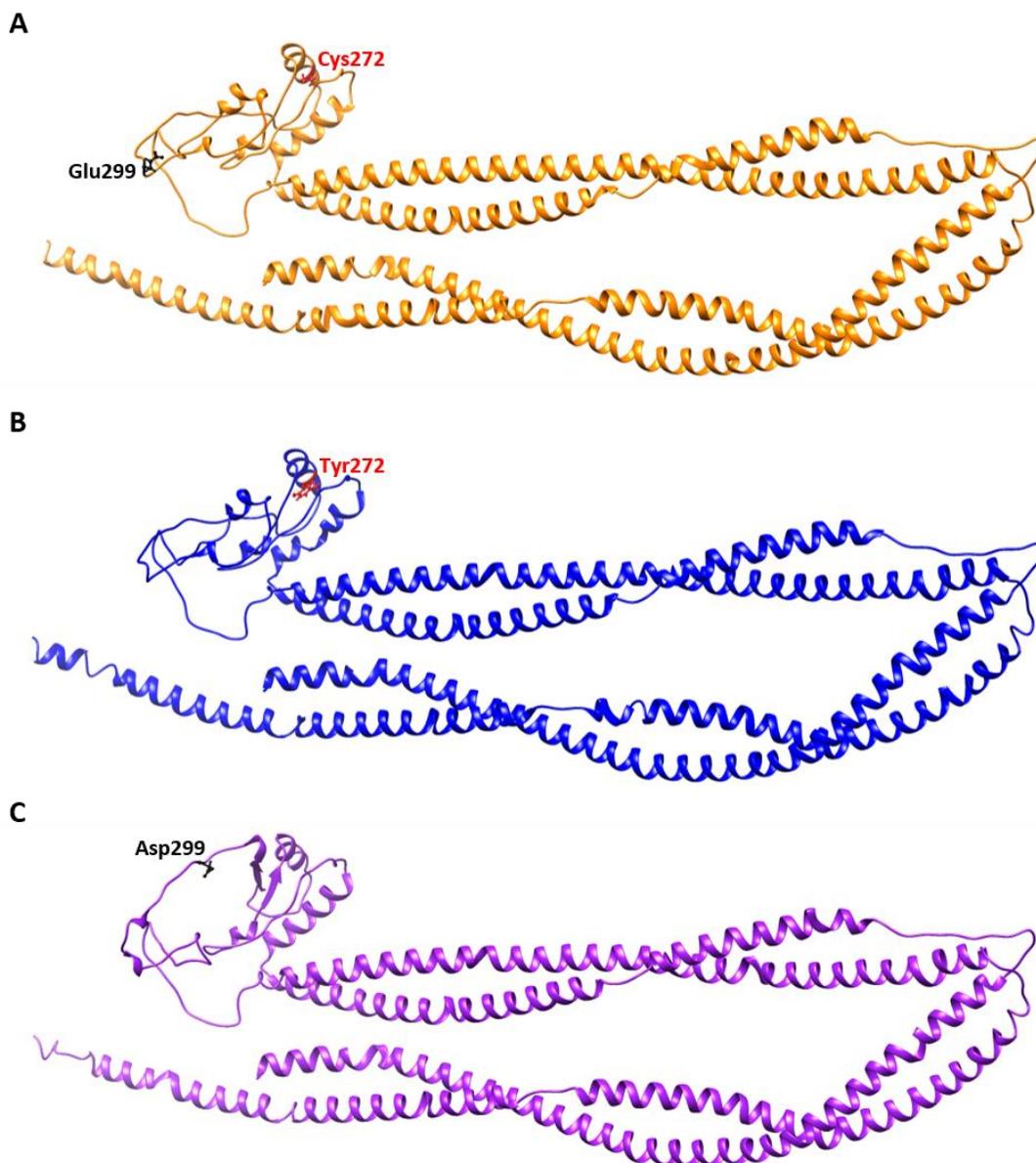


Figura 8. Efectos de las mutaciones C272Y y E299del sobre la estructura de la Dp71.

(A) La visualización y edición en Chimera 1.16 de los modelos 3D obtenidos en el servidor I-TASSER permitió distinguir la estructura de las proteínas Dp71 y sus mutantes, así como los cambios estructurales producidos por las mutaciones C272Y (B) y E299del (C).

La confiabilidad de cada modelo es medida cuantitativamente por el C-score, que se calcula en función de la significancia de los alineamientos del templado y los parámetros de convergencia de las simulaciones del ensambaje de la estructura. El valor del C-score va de -5 a 2, donde el C-score con el valor más alto significa que es un modelo con alta confianza. Asimismo, se considera que un valor mayor a -1.5 corresponde a un modelo que suele tener un plegamiento correcto (Yang & Zhang, 2015). Los modelos que se eligieron corresponden al C-score más alto obtenido para cada serie de resultados: de esta forma, el C-score del modelo de la Dp71 correspondió a -0.44, el modelo de Dp71-C272Y a -0.45 y finalmente, el modelo Dp71-E299del a -0.43 (Tabla 5).

Estructuras	C-score	RMSD (Å)	TM-score
Dp71	-0.44	8.7±4.6	0.66±0.13
Dp71-C272Y	-0.45	8.8±4.6	0.66±0.13
Dp71-E299del	-0.43	11.44±	0.53±0.15

Tabla 5. Parámetros de los modelos estructurales de las proteínas Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del obtenidos en el servidor I-TASSER.

TM score y RMSD son estándares para medir la similitud entre dos estructuras y medir la precisión del modelado cuando se conoce la estructura nativa, y cuando la estructura nativa es desconocida se predice el puntaje TM y RMSD de los modelos en relación con las estructuras nativas basado en el C-score.

La validación de los modelos se llevó a cabo empleando el Ramachandran Plot Server que se basa en el examen de la estructura total de las proteínas considerando los ángulos de torsión phi (φ) y psi (ψ) de los aminoácidos, analizando en la estructura el contacto entre los átomos considerando sus radios de Van Der Waals, y cada ángulo de torsión que cause un choque de átomos corresponderá a

una conformación estéricamente no permitida en el modelo (Choudhuri, 2014). Se considera que en un modelo de buena calidad, más del 90% de los aminoácidos se encuentran en las regiones más favorecidas (Muzammal *et al.*, 2022), y es común que un número muy pequeño de valores se encuentren en regiones atípicas o no permitidas ya que a menudo se encuentran relacionados a algunos aspectos funcionales de la proteína (Richardson *et al.*, 2018). Adicionalmente, el porcentaje de calidad/precisión de los modelos se calculó sumando los números residuos incluidos en zonas preferenciales y zonas permitidas (Fig 9).

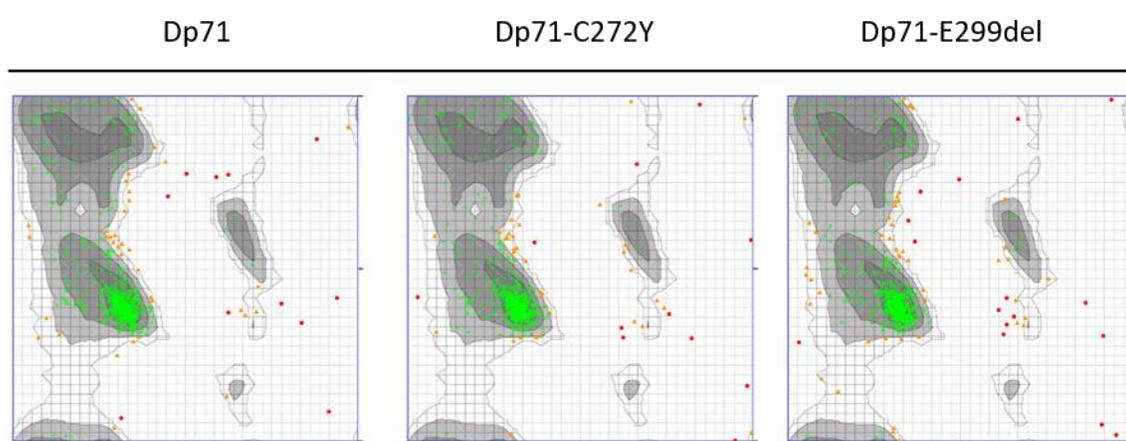


Figura 9. Análisis Ramachandran de los modelos Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del.

El análisis Ramachandran Plot obtenido para los modelos Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del muestra los residuos de cada modelo localizados en una región favorecida (puntos verdes), región permitida (puntos cafés) y región no permitida (puntos rojos).

Los resultados del análisis Ramachandran de la estructura de las proteínas demuestran que los modelos obtenidos en este trabajo presentan buena calidad y estabilidad estereoquímica (Tabla 6).

Estructuras	Residuos en región favorecida (%)	Residuos en región permitida (%)	Residuos en región no permitida (%)	Precisión del modelo (%)
Dp71	92.19	5.98	1.82	98.18
Dp71-C272Y	92.19	5.98	1.82	98.18

Dp71-E299del	89.68	7.65	2.66	97.34
--------------	-------	------	------	-------

Tabla 6. Analisis de las estructuras de las proteínas Dp71 y las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del mediante Ramachandran plots.

El alto porcentaje de los residuos en las regiones favorecidas y permitidas en los modelos Dp71, Dp71-C272Y y Dp71-E299del resulta en la alta precisión de todos los modelos analizados, como se puede apreciar en la columna de la extrema derecha.

Posteriormente, para hacer un alineamiento estructural de los modelos de proteínas, el alineamiento entre Dp71 y las estructuras mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del fue realizado empleando la herramienta TM-Align contenida en el servidor I-Tasser. De este análisis, se obtuvieron los parámetros TM-score y *Root Mean Square Deviation* (RMSD). El TM-score analiza la similaridad topológica de dos estructuras proteicas y sus valores van del 0 al 1, donde 1 indica una coincidencia perfecta, y los valores mas altos indican una mayor similaridad con el modelo nativo (Alapati *et al.*, 2020). Por su parte, el RMSD indica la distancia promedio entre los esqueletos de las proteínas superpuestas, y se considera que los valores mayores que 0.15 constituyen perturbaciones estructurales significantes que podrían tener implicaciones funcionales en la proteína (Moreira *et al.*, 2013). De esta manera, los resultados obtenidos indican que, respecto al modelo predicho de la Dp71, las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del dan lugar a estructuras diferentes (TM-score) con perturbaciones estructurales significantes que podrían tener efectos funcionales (RMSD) (Tabla 7).

Comparación de modelos	TM-score	RMSD (Å)
Dp71/Dp71	1	0
Dp71/Dp71-C272Y	0.9824	1.24
Dp71/Dp71-E299del	0.9523	1.74

Tabla 7. Indices obtenidos en el alineamiento estructural de los modelos estructurales de las proteínas Dp71 y las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del.

Los modelos obtenidos en el servidor I-TASSER fueron comparados con la herramienta TM-Align y los resultados indican diferencias significativas en el TM-score y RMSD entre Dp71 vs Dp71-C272Y y Dp71 vs Dp71-E299del.

Posteriormente, se realizó una superposición de estructuras, que es un método de alineamiento de estructuras independiente de su secuencia para comparar la estructura de la Dp71 con Dp71-C272Y y Dp71-E299del. En el primer caso, fue posible observar que tanto C272 y Y272 se encuentran en una hélice y en ambas estructuras en el mismo posicionamiento; sin embargo, la mutación Dp71-C272Y causa cambios sutiles en el arreglo de las asas que forman parte de la estructura con respecto al modelo de la Dp71. Por otra parte, la comparación de la Dp71 contra Dp71-E299del indica que los aminoácidos E299 y G299 se localizan en una posición distinta en cada modelo, además en la estructura Dp71-E299del se observan cambios evidentes en la región cercana al aminoácido 299, por lo que su eliminación tiene un gran impacto en la estructura de la Dp71 (Fig 10B). Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos con la herramienta TM-Align y descritos en el párrafo anterior, que indican que respecto a Dp71, Dp71-E299del tiene mayores diferencias que Dp71-C272Y y que sugieren que ambas mutaciones tienen efectos funcionales potenciales sobre la Dp71.

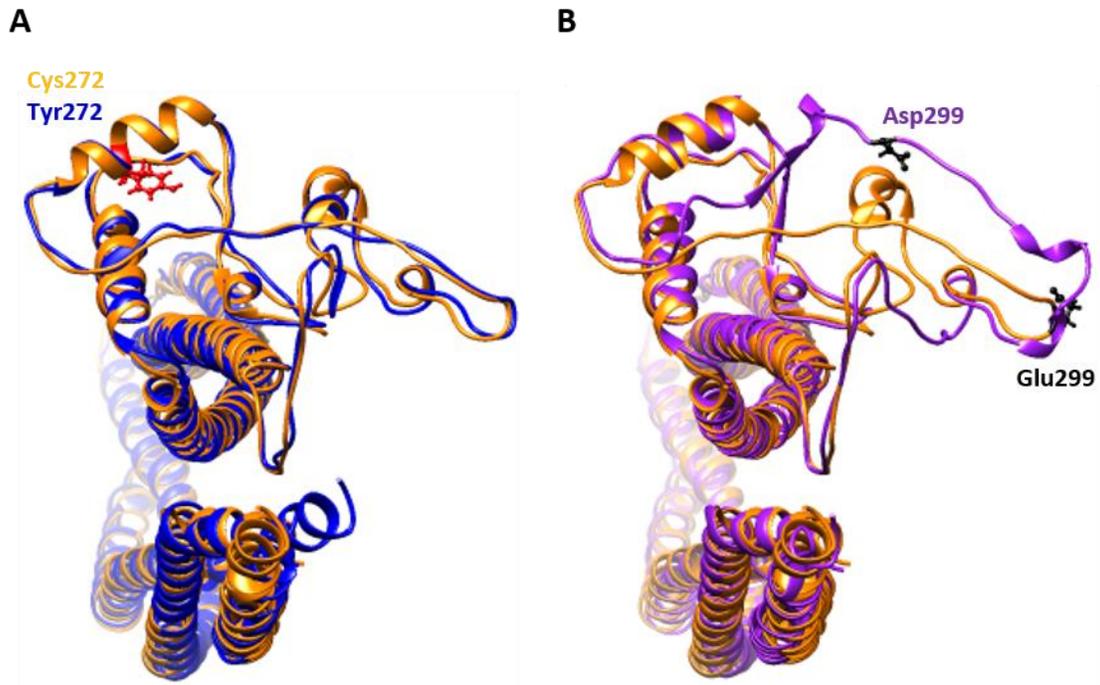


Figura 10. Sobrelapamiento estructural de los modelos Dp71-C272Y y Dp71-E299del.

Los modelos 3D obtenidos en I-TASSER de la Dp71 (naranja) y las estructuras de las proteínas mutantes Dp71-C272Y (azul) y Dp71-E299del (morado) se sobrelaparon con la estructura de la Dp71. De esta manera, se observan a detalle los cambios en las estructuras mutantes, cambios discretos y ligeros desplazamientos de las asas en el sobrelapamiento de la mutante Dp71-C272Y vs Dp71 (A) y cambios más evidentes en el sobrelapamiento de la mutante Dp71-E299del que causan que el aminoácido 299 se desplace y se encuentre en una posición distinta respecto a la que ocupa en Dp71 (B).

Debido a que los cambios observados en la estructura de la Dp71-C272Y al comparar con la estructura de la Dp71 fueron discretos, y con la finalidad de analizar a detalle el posible efecto de esta mutación sobre la estructura de la Dp71, se ingresó el modelo de la Dp71 al servidor Dynamut. Brevemente, Dynamut emplea el “Normal Mode Analysis” (NMA) que estudia movimientos armónicos en un sistema molecular, proporcionando información sobre su dinámica y conformaciones accesibles; de esta manera, Dynamut permite predecir el efecto de mutaciones puntuales sobre la estabilidad de la proteína (Rodrigues *et al.*, 2018). Adicionalmente, se sabe que la flexibilidad de los residuos expuestos en la superficie proteica tiene un papel en el reconocimiento de los sitios de unión durante las interacciones proteína-proteína (Singh *et al.*, 2021). Interesantemente, los resultados obtenidos en nuestro análisis indican que la sustitución de cisteína por

tirosina en el aminoácido 272 de la Dp71 causa la disminución de la flexibilidad de la estructura, principalmente en 3 regiones. La primera región afectada va del aminoácido 230 al 241, la segunda región del aminoácido 265 al 280 y finalmente, del aminoácido 295 al 300 y que se señalan con color azul (Fig. 11A). La disminución de la flexibilidad en esta región se puede derivar del cambio de interacciones atómicas, toda vez que la presencia de la cisteína puede generar puentes disulfuro que son esenciales para la función de las proteínas, mientras que la tirosina es un aminoácido hidrofóbico a causa de su anillo aromático que puede interactuar con aminoácidos de la hélice localizada en esta región (Fig. 11B).

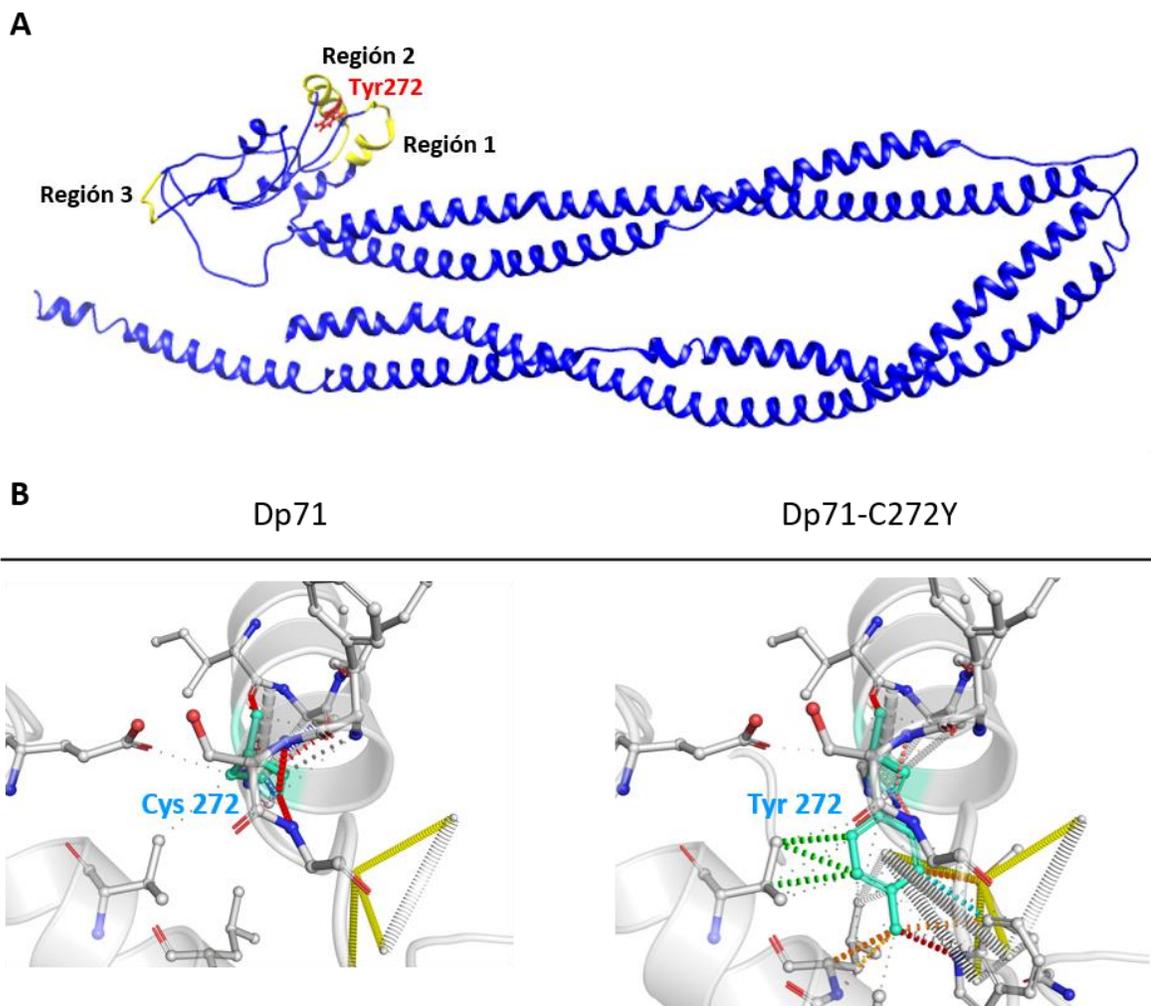


Figura 11. Análisis del efecto de la mutación Dp71-C272Y empleando el servidor DynaMut.

(A) El análisis de la flexibilidad de Dp71-C272Y determinado por la energía entrópica vibratoria entre Dp71 y Dp71-C272Y que corresponde a $\Delta\Delta S_{\text{vib}} \text{ ENCoM: } -1.173 \text{ kcal.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$, indica que la mutación causa la disminución de la flexibilidad o rigidificación de la estructura principalmente en tres regiones que comprenden los aminoácidos 230 al 241 (región 1), 265 a 280 (región 2) y 295 al 300 (región 3). (B) Los residuos C272 y Y272 están coloreados en verde claro, en la Dp71 se muestran los enlaces de hidrógeno existentes (rojo), mientras que la sustitución por tirosina provoca un cambio en las interacciones interatómicas circundantes caracterizadas por contactos hidrofóbicos (verde) y enlaces de hidrógeno débiles (naranja).

En conjunto, los resultados de los análisis bioinformáticos realizados indican, de forma predictiva, que las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan cambios en la estructura de la Dp71 que pueden influir tanto en la arquitectura de las cadenas laterales de esta proteína como en las interacciones de las regiones aledañas entre sí, lo que podría ocasionar modificaciones conformacionales localizadas que explicarían la formación de los agregados que se observan al expresar las proteínas mutantes en distintas líneas celulares.

8.3 Los agregados Dp71-C272Y y Dp71-E299del tienen una localización celular diferencial y causan alteraciones en la morfología celular y nuclear.

Como se mencionó previamente, las mutaciones analizadas en este trabajo se ubican en el dominio ZZ de la Dp71. La cisteína correspondiente al aminoácido 272 de la Dp71 se localiza en el segundo dedo de zinc del dominio ZZ de la Dp71, mientras que, el aminoácido 299 se localiza en una región adyacente a los dedos de zinc (Becker *et al.*, 2003; Flanigan *et al.*, 2009; Juan-Mateu *et al.*, 2015; Lenk *et al.*, 1996). Previamente, se reportó que el dominio ZZ de la Dp71 está involucrado en la importación nuclear de la Dp71 y que algunos aminoácidos dentro de este dominio tienen un papel crítico en la importación nuclear. Uno de ellos fue la cisteína 272, ya que al sustituirla se observó la disminución de la localización nuclear de una construcción que contenía al dominio ZZ de la Dp71 fusionado a TetraGFP (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a). Sorpresivamente, en este trabajo encontramos que ambas proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del, retuvieron su capacidad de localizarse en núcleo, aunque su distribución se observó predominantemente en

forma de agregados. Debido a que dichos agregados se observaron tanto en el núcleo como en el citoplasma, y con la finalidad de determinar si la proporción de la distribución subcelular de los agregados era la misma para ambas mutaciones, se cuantificó el número de células con localización de los agregados predominantemente nuclear o predominantemente citoplasmática, en la línea celular N1E-115. En el caso de la expresión de la forma mutante Dp71-C272Y se observó que, en el 40% de las células transfectadas los agregados se localizaron exclusivamente en el núcleo, en el 16% se localizaron solo en el citoplasma y en el restante 44% se observaron en ambos compartimentos. Respecto a las células que expresaron Dp71-E299del, en el 3.33% de las células se observaron agregados exclusivamente en el núcleo, en el 40% se observaron exclusivamente en el citoplasma y en el 56% de las células se observaron en ambos compartimentos celulares (Fig 12A). Lo anterior indica que, aunque ambas proteínas mutantes tienen la capacidad de entrar al núcleo, estas tienen una localización diferencial, siendo la Dp71-C272Y mayoritariamente nuclear y la Dp71-E299del mayoritariamente citoplasmática, con respecto a la Dp71 silvestre.

Previamente, se ha reportado que la proteína Dp71 tiene un papel importante en el mantenimiento de la estructura nuclear, ya que se ha descrito su interacción con proteínas como lámina B1, emerina y miembros del complejo DAP nuclear (Fuentes-Mera *et al.*, 2006; Suárez-Sánchez *et al.*, 2014; Villarreal-Silva *et al.*, 2011). Para iniciar la evaluación del efecto de las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del sobre la morfología nuclear, usando el programa Image J, se analizó la circularidad/redondez y el área de los núcleos teñidos con DAPI. A partir de células N1E-115 transfectadas con los vectores de estudio, se observó que las células que expresan a las formas mutantes de Dp71 tienen una morfología nuclear alterada, lo cual es evidenciado por la disminución del área nuclear y alteraciones en la circularidad de las células (Fig. 12B). Usando el programa Image J, se cuantificó el área nuclear y la circularidad en células N1E-115 transfectadas transitoriamente, lo que demostró que la sobreexpresión de las proteínas mutantes causa una disminución estadísticamente significativa en el área nuclear cuando se expresan

las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del; mientras que la circularidad se vio afectada solo cuando se expresa Dp71-C272Y (Fig 12B). Lo anterior muestra que efectivamente, la presencia de las formas mutantes de la Dp71 que se estudian en este trabajo, altera la morfología del núcleo celular.

Además de su papel en el núcleo, la proteína Dp71 tiene un papel muy importante para el mantenimiento de la integridad de la membrana citoplasmática y permite la unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de actina (Hemmings *et al.*, 1992; Sjöblom *et al.*, 2008; Way *et al.*, 1992) Esta función, en conjunto con las alteraciones morfológicas observadas en el núcleo nos llevarón a estudiar si las mutaciones también afectaban la morfología celular, a través del análisis del citoesqueleto formado por los filamentos de actina. Para esto, células SHSY5Y transfectadas con los vectores de estudio, fueron teñidas con faloidina para marcar la actina filamentosa. Usando microscopia de epifluorescencia se pudo observar un menor tamaño del citoesqueleto y una clara afectación de los filamentos de actina, cuando se expresaron las proteínas mutantes Dp71-C272Y en comparación al control Dp71 (Fig 12C). La cuantificación del área celular usando el programa ImageJ confirmó que la presencia de la mutación C272Y provoca una disminución estadísticamente significativa del área celular, mientras que la tendencia observada con la mutación E299del no fue estadísticamente significativa.

En conjunto, lo anterior revela que las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del, son suficientes para alterar la distribución subcelular de la Dp71, y afectan la morfología nuclear y celular. Esto sugiere que, en consecuencia, las mutaciones en la Dp71 podrían alterar las funciones de la Dp71 en distintos niveles.

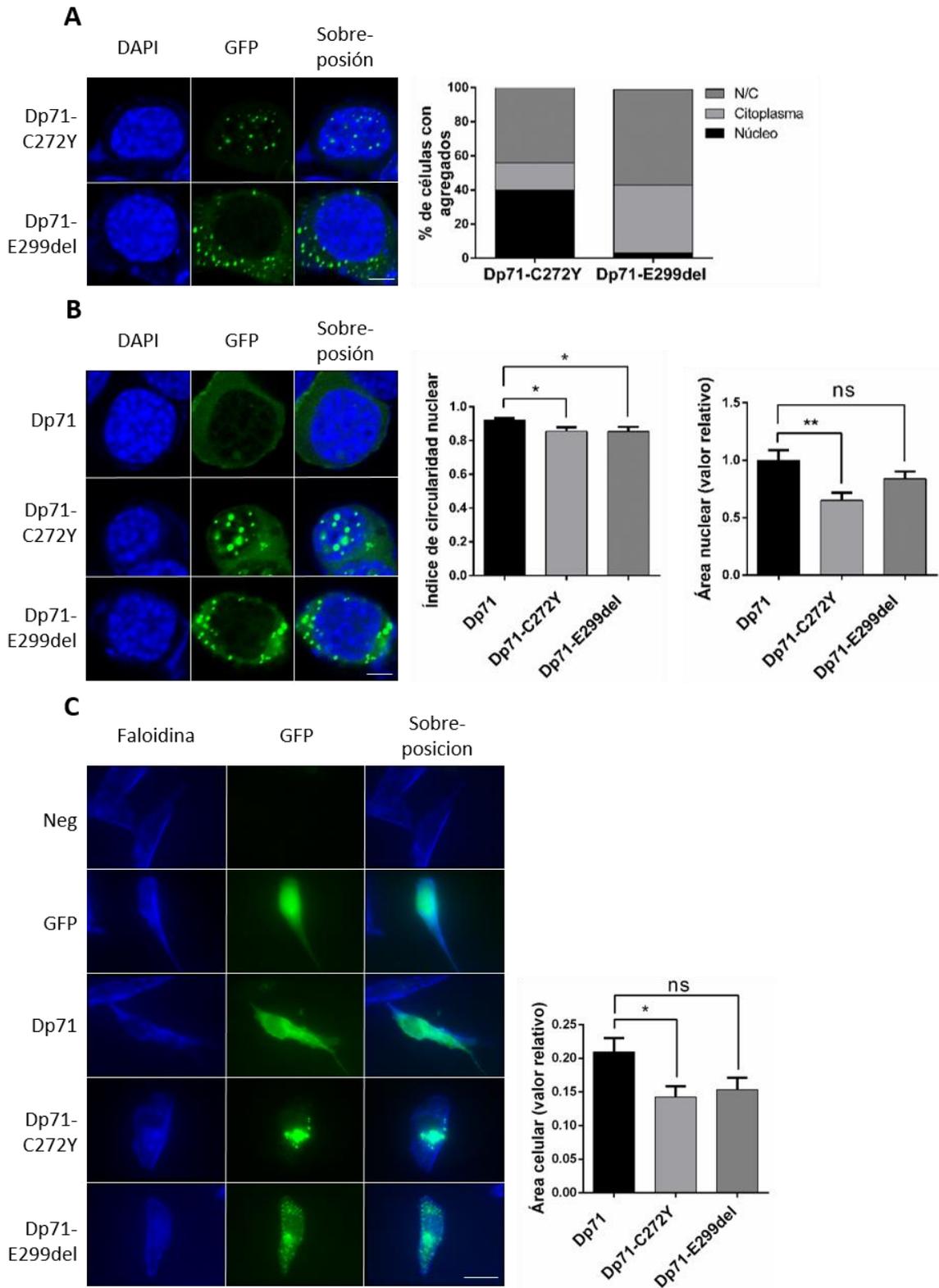


Figura 12. Efecto de los agregados Dp71-C272Y y Dp71-E299del sobre la morfología celular y nuclear.

(A) Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal. El análisis de la localización subcelular de los agregados de Dp71-C272Y y Dp71-E299del, muestra la ubicación celular diferencial de los agregados en las células N1E-115. (B) El análisis morfométrico muestra una reducción significativa del área nuclear de las células que expresan proteínas mutantes y cambios en el índice de circularidad de las células que expresan Dp71-C272Y. (C) El análisis morfométrico muestra una reducción significativa del área celular teñida con faloidina (azul) en las células SHSY5Y y que expresan ambas proteínas mutantes. El análisis cuantitativo se realizó empleando el software GnapPrism 6 y las diferencias significativas se indican mediante los valores de p obtenidos mediante el análisis ANOVA (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Barra de escala: A-B: 5 μm y C: 20 μm .

8.4 Dp71-C272Y/E299del causa la deslocalización subcelular de β -dístroglicano

Como anteriormente se ha mencionado, la Dp71 se asocia con proteínas de complejo DAP, que une al citoesqueleto de actina con la matriz extracelular (Matsumura & Campbell, 1994). Por su parte, el complejo DAP nuclear está constituido por las proteínas β -dístrobrevina y β -dístroglicano, y se ha reportado que la Dp71 estabiliza este complejo y mantiene los niveles de β -dístroglicano (Villarreal-Silva *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha comprobado que la Dp71 se une directamente con β -dístroglicano a través de los dominios WW, EF y ZZ de la distrofina (Chung & Campanelli, 1999; Grabarek, 2006; Huang *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 1995; Rentschler *et al.*, 1999) y que dentro del dominio ZZ, algunos residuos como la cisteína 3340 (272 de la Dp71) son cruciales para la unión de estas proteínas (Hnia *et al.*, 2007; Ishikawa-Sakurai *et al.*, 2004; Vulin *et al.*, 2014). En un paciente con DMD que tenía la sustitución de cisteína por tirosina en el aminoácido 3340 en la distrofina (C272Y de la Dp71) y que presentaba el fenotipo cognitivo de la DMD, se observó la reducción de β -dístroglicano en una biopsia muscular, lo que revela la importancia de la Dp71 para mantener los niveles de esta proteína. Debido a lo anterior, en este trabajo decidimos evaluar el efecto de las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del en la localización subcelular de β -dístroglicano en las líneas celulares SHSY5Y y N1E-115, usando inmunofluorescencia acoplada a microscopía

confocal. Las imágenes obtenidas al expresarse las proteínas Dp71-C272Y y Dp71-E299del muestran un patrón de inmunotinción alterado, caracterizado por la pérdida del característico anillo de β -dístroglicano y por su relocalización hacia el citoplasma, en ambas líneas celulares (Fig. 13A y 13B). Lo anterior indica que las mutaciones analizadas tienen un impacto sobre la localización subcelular de β -dístroglicano, posiblemente comprometiendo la integridad del complejo DAP nuclear y citoplasmático, y afectando las funciones propias de β -dístroglicano, toda vez que se ha reportado que β -dístroglicano cumple un importante papel en ambos compartimentos (Vélez-Aguilera *et al.*, 2018).

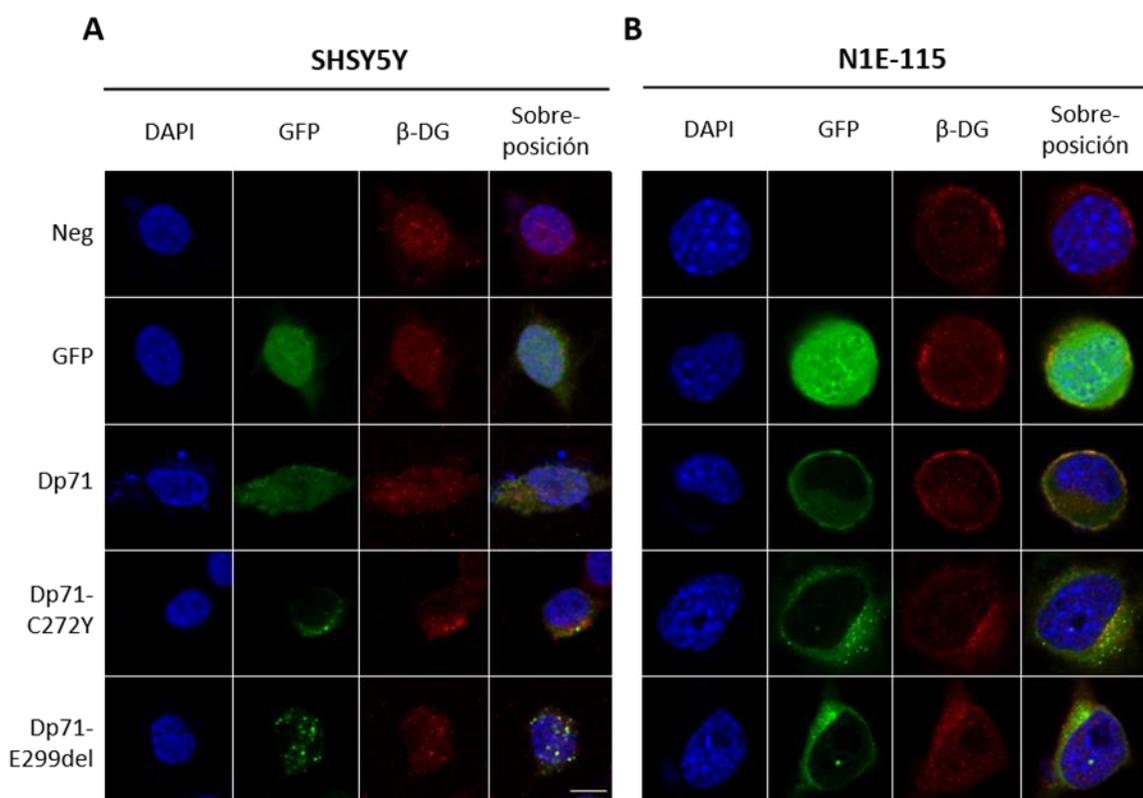


Figura 13. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de β -dístroglicano en líneas celulares neuronales.

(A) Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con un anticuerpo anti- β -dístroglicano (rojo) y posteriormente contrateñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal. La localización subcelular de β -dístroglicano se ve alterada y se reubica hacia el citoplasma en las células SHSY5Y (A) y N1E-115 (B) que expresan Dp71-C272Y y Dp71-E299del, en comparación con las células control. Barra de escala: A-B 10 μ m.

8.5 Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la lámina nuclear.

Se ha descrito que la proteína Dp71 se asocia con diversas proteínas nucleares, incluyendo lámina B1 (Villarreal-Silva *et al.*, 2011). La lámina B1 forma parte de la lámina nuclear, la cual es una red fibrilar que se intercala entre la cromatina y la envoltura nuclear, y que se asocia a importantes funciones tales como, el mantenimiento de la organización nuclear, estabilidad mecánica, organización de la cromatina, señalización, regulación de genes, estabilidad genómica y diferenciación celular (Worman, 2012). La Dp71 se une directamente a lámina B1, y se ha demostrado que la disminución de los niveles de Dp71 provoca una disminución de los niveles de lámina B1 y un desarreglo de la lámina nuclear (Villarreal-Silva *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, quisimos evaluar el efecto de las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del sobre la localización subcelular de la lámina B1 en las líneas celulares SHSY5Y y N1E-115, usando inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal. Las imágenes obtenidas muestran un patrón de inmunotinción alterado de la lámina B1, caracterizado por su disminución en la lámina nuclear, localización aberrante en citoplasma y la formación de agregados (células afectadas) (Fig. 14A y 14B). A partir de estas imágenes se realizó el conteo de células que presentaron afectaciones en la lámina B1 en tres ensayos independientes y los datos fueron analizados con una prueba ANOVA. Se encontró que en ambas líneas celulares existe diferencia estadísticamente significativa en el número de células con alteraciones en lámina B1 cuando se expresan Dp71-C272Y y Dp71-E299del, en comparación con Dp71, en ambas líneas celulares (Fig 14C). Estos resultados sugieren que la expresión de las formas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del tiene un impacto relevante sobre la integridad de la lámina y la morfología nuclear.

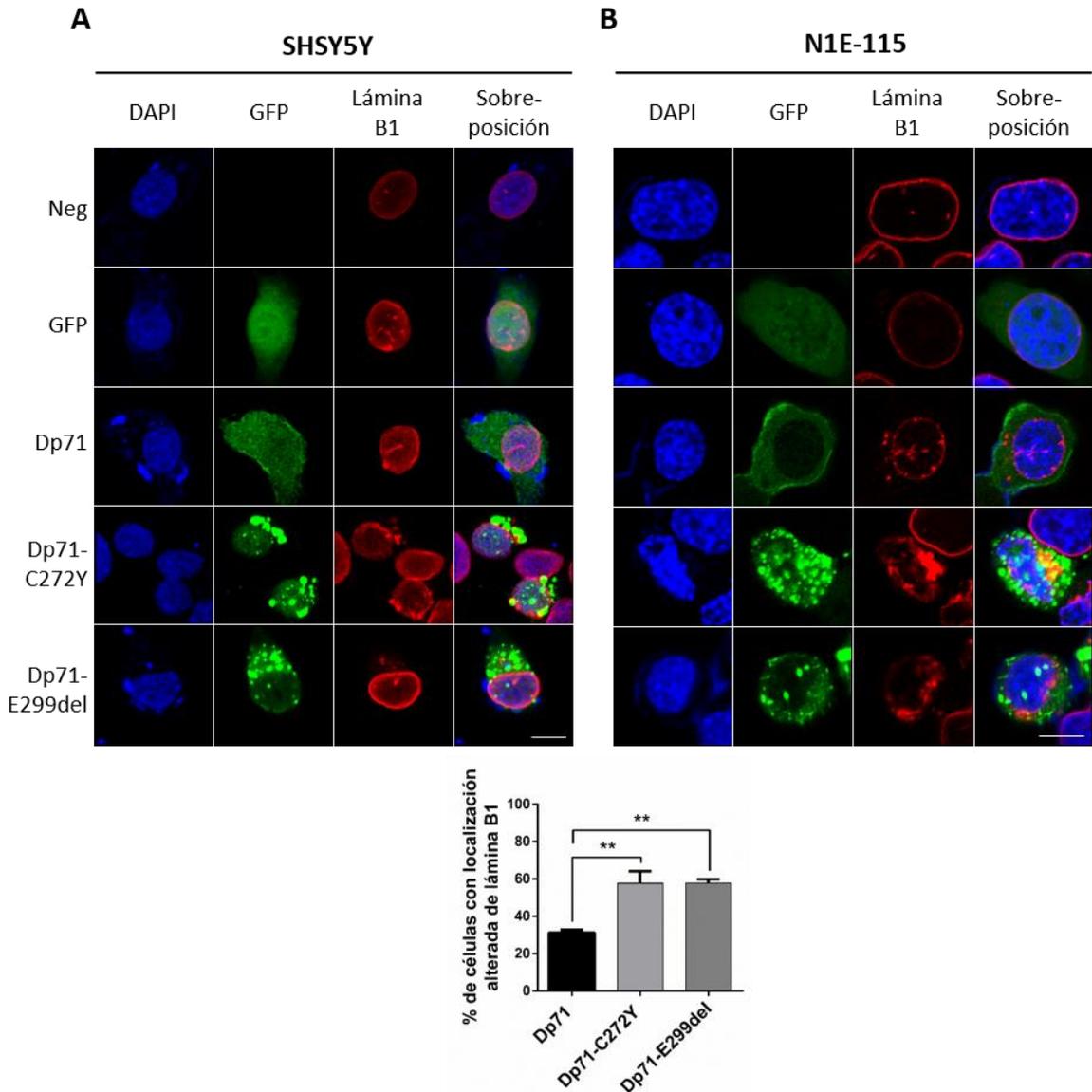


Figura 14. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la lámina B1 en líneas celulares neuronales

Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-lámina B1 (rojo) y posteriormente contrateñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal. Lámina B1 se muestra relocalizada hacia el citoplasma en las células SHSY5Y (A) y N1E-115 (B) que expresan Dp71-C272Y y Dp71-E299del en comparación con el control. El análisis cuantitativo se realizó empleando el software GhapPrism 6 y el porcentaje de células con expresión de Dp71 afectadas frente a las que expresan Dp71-C272Y y a Dp71-E299del muestra diferencias significativas indicadas por los valores de p obtenidos mediante el análisis ANOVA (**, $p < 0.01$) (C). Barra de escala: A-B 10 μ m.

A continuación, procedimos a analizar el efecto de las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del sobre la localización de lámina A/C, la cual es otra proteína de la lámina nuclear (de Leeuw *et al.*, 2018). Si bien a la fecha no se ha descrito su asociación con Dp71, se ha demostrado que lámina A/C se asocia con β -dístroglicano (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013) y que su localización es alterada cuando disminuyen los niveles de α -dístrobrevina (Aguilar *et al.*, 2015). Usando inmunofluorescencia acoplada a microscopía confocal observamos que tanto en la línea celular SHSY5Y, como en N1E-115, la lámina A/C se deslocalizó de la lámina nuclear y se relocalizó parcialmente al citoplasma (células afectadas), en presencia de las formas mutantes de la Dp71 (Fig. 15A y 15B). Un análisis estadístico ANOVA demostró que las diferencias en el porcentaje de células afectadas fueron estadísticamente significativas, cuando se compararon las células transfetadas con las mutantes de Dp71 con respecto a las células transfetadas con la Dp71 sin mutaciones (Fig. 15C). Las alteraciones observadas en la localización de la lámina B1 y la lámina A/C, demuestran que la Dp71 es relevante para la integridad de la lámina nuclear, lo que sugiere que la expresión de las formas mutantes de la Dp71, altera las funciones asociadas a esta estructura.

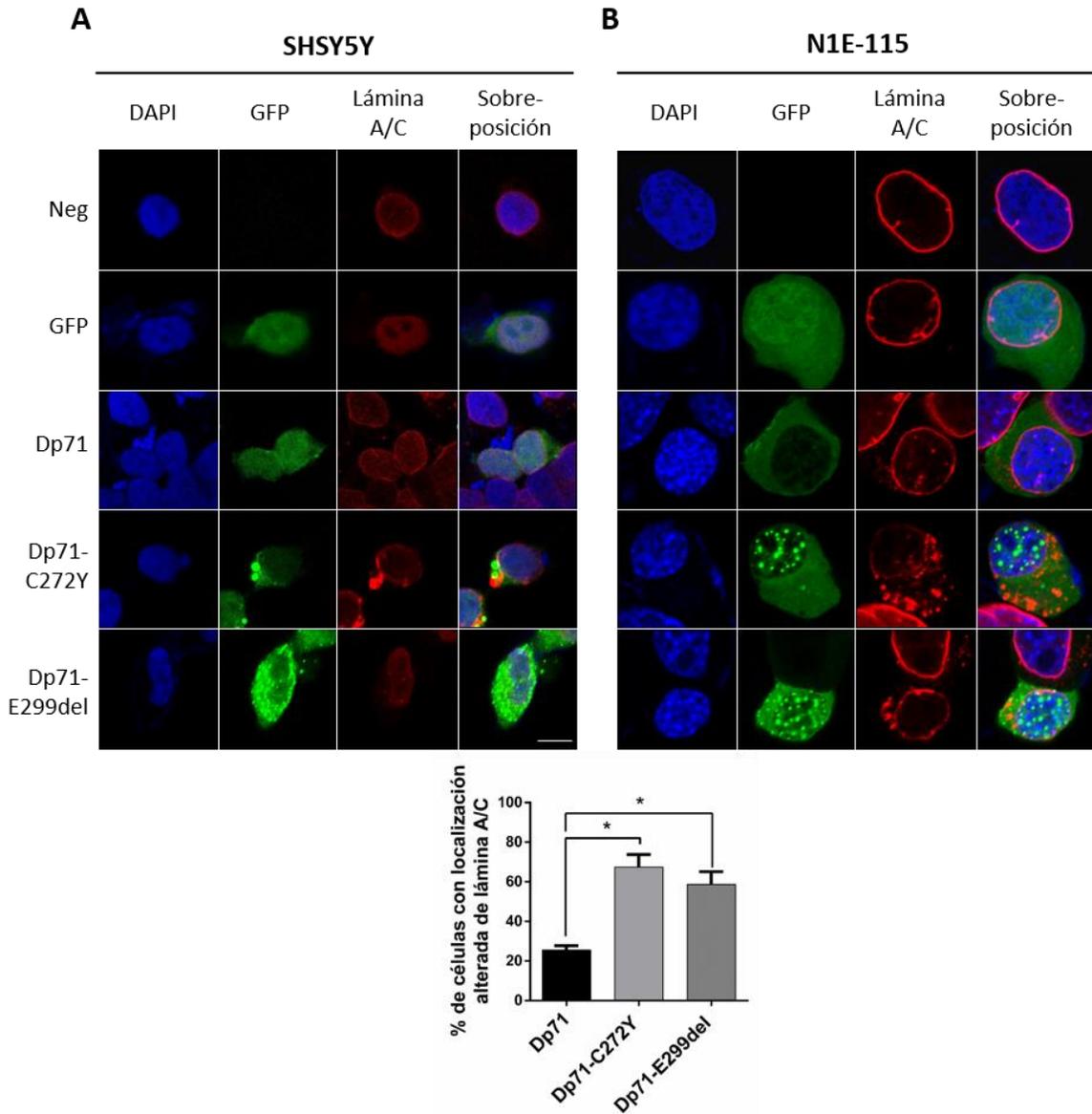


Figura 15. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la lámina A/C en líneas celulares neuronales.

(A) Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-lámina A/C (rojo) y posteriormente contrateñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal. La localización subcelular de lámina A/C se muestra alterada y parcialmente reubicada hacia el citoplasma en las células SHSY5Y (A) y N1E-115 (B) que expresan ambas proteínas mutantes en comparación con el control. El análisis cuantitativo se realizó en GraphPrism 6 y el porcentaje de células afectadas muestra diferencias estadísticamente significativas indicadas por los valores de p obtenidos mediante el análisis ANOVA (*, $p < 0.05$) (C). Barra de escala: A-B 10 μ m.

8.6 La expresión de Dp71-C272Y y Dp71-E299del altera la marca epigenética H3K9me3.

Una de las principales funciones asociadas a la lámina nuclear, consiste en la organización de regiones del genoma en dominios llamados Dominios Asociados a Lámina (LADs). Estos dominios se asocian con regiones de la cromatina con baja densidad génica, y están enriquecidos en H3K9me2 y H3K9me3, dos marcas de histona asociadas a heterocromatina constitutiva, por lo que la mayoría de los genes ubicados en los LADs están reprimidos o se expresan en bajos niveles (Roopra *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2020). Debido a las alteraciones observadas en la localización subcelular de las láminas B y A/C, nos preguntamos si la expresión de Dp71-C272Y y Dp71-E299del también tendría un efecto sobre la organización de los dominios LADs. Para esto, evaluamos la distribución nuclear de la modificación de histona H3K9me2 usando inmunofluorescencia acoplada a microscopia confocal en las células N1E-115. Las imágenes obtenidas muestran un patrón de inmunotinción irregular de H3K9me2 cuando se expresan Dp71-C272Y y Dp71-E299del (Fig. 16A). Adicionalmente, el análisis de la densidad integrada que corresponde al producto del área y el valor medio de grises, no mostro diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la Dp71 y Dp71-C272Y/Dp71-E299del (Fig. 16B). Sin embargo, al analizar el perfil de intensidad a lo largo de una línea observamos un patrón alterado; mientras que en las células que expresan a la Dp71, la señal de la marca H3K9me2 se concentra en la periferia nuclear, en las células que expresan a las proteínas mutantes, la señal de la marcar H3K9me2 se distribuye homogéneamente a través de todo el núcleo (Fig. 16C). Lo anterior sugiere que la Dp71 tiene un papel importante en la organización de los dominios LADs y por consiguiente en la distribución de la heterocromatina.

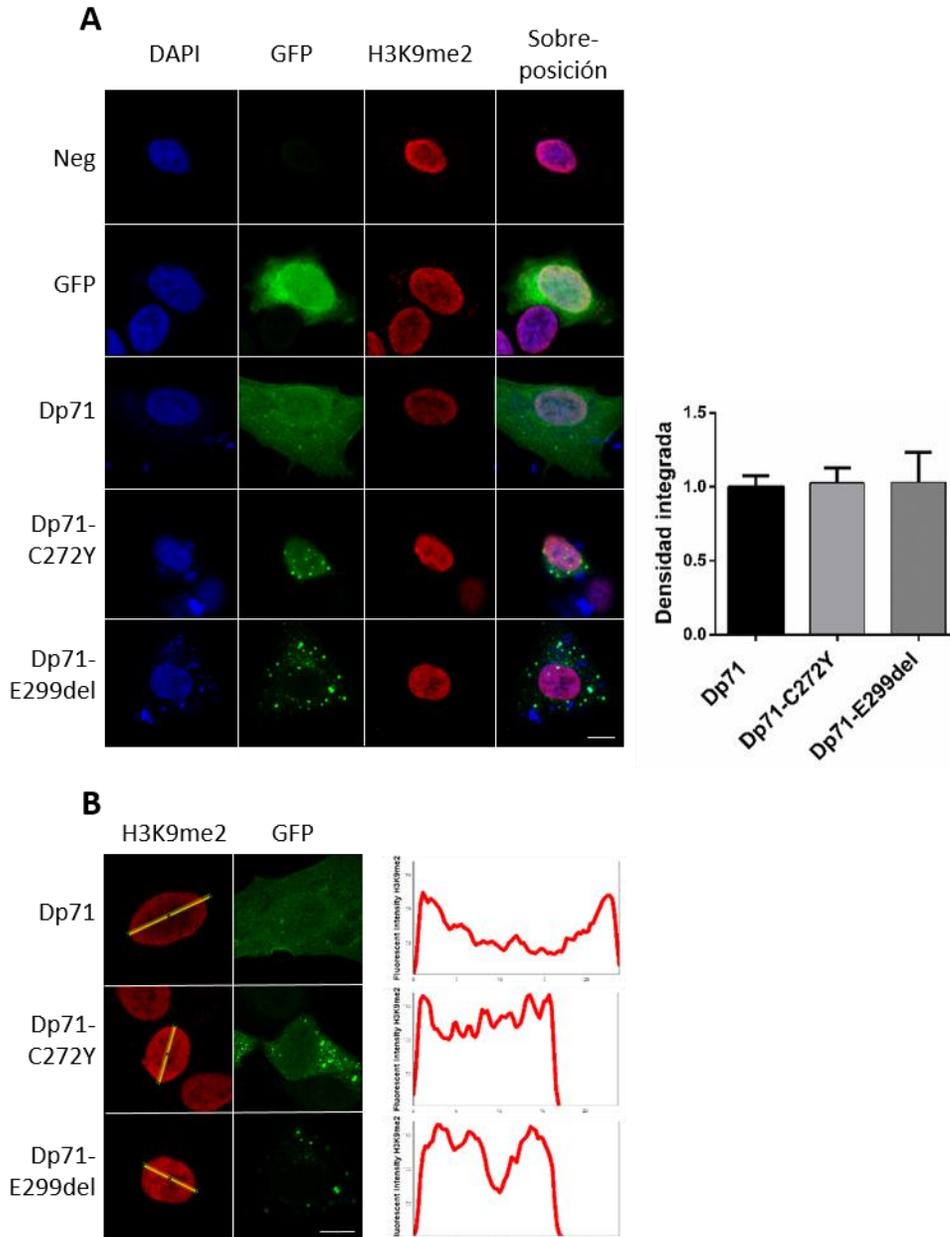


Figura 16. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan la deslocalización de la heterocromatina revelada por la marca epigenética H3K4me2.

(A) Las células fueron cultivadas en cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-H3K9me2 (rojo) y posteriormente contrateñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal. La marca H3K9me2 muestra una alteración en la distribución de su señal en las células SHSY5Y que expresan ambas proteínas mutantes respecto al control. La densidad integrada de la señal H3K9me2 no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las células que expresan Dp71-C272Y o Dp71-E299 y el control. (B) El análisis de perfil de línea muestra la alteración del patrón de fluorescencia de la marca H3K9me2 cuando se expresan proteínas mutantes, en comparación con el control. Barra de escala: A y C 10 μ m.

8.7 La Dp71 participa en la regulación de la expresión de genes RE-1 a través de su asociación con Braf35.

Como se mencionó previamente, la modificación de histona H3K9me2 es parte importante para la regulación de la transcripción de genes neuronales, mediada por el complejo REST. Para esto, la metiltransferasa G9a es reclutada por el complejo REST para dimetilar a H3K9, y la demetilasa LSD1 para desmetilar a H3K4, y así consolidar la represión genética en células no neuronales (Li *et al.*, 2019). El complejo REST además incluye otras proteínas como, CoREST, BHC80 y Braf35 e iBraf (Annese *et al.*, 2016), que contribuyen a la regulación de la expresión de genes neuronales a través de la remodelación de la cromatina (Annese *et al.*, 2016; Ceballos-Chávez *et al.*, 2012). Interesantemente, se ha descrito que las proteínas Braf35 e iBraf también se asocian con distrobrevina, y ensayos de interacción *in vitro* indicaron una posible asociación con Dp71 (Artegiani *et al.*, 2010b). Previamente, se ha reportado que la Dp71 participa en la diferenciación neuronal (Acosta *et al.*, 2004; Marquez *et al.*, 2003; Villarreal-Silva *et al.*, 2010). Sin embargo, a la fecha no ha sido completamente descrito su papel en la regulación de este proceso. Por esta razón, en este trabajo nos propusimos evaluar la posible asociación entre la Dp71 y las proteínas Braf35 e iBraf, e iniciar el estudio del papel de la Dp71 sobre las funciones de estas proteínas. Con el objetivo de corroborar la interacción entre la distrofina Dp71 y Braf35 se realizaron pruebas de interacción *in vivo*, usando ensayos de inmunoprecipitación y de GFP-Trap. Se realizó la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Braf35, usando extractos totales de células N1E115. El inmunoprecipitado fue analizado por inmunodetección en fase sólida con el mismo anticuerpo inmunoprecipitante, como control, y con un anticuerpo anti-Dp71. El resultado confirmó que la proteína Dp71 se une *in vivo* a Braf35 (Fig 17A). Adicionalmente, se realizaron ensayos de GFP-Trap utilizando extractos de células N1E-115 transfectadas con vectores que expresan GFP, como control, y GFP-Dp71. Los resultados confirmaron que las proteínas Dp71 y Braf35 están asociadas *in vivo*, ya que se observó una banda de unión específica en el GFP-Trap de la fusión GFP-Dp71, pero no usando solo GFP (Fig 17B). Con el objetivo de estudiar la colocalización de la Dp71 con Braf35 en células N1E115

diferenciadas y no diferenciadas, se realizaron ensayos de colocalización usando anticuerpos específicos para cada proteína. Para esto, las células N1E-115 fueron sembradas en cubreobjetos e inducidas a diferenciación por 5 días. La presencia de extensiones neuríticas observada a través de campo claro permitió confirmar la diferenciación de las células a un fenotipo neuronal. Adicionalmente, se evaluó por inmunofluorescencia a la proteína MAP2, la cual es usada como marcador de diferenciación (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; Lauzon *et al.*, 2017). Como se esperaba, en las células N1E-115 diferenciadas, MAP2 mantiene cierta localización en el núcleo, pero se enriquece en el citoplasma y particularmente hacia las prolongaciones neuríticas, confirmando la correcta diferenciación de las células N1E-115 (Fig 17C).

A continuación, para verificar la posible colocalización de Dp71 con Braf35 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia doble acoplada a microscopia confocal en células N1E-115 no diferenciadas e inducidas a diferenciación. Previamente se ha descrito que ante un estímulo de diferenciación neuronal Dp71 se concentra en núcleo, pero parte de la señal se relocaliza a citoplasma y a las extensiones neuríticas (Marquez *et al.*, 2003; Rodríguez-Muñoz *et al.*, 2015). Interesantemente, en nuestro ensayo se observó que en células no diferenciadas las proteínas Dp71 y Braf35 se localizaron predominantemente en el núcleo, pero después de la diferenciación Braf35 y Dp71 fueron relocalizadas al citoplasma, en donde además se observan en las extensiones neuríticas (Fig. 17D).

Como un primer abordaje sobre la importancia funcional de estas interacciones, se realizaron ensayos de transfección transitoria con los vectores que expresan a las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del en células SHSY5Y, seguidas de ensayos de inmunofluorescencia para identificar a la proteína Braf35. En las células sin transfectar se observó la distribución nuclear de Braf35, la cual se mantiene al sobreexpresar a la proteína reportera GFP (control) y fusionada a la Dp71. Sin embargo, la sobreexpresión de las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del causa un importante efecto sobre la proteína Braf35, caracterizado su deslocalización hacia el citoplasma (Fig. 17E). Lo anterior apunta hacia una relación funcional entre

Dp71 y BraF35, y sugiere que la Dp71 podría estar involucrada en el proceso de diferenciación a través de su asociación con BraF35.

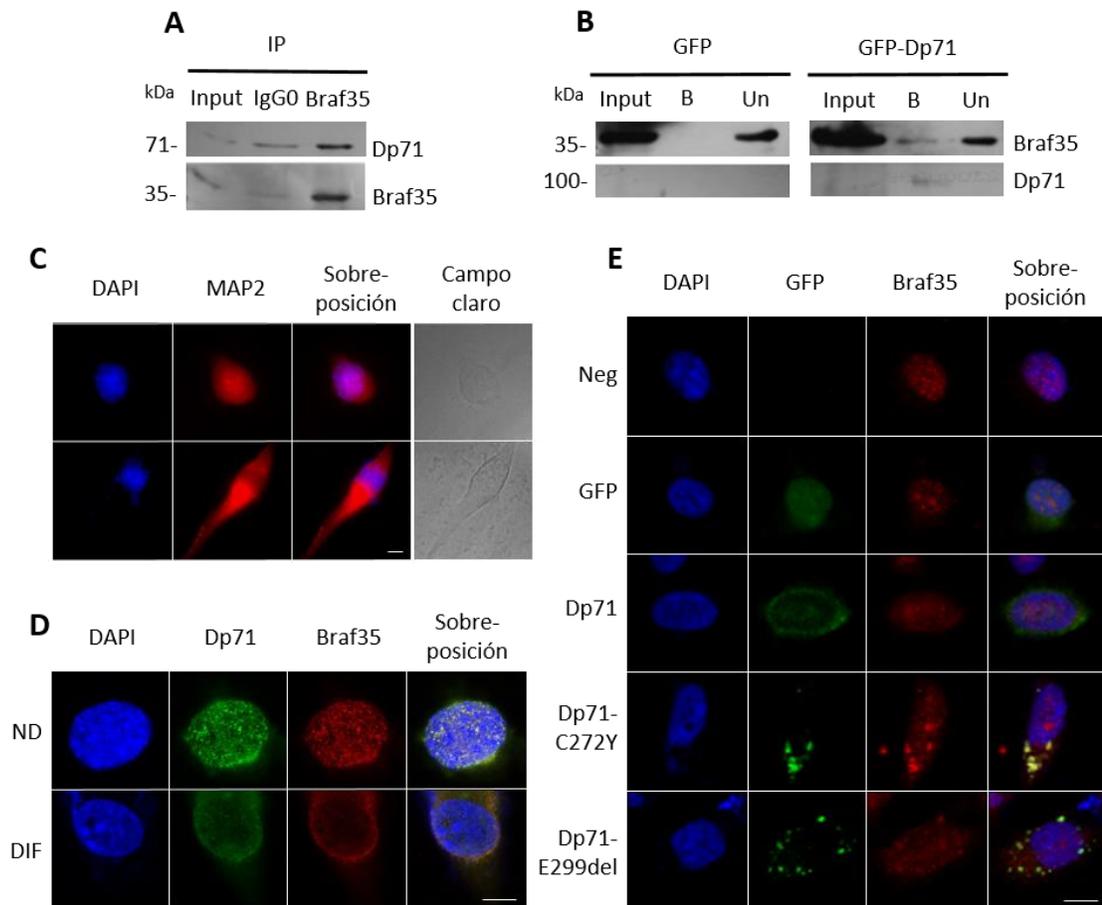


Figura 17. Dp71 se asocia con BraF35 y afecta su distribución.

(A) Las células N1E-115 fueron transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente, los inmunoprecipitados totales de BraF35 de células N1E-115 se sometieron a análisis de Western Blot con anticuerpos específicos para BraF35 y Dp71 y se reveló la interacción de Dp71 con BraF35. (B) Los lisados de células N1E-115 transfectadas transitoriamente para expresar GFP-Dp71 se inmunoprecipitaron usando GFP-Trap y las proteínas inmunoprecipitadas se sometieron a análisis de Western blot con anticuerpos contra BraF35 y GFP; Un, proteínas no unidas; B, proteínas unidas. (C) Las células N1E-115 fueron cultivadas en cubreobjetos y se diferenciaron con tratamiento con DMSO, se fijaron 1 día después de la siembra (sin diferenciar, ND) y 5 días después del tratamiento (diferenciadas, DIF). La extensión de las neuritas propias de la diferenciación neuronal fué revelada por inmunofluorescencia usando un anticuerpo anti-Map2 (rojo) y se realizo una contratinción con DAPI para revelar los núcleos (azul). (D) Las celulas fueron teñidas con un anticuerpo anti-BraF35 (rojo) y posteriormente contrateñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). Las imágenes corresponden a cortes transversales obtenidos por microscopía confocal y la inmunofluorescencia dual de la Dp71 (verde) y BraF35 (roja) muestra una relocalización de BraF35 hacia el citoplasma

en respuesta al proceso de diferenciación, lo cual coincide con la relocalización de la Dp71. (E) La inmunofluorescencia de Braf35 (rojo) en células transfectadas con las proteínas mutantes muestra que Braf35 se relocaliza al citoplasma y su señal se agrupa en presencia de Dp71-C272Y y Dp71-299del en células SHSY5Y (E) y N1E-115 (F). Barra de escala: C 20 μm y D-E 10 μm .

Por otra parte, con el objetivo de estudiar la colocación de la Dp71 con iBraf, en células N1E-115 diferenciadas y no diferenciadas, se realizaron ensayos de colocación usando un anticuerpo anti-iBraf, en células N1E-115 no diferenciadas e inducidas a diferenciación (Fig 18A). Se observó que en células no diferenciadas las proteínas Dp71 e iBraf se localizaron predominantemente en el núcleo, mientras que luego de la diferenciación, Dp71 se relocaliza importantemente a citoplasma e iBraf mantiene su localización predominantemente nuclear y solo se relocaliza parcialmente a citoplasma (Fig. 18A). Posteriormente, se realizaron ensayos de transfección con los vectores que expresan a las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del en células N1E-115, seguidas de ensayos de inmunofluorescencia para identificar a la proteína iBraf. En las células sin transfectar se observó la distribución nuclear de iBraf, la cual se mantiene al sobreexpresar a la proteína reportera GFP (control) y fusionada a la Dp71. Sin embargo, la sobreexpresión de las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del causan un importante efecto sobre iBraf, caracterizado por la disminución de sus niveles en el núcleo y su deslocalización hacia el citoplasma en las líneas celulares SHSY5Y (Fig 18B) y N1E-115 (Fig 18C).

En conjunto, los hallazgos sobre la localización subcelular de Braf35 e iBraf son consistentes con su función, y los resultados indican que la integridad de la Dp71 es necesaria para la correcta localización de Braf35 e iBraf, ya que la expresión de las formas mutantes de Dp71 provoca la deslocalización de Braf35 e iBraf, lo que podría afectar sus funciones y de esta manera, al proceso de diferenciación neuronal. Además, dichos resultados sugieren que, ante el estímulo de diferenciación, la Dp71 podría tener un papel en la relocalización de Braf35 hacia citoplasma, lo que contribuiría a la liberación de la represión de genes neuronales mediada por Braf35 y el complejo REST.

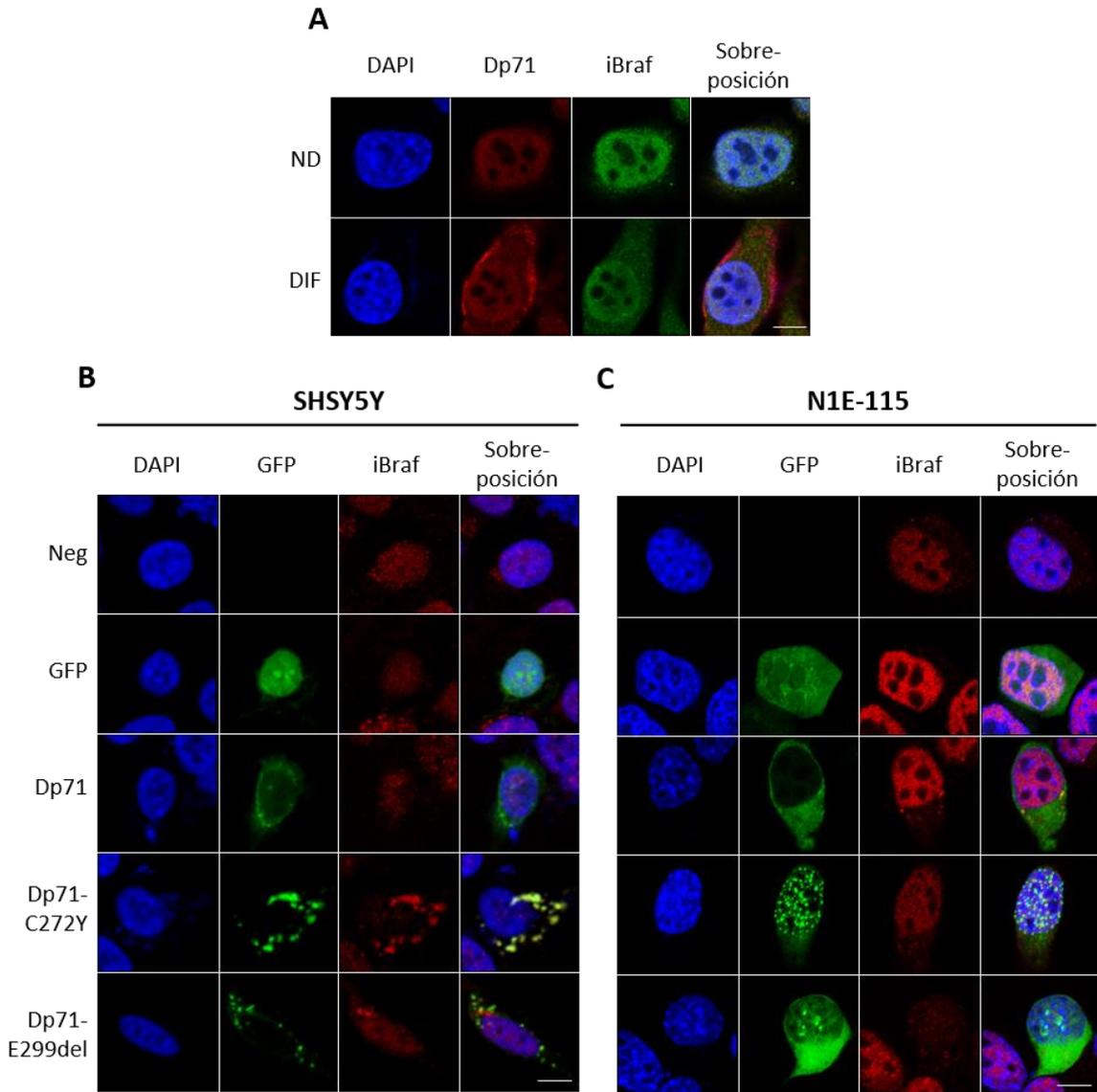


Figura 18. Dp71-C272Y y Dp71-E299del causa la deslocalización de iBraf

(A) Las células N1E-115 fueron cultivadas en cubreobjetos y se diferenciaron con tratamiento con DMSO, se fijaron 1 día después de la siembra (sin diferenciar, ND) y 5 días después del tratamiento (diferenciadas, DIF). La inmunofluorescencia dual de la Dp71 (verde) e iBraf (rojo) muestra una mayor colocalización de estas proteínas en el núcleo de las células ND y las células DIF. (B) Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos, transfectadas e incubadas con los complejos lipídicos por 24 horas, posteriormente fijadas y teñidas con un anticuerpo anti-iBraf (rojo) y posteriormente contrateñidas con DAPI para visualizar los núcleos (azul). iBraf (rojo) se muestra reubicado en el citoplasma y su señal agrupada en células SHSY5Y (B) y N1E-115 (C) y que expresan ambas proteínas mutantes en comparación con el control. Barra de escala: C 20 μ m y D-E 10 μ m.

8.8 La Dp71 regula la expresión de sinapsina.

Como se mencionó previamente, se ha reportado que parte del programa de diferenciación neuronal involucra a las proteínas Braf35 e iBraf, a través de su participación en el complejo REST, el cuál regula genes con el elemento RE-1 (Bianchi & Agresti, 2005; Wynder *et al.*, 2005). De esta manera, en células no diferenciadas Braf35 reprime la expresión de genes neuronales específicos, como sinapsina, mientras que ante un estímulo de diferenciación, iBraf activa la expresión de estos genes necesarios para inducir el fenotipo neuronal (Wynder *et al.*, 2005). Para conocer si Dp71 tiene un papel en la diferenciación a través de este mecanismo, se realizaron ensayos de qPCR para verificar la expresión del gen de sinapsina, el cual es responsivo a Braf35 e iBraf (en colaboración con QFB. Nadia Mireya Murillo y Dra. Yessica S. Tapia Guerrero). El cDNA fue obtenido a partir de células N1E-115 transfectadas con vectores que expresan a las Dp71 y a sus formas mutantes, e inducidas a diferenciación con DMSO por 3 días (Fig 19A). Los resultados revelaron que cuando las células control (células sin transfectar, transfectadas con el vector vacío y que únicamente expresa la proteína reportera GFP, y transfectadas con el vector que expresa a la Dp71) son inducidas a diferenciación, hay un incremento estadísticamente significativo en la expresión de sinapsina pero, cuando se expresa a la Dp71-C272Y, no se observa ningún cambio sobre la expresión de este gen (Fig 19B). Lo anterior demuestra que esta mutación en la Dp71 es suficiente para abatir el aumento de la expresión de sinapsina, indicando que la integridad de la Dp71 es vital para la regulación de la expresión de genes neuronales responsivos a RE-1.

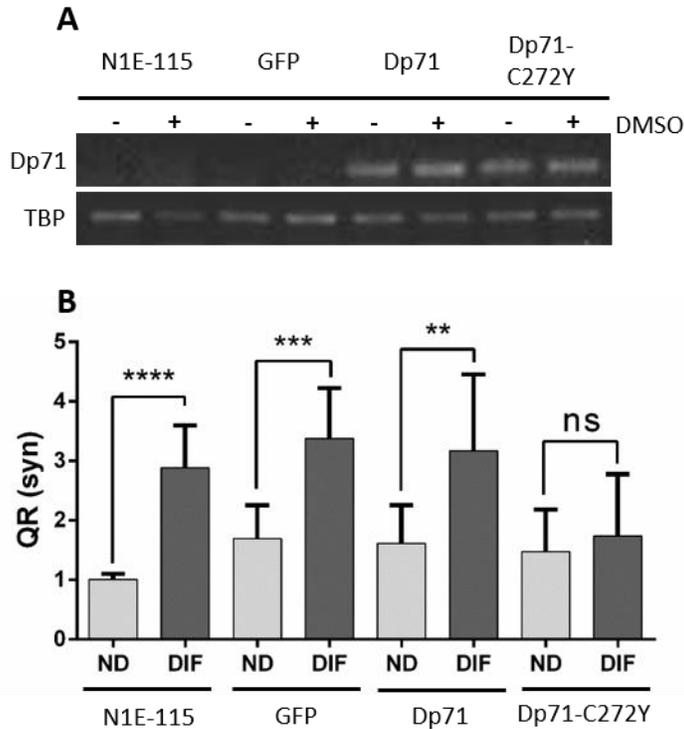


Figura 19. La Dp71 participa en la regulación de la expresión de sinapsina.

(A) Los vectores que permiten la expresión de la proteína reportera GFP, la Dp71 y la proteína mutante Dp71-C272Y fueron transfectados en células N1E-115 (no diferenciadas, ND) y posteriormente, las células fueron inducidas a diferenciación por 3 días con DMSO (DIF). Se realizó la extracción de RNA, y la síntesis de cDNA. La expresión del RNAm recombinante GFP-Dp71 se evaluó por PCR punto final usando a TBP como control. (B) La expresión del gen de sinapsina fué evaluada por PCR cuantitativa en células no transfectadas, transfectadas con GFP, Dp71, y Dp71-C272Y. Las células control mostraron un aumento estadísticamente significativo en la expresión de sinapsina, mientras que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en células que expresaron la mutante Dp71-C272Y. Se muestran diferencias significativas indicadas por los valores de p obtenidas mediante el análisis ANOVA (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).

9 DISCUSIÓN

A la fecha ha sido descrito que mutaciones que afectan a la distrofina Dp71 están asociadas con alteraciones cognitivas en los pacientes con DMD; sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que provoca estas afectaciones (Daoud *et al.*, 2009; Desguerre *et al.*, 2009; Lenk *et al.*, 1996; Magri *et al.*, 2011; Milic Rasic *et al.*, 2015; Moizard *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2010; Tuffery *et al.*, 1995). En este estudio analizamos dos mutaciones puntuales ubicadas en el dominio ZZ de la Dp71, que han sido reportadas en pacientes con DMD. La primera mutación es la sustitución de cisteína por tirosina en el aminoácido 272 de la Dp71 (Flanigan *et al.*, 2009; Lenk *et al.*, 1996) y la segunda es la eliminación del ácido glutámico, correspondiente al aminoácido 299 de la Dp71 (Becker *et al.*, 2003; Juan-Mateu *et al.*, 2015). Estas mutaciones provocaron el fenotipo muscular clásico de la DMD y alteraciones en los niveles de la distrofina muscular Dp427 y sus proteínas asociadas (Becker *et al.*, 2003; Fujimoto *et al.*, 2020; Ishikawa-Sakurai *et al.*, 2004; Juan-Mateu *et al.*, 2015; Vulin *et al.*, 2014). De manera interesante, el paciente que porta la mutación C272Y presenta retraso mental (Lenk *et al.*, 1996). A pesar de que se han descrito múltiples mutaciones puntuales en la Dp71 que provocan la DMD, no se ha reportado el mecanismo por el cual estas mutaciones pueden afectar las funciones de la proteína. Por este motivo, en este trabajo decidimos estudiar el efecto de la expresión de las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del sobre las funciones de la Dp71 en líneas celulares neuronales. Con este fin, expresamos las variantes mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del en dos líneas celulares neuronales y una línea celular epitelial, e interesantemente encontramos que las mutantes de la Dp71 forman agregados nucleares y citoplasmáticos, en un importante porcentaje de las células transfectadas. La formación de agregados en proteínas con mutaciones puntuales, ha sido ampliamente descrita en distintas patologías incluyendo cáncer, enfermedades inmunes, inflamatorias y neurodegenerativas (De Baets *et al.*, 2015; Herrada *et al.*, 2015; Herrmann *et al.*, 2020). En la distrofia muscular de Emery-Dreifuss la cual es provocada por mutaciones en la emerina, una proteína de la envoltura nuclear que interacciona con Dp71, se ha reportado que las mutaciones puntuales P183H y P183T provocan

la formación de agregados, lo que, en consecuencia, altera las funciones de emerina y desencadena la patología (Ellis *et al.*, 1999; Herrada *et al.*, 2015). En la distrofia muscular de Duchenne se ha reportado que algunas mutaciones localizadas en el dominio 1 de unión a actina (ABD1) de la distrofina Dp427, provocan la pérdida de función de la distrofina, debido a que alteran su solubilidad y favorecen la formación de agregados (Henderson *et al.*, 2010). Por lo que respecta a la Dp71, se ha reportado que pacientes con glioblastoma y meningioma presentan cambios en la localización subcelular de la Dp71, e interesantemente, se encontró que la Dp71 forma agregados en modelos celulares de estas patologías, aunque en este caso los agregados no son desencadenados por mutaciones (Ruggieri, De Giorgis, *et al.*, 2019).

Para tratar de explicar la formación de agregados y debido a que la estructura de la Dp71 no ha sido completamente cristalizada, obtuvimos modelos de la estructura de Dp71 y de sus formas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del usando distintas herramientas bioinformáticas. En el caso de la mutación C272Y, el análisis de las estructuras obtenidas mostró que, si bien el aminoácido 272Y (mutante) se mantiene en la misma región de α -hélice en la que se encuentra el aminoácido 272C (wt), la rigidez de tres regiones cercanas se ve afectada, lo que podría contribuir a la formación de agregados. Un caso parecido fue previamente reportado para la esclerosis lateral amiotrófica, un desorden neurodegenerativo en el que se pierden las células nerviosas que controlan el movimiento voluntario. En este caso se encontró que mutaciones puntuales en la superóxido dismutasa-1 SOD1 provocaron alteraciones en los patrones de rigidez y flexibilidad de la proteína, lo que contribuye a la formación de agregados (McAlary *et al.*, 2016; Sannigrahi *et al.*, 2021). Por otra parte, de acuerdo a nuestros análisis para la mutación E299del de la Dp71, la eliminación del aminoácido 299 de la Dp71 da lugar a diferencias estructurales importantes con respecto al modelo predicho de la Dp71, ya que la estructura del asa que contiene al aminoácido 299 se altera significativamente. Diversos estudios han reportado hallazgos semejantes, en donde la delección de un solo aminoácido causa alteraciones importantes en la estructura de las proteínas, llevándolas además a la formación de agregados. Un ejemplo es una de las

mutaciones reportadas en la enfermedad del Alzheimer, en donde la eliminación del glutamato 22 del péptido beta amiloide (A β), conocida como la mutación Osaka, causa la formación de agregados en forma de oligómeros intracelulares (Kulic *et al.*, 2012; Tomiyama & Shimada, 2020).

Estudios previos han mostrado que la Dp71 tiene localización tanto en el citoplasma como en el núcleo, en este último compartimento desempeña funciones específicas de este (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a; Villarreal-Silva *et al.*, 2010). Al analizar la localización subcelular de las formas mutantes de la Dp71 descritas en este trabajo, observamos que los agregados de las formas mutantes de Dp71 se ubican tanto en el núcleo como en el citoplasma; sin embargo, los agregados de Dp71-C272Y se localizan en mayor medida en núcleo, mientras que los agregados de la Dp71-E299del se ubican mayoritariamente en citoplasma. Este resultado es consistente con un reporte previo en el que se sobreexpresó a la proteína mutante Dp71-C272Y en células HeLa, en el que también se observó la deslocalización de la Dp71, principalmente del citoplasma al núcleo (Fujimoto *et al.*, 2020). Se ha descrito que el dominio ZZ de la Dp71 contiene la señal de localización nuclear (Suárez-Sánchez *et al.*, 2014a), y que algunas mutaciones en este dominio pueden alterar su importación al núcleo. La mutación Dp71-C272Y se localiza en el segundo dedo de zinc del dominio ZZ, mientras que Dp71-E299del se localiza en una región adyacente a este dominio (Hnia *et al.*, 2007; Ishikawa-Sakurai *et al.*, 2004; Ponting *et al.*, 1996; Vulin *et al.*, 2014); sin embargo, ambas mutantes mantuvieron la localización nuclear en las tres líneas celulares analizadas, lo que sugiere que las mutaciones C272Y y E299del no afectaron el reconocimiento de la Dp71 por la maquinaria de importación nuclear.

La Dp71 ha sido ampliamente descrita como un importante componente estructural, formando complejos con proteínas como actina, miembros del complejo DAP y proteínas de adhesión en el citoplasma (Cerna *et al.*, 2006; Nico *et al.*, 2010; Fort *et al.*, 2014), así como con lámina B1, emerina, actina y miembros del complejo DAP en el núcleo (Fuentes-Mera *et al.*, 2006; González-Ramírez *et al.*, 2008; Nico *et al.*, 2010; Ruggieri, De Giorgis, *et al.*, 2019; Villarreal-Silva *et al.*, 2010). En diversos

casos, el mecanismo de acción de los agregados de proteínas en el desarrollo de patologías ha sido descrito, y se sabe que la presencia de agregados puede implicar tanto la pérdida como la ganancia de función (De Baets *et al.*, 2015). En este trabajo encontramos que parte de la función estructural de la Dp71 podría verse alterada por la presencia de las mutaciones C272Y y E299del, ya que su expresión provocó la disminución del área celular. Previamente, en un modelo de ratón KO-Dp71, se observó que la ausencia de Dp71 provocaba también la desorganización de los filamentos de actina en las fibras del cristalino (Fort *et al.*, 2014), lo que fortalece la idea de que de la integridad de la Dp71 es crítica para el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto de actina. Adicionalmente, nuestro estudio mostró que la morfología del núcleo se ve alterada también por la presencia de las mutaciones C272Y y E299del.

El β -dístroglicano es parte del complejo DAP y es un receptor de membrana que une la matriz extracelular con el citoesqueleto de actina y de esta manera, participa en diversas funciones como la adhesión celular (Moore & Winder, 2010). Por otra parte, β -dístroglicano se asocia con proteínas de la envoltura nuclear como emerina y las láminas A/C y B1, y de esta manera regula el mantenimiento de la estructura nuclear (Martínez-Vieyra *et al.*, 2013). En este trabajo nuestros resultados indican que la expresión de las variantes mutantes de la Dp71 causan la deslocalización del β -dístroglicano hacia citoplasma comprometiendo principalmente la integridad de la envoltura nuclear. En un estudio previo donde la mutante Dp71-C272Y se expresó en la línea celular HeLa, se observó que el β -dístroglicano mantiene su localización en membrana citoplasmática, sin embargo se agrupa en el citoplasma (Fujimoto *et al.*, 2020), lo que coincide con nuestros resultados en las líneas celulares empleadas

Además de las alteraciones morfológicas del núcleo, observamos alteraciones en la localización nuclear de las proteínas de la lámina nuclear, lámina B1 y lámina A/C. Aunque no se tiene evidencia de la interacción de la Dp71 con lámina A/C, la interacción con la lámina B1 está bien documentada; de hecho, se ha demostrado que la ausencia de Dp71 ocasiona la disminución del nivel de la lámina B1 (Ruggieri, De Giorgis, *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2017; Villarreal-Silva *et al.*, 2011). La

inmuntinción irregular de las láminas B1 y A/C observada en este trabajo, se caracterizó por la disminución en la fluorescencia nuclear y la localización aberrante en el citoplasma, lo que indica que la expresión de las proteínas mutantes de la Dp71 tiene un efecto sobre la integridad de la lámina nuclear.

Una de las múltiples funciones de la lámina nuclear es la organización de la cromatina, formando una plataforma de anclaje de ciertos dominios del DNA genómico, conocidos como dominios asociados a láminas (LADs). Los LADs están asociados a regiones transcripcionalmente inactivas, y están enriquecidos en histonas con modificaciones postraduccionales características de heterocromatina, como H3K9me3, H3K9me2 y H3K27me3 (Briand & Collas, 2020; Guelen *et al.*, 2008; van Steensel & Belmont, 2017). Interesantemente, cuando analizamos la inmuntinción para la marca de heterocromatina H3K9me2, encontramos que las células que expresan las proteínas mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del, presentan un patrón de distribución anormal de H3K9me2. Estas observaciones sugieren que la deslocalización de la lámina nuclear causada por la expresión de las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del, afecta la función de la lámina nuclear asociada con la organización de los dominios de cromatina, lo que lleva a proponer que la Dp71 estabiliza a la lámina nuclear y en consecuencia participa en el mantenimiento de la estructura y función de la cromatina.

Previamente, se ha descrito que Dp71 tiene un papel importante en el correcto desarrollo de la diferenciación neuronal. Durante este proceso, se ha reportado que las isoformas Dp71f y Dp71d aumentan sus niveles totales y se relocalizan diferencialmente; la Dp71f se relocaliza del citoplasma hacia los procesos neuríticos, mientras que la Dp71d se concentra en el núcleo, pero mantiene parte de su localización en el citoplasma y en los procesos neuríticos (Marquez *et al.*, 2003; Rodríguez-Muñoz *et al.*, 2015b). Además, se ha demostrado que la ausencia o disminución de Dp71 afecta la formación de extensiones neuríticas en células PC12 inducidas a diferenciación y abate la inducción del marcador tardío de diferenciación MAP2 (Acosta *et al.*, 2004). Por otra parte, un estudio previo mostró una posible asociación *in vitro* de la Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf, las cuales

forman parte del complejo REST, el cual se encarga de controlar la expresión de genes neuronales en células no neuronales y en células neuronales no diferenciadas (Artegiani *et al.*, 2010b; Qureshi *et al.*, 2010). Este complejo, regula la expresión de genes neuronales a través del reclutamiento de proteínas remodeladores de cromatina, como G9a, la cual cataliza la dimetilación de H3K9 (Roopra *et al.*, 2004) y constituye un importante elemento regulador del contacto entre la lámina nuclear y los dominios LADs (Kind *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, confirmamos que la interacción entre Dp71 y Braf35 puede ocurrir en cultivos de líneas neuronales, y que tras la diferenciación de las células N1E-115, la proteína Braf35 se relocaliza al citoplasma de manera similar a la Dp71, lo que sugiere que la Dp71 podría tener un papel importante en la regulación de la localización de Braf35 tras la diferenciación neuronal. Adicionalmente, reportamos que en presencia de las mutantes Dp71-C272Y y -E299del, la distribución de las proteínas Braf35 e iBraf se altera, mostrando ahora una relocalización parcial hacia el citoplasma, siendo la relocalización de Braf35 la más evidente. Lo anterior, en conjunto con las alteraciones observadas en varios elementos de los dominios LADs (lámina B1, lámina A/C y H3K9me2), muestra que la interacción de la Dp71 con Braf35 e iBraf, es importante para su correcta localización y posiblemente para su función. Previamente, se reportó que Braf35 e iBraf se unen a la β -distrobrevina, una proteína con alta homología a Dp71. Además, la β -distrobrevina se unió directamente con el elemento RE-1, y mostró tener un efecto represor sobre la actividad promotora de sinapsina, un marcador de diferenciación neuronal responsivo al complejo REST (Artegiani *et al.*, 2010b; Wynder *et al.*, 2005). Para estudiar la posible implicación de la Dp71 sobre las funciones de las proteínas Braf35 e iBraf en la regulación de genes neuronales, evaluamos la expresión de sinapsina, en las células N1E-115 que expresan la mutante Dp71-C272Y. Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de la mutante Dp71-C272Y evita el aumento de la expresión de sinapsina tras el estímulo de diferenciación. Lo anterior indica que la integridad de la Dp71 es necesaria para la correcta regulación de la expresión de sinapsina, posiblemente a través de su contribución sobre las funciones de las proteínas Braf35 o iBraf. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren

que la Dp71 tiene un papel en la diferenciación neuronal a través de la regulación de genes neuronales RE-1 mediada por el complejo LSD1-coREST.

10 CONCLUSIÓN

Nuestros resultados en conjunto sugieren que las mutaciones C272Y y E299del causan alteraciones en las funciones de la Dp71. En primer lugar nuestros resultados indican que las mutaciones analizadas causan alteraciones estructurales en la proteína Dp71, lo que deriva en la formación de agregados. A su vez, la expresión de las mutaciones Dp71-C272Y y Dp71-E299del provocan alteraciones en la célula, afectando el citoesqueleto y la estructura del núcleo, así como la localización de β -dístroglicano. Además, la expresión de dichas formas mutantes provocaron alteraciones en la morfología nuclear a través de la desestabilización de las láminas A/C y B1; así mismo, nuestros resultados indican que la Dp71 tiene un papel en las funciones de la lámina nuclear relacionadas al mantenimiento de la heterocromatina y la represión de genes específicos, ya que el perfil de H3K9me2 se encontró también alterado. Lo anterior, podría estar relacionado con la asociación de la Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf, miembros del complejo LSD1-coREST, ya que en este estudio demostramos que la integridad de la Dp71 es sustancial para la correcta localización de estas proteínas y su función en la regulación de genes neuronales. En conjunto, nuestros resultados constituyen un avance para la comprensión del mecanismo por el cual las alteraciones en la Dp71 contribuyen al desarrollo de alteraciones en el sistema nervioso central en pacientes con DMD.

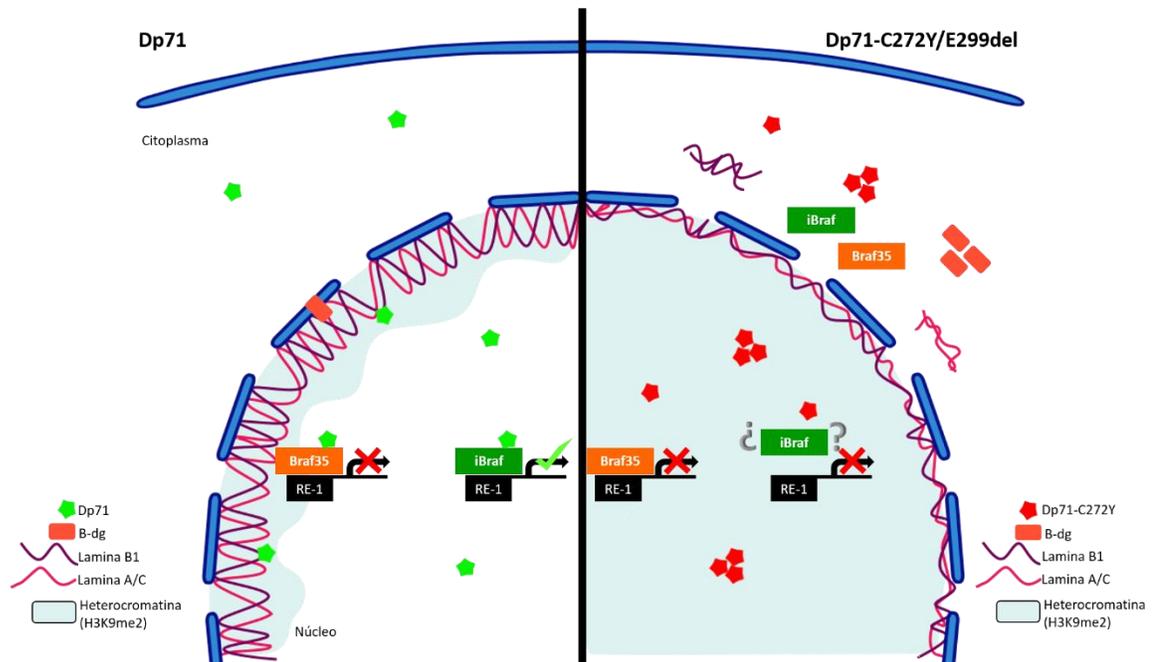


Figura 20. Modelo propuesto de los efectos de la expresión de la Dp71-C272Y.

La Dp71 se localiza en el citoplasma y núcleo, e interacciona con lamina B1 y participa en la expresión de genes neuronales responsivos a RE-1. La expresión de las mutaciones en la Dp71 causa la formación de agregados de esta proteína, la deslocalización de las láminas B1 y A/C, la expansión por el núcleo de regiones de heterocromatina enriquecidas en H3K9me2 y el abatimiento de la expresión de sinapsina, un gen responsivo a RE-1.

11 PERSPECTIVAS

Para dar continuidad a este trabajo, se propone lo siguiente:

Evaluar la presencia de Dp71 en el promotor de sinapsina a través de ensayos de la inmunoprecipitación de la cromatina, antes y durante la diferenciación neuronal.

Evaluar el efecto de las mutantes Dp71-C272Y y Dp71-E299del en la expresión de otros genes responsivos a RE-1 e involucrados en la diferenciación neuronal como el factor de transcripción NeuroD y las subunidades del canal de sodio, SCN1A, SCN2A2 y SCAN3A.

Analizar la dinámica de la interacción entre Dp71 con las proteínas Braf35 e iBraf durante la diferenciación neuronal.

12 BIBLIOGRAFÍA

Acosta, R., Montañez, C., Fuentes-Mera, L., Gonzalez, E., Gómez, P., Quintero-Mora, L., Mornet, D., Alvarez-Salas, L. M., & Cisneros, B. (2004). Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Experimental Cell Research*, 296(2), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.01.015>

Alapati, R., Shuvo, Md. H., & Bhattacharya, D. (2020). SPECS: Integration of side-chain orientation and global distance-based measures for improved evaluation of protein structural models. *PLoS ONE*, 15(2), e0228245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228245>

Anderson, J. T., Rogers, R. P., & Jarrett, H. W. (1996). Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(12), 6605-6610. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.12.6605>

Annese, T., Corsi, P., Ruggieri, S., Tamma, R., Marinaccio, C., Picocci, S., Errede, M., Specchia, G., De Luca, A., Frassanito, M. A., Desantis, V., Vacca, A., Ribatti, D., & Nico, B. (2016). Isolation and characterization of neural stem cells from dystrophic mdx mouse. *Experimental Cell Research*, 343(2), 190-207. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.019>

Artegiani, B., Labbaye, C., Sferra, A., Quaranta, M. T., Torreri, P., Macchia, G., Ceccarini, M., Petrucci, T. C., & Macioce, P. (2010a). The interaction with HMG20a/b proteins suggests a potential role for beta-dystrobrevin in neuronal differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24740-24750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090654>

Artegiani, B., Labbaye, C., Sferra, A., Quaranta, M. T., Torreri, P., Macchia, G., Ceccarini, M., Petrucci, T. C., & Macioce, P. (2010b). The Interaction with HMG20a/b Proteins Suggests a Potential Role for β -Dystrobrevin in Neuronal Differentiation *. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24740-24750. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090654>

Austin, R. C., Morris, G. E., Howard, P. L., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscular Disorders: NMD*, 10(3), 187-193. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(99\)00105-4](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(99)00105-4)

Banihani, R., Smile, S., Yoon, G., Dupuis, A., Mosleh, M., Snider, A., & McAdam, L. (2015). Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of Child Neurology*, 30(11), 1472-1482. <https://doi.org/10.1177/0883073815570154>

- Becker, K., Robb, S. A., Hatton, Z., Yau, S. C., Abbs, S., & Roberts, R. G. (2003). Loss of a single amino acid from dystrophin resulting in Duchenne muscular dystrophy with retention of dystrophin protein. *Human Mutation*, 21(6), 651. <https://doi.org/10.1002/humu.9143>
- Bianchi, M. E., & Agresti, A. (2005). HMG proteins: Dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(5), 496-506. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.08.007>
- Bies, R. D., Caskey, C. T., & Fenwick, R. (1992). An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *Journal of Clinical Investigation*, 90(2), 666-672.
- Birnkrant, D. J., Bushby, K., Bann, C. M., Alman, B. A., Apkon, S. D., Blackwell, A., Case, L. E., Cripe, L., Hadjiyannakis, S., Olson, A. K., Sheehan, D. W., Bolen, J., Weber, D. R., & Ward, L. M. (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: Respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *The Lancet Neurology*, 17(4), 347-361. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30025-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30025-5)
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiological Reviews*, 82(2), 291-329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001>
- Briand, N., & Collas, P. (2020). Lamina-associated domains: Peripheral matters and internal affairs. *Genome Biology*, 21(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02003-5>
- Calderilla-Barbosa, L., Ortega, A., & Cisneros, B. (2006). Phosphorylation of dystrophin Dp71d by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II modulates the Dp71d nuclear localization in PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, 98(3), 713-722. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03904.x>
- Ceballos-Chávez, M., Rivero, S., García-Gutiérrez, P., Rodríguez-Paredes, M., García-Domínguez, M., Bhattacharya, S., & Reyes, J. C. (2012). Control of neuronal differentiation by sumoylation of BRAF35, a subunit of the LSD1-CoREST histone demethylase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(21), 8085-8090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121522109>
- Cerna, J., Cerecedo, D., Ortega, A., García-Sierra, F., Centeno, F., Garrido, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2006). Dystrophin Dp71f associates with the beta1-integrin adhesion complex to modulate PC12 cell adhesion. *Journal of Molecular Biology*, 362(5), 954-965. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.075>

Chiurazzi, P., Schwartz, C. E., Gecz, J., & Neri, G. (2008). XLMR genes: Update 2007. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 16(4), 422-434. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201994>

Choudhuri, S. (2014). Chapter 8—Additional Bioinformatic Analyses Involving Protein Sequences**The opinions expressed in this chapter are the author's own and they do not necessarily reflect the opinions of the FDA, the DHHS, or the Federal Government. En S. Choudhuri (Ed.), *Bioinformatics for Beginners* (pp. 183-207). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00008-6>

Chung, W., & Campanelli, J. T. (1999). WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Molecular Cell Biology Research Communications: MCBRC*, 2(3), 162-171. <https://doi.org/10.1006/mcbr.1999.0168>

Clejan, S., Dotson, R. S., Wolf, E. W., Corb, M. P., & Ide, C. F. (1996). Morphological differentiation of N1E-115 neuroblastoma cells by dimethyl sulfoxide activation of lipid second messengers. *Experimental Cell Research*, 224(1), 16-27. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0107>

Compton, A. G., Cooper, S. T., Hill, P. M., Yang, N., Froehner, S. C., & North, K. N. (2005). The syntrophin-dystrobrevin subcomplex in human neuromuscular disorders. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 64(4), 350-361. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.4.350>

Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C., & Campbell, K. P. (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(50), 31221-31224. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31221>

Cunniff, C., Andrews, J., Meaney, F. J., Mathews, K. D., Matthews, D., Ciafaloni, E., Miller, T. M., Bodensteiner, J. B., Miller, L. A., James, K. A., Druschel, C. M., Romitti, P. A., & Pandya, S. (2009). Mutation Analysis in a Population-Based Cohort of Boys With Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. *Journal of child neurology*, 24(4), 425-430. <https://doi.org/10.1177/0883073808324770>

Daoud, F., Angeard, N., Demerre, B., Martie, I., Benyaou, R., Leturcq, F., Cossée, M., Deburgrave, N., Saillour, Y., Tuffery, S., Urtizbera, A., Toutain, A., Echenne, B., Frischman, M., Mayer, M., Desguerre, I., Estournet, B., Réveillère, C., Penisson-Besnier, null, ... Chelly, J. (2009). Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Human Molecular Genetics*, 18(20), 3779-3794. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp320>

De Baets, G., Van Doorn, L., Rousseau, F., & Schymkowitz, J. (2015). Increased Aggregation Is More Frequently Associated to Human Disease-Associated Mutations Than to Neutral Polymorphisms. *PLoS Computational Biology*, *11*(9), e1004374. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004374>

de Leeuw, R., Gruenbaum, Y., & Medalia, O. (2018). Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends in Cell Biology*, *28*(1), 34-45. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.004>

de León, M. B., Montañez, C., Gómez, P., Morales-Lázaro, S. L., Tapia-Ramírez, V., Valadez-Graham, V., Recillas-Targa, F., Yaffe, D., Nudel, U., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: Role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(7), 5290-5299. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411571200>

Desguerre, I., Chorasistov, C., Mayer, M., Zeller, R., Becane, H.-M., Bastuji-Garin, S., Leturcq, F., Chiron, C., Chelly, J., & Gherardi, R. K. (2009). Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): Definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PloS One*, *4*(2), e4347. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004347>

Ellis, J. A., Yates, J. R., Kendrick-Jones, J., & Brown, C. A. (1999). Changes at P183 of emerin weaken its protein-protein interactions resulting in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Human Genetics*, *104*(3), 262-268. <https://doi.org/10.1007/s004390050946>

Enríquez-Aragón, J. A., Cerna-Cortés, J., Bermúdez de León, M., García-Sierra, F., González, E., Mornet, D., & Cisneros, B. (2005). Dystrophin Dp71 in PC12 cell adhesion. *Neuroreport*, *16*(3), 235-238. <https://doi.org/10.1097/00001756-200502280-00006>

Ervasti, J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1772*(2), 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.05.010>

Flanigan, K. M., Dunn, D. M., von Niederhausern, A., Soltanzadeh, P., Gappmaier, E., Howard, M. T., Sampson, J. B., Mendell, J. R., Wall, C., King, W. M., Pestronk, A., Florence, J. M., Connolly, A. M., Mathews, K. D., Stephan, C. M., Laubenthal, K. S., Wong, B. L., Morehart, P. J., Meyer, A., ... Weiss, R. B. (2009). Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: Application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Human Mutation*, *30*(12), 1657-1666. <https://doi.org/10.1002/humu.21114>

Fort, P. E., Darche, M., Sahel, J.-A., Rendon, A., & Tadayoni, R. (2014). Lack of dystrophin protein Dp71 results in progressive cataract formation due to loss of fiber cell organization. *Molecular Vision*, *20*, 1480-1490.

Fort, P. E., Sene, A., Pannicke, T., Roux, M. J., Forster, V., Mornet, D., Nudel, U., Yaffe, D., Reichenbach, A., Sahel, J. A., & Rendon, A. (2008). Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia*, *56*(6), 597-610. <https://doi.org/10.1002/glia.20633>

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), 3023-3035. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.002>

Fujimoto, T., Yaoi, T., Fushiki, S., & Itoh, K. (2017). Dp71 is regulated by phosphorylation and ubiquitin-proteasome system in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *492*(3), 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.108>

Fujimoto, T., Yaoi, T., Tanaka, H., & Itoh, K. (2020). Dystroglycan regulates proper expression, submembranous localization and subsequent phosphorylation of Dp71 through physical interaction. *Human Molecular Genetics*, *29*(19), 3312-3326. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa217>

Gherardi, S., Bovolenta, M., Passarelli, C., Falzarano, M. S., Pignini, P., Scotton, C., Neri, M., Armaroli, A., Osman, H., Selvatici, R., Gualandi, F., Recchia, A., Mora, M., Bernasconi, P., Maggi, L., Morandi, L., Ferlini, A., & Perini, G. (2017). Transcriptional and epigenetic analyses of the DMD locus reveal novel cis-acting DNA elements that govern muscle dystrophin expression. *Biochimica Et Biophysica Acta. Gene Regulatory Mechanisms*, *1860*(11), 1138-1147. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.08.010>

González-Ramírez, R., Morales-Lázaro, S. L., Tapia-Ramírez, 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. <https://doi.org/10.1002/jcb.21870>

Grabarek, Z. (2006). Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *Journal of Molecular Biology*, *359*(3), 509-525. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.066>

Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., Eussen, B. H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., & van Steensel, B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, *453*(7197), 948-951. <https://doi.org/10.1038/nature06947>

Gusel'nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, *7*(2), 42-47.

Hakimi, M.-A., Bochar, D. A., Chenoweth, J., Lane, W. S., Mandel, G., & Shiekhattar, R. (2002). A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(11), 7420-7425. <https://doi.org/10.1073/pnas.112008599>

Hemmings, L., Kuhlman, P. A., & Critchley, D. R. (1992). Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *The Journal of Cell Biology*, *116*(6), 1369-1380. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.6.1369>

Henderson, D. M., Lee, A., & Ervasti, J. M. (2010). Disease-causing missense mutations in actin binding domain 1 of dystrophin induce thermodynamic instability and protein aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9632-9637. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001517107>

Hendriksen, J. G. M., & Vles, J. S. H. (2008). Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: Frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *Journal of Child Neurology*, *23*(5), 477-481. <https://doi.org/10.1177/0883073807309775>

Herrada, I., Samson, C., Velours, C., Renault, L., Östlund, C., Chervy, P., Puchkov, D., Worman, H. J., Buendia, B., & Zinn-Justin, S. (2015). Muscular Dystrophy Mutations Impair the Nuclear Envelope Emerin Self-assembly Properties. *ACS Chemical Biology*, *10*(12), 2733-2742. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00648>

Herrmann, H., Cabet, E., Chevalier, N. R., Moosmann, J., Schultheis, D., Haas, J., Schowalter, M., Berwanger, C., Weyerer, V., Agaimy, A., Meder, B., Müller, O. J., Katus, H. A., Schlötzer-Schrehardt, U., Vicart, P., Ferreira, A., Dittrich, S., Clemen, C. S., Lilienbaum, A., & Schröder, R. (2020). Dual Functional States of R406W-Desmin Assembly Complexes Cause Cardiomyopathy With Severe Intercalated Disc Derangement in Humans and in Knock-In Mice. *Circulation*, *142*(22), 2155-2171. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.050218>

- Hetzer, M. W. (2010). The Nuclear Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), a000539. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000539>
- Hnia, K., Zouiten, D., Cantel, S., Chazalette, D., Hugon, G., Fehrentz, J.-A., Masmoudi, A., Diment, A., Bramham, J., Mornet, D., & Winder, S. J. (2007). ZZ domain of dystrophin and utrophin: Topology and mapping of a beta-dystroglycan interaction site. *The Biochemical Journal*, 401(3), 667-677. <https://doi.org/10.1042/BJ20061051>
- Howard, P. L., Klamut, H. J., & Ray, P. N. (1998). Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Letters*, 441(2), 337-341. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01566-x](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01566-x)
- Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., & Eck, M. J. (2000). Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nature Structural Biology*, 7(8), 634-638. <https://doi.org/10.1038/77923>
- Ilsley, J. L., Sudol, M., & Winder, S. J. (2001). The interaction of dystrophin with beta-dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling*, 13(9), 625-632. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(01\)00188-7](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00188-7)
- Ishikawa-Sakurai, M., Yoshida, M., Imamura, M., Davies, K. E., & Ozawa, E. (2004). ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to β -dystroglycan. *Human Molecular Genetics*, 13(7), 693-702. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh087>
- Juan-Mateu, J., Gonzalez-Quereda, L., Rodriguez, M. J., Baena, M., Verdura, E., Nascimento, A., Ortez, C., Baiget, M., & Gallano, P. (2015). DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations. *PloS One*, 10(8), e0135189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135189>
- Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., & Campbell, K. P. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27305-27310. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27305>
- Kawaguchi, T., Niba, E. T. E., Rani, A. Q. M., Onishi, Y., Koizumi, M., Awano, H., Matsumoto, M., Nagai, M., Yoshida, S., Sakakibara, S., Maeda, N., Sato, O., Nishio, H., & Matsuo, M. (2018). Detection of Dystrophin Dp71 in Human Skeletal Muscle Using an Automated Capillary Western Assay System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), E1546. <https://doi.org/10.3390/ijms19061546>

Kind, J., Pagie, L., Ortazobkoyun, H., Boyle, S., de Vries, S. S., Janssen, H., Amendola, M., Nolen, L. D., Bickmore, W. A., & van Steensel, B. (2013). Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell*, *153*(1), 178-192. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.028>

Kulic, L., McAfoose, J., Welt, T., Tackenberg, C., Späni, C., Wirth, F., FINDER, V., Konietzko, U., Giese, M., Eckert, A., Noriaki, K., Shimizu, T., Murakami, K., Irie, K., Rasool, S., Glabe, C., Hock, C., & Nitsch, R. M. (2012). Early accumulation of intracellular fibrillar oligomers and late congophilic amyloid angiopathy in mice expressing the Osaka intra-A β APP mutation. *Translational Psychiatry*, *2*, e183. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.109>

Lauzon, M.-A., Drevelle, O., & Faucheux, N. (2017). Peptides derived from the knuckle epitope of BMP-9 induce the cholinergic differentiation and inactivate GSK3 β in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Scientific Reports*, *7*(1), 4695. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04835-x>

Lázaro, S. L. M., & Vega, B. C. (2007). Regulation of Dp71 gene expression by Sp1 and AP2 transcription factors during neuronal differentiation. *The FASEB Journal*, *21*(5), A284-A284. <https://doi.org/10.1096/fasebj.21.5.A284-b>

Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D., & Nudel, U. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(12), 5346-5350.

Lee, A. J., Buckingham, E. T., Kauer, A. J., & Mathews, K. D. (2018). Descriptive phenotype of obsessive compulsive symptoms in males with Duchenne Muscular Dystrophy. *Journal of child neurology*, *33*(9), 572-579. <https://doi.org/10.1177/0883073818774439>

Lenk, U., Hanke, R., Thiele, H., & Speer, A. (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: Implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Human Molecular Genetics*, *2*(11), 1877-1881. <https://doi.org/10.1093/hmg/2.11.1877>

Lenk, U., Oexle, K., Voit, T., Ancker, U., Hellner, K.-A., Speer, A., & Hübner, C. (1996). A Cysteine 3340 Substitution in the Dystroglycan-Binding Domain of Dystrophin Associated with Duchenne Muscular Dystrophy, Mental Retardation and Absence of the ERG b-Wave. *Human Molecular Genetics*, *5*(7), 973-975. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.973>

Li, Z., Jiao, X., Di Sante, G., Ertel, A., Casimiro, M. C., Wang, M., Katiyar, S., Ju, X., Klopfenstein, D. V., Tozeren, A., Dampier, W., Chepelev, I., Jeltsch, A., & Pestell, R.

G. (2019). Cyclin D1 integrates G9a-mediated histone methylation. *Oncogene*, 38(22), 4232-4249. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0723-8>

Magri, F., Govoni, A., D'Angelo, M. G., Del Bo, R., Ghezzi, S., Sandra, G., Turconi, A. C., Sciacco, M., Ciscato, P., Bordoni, A., Tedeschi, S., Fortunato, F., Lucchini, V., Bonato, S., Lamperti, C., Coviello, D., Torrente, Y., Corti, S., Moggio, M., ... Comi, G. P. (2011). Genotype and phenotype characterization in a large dystrophinopathic cohort with extended follow-up. *Journal of Neurology*, 258(9), 1610-1623. <https://doi.org/10.1007/s00415-011-5979-z>

Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velázquez, F., Depardón, F., Cervantes, L., Rendón, A., Mornet, D., Rosas-vargas, H., Mustre, M., & Montañez, C. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118(4), 957-966. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00063-0](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00063-0)

Marshall, J. L., & Crosbie-Watson, R. H. (2013). Sarcospan: A small protein with large potential for Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-3-1>

Martínez-Vieyra, I. A., Vásquez-Limeta, A., González-Ramírez, R., Morales-Lázaro, S. L., Mondragón, M., Mondragón, R., Ortega, A., Winder, S. J., & Cisneros, B. (2013). A role for β -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(3), 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.019>

Matsumura, K., & Campbell, K. P. (1994). Dystrophin-glycoprotein complex: Its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Muscle & Nerve*, 17(1), 2-15. <https://doi.org/10.1002/mus.880170103>

McAlary, L., Aquilina, J. A., & Yerbury, J. J. (2016). Susceptibility of Mutant SOD1 to Form a Destabilized Monomer Predicts Cellular Aggregation and Toxicity but Not In vitro Aggregation Propensity. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 499. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00499>

Mehler, M. F. (2000). Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 32(1), 277-307. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(99\)00090-9](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(99)00090-9)

Milic Rasic, V., Vojinovic, D., Pesovic, J., Mijalkovic, G., Lukic, V., Mladenovic, J., Kosac, A., Novakovic, I., Maksimovic, N., Romac, S., Todorovic, S., & Savic Pavicevic, D. (2015). Intellectual Ability in the Duchenne Muscular Dystrophy and Dystrophin Gene Mutation Location. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 17(2), 25-35. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2014-0071>

- Mirza, F. J., & Zahid, S. (2018). The Role of Synapsins in Neurological Disorders. *Neuroscience Bulletin*, 34(2), 349-358. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0201-7>
- Moat, S. J., Bradley, D. M., Salmon, R., Clarke, A., & Hartley, L. (2013). Newborn bloodspot screening for Duchenne Muscular Dystrophy: 21 years experience in Wales (UK). *European Journal of Human Genetics*, 21(10), 1049-1053. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.301>
- Moizard, M. P., Billard, C., Toutain, A., Berret, F., Marmin, N., & Moraine, C. (1998). Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *American Journal of Medical Genetics*, 80(1), 32-41. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19981102\)80:1<32::aid-ajmg6>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19981102)80:1<32::aid-ajmg6>3.0.co;2-y)
- Moore, C. J., & Winder, S. J. (2010). Dystroglycan versatility in cell adhesion: A tale of multiple motifs. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 8, 3. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-3>
- Moreira, L. G. A., Pereira, L. C., Drummond, P. R., & Mesquita, J. F. D. (2013). Structural and Functional Analysis of Human SOD1 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLOS ONE*, 8(12), e81979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081979>
- Muzammal, M., Khan, M. A., Mohaini, M. A., Alsalman, A. J., Hawaj, M. A. A., & Farid, A. (2022). In Silico Analysis of Honeybee Venom Protein Interaction with Wild Type and Mutant (A82V + P375S) Ebola Virus Spike Protein. *Biologics*, 2(1), 45-55. <https://doi.org/10.3390/biologics2010003>
- Naidoo, M., & Anthony, K. (2020). Dystrophin Dp71 and the Neuropathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecular Neurobiology*, 57(3), 1748-1767. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01845-w>
- Nico, B., Tamma, R., Annese, T., Mangieri, D., De Luca, A., Corsi, P., Benagiano, V., Longo, V., Crivellato, E., Salmaggi, A., & Ribatti, D. (2010). Glial dystrophin-associated proteins, laminin and agrin, are downregulated in the brain of mdx mouse. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 90(11), 1645-1660. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.149>
- Oh, J., Karlmark, K. R., Shin, J., Pollak, A., Freilinger, A., Hengstschläger, M., & Lubec, G. (2005). Differentiation of neuroblastoma cell line N1E-115 involves several signaling cascades. *Neurochemical Research*, 30(3), 333-348. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-2607-2>
- Ohno, Y., Kinboshi, M., & Shimizu, S. (2018). Inwardly Rectifying Potassium Channel Kir4.1 as a Novel Modulator of BDNF Expression in Astrocytes.

International Journal of Molecular Sciences, 19(11), 3313.
<https://doi.org/10.3390/ijms19113313>

Pane, M., Lombardo, M. E., Alfieri, P., D'Amico, A., Bianco, F., Vasco, G., Piccini, G., Mallardi, M., Romeo, D. M., Ricotti, V., Ferlini, A., Gualandi, F., Vicari, S., Bertini, E., Berardinelli, A., & Mercuri, E. (2012). Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in Duchenne muscular dystrophy: Phenotype-genotype correlation. *The Journal of Pediatrics*, 161(4), 705-709.e1.
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.03.020>

Perronnet, C., & Vaillend, C. (2010). Dystrophins, utrophins, and associated scaffolding complexes: Role in mammalian brain and implications for therapeutic strategies. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 849426.
<https://doi.org/10.1155/2010/849426>

Ponting, C. P., Blake, D. J., Davies, K. E., Kendrick-Jones, J., & Winder, S. J. (1996). ZZ and TAZ: New putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(1), 11-13.

Qureshi, I. A., Gokhan, S., & Mehler, M. F. (2010). REST and CoREST are transcriptional and epigenetic regulators of seminal neural fate decisions. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(22), 4477-4486. <https://doi.org/10.4161/cc.9.22.13973>

Ravanpay, A. C., Hansen, S. J., & Olson, J. M. (2010). Transcriptional inhibition of REST by NeuroD2 during neuronal differentiation. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 44(2), 178-189. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.03.006>

Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M. T., Espanel, X., & Sudol, M. (1999). *The WW Domain of Dystrophin Requires EF-Hands Region to Interact with β -Dystroglycan*. 380(4), 431-442. <https://doi.org/10.1515/BC.1999.057>

Richardson, J. S., Williams, C. J., Hintze, B. J., Chen, V. B., Prisant, M. G., Videau, L. L., & Richardson, D. C. (2018). Model validation: Local diagnosis, correction and when to quit. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*, 74(Pt 2), 132-142. <https://doi.org/10.1107/S2059798317009834>

Ricotti, V., Mandy, W. P. L., Scoto, M., Pane, M., Deconinck, N., Messina, S., Mercuri, E., Skuse, D. H., & Muntoni, F. (2016). Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 58(1), 77-84. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12922>

- Rivero, S., Ceballos-Chávez, M., Bhattacharya, S. S., & Reyes, J. C. (2015). HMG20A is required for SNAI1-mediated epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene*, *34*(41), 5264-5276. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.446>
- Rodrigues, C. H., Pires, D. E., & Ascher, D. B. (2018). DynaMut: Predicting the impact of mutations on protein conformation, flexibility and stability. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W350-W355. <https://doi.org/10.1093/nar/gky300>
- Rodríguez-Muñoz, R., Cárdenas-Aguayo, M. D. C., Alemán, V., Osorio, B., Chávez-González, O., Rendon, A., Martínez-Rojas, D., & Meraz-Ríos, M. A. (2015a). Novel Nuclear Protein Complexes of Dystrophin 71 Isoforms in Rat Cultured Hippocampal GABAergic and Glutamatergic Neurons. *PloS One*, *10*(9), e0137328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137328>
- Rodríguez-Muñoz, R., Cárdenas-Aguayo, M. del C., Alemán, V., Osorio, B., Chávez-González, O., Rendon, A., Martínez-Rojas, D., & Meraz-Ríos, M. A. (2015b). Novel Nuclear Protein Complexes of Dystrophin 71 Isoforms in Rat Cultured Hippocampal GABAergic and Glutamatergic Neurons. *PLOS ONE*, *10*(9), e0137328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137328>
- Roopra, A., Qazi, R., Schoenike, B., Daley, T. J., & Morrison, J. F. (2004). Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Molecular Cell*, *14*(6), 727-738. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.026>
- Ruggieri, S., De Giorgis, M., Annese, T., Tamma, R., Notarangelo, A., Marzullo, A., Senetta, R., Cassoni, P., Notarangelo, M., Ribatti, D., & Nico, B. (2019). Dp71 Expression in Human Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(21), E5429. <https://doi.org/10.3390/ijms20215429>
- Ruggieri, S., Viggiano, L., Annese, T., Rubolino, C., Gerbino, A., De Zio, R., Corsi, P., Tamma, R., Ribatti, D., Errede, M., Operto, F., Margari, L., Resta, N., Di Tommaso, S., Rosati, J., Trojano, M., & Nico, B. (2019). DP71 and SERCA2 alteration in human neurons of a Duchenne muscular dystrophy patient. *Stem Cell Research & Therapy*, *10*(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1125-5>
- Sandonà, D., & Betto, R. (2009). Sarcoglycanopathies: Molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *11*, e28. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001203>
- Sannigrahi, A., Chowdhury, S., Das, B., Banerjee, A., Halder, A., Kumar, A., Saleem, M., Naganathan, A. N., Karmakar, S., & Chattopadhyay, K. (2021). The metal cofactor zinc and interacting membranes modulate SOD1 conformation-aggregation landscape in an in vitro ALS model. *ELife*, *10*, e61453. <https://doi.org/10.7554/eLife.61453>

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A., & Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, *119*(7), 941-953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>

Sjöblom, B., Salmazo, A., & Djinović-Carugo, K. (2008). Alpha-actinin structure and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *65*(17), 2688-2701. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8080-8>

Suárez-Sánchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K. M., Velez, G., Azuara-Medina, P. M., Gomez, P., Vásquez-Limeta, A., Hernández-Hernández, O., Lieu, K. G., Jans, D. A., & Cisneros, B. (2014a). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1843*(5), 985-1001. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.027>

Suárez-Sánchez, R., Aguilar, A., Wagstaff, K. M., Velez, G., Azuara-Medina, P. M., Gomez, P., Vásquez-Limeta, A., Hernández-Hernández, O., Lieu, K. G., Jans, D. A., & Cisneros, B. (2014b). Nucleocytoplasmic shuttling of the Duchenne muscular dystrophy gene product dystrophin Dp71d is dependent on the importin α/β and CRM1 nuclear transporters and microtubule motor dynein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1843*(5), 985-1001. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.027>

Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L. E., & Cisneros, B. (2012). Dystrophin Dp71: The smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Molecular Neurobiology*, *45*(1), 43-60. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8218-9>

Tan, S., Zhao, S., Chen, Z., Ma, Q., Wang, W., Cheng, S., Wen, Q., Tan, S., & Xie, J. (2017). Altered Biological Properties in Dp71 Over-Expressing HBE Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *43*(5), 2022-2036. <https://doi.org/10.1159/000484181>

Taylor, P. J., Betts, G. A., Maroulis, S., Gilissen, C., Pedersen, R. L., Mowat, D. R., Johnston, H. M., & Buckley, M. F. (2010). Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One*, *5*(1), e8803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008803>

Tomiya, T., & Shimada, H. (2020). APP Osaka Mutation in Familial Alzheimer's Disease-Its Discovery, Phenotypes, and Mechanism of Recessive Inheritance. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), E1413. <https://doi.org/10.3390/ijms21041413>

Tuffery, S., Lenk, U., Roberts, R. G., Coubes, C., Demaille, J., & Claustres, M. (1995). Protein truncation test: Analysis of two novel point mutations at the carboxy-

terminus of the human dystrophin gene associated with mental retardation. *Human Mutation*, 6(2), 126-135. <https://doi.org/10.1002/humu.1380060205>

van Steensel, B., & Belmont, A. S. (2017). Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell*, 169(5), 780-791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022>

Vélez-Aguilera, G., de Dios Gómez-López, J., Jiménez-Gutiérrez, G. E., Vásquez-Limeta, A., Laredo-Cisneros, M. S., Gómez, P., Winder, S. J., & Cisneros, B. (2018). Control of nuclear β -dystroglycan content is crucial for the maintenance of nuclear envelope integrity and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(2), 406-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.11.013>

Villarreal-Silva, M., Centeno-Cruz, F., Suárez-Sánchez, R., Garrido, E., & Cisneros, B. (2011). Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: Localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. *PLoS One*, 6(8), e23504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023504>

Villarreal-Silva, M., Suárez-Sánchez, R., Rodríguez-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. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0064-z>

Vulin, A., Wein, N., Strandjord, D. M., Johnson, E. K., Findlay, A. R., Maiti, B., Howard, M. T., Kaminoh, Y. J., Taylor, L. E., Simmons, T. R., Ray, W. C., Montanaro, F., Ervasti, J. M., & Flanigan, K. M. (2014). The ZZ domain of dystrophin in DMD: Making sense of missense mutations. *Human Mutation*, 35(2), 257-264. <https://doi.org/10.1002/humu.22479>

Way, M., Pope, B., Cross, R. A., Kendrick-Jones, J., & Weeds, A. G. (1992). Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin. *FEBS Letters*, 301(3), 243-245. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80249-g](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80249-g)

Worman, H. J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *The Journal of Pathology*, 226(2), 316-325. <https://doi.org/10.1002/path.2999>

Wynder, C., Hakimi, M.-A., Epstein, J. A., Shilatfard, A., & Shiekhattar, R. (2005). Recruitment of MLL by HMG-domain protein iBRAF promotes neural differentiation. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1113-1117. <https://doi.org/10.1038/ncb1312>

Yan, Z., Ji, L., Huo, X., Wang, Q., Zhang, Y., & Wen, B. (2020). G9a/GLP-sensitivity of H3K9me2 Demarcates Two Types of Genomic Compartments. *Genomics*,

Proteomics & Bioinformatics, 18(4), 359-370.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.08.001>

Yang, J., & Zhang, Y. (2015). Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*, 52, 5.8.1-5.8.15. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0508s52>

Zablotsky, B., Black, L. I., & Blumberg, S. J. (2017). Estimated Prevalence of Children With Diagnosed Developmental Disabilities in the United States, 2014-2016. *NCHS Data Brief*, 291, 1-8.