



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

TESIS

INTERACCIÓN DE LA DISTROFINA DP71 CON LAS PROTEÍNAS BRAF35 E IBRAF

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Abel Segura Olvera

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA DEL ROCÍO SUÁREZ SÁNCHEZ

MÉXICO, D.F. 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

VOCAL: DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL ROCÍO SUÁREZ SÁNCHEZ

1er. SUPLENTE: DRA. FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

2° SUPLENTE: M. EN C.JAVIER AXOSCO MARIN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE GENÉTICA Y MEDICINA GENÓMICA DEL INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA DEL ROCÍO SUÁREZ SÁNCHEZ

SUSTENTANTE (S):

ABEL SEGURA OLVERA



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética y Medicina Genómica del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, bajo la dirección de la Dra. María del Rocío Suárez Sánchez.

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| Distrofia Muscular de Duchenne | 2 |
| Distrofina: gen y proteína | 4 |
| Proteína DMD | 6 |
| Distrofina Dp71 | 9 |
| Distrofina Dp71 y desarrollo neuronal | 11 |
| RE1, REST y CoREST..... | 13 |
| BRA35 e iBRA3 | 14 |
| Justificación | 16 |
| Hipótesis..... | 17 |
| Objetivo general | 17 |
| Objetivos particulares..... | 17 |
| Metodología..... | 18 |
| Cultivo celular | 18 |
| Anticuerpos..... | 18 |
| Transfección transitoria de células | 18 |
| Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal | 18 |
| Extractos celulares | 19 |
| Análisis de inmunodetección en fase sólida (Western blot) | 19 |
| Inmunoprecipitación | 20 |
| RESULTADOS | 21 |
| Expresión de Dp71, BRA35 e iBRA3 en la línea celular N1E-115 | 21 |
| Localización subcelular y colocalización de la proteína Dp71 con BRA35 e iBRA3... .. | 23 |
| Identificación de BRA35 como proteína asociada a Dp71 | 25 |
| Efecto de mutaciones en la distrofina Dp71 sobre la localización subcelular de iBRA3 .. | 27 |
| Discusión | 29 |
| Conclusiones..... | 31 |
| Perspectivas | 31 |
| Bibliografía..... | 32 |

Resumen

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad que se presenta en 1 de cada 3500 niños varones y se caracteriza por debilidad muscular progresiva. Además de la característica muscular, se ha observado que cerca del 30% de los pacientes con DMD presentan algún nivel de retraso mental. Se sabe que la isoforma de la distrofina, proteína expresada por el gen *DMD*, con mayor expresión en cerebro es la isoforma más corta conocida y nombrada como Dp71 por su peso molecular. Hasta el momento se sabe que esta isoforma funciona como proteína de andamiaje atrayendo a proteínas que forman parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), como son los distorglicanos, y que da estabilidad a la membrana nuclear e influye en la diferenciación neuronal. Se observó además en un estudio, la interacción *in vitro* de Dp71 con las proteínas BRAF35 e iBRAF, que forman parte del complejo co-represor REST, el cual impide la transcripción de genes neuronales específicos tanto en células neuronales no diferenciadas como en células no neuronales. Hasta el momento no se tiene clara una vía mediante la cual Dp71 pueda estar regulando la diferenciación neuronal, por lo que el estudio de su interacción con las proteínas BRAF35 e iBRAF podría ayudar a esclarecer este punto.

Para iniciar el estudio del papel de la Dp71 en la diferenciación neuronal se realizaron ensayos de inmunofluorescencia buscando una posible colocalización de esta con las proteínas BRAF35 e iBRAF *in vitro*. La interacción, fue confirmada mediante inmunoprecipitación asociada a western blot. Finalmente, con el objetivo de establecer una importancia funcional se realizaron ensayos de inmunofluorescencia buscando los efectos que podría llegar a tener sobre iBRAF, la expresión de una forma mutante de la Dp71.

Se observó que en la línea celular N1E-115, línea celular inducible a diferenciación neuronal, se expresan las tres proteínas de interés, Dp71, BRAF35 e iBRAF, y todas muestran un aumento al llevar esta línea celular a diferenciación. Se observó la colocalización de estas proteínas mediante microscopía confocal, en un tiempo previo y posterior a la diferenciación, mostrando una relocalización de BRAF35 y Dp71, posterior a la diferenciación; además, se vio que, tras la diferenciación, iBRAF se mantiene principalmente a nivel nuclear. Se confirmó la interacción de Dp71 con BRAF35 mediante inmunoprecipitación. Por último, mediante inmunofluorescencia, se observó que la presencia de Dp71 mutada afecta la localización normal de iBRAF, lo que sugiere que su asociación con Dp71 es importante para la correcta localización de iBRAF. Los resultados de este trabajo sugieren una posible influencia de Dp71, como una proteína de andamiaje en la diferenciación neuronal, y que mutaciones en Dp71 podrían influir en la interacción de ésta con las proteínas BRAF e iBRAF, afectando así la diferenciación neuronal.

Introducción

Distrofia Muscular de Duchenne

Las distrofias musculares son un grupo de trastornos hereditarios caracterizados por pérdida de masa muscular y debilidad que no son de origen neurogénico. Son enfermedades hereditarias que afectan a varios tipos de animales, entre ellos al humano; la manifestación primaria es una debilidad muscular progresiva (Emery, et al., 2002).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD), descrita por primera vez a mediados del siglo XIX, es la forma más común de este grupo de enfermedades. Fue detallada por el médico inglés Edward Meryon, quien mostró que la enfermedad solo se observaba en varones y que mostraba su inicio en la infancia con una debilidad progresiva y con muerte en la etapa joven. Es una enfermedad muscular ligada al cromosoma X, es la distrofia muscular hereditaria más común de la infancia y se presenta en aproximadamente 1 de cada 3500 niños (Blake, 2002).

Una forma más leve de la enfermedad, la distrofia muscular de Becker (DMB por sus siglas en inglés), tiene un inicio posterior y una supervivencia mucho más larga. Ambos trastornos son causados por mutaciones en el gen DMD, que codifica para una proteína citoesquelética de 427 KDa llamada distrofina. Las mutaciones del gen DMD resultan en la ausencia completa de distrofina, o bien en una proteína truncada, lo que afecta la función de la proteína. La distrofina tiene funciones tanto mecánicas como no mecánicas en la estabilización del sarcolema y la protección de las células musculares del daño inducido por la contracción. En el músculo, donde se han realizado la mayoría de los estudios, la distrofina está asociada con un complejo proteico, el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC), ubicado en el sarcolema. En el músculo deficiente en distrofina, este complejo se altera, provocando una reducción severa de los niveles del DAPC en la membrana. El DAPC se puede subdividir en tres componentes distintos, el complejo de distroglicano, el complejo de sarcoglicano y el complejo citoplasmático. De manera similar a lo que ocurre en el músculo, un complejo DAP se ha reportado en células neuronales, y su afectación puede contribuir a la etiología o neuropatología del deterioro cognitivo en pacientes con DMD. Sin embargo, mientras que la distrofina solo se expresa en neuronas, varios componentes de la DAPC, como el distroglicano y la laminina-2, están asociados con la interfaz glial / vascular (Blake et al., 1999) Además de estas enfermedades, las mutaciones en los genes que codifican muchos componentes del complejo proteico asociado a distrofina (DAPC por sus siglas en inglés) causan otras formas de distrofia muscular (Blake, et al., 2002).

Clínicamente, la DMD se manifiesta en estados tempranos de la infancia, los pacientes muestran dificultades al realizar movimientos simples, como saltar y correr, debido al debilitamiento de los músculos proximales (Figura 1A). La debilidad en las piernas y la cintura favorece el signo de Gower, en el que el paciente distrófico tiene dificultades para levantarse del suelo sin apoyo, necesitando subir en sus piernas para llegar a la posición vertical (Figura 1B) (Bushby et al., 2010, Chen et al., 2014).

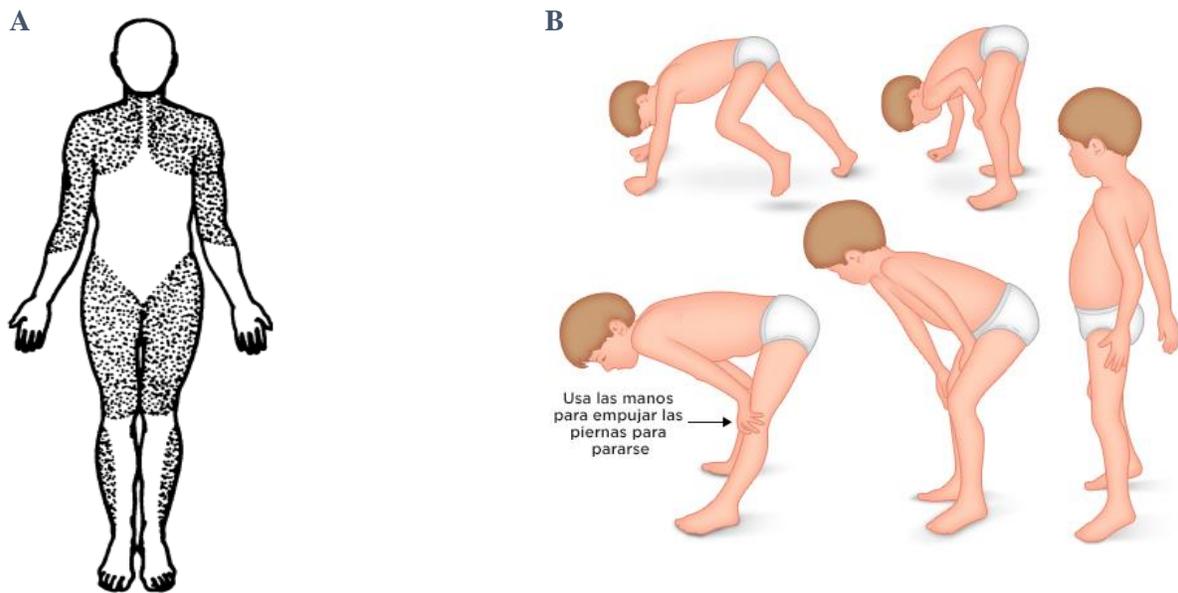


Figura 1. A. Distribución de la debilidad muscular predominante en diferentes tipos de distrofia tipo Duchenne y tipo Becker. B Signo de Gower

Al tratarse de una enfermedad crónica degenerativa, al paso del tiempo los síntomas de la distrofia se intensifican llegando a ser necesarios el uso de silla de ruedas alrededor de los 12 años de edad, así como el uso de ventilación mecánica, de cuidados respiratorios y de traqueostomía. La esperanza de vida de los pacientes distróficos es de alrededor de 20 años, y en algunos casos cerca de los 30 años, y llegan a fallecer por complicaciones cardiorrespiratorias (Emery et al., 2002)

Los pacientes con Duchenne, manifiestan, además de la debilidad en las piernas, debilidad en cuello, brazos y otras áreas, pero éstas no se ven afectadas tan severamente como las extremidades inferiores.

Además de la patología del músculo esquelético, ha surgido nueva evidencia que asocia a más del 30% de los niños con DMD, con problemas cognitivos y de

conducta. Déficit cognitivos y las alteraciones del habla en pacientes con DMD se han descrito en informes de metaanálisis de función mental y DMD (Cotton, et al., 2001). En particular, se han reportado déficit de atención en tareas verbales, repetición de oraciones, procesamiento fonológico y memoria verbal (Hinton, et al.2000; et al., 2007).

La distrofina está presente en muchas regiones cerebrales responsables de funciones como el aprendizaje y la memoria, que incluyen la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo (Snow, et al.,2013). Un estudio en el que se utilizó tomografía por emisión de positrones (PET) demostró un metabolismo reducido de la glucosa en personas con DMD, específicamente en áreas que son típicamente ricas en distrofina, como las antes mencionadas (Lee, et al.,2002). En la corteza motora, la sincronización local de la actividad espontánea de las redes neuronales se reduce en las personas con DMD, medida por resonancia magnética funcional en estado de reposo (RS-fMRI) (Lv et al., 2011). Además, un estudio que utilizó estimulación magnética transcraneal (TMS) encontró hipoexcitabilidad en la corteza motora de aquellos pacientes con DMD.

Distrofina: gen y proteína

Las distrofinopatías son el trastorno neuromuscular más frecuente. Son causados por mutaciones en el gen *DMD*, uno de los genes más grandes encontrados en humanos, abarcando 2.5 Mb de secuencia genómica y compuesto por 79 exones. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp21) y el producto proteico codificado por esta transcripción se denomina distrofina (Blake, et al., 2002).

El gen *DMD* contiene siete promotores internos independientes, que se expresan de manera tejido específica resumidos en la tabla 1.

La transcripción de la distrofina de longitud completa está controlada por 3 promotores localizados corriente arriba del primer exón. Los promotores de músculo (M), cerebro (B) y Purkinje (P) se nombran según su sitio principal de expresión. El promotor cerebral se expresa principalmente en las neuronas corticales y en el hipocampo. El promotor de Purkinje induce la transcripción en células de Purkinje, pero también en el músculo esquelético. El promotor muscular (M) induce la transcripción predominantemente en el músculo esquelético y cardíaco, y la proteína que produce está bien caracterizada tanto en humanos como en modelos animales. Esta distrofina, de 427 KDa, es un componente crucial del complejo distrofina-glicoproteína (DGC), que une el citoesqueleto interno y la matriz extracelular que proporciona estabilidad estructural a las fibras musculares (Doorenweerd, N. 2017), pero también se ha observado que se expresa en algunas células gliales en el cerebro.

Tabla 1 Expresión tejido dependiente de distrofina

| Promotores | Tejido específico |
|------------------------------|---------------------|
| Dp427m [Koenig et al., 1989] | Músculo esquelético |
| | Músculo cardiaco |
| | Células de glía |
| Dp427c [Daoud, F_1990] | Retina |
| | Cerebro |
| Dp427p [Daoud, F_1990] | Células de Purkinje |
| | Músculo |
| Dp260 [D'Souza et al., 1995] | Retina |
| Dp140 [Lidov et al., 1995] | Riñón |
| | Retina |
| | Cerebro |
| Dp116 [Byers et al., 1993] | Células de Schwann |
| Dp71 [Hugnot et al., 1992] | Cerebro |

Además, existen 4 promotores internos, Dp260, Dp140, Dp116 y Dp71 (nombrados según el peso molecular de la proteína producida) (Figura 2). Dp260 tiene una transcripción específica en la retina, particularmente en la capa plexiforme externa de la retina, pero también se encuentra en el corazón y el cerebro en cantidades menores. Dp140 se encuentra principalmente en el riñón, la retina y el cerebro, mientras que Dp116 es dirigida por un promotor específico de células de Schwann. A su vez, Dp71 es transcrita en la mayoría de los tejidos, como el cerebro, riñón, hígado, y pulmón, excepto en músculo esquelético (Blake, et al., 2002).

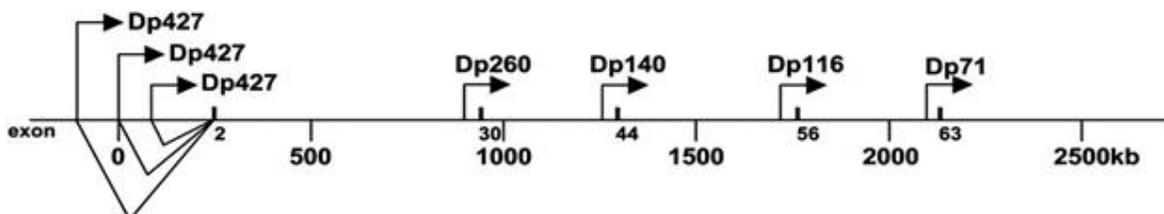


Figura 2 Promotores internos del gen DMD

Adicionalmente, el splicing alternativo que se produce en el extremo 3' del transcrito produce un número aún mayor de isoformas. Este splicing diferencial puede regular la unión de la distrofina a las DAPC en la membrana (Blake, et al., 2002).

Proteína DMD

La distrofina es una proteína citoesquelética de 427 kDa que es un miembro de la familia de proteínas espectrinas. Esta familia se caracteriza por un dominio de unión a actina en el extremo NH₂-terminal seguido de un número variable de unidades repetitivas, conocidas como repeticiones similares a las espectrinas (Gao, et al., 2015).

La distrofina comprende cuatro regiones esenciales que se extienden desde el extremo NH₂-terminal que, como se mencionó, muestra actividad de unión a actina, a través de una región muy larga del dominio rod central de 24 repeticiones de tipo espectrina, hasta un dominio rico en cisteína y un dominio coiled-coil en la región COOH-terminal (Figura 3). La región rica en cisteína comprende un dominio WW, dos EF-hands y un dominio rico en cisteína.

El dominio rod es el dominio central de la proteína y representa aproximadamente el 75% de la distrofina. Este dominio se compone de 24 repeticiones homólogas a las espectrina y 4 bisagras (H1 a H4). Estas bisagras dividen el dominio rod en tres sub dominios. Las repeticiones se pueden plegar en tres hélices alfa que constituyen bobinas helicoidales en espiral antiparalelas levógiras. Al final de los 24 repetidos y después de la cuarta bisagra se encuentra el inicio del dominio WW, el cual se une a sustratos ricos en prolina. Esta región media la interacción entre el β -Distroglicano y la distrofina, a través de la secuencia PPxY contenida en el dominio citoplasmático del β -Distroglicano (Pereboev, A. V. 2001). Sin embargo, el dominio WW completo de la distrofina no parece ser necesario para la interacción con el distroglicano, ya que Dp71, una isoforma corta de distrofina, que contiene solo parte del dominio WW, se puede unir al β -distroglicano (Pereboev, et al., 2001).

El dominio ZZ también forma parte del dominio rico en cisteína, contiene una serie de residuos de cisteína conservados que se piensa forman los sitios de coordinación para cationes metálicos divalentes como el Zn²⁺. El dominio ZZ es similar a muchos tipos de dedos de zinc y se encuentra tanto en proteínas nucleares como en proteínas citoplasmáticas. El dominio ZZ de la distrofina se une a la calmodulina de manera dependiente de Ca²⁺, por lo que se considera que el dominio ZZ puede tener implicaciones para la unión de la calmodulina a otras proteínas relacionadas con la distrofina (Blake, D. J 2002).

La región COOH-terminal de la distrofina contiene dos polipéptidos que se sabe forman bobinas helicoidales, α -hélices, similares a las del dominio *rod*. Este dominio ha recibido el nombre de dominio coiled-coil (CC). La región CC de la distrofina

forma el sitio de unión de la distrobrevina y puede modular la interacción con la sintrofina y con otras proteínas asociadas a la distrofina (Blake, D. J 2002).

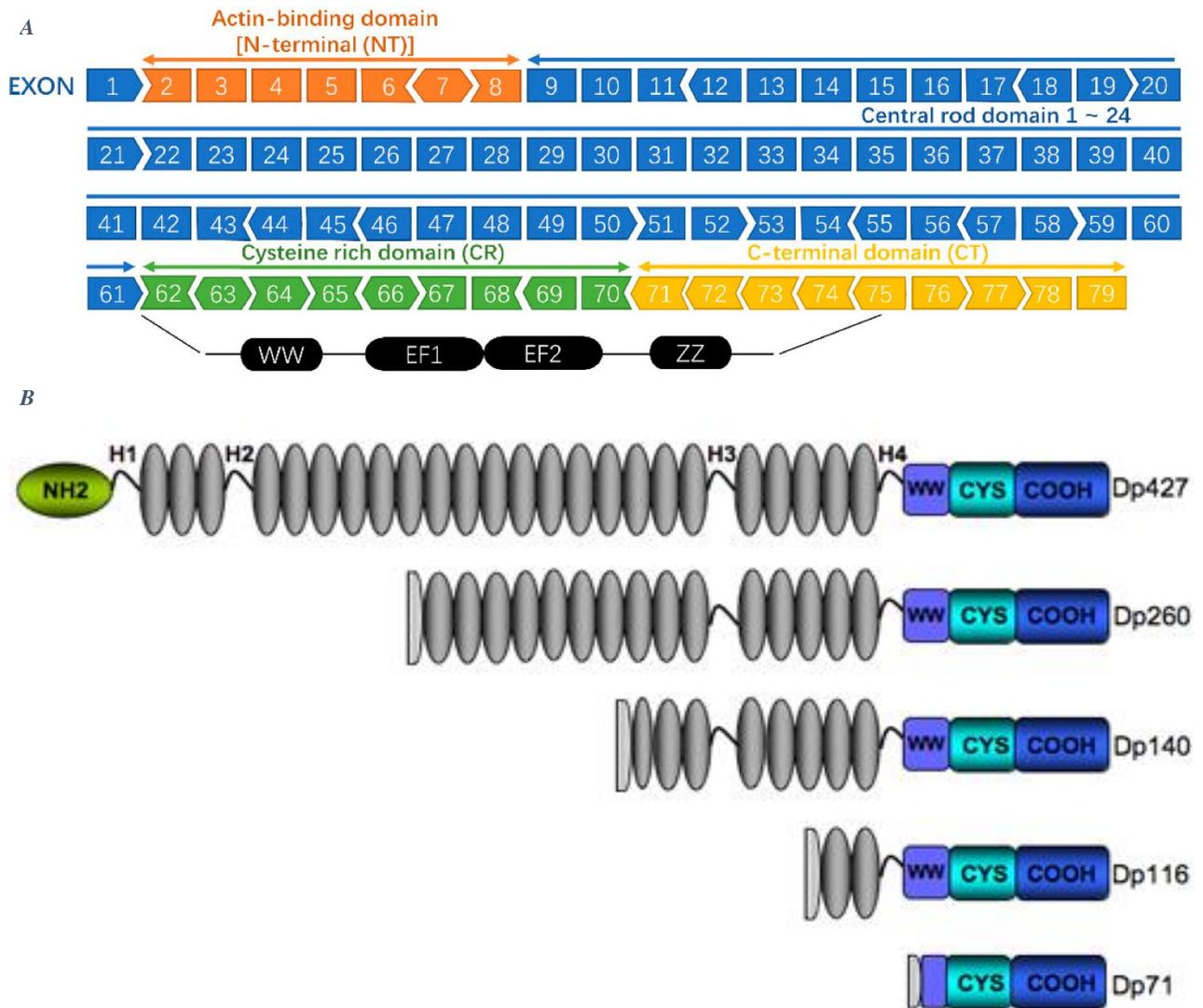


Figura 3. A La estructura del gene de la distrofina. El gen Distrofina contiene 79 exones. El dominio N-terminal (NT): exón 2-8; Dominio de rod central: exón 9-61; Dominio rico en cisteína (CR): exón 64-70; Dominio C-terminal (CT): exón 71-79. La forma de flecha de los exones adyacentes muestra compatibilidad con marco de lectura abierto (ORF). Los dominios CR y CT comprenden el dominio WW, la EF-hand y los dominios ZZ. B Las Regiones de unión a DAPC de la distrofina, cuatro isoformas de distrofina más cortas retienen los dominios ricos en cisteína y C-terminal de la distrofina, preservando los sitios de unión para el distroglicano, la distrobrevina y la sintrofina

Mutaciones en la Distrofia Muscular de Duchenne

Como se mencionó previamente, la Distrofia Muscular de Duchenne es causada por mutaciones generadas en el gen *DMD*, que generalmente resultan en la ausencia o en niveles muy reducidos de la proteína distrofina; mientras que, los pacientes con DMB generalmente producen alguna proteína parcialmente funcional. Aproximadamente el 65% de los pacientes con DMD y DMB tienen amplias deleciones del gen *DMD*. Si una deleción conduce a la expresión de un transcrito con ausencia de uno o varios exones internos, pero sin que cambie el marco de lectura abierto normal, entonces se podría producir una versión más pequeña pero funcional de distrofina. Este caso sería consistente con un fenotipo de DMB. Por otro lado, si la eliminación crea un cambio de marco de la traducción, entonces la terminación prematura de la traducción tendrá como resultado la síntesis de una proteína truncada. Este escenario a menudo se asocia con niveles extremadamente bajos de expresión de distrofina debido a la inestabilidad del mRNA o de la proteína y da como resultado un fenotipo de DMD (Blake, et al., 2002).

La gran mayoría de las grandes eliminaciones detectadas en DMB y DMD se agrupan alrededor de dos regiones denominadas "hot-spots". La región de eliminación I abarca los exones 45–53 e incluye parte del dominio *rod* central, mientras que la región de eliminación II abarca los exones 2–20 e incluye los sitios de unión a actina junto con la parte del dominio *rod* central. La mayoría de los puntos de interrupción que ocurren en la región II se producen en los intrones grandes 1 y 7 (Blake, et al., 2002).

Un tercio de los casos de DMD son causados por deleciones muy pequeñas y mutaciones puntuales, la mayoría de las cuales introducen codones de paro prematuros. Estos, a diferencia de las grandes deleciones, se encuentran distribuidos a lo largo del gen. Adicionalmente, también se han reportado algunos casos de mutaciones que no generan codones de paro, pero que producen un fenotipo clínico de DMD. Un ejemplo de este tipo de mutación se describió en un reporte de caso, en el que se observa una mutación en la región ZZ, que altera uno de los residuos de coordinación en el dominio ZZ, que se sabe asociado a la proteína β -dístroglicano. En esta mutación, un residuo de aspartato cambia a un residuo de histidina en la posición 3335 afectando el sitio de unión a β -dístroglicano, y aunque se detectó una localización y cantidades de distrofina normales, en el paciente se produjo un fenotipo DMD grave. Curiosamente, el dominio rico en cisteína nunca se elimina en pacientes con DMB, lo que sugiere que este dominio es crítico para la función de la distrofina (Ho-Goldberg, et al., 1998).

Otro ejemplo de mutación es la deleción 10099-10101delGAA del transcrito de la Dp427 (E299 en la distrofina Dp71), que provoca una deleción del aminoácido E3367, adyacente al dominio ZZ de la distrofina y que no cambia el marco de lectura. Se analizaron biopsias musculares del paciente y se encontró que los niveles y la localización de la distrofina Dp427 estaban alterados solo parcialmente, pero el paciente mostraba un fenotipo clásico de DMD. Lo anterior sugiere que la mutación

E3367 es suficiente para comprometer la función de la distrofina (Juan-Mateu, et al.,2003).

Adicionalmente, también se ha reportado un caso con la mutación puntual G10227A, la cual genera el cambio del aminoácido C3340Y en la distrofina Dp427 (C272Y en la distrofina Dp71), que corresponde a un residuo conservado de cisteína involucrado en el acoplamiento de zinc en el dominio ZZ. Se ha demostrado que esta mutación no provoca la ausencia total ni de la distrofina Dp427, ni de sus proteínas clásicas de unión, como el β -dístroglicano, lo que indica que las distrofinas podrían mantener cierta función ante esta mutación. Interesantemente, en este caso, además del fenotipo muscular clásico de DMD, el paciente presentó retraso mental (WISC-III, IQ 52) y ausencia de ondas B en un electroretinograma, lo que indica que las funciones del sistema nervioso central están afectadas por esta mutación (Lenk, et al., 2009).

En otro estudio Lenk y cols.en el 2013 examinaron 26 pacientes con DMD / BMD para detectar mutaciones puntuales. Siete individuos tuvieron mutaciones puntuales en la región COOH terminal, de los cuales cinco se caracterizaron con cierto grado de retraso mental. Interesantemente, en esta región COOH terminal, que incluye al dominio ZZ, se encuentran codificadas las distrofinas cortas como la Dp71, por lo que se ha asociado la presencia de mutaciones que afectan estas distrofinas con el fenotipo de retraso mental en pacientes DMD (Lenk, et al., 2013).

Distrofina Dp71

La distrofina Dp71 es el principal producto del gen DMD en el cerebro y se ha encontrado expresada en retina. Además, Dp71 se expresa en células madre embrionarias pluripotentes, siendo el primer producto del gen detectable durante el desarrollo. Al igual que la distrofina de longitud completa en el músculo esquelético, Dp71 se asocia con dístroglicanos, sarcoglicanos, dístrobrevinas, distrofinas y proteínas accesorias para formar el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) (Tadayoni, et al., 2012).

La producción de Dp71 está controlada por un promotor interno ubicado en el intrón 62. La proteína Dp71 es la estructura más distintiva de todas las isoformas de distrofina. Tiene un extremo NH₂-terminal único de siete aminoácidos y contiene los dominios ricos en cisteína de la región COOH-terminal de la distrofina, región crucial para la unión a los complejos de DAPC, pero carece de los dominios de tipo espectrina y NH₂-terminal (David, et al.,2013; Márquez, et al., 2003). Se ha observado que la deficiencia de Dp71 se asocia con niveles reducidos de DAPC en el cerebro, lo que indica que Dp71 se requiere para la organización o estabilización de los complejos de DAPC (Sarig, et al., 1999).

Por otra parte, los transcritos de Dp71 se pueden procesar por splicing alternativo para los exones 71 y / o 78. Mientras que la eliminación del exón 71 no cambia el

marco de lectura, la pérdida del exón 78 sí lo hace. Esto resulta en el reemplazo de los últimos 13 aminoácidos hidrofílicos (Dp71d) con 31 nuevos aminoácidos hidrófobos en la proteína Dp71 (Dp71f) (Márquez, et al.,2003). Otras isoformas de la distrofina Dp71, con splicing alternativo de los exones 71-74 y 79 se muestran en la figura 4.

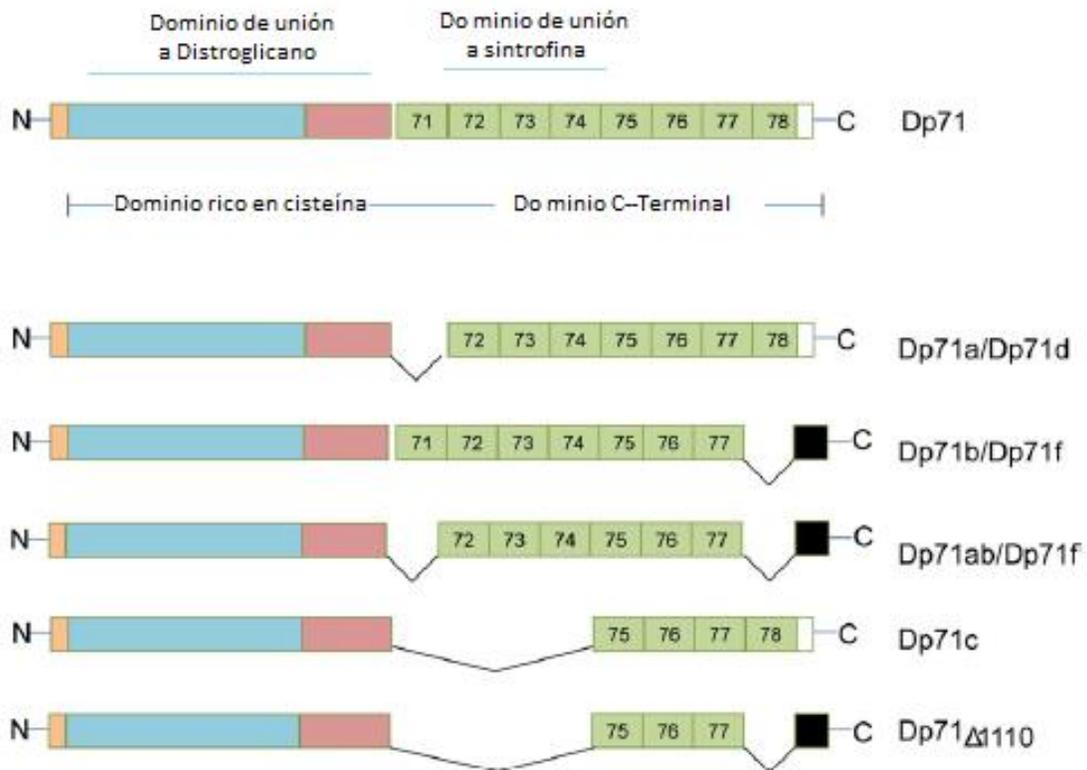


Figura 4 Splicing e isoformas de la distrofina Dp71, líneas negras muestran los exones que son "saltados" en el splicing, cuadro negro muestra los exones finales faltantes.

Se ha reportado que la distrofina Dp71 se asocia con sarcoglicanos, distroglicanos, sintrofinas y distrobrevina, para conformar el DAPC asociada a la membrana plasmática y también a la membrana nuclear. Este conjunto de proteínas proporciona estabilidad a la membrana plasmática y modula la señalización celular; mientras que, en núcleo, participa en el mantenimiento de la arquitectura nuclear, apoyándose además en su interacción con las proteínas de la lámina y envoltura nuclear, como son lámina B1 y emerina (Suárez-Sánchez, et al., 2016).

Distrofina Dp71 y desarrollo neuronal

Evidencias experimentales han llevado a pensar que la distrofina Dp71 juega un papel importante en el sistema nervioso central, algunas de ellas son: las mutaciones en regiones COOH-terminales en el gen DMD que llegan a interrumpir la expresión de Dp71 están relacionadas con el deterioro cognitivo de los pacientes con DMD (Taylor, et al., 2010). Dp71 juega un papel muy importante en estabilización del DAPC en cerebro asociándose con proteínas de señalización clave como FAK, c-Src y Grb2, proteínas que se sabe que contribuyen al crecimiento de las neuritas, la morfogénesis de la columna dendrítica y la plasticidad sináptica (Daoud, et al., 2009); experimentos realizados en la línea celular neuronal PC12 en la que se eliminó a la distrofina Dp71, mostraron una disminución en el desarrollo de dendritas y en la adhesión celular (Morales-Lázaro, et al.,2010).

Respaldando la función de Dp71 en las células neuronales, se ha demostrado que la expresión de los niveles de mRNA de Dp71, así como la proteína, aumenta con la diferenciación neuronal inducida por DMSO o AMPc, demostrando la regulación positiva de Dp71 observada in vivo en el sistema nervioso (Morales-Lázaro, et al., 2010).

En estudios realizados con células PC12, las cuales responden al factor de crecimiento neural (NGF) diferenciándose a células de tipo neuronal, se observó que cuando se abate la expresión de Dp71, hay un marcado decremento en el crecimiento celular, el cual no está relacionado con la apoptosis. Lo anterior fue indicativo de que la deficiencia de Dp71 tiene un efecto en el ciclo celular. Adicionalmente, se demostró que la deficiencia de Dp71 podría modular el ciclo de división celular al afectar los niveles de lámina B1 y β -dístroglicano (Villarreal-Silva, et al.,2011).

Trabajos con ratones Dp71-nulo mostraron que la interrupción selectiva del complejo Dp71-DAPC afecta la maduración y función sináptica, y da como resultado déficits en las funciones cognitivas. La caracterización conductual de ratones Dp71-nulo reveló alteraciones selectivas caracterizadas por una conducta exploratoria reducida, deterioros del aprendizaje espacial y la memoria. Estos resultados sugieren deficiencias en el aprendizaje en ratones con Dp71-nulo, lo que apoya la hipótesis de que la pérdida de Dp71 tiene un papel importante en la génesis de los déficits cognitivos en la DMD (Daoud, et al.,2009).

En un estudio realizado en 12 pacientes con DMD que presentaban problemas cognitivos, pero sin deleciones o duplicaciones detectables, se encontraron 5 mutaciones puntuales que causaban la terminación temprana de la traducción de Dp71 en los casos más severos de daño cognitivo (Moizard, et al., 2000). Previamente se habían descrito cuatro pacientes con DMD y severo deterioro cognitivo, de los cuales dos pacientes carecían de promotor de la distrofina Dp140 y dos pacientes tenían transcritos alterados de Dp71, uno con una ausencia total de

la proteína y otro con una mutación que generaba una proteína trunca. Ambos pacientes con delección Dp140 tenían un QIV <70 y mala o ninguna adquisición de lectura, mientras que en los pacientes con transcritos alterados de Dp71 no fue posible realizar ninguna prueba debido a la gravedad de la deficiencia mental (Moraine et al., 1998).

Un estudio adicional, usando una cohorte de 81 pacientes mostró que aquellos con mutaciones que no afectan a la Dp71 presentan funciones cognitivas normales o marginales, mientras que las mutaciones que afectan a la Dp71 se asocian a formas de retraso mental severas, llevando a una disminución de 2 SD del IQ (Daoud, et al., 2009.)

En conjunto, estos hallazgos sugieren, por un lado, que el deterioro cognitivo en algunos pacientes con DMD puede estar relacionado con la disfunción de ciertas isoformas cerebrales de la DMD, particularmente las isoformas cortas, y, por otra parte, que el grado de retraso mental está relacionado con la ubicación de la mutación en el gen.

A pesar de las evidencias mostradas, no se conoce claramente el mecanismo molecular de la función de la distrofina Dp71 en células neuronales; lo que hace necesaria la búsqueda y comprensión de las bases moleculares que están tras el retraso mental asociado con DMD.

En un estudio previo, utilizando proteínas recombinantes, se sugirió la interacción de la distrofina Dp71 con las proteínas HMG20, iBRAf y BRAf35 en ensayos *in vitro* (Figura 5) Estas proteínas iBRAf y BRAf35, están asociadas a la regulación de la expresión de genes neuronales a través de remodelación de la cromatina mediada por el complejo co-REST. co-REST es un complejo correpressor modificador de la cromatina que actúa con REST para regular la expresión de genes neuronales y el destino de las células madre neuronales (Artegiani, et al. 2010). Así, de comprobarse estas interacciones, y debido a las funciones estructurales y de andamiaje que tiene Dp71 y los complejos DAP, se podría sugerir que la Dp71 esté involucradas en la estabilización de los complejos co-REST y de este modo participen en la regulación de sus funciones.

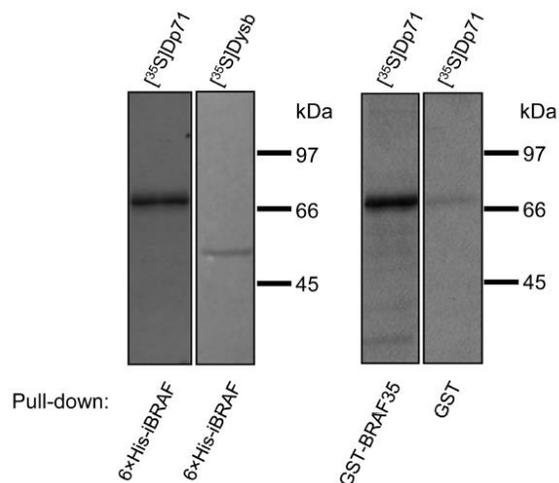


Figura 5. Ensayos de interacción con proteínas recombinantes Dp71 e iBRAF y BRAF35 (Artegiani, et al. 2010)

RE1, REST y CoREST

La proteína REST (factor de transcripción silenciador RE1) se descubrió en 1995 como un represor de genes neuronales que contienen un motivo conservado de 23 pb, conocido como RE1 (elemento represor 1 o NRSE) (Hakimi, et al., 2005). El RE1, un elemento silenciador también conocido como elemento silenciador con restricción neuronal (NRSE), se encontró originalmente en la región 5' que flanquea el gen del canal de sodio tipo II (NaV1.2) dependiente de voltaje y de los genes del ganglio cervical superior 10 (SCG10). Este elemento de 21 pb fue posteriormente identificado en las regiones reguladoras de más de 30 genes (Bruce, et al., 2004) y ha sido identificado principalmente en genes neuronales que codifican a sinapsina I, la subunidad b2 del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), la molécula de adhesión neurona-célula glial (Ng-CAM), el receptor muscarínico m4 y la colina acetiltransferasa (ChAT) (Bessis, et al., 1997).

REST es una proteína necesaria para el correcto desarrollo en vertebrados, ya que la perturbación de la expresión o función de REST en el desarrollo embrionario, da como resultado la expresión ectópica de genes neuronales en tejidos no neuronales y la muerte embrionaria temprana (Chen, et al., 1998).

La manera en que REST dirige el silenciamiento neuronal específico radica en sus dominios funcionales distintivos, REST contiene tres dominios funcionales: un dominio de unión a ADN con ocho motivos de dedos de zinc que se unen al motivo RE1, y dos dominios represores independientes; uno ubicado en el NH₂- y otro en el COOH- terminal de la proteína (Grimes, et al., 2000). El dominio represor NH₂-terminal interactúa con mSin3, un co-represor encontrado en todos los eucariotas, que recluta deacetilasas de histonas (HDAC) y que se ha asociado principalmente con un modelo dinámico de represión que puede alternar entre represión y

activación (Hakimi, et al., 2005). Por otra parte, el dominio represor COOH-terminal de REST interactúa con el co-represor CoREST, el cual, de manera similar a mSin3 interactúa con HDAC. Específicamente, CoREST puede formar complejos no solo con HDAC sino también con un complejo co-represor que incluye otras proteínas remodeladoras de la cromatina y a la proteína BRAF35. Este complejo ha sido denominado de manera diversas, tales como, complejo HDAC1 / 2, complejo CoREST-HDAC o complejo BRAF35–HDAC (BHC), y media la represión de genes neuronales en tejidos no neuronales y en progenitores neuronales (Lakowski, et al., 2006; Hakimi, et al., 2005).

BRAF35 e iBRAF

BRAF35 (HMG20b) es una proteína con un grupo de alta movilidad HMG y es un componente del complejo represor BHC. En un estudio en el que se generó una mutante puntual de BRAF35 (mutante K116I), se observó que la mutación provocaba una disminución de la unión del complejo BHC al promotor de sinapsina. Adicionalmente, las concentraciones crecientes de BRAF35 mutada disminuyeron la represión transcripcional mediada por REST. Esto reveló que BRAF35 tiene una importante participación en la represión de genes neuronales dependiente de REST (Hakimi, et al., 2002).

Por otra parte, la diferenciación de las células progenitoras en neuronas post-mitóticas requiere la participación de mecanismos mediante los cuales se puedan superar los efectos represivos de REST. En este sentido, se ha descrito una proteína que tiene la función opuesta a BRAF35, es decir, funciona como un inhibidor de BRAF35 por lo que es llamada iBRAF (HMG20a). iBRAF es una proteína que contiene el dominio HMG con secuencia cercana y homología estructural con BRAF35. iBRAF se expresa en neuronas maduras y su expresión da como resultado el reclutamiento de la histona metiltransferasa MLL y el consiguiente aumento de la metilación de H3K4 (Figura 6). Esta marca está enriquecida en promotores activos cerca de los sitios de inicio de la transcripción y se correlaciona positivamente con la transcripción (Wynder, et al., 2005). En neuronas maduras iBRAF promueve la expresión de los genes que se requieren para la inducción de fenotipos neuronales, mediante la activación de genes que responden a REST, a través de la modulación de la metilación de las histonas (Wynder, et al., 2005).

Lo anterior, en conjunto con la evidencia in vitro de la unión de la distrofina Dp71 con las proteínas BRAF35 e iBRAF, sugiere la participación de la Dp71 en la estabilización y andamiaje de estos complejos y por consiguiente, una posible implicación en la regulación de genes neuronales, lo que podría contribuir a explicar la presencia de problemas cognitivos en los pacientes con DMD que tienen mutaciones que afectan la expresión de esta distrofina.

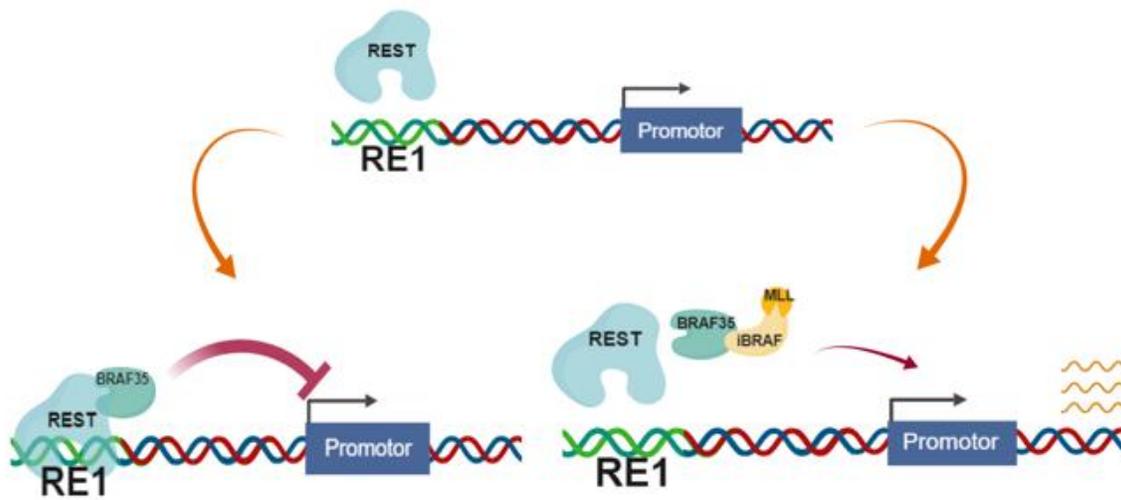


Figura 6. Complejo de represión asociado a REST, por el lado izquierdo: al unirse REST a la región RE1, interactúa con la proteína BRAF35, promoviendo la metilación de regiones cercanas al promotor inhibiendo su transcripción; por el otro lado, la intervención de iBRAF desacopla el complejo RE1/REST/BRAF35, atrayendo al complejo MLL promoviendo así la desmetilación y acetilación de zonas cercanas al promotor, permitiendo la transcripción de genes neuronales.

Justificación

La Distrofia Muscular de Duchenne es una enfermedad hereditaria causada por mutaciones en el gene DMD, que provoca debilidad muscular progresiva. Adicionalmente, se ha descrito que el 30% de los pacientes con DMD presentan también problemas cognitivos, los cuales se han asociado a mutaciones en el gen DMD en la región codificante para la isoforma de distrofina Dp71. Esta isoforma es la más abundante en cerebro y tiene funciones de andamiaje y señalización tanto en núcleo como en citoplasma. Como se describió previamente, a la fecha se sabe que Dp71 participa en la diferenciación neuronal, pero a pesar de las evidencias mostradas, no se tiene aún claro un mecanismo molecular de la función de la distrofina Dp71 en células neuronales, ni su papel funcional en el desarrollo de déficit cognitivo en los pacientes DMD. La posible interacción con proteínas remodeladoras de la cromatina a través del complejo co-REST que regula la expresión de genes neuronales, podrían hacer posible la comprensión de las bases moleculares de la función de Dp71 en las células neuronales, así como de su participación en el desarrollo de déficit cognitivo en la DMD.

Hipótesis

La distrofina Dp71 se asocia a las proteínas BRAF35 e iBRAF y participa en su correcta localización subcelular.

Objetivo general

Evaluar la interacción de la distrofina Dp71 con las proteínas BRAF35 e iBRAF en un modelo celular neuronal.

Objetivos particulares

1. Evaluar la expresión de las proteínas BRAF35 e iBRAF en células N1E-115
2. Evaluar la distribución subcelular de BRAF35 e iBRAF, así como su colocalización con la proteína Dp71 en células N1E-115 diferenciadas y no diferenciadas.
3. Evaluar *in vitro* la interacción de la Dp71 con BRAF35 en células N1E-115
4. Evaluar el efecto de mutaciones en Dp71 sobre la localización de iBRAF

Metodología

Cultivo celular

Se cultivaron células de neuroblastoma de ratón N1E-115 en medio de DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado con 4,5 g / L de glucosa, 10% de suero bovino fetal y 100 µg/ml de estreptomicina/penicilina, se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio se cambió cada tercer día.

Para inducir la diferenciación, los cultivos celulares subconfluentes se cultivaron en medio DMEM con 2% de suero bovino fetal y de 1.25% de DMSO. El medio se cambió cada tercer día, por seis días.

Como células control de expresión de Dp71 se utilizaron células HeLa, mantenidas a las mismas condiciones que las células N1E-115

Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: +78Dp71 (GenemedSynthesis Inc. San Francisco, CA, USA), un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra los 13 aminoácidos COOH-terminales de la distrofina (Cisneros, 2008); anticuerpo policlonal de ratón contra BRAF35 (F-4) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); anticuerpo policlonal de conejo contra iBRAF (Anti-HMG20A) (Abcam, Cambridge, UK); anticuerpo policlonal de ratón anti-GFP (B-2) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpo IgG anti-conejo de cabra, conjugado HRP (Thermo Fisher) y anticuerpo IgG anti-ratón de cabra, conjugado HRP ((Thermo Fisher)

Transfección transitoria de células

Las células N1E-115 se sembraron en placas de 60 y 100mm a 70-80% de confluencia. Al día siguiente, se transfectaron con cada constructo reportero Dp71-GFP o GFP vacío, o las mutantes 272 o 299. La mutación 272, presenta un cambio de aminoácido en la posición 277, cisteína (C) por tirosina (Y), C272Y, que replica la mutación de un paciente que presentaba DMD. La mutación 299, se presenta por la eliminación de un residuo de ácido glutámico en la posición 299, E299del, la cual fue reportada en un paciente que presentaba DMD y que tenía una disminución en la expresión de distrofina. Las células se transfectaron con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo el protocolo del proveedor y se analizaron 24 h después de la transfección.

Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células cultivadas y en su caso transfectadas, en cubreobjetos de vidrio se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente, se permeabilizaron con 0.2% de triton X-100 en PBS durante 5 min a 4°C, se bloquearon con gelatina al 0.5% y 1.5% de FBS en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario apropiado. A continuación, los cubreobjetos se incubaron durante 1 h con

un anticuerpo secundario anti-rabbit/anti-mouse marcado con fluoroisotiocianato (FITC) ó isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC). Después del lavado, los cubreobjetos se contratiñeron con VectaShield-DAPI y se montaron en portaobjetos y finalmente se analizaron por microscopia confocal y epifluorescencia. Para comprobar la diferenciación neuronal de las células N1E-115, se realizó inmunotinción contra los anticuerpos primarios NeuN y MAP2 y como anticuerpos secundarios se utilizó anticuerpo anti-mouse marcado con fluoroisotiocianato (FITC).

Extractos celulares

Para obtener extractos celulares totales, se recogieron células cultivadas, se lavaron tres veces con PBS y se centrifugaron a 194g durante 5 min. La pastilla celular se resuspendió en un amortiguador de lisis, el cual contenía Tris-HCl 50 mM [pH 8.0], NaCl 150 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.5 mM, Complete 1x y Triton X-100 0.5%. Se sometió a sonicación cuatro veces durante 10 s a 10% de potencia para obtener extractos celulares totales. Luego se centrifugó la suspensión a 8,000 rpm durante 2 min para separar la fracción no soluble.

Las fracciones nucleares se obtuvieron, lavando tres veces con PBS y se centrifugaron a 1,200 rpm durante 5 min. La pastilla celular se resuspendió en un amortiguador TM, el cual contenía Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], MgCl₂ 2 mM, PMSF 0.5 mM y Complete 1x. Se incubó en hielo por 10 min, posteriormente se adicionó Nonidet P-40 al 0.5%, y se centrifugó la suspensión a 8,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se separaron los núcleos de la fracción citoplasmática (sobrenadante). Los núcleos se resuspendieron en amortiguador de lisis, el cual contenía Tris-HCl 50 mM [pH 8.0], NaCl 150 mM, PMSF 0.5 mM, Complete 1x y Triton X-100 0.5%. Se sometió a sonicación cuatro veces durante 10s a 10% de potencia para obtener extractos nucleares. Luego se centrifugó la suspensión a 8,000 rpm durante 2 min eliminando restos de membrana nuclear. Las concentraciones de proteína se determinaron por el método de Bradford.

Análisis de inmunodetección en fase sólida (Western blot)

Cantidades iguales de extractos de proteínas celulares se mezclaron con Buffer Laemlli y las proteínas se desnaturalizaron por ebullición durante 5 min. Los lisados se separaron luego mediante SDS-PAGE al 10% y se electrotransferieron a membranas de PVDF. Las membranas se incubaron durante 1 h en TBST (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8, Tween 20 al 0.05%) que contenía 6% de leche deshidratada y luego se incubaron toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente. Después de tres lavados con TBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano apropiado (Amersham-Pharmacia, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y se revelaron utilizando el sistema de análisis de transferencia Western ECL (Amersham-Pharmacia).

Inmunoprecipitación

Los extractos proteicos totales se preclarificaron previamente con perlas de proteína G-agarosa recombinante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 2 h a 4°C; luego, las perlas se retiraron por centrifugación a 1,200 rpm durante 5 min y los extractos pretratados se incubaron toda 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 toda la noche a 4°C. Los inmunocomplejos se colectaron por centrifugación durante 5 min a 2,500 rpm y se lavaron tres veces en amortiguador (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 hirviendo en 10 µl de Laemmli [Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, SDS al 2% (p / v), glicerol al 10% (v / v), 2% de mercaptoetanol (v / v) y 0.01% (p / v) de azul de bromofenol] y se analizaron mediante Western Blot. Las proteínas de fusión GFP se inmunoprecipitaron utilizando el sistema de perlas GFP-Trap® (Chromotek, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS

Expresión de Dp71, BRAF e iBRAF en la línea celular N1E-115

Para determinar las posibles interacciones de la distrofina Dp71 en el desarrollo y diferenciación neuronal se seleccionó la línea celular N1E-115, la cual es derivada de neuroblastoma de ratón. Esta línea ha sido usada como modelo celular neuronal ya que al inducirse la diferenciación con dimetilsulfóxido (DMSO), las células N1E-115 exhiben muchas de las propiedades de las neuronas del sistema nervioso central, incluida la formación de neuritas, la excitabilidad de la membrana y la liberación y unión de neurotransmisores (Morales-Lázaro, et al. 2010). Como primer paso corroboramos la expresión de la distrofina Dp71 en la línea celular N1E-115 no diferenciada y diferenciada, la cual había sido previamente reportada con un aumento tras la diferenciación (Morales-Lázaro, 2010). Adicionalmente, debido a que a la fecha no se ha demostrado la expresión de BRAF35 ni de iBRAF en la línea celular N1E-115, en este trabajo evaluamos su expresión a nivel proteico mediante Western Blot. Como se describió previamente, la regulación de la expresión de genes neuronales en la que interviene BRAF35 y el complejo asociado no solo ocurre en células neuronales, sino que también se observa en células no neuronales, como Hela. El análisis de Western Blot mostró las bandas esperadas de 71, 35 y 45 kDa, correspondientes a Dp71, BRAF35 e iBRAF respectivamente (Figura 7 A). Adicionalmente, se evaluaron los niveles de estas proteínas en las células N1E-115 llevadas a diferenciación, mostrando un aumento en los niveles de Dp71 y de iBRAF, y una disminución de BRAF35 (Figura 7 A y B). Este resultado demuestra que la línea celular N1E-115 expresa las proteínas de estudio, y que, como era esperado, tanto Dp71 como iBRAF aumentan en células diferenciadas a fenotipo neuronal, mientras que BRAF35 disminuye.

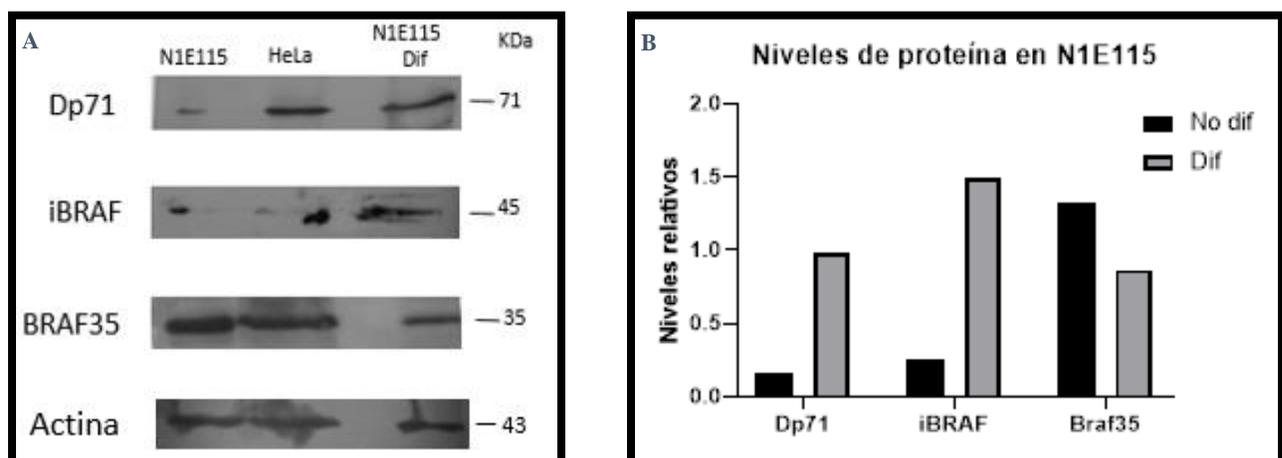
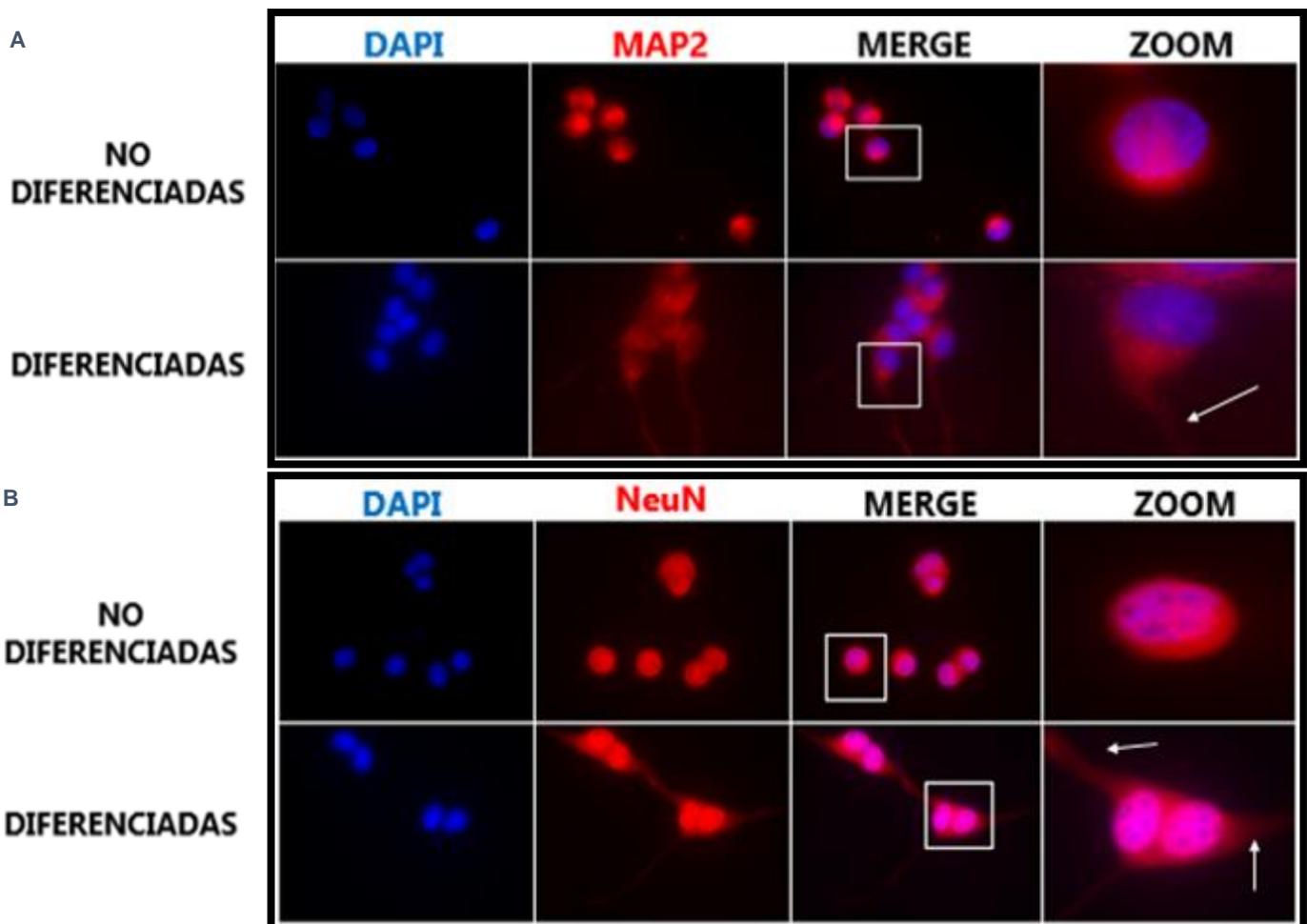


Figura 7. (A). Análisis por western blot de la expresión de las proteínas BRAF, (35 KDa), iBRAF, (45 KDa), y Dp71 (71 KDa) en las líneas celulares N1E-115, (neuroblastoma de ratón), e HeLa, como control positivo de expresión obtenido de extractos celulares totales. (B). Cuantificación de los niveles de estas proteínas usando Image J

Para verificar la diferenciación de las células N1E-115, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con las proteínas NeuN y MAP2. MAP2 es una proteína de 280 kDa, que está altamente concentrada en el soma neuronal y dendritas, y está asociada a microtúbulos. Por otro lado, NeuN es una proteína específica de la neurona, expresada por la mayoría de las neuronas en el sistema nervioso central y periférico; emerge durante la embriogénesis temprana en neuroblastos postmitóticos y permanece en neuronas diferenciadas terminalmente. La proteína NeuN se localiza en el núcleo y el citoplasma perinuclear en el sistema nervioso central de los mamíferos y se sabe que aumenta en células diferenciadas (Gusel'nikova, et al. 2015). Ambas proteínas han sido ampliamente usadas como marcadores de diferenciación, por lo que en este trabajo se emplearon para verificar la eficiencia del protocolo de diferenciación. Como se puede observar, MAP2, se encuentra en las prolongaciones neuríticas de las N1E-115 diferenciadas (Figura 8A) y NeuN aumenta su expresión tanto en núcleo como en citoplasma (Figura 8B). Además, las prolongaciones neuríticas son claramente visibles tanto en las imágenes de fluorescencia como en las imágenes de campo claro (Figura 8C).



C

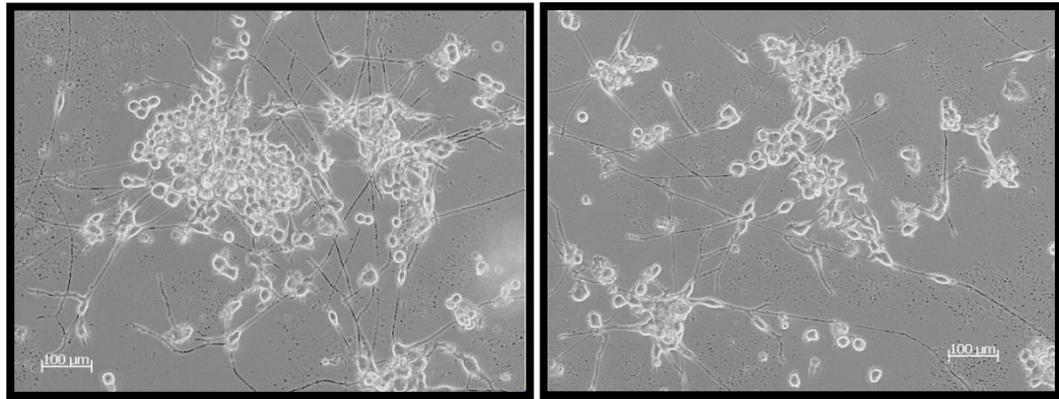


Figura 8. (A) y (B) Ensayos de inmunofluorescencia y microscopia de epifluorescencia de marcadores de diferenciación, Map2 (se observa principalmente en el soma y en dendritas) y NeuN (se observa primordialmente perinuclear). (C) Microscopia de campo de células N1E-115 diferenciadas

Localización subcelular y colocalización de la proteína Dp71 con BRAF35 e iBRAF

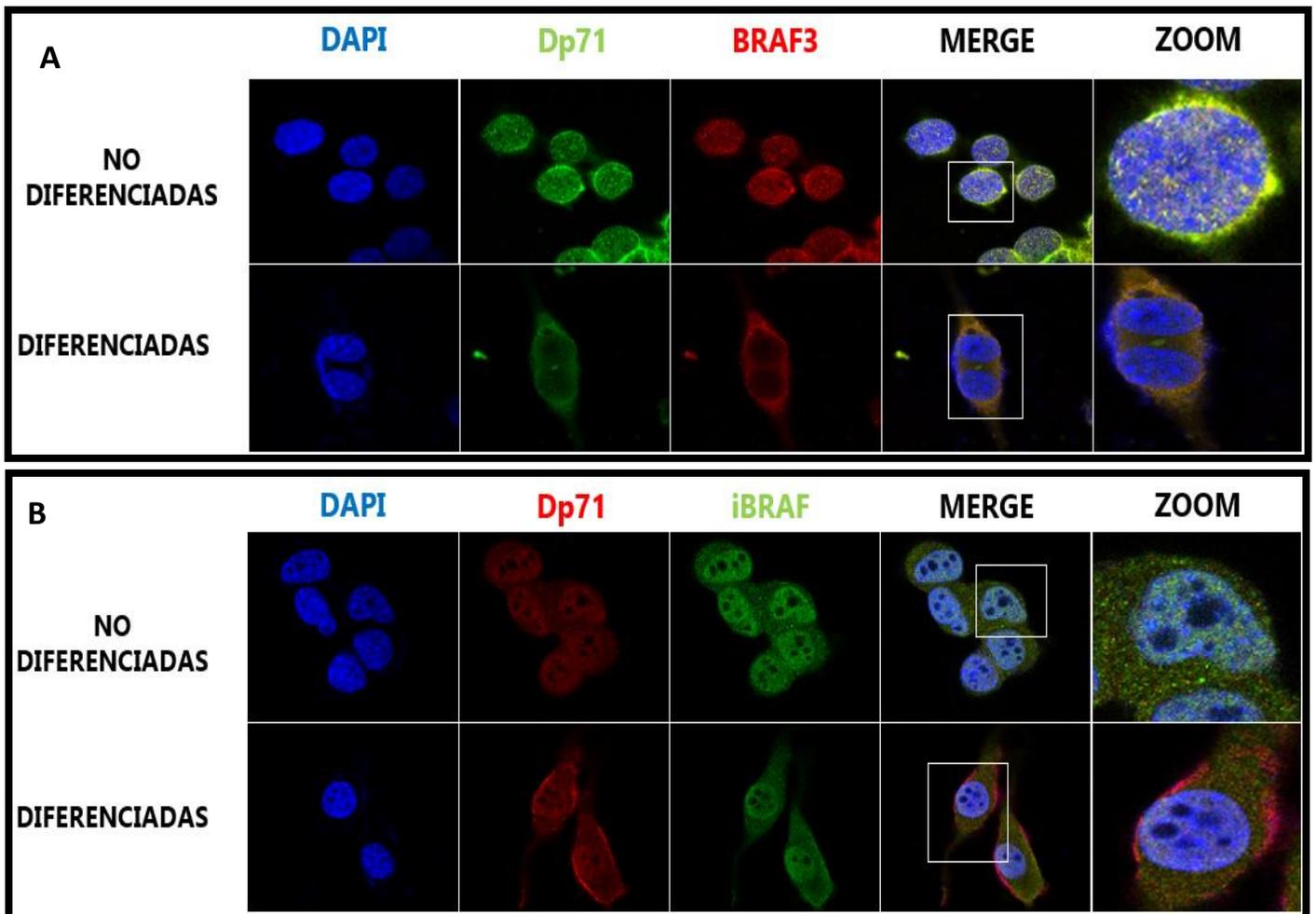
Previamente se había reportado la posible asociación de las proteínas BRAF35 e iBRAF con Dp71 usando proteínas purificadas en ensayos *in vitro* (Artegiani, 2010). Como un primer paso para evaluar la posibilidad de que estas interacciones ocurrieran *in vivo*, en este trabajo se realizaron ensayos de inmunofluorescencia doble acoplada a microscopia confocal, tanto en células diferenciadas como en células no diferenciadas para evaluar la colocalización de estas proteínas.

Primero se determinó la distribución de Dp71 y BRAF35 en células N1E-115 no diferenciadas, en las que se observa una distribución principalmente a nivel nuclear. También se observa su presencia a nivel citoplasmático, pero principalmente en la periferia nuclear. Al realizar la diferenciación de las células, se puede observar que la localización, antes predominantemente nuclear, en general se desplaza a una localización citoplasmática, tanto para BRAF35 como para la distrofina Dp71, localizándose además a lo largo de las extensiones neuríticas. Al observar la colocalización de estas dos proteínas, se observa que se sigue manteniendo un nivel alto de colocalización, pero este es más evidente en el compartimiento citoplasmático (Figura 9A).

El mismo ensayo fue realizado para la interacción Dp71-iBRAF, en el cual al analizar las células no diferenciadas bajo microscopía confocal se puede observar que ambas proteínas se encuentran localizadas en el núcleo. Posteriormente, al realizar la diferenciación celular se observa que Dp71 se relocaliza en buena medida hacia el compartimiento citoplasmático, mientras que iBRAF conserva principalmente su localización en el núcleo, pero también se observa un poco en citoplasma (Figura 9B).

Debido a que no se observó relocalización de iBRAF durante la diferenciación que apuntara a una influencia de Dp71 en su distribución, se evaluó si a pesar de esto, habría alguna diferencia en sus niveles de colocalización, que apuntaran a una posible relación durante el proceso de diferenciación. Para esto, se realizaron

análisis cuantitativos del grado de colocalización entre iBRAF y Dp71 en el núcleo de células N1E-115 no diferenciadas y diferenciadas. Se realizaron análisis de 1 Coeficiente de correlación y Tasa de superlapiamiento. El coeficiente de correlación de Pearson es un método que considera la presencia de ambos fluoróforos en píxeles individuales, lo que es nombrado como correlación. Por otro lado, el coeficiente de superposición de Mander, el cual examina la relación entre las intensidades y el superlapiamiento, y toma en cuenta las combinaciones que dan una alta intensidad de fluorescencia, descartando aquellas en las que una o ambas señales son bajas y finamente ignora las señales en blanco. Debido a que el coeficiente de Pearson solo mide la correlación media existente, y a que se ha observado que la presencia de un factor de fluorescencia adicional, como DAPI, puede alterar la correlación media, es importante excluir los píxeles de fondo mediante el coeficiente de superposición de Mander. Ambas medidas se utilizan para cuantificar el grado de colocalización entre fluoróforos (Adler, 2010). En nuestro análisis para la colocalización Dp71-iBRAF, la medición de las intensidades de fluorescencia y el respectivo superlapiamiento asociado a ellas, muestra que efectivamente hay una colocalización de estas proteínas, e interesantemente, esta disminuyó significativamente en las células diferenciadas (Figura 9C).



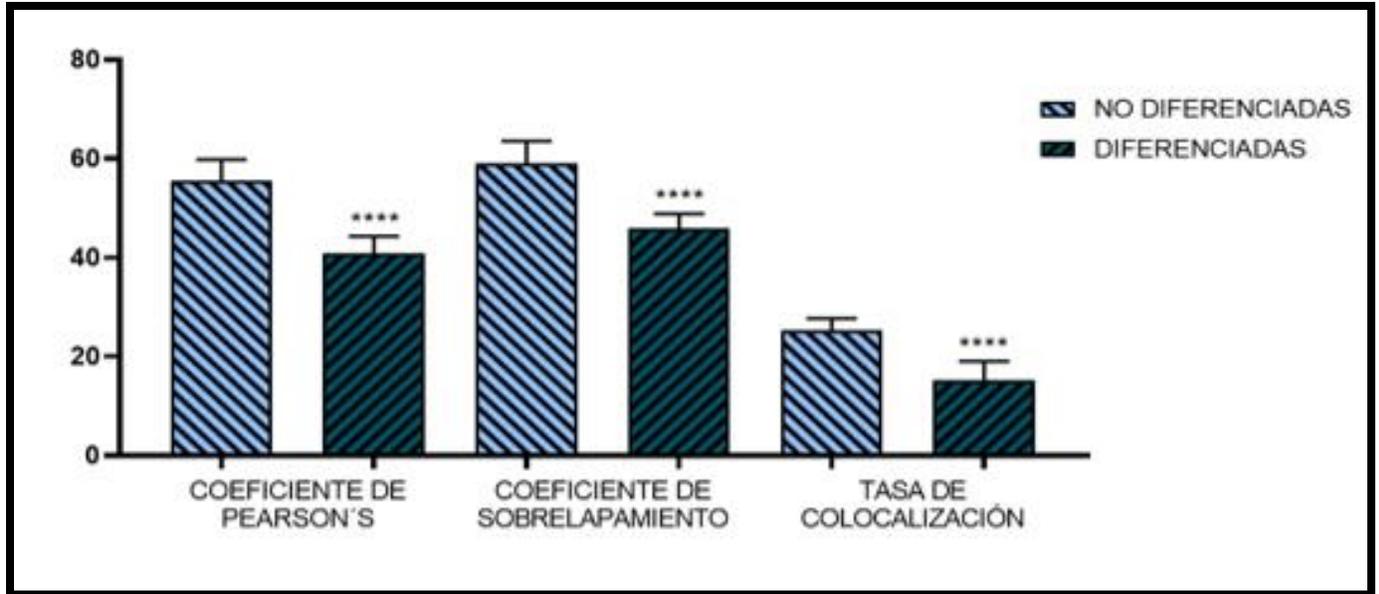


Figura 9. (A) Localización de las proteínas Dp71 y BRAF35 mediante microscopía confocal, 63X, se observa la presencia nuclear de ambas proteínas, al realizar el merge podemos confirmar una colocalización (panel superior); Misma que se mantiene, ahora en citoplasma, al someter a diferenciación (panel inferior). (B) Localización de las proteínas Dp71 e iBRAF en un inicio, previo a la diferenciación muestran un sobrelapamiento en núcleo (panel superior), mismo que disminuye al someter a diferenciación por un escape de Dp71 a citoplasma (panel inferior). (C) Gráfica que muestra los coeficientes de Pearson y sobrelapamiento, dichos coeficientes nos indican la probabilidad que dos proteínas se encuentren en un mismo compartimiento celular, se observa una disminución al realizar la diferenciación. Realizado para la interacción Dp71-iBRAF (n=10 células de 4 experimentos independientes. Significancia estadística $P < 0.05$)

Identificación de BRAF35 como proteína asociada a Dp71

Adicionalmente, para comprobar la interacción entre la distrofina Dp71 y BRAF35 se realizaron pruebas de interacción *in vivo*, usando por un lado ensayos de GFP-Trap con la sobreexpresión de la distrofina Dp71 fusionada a GFP, y por otro, para el ensayo cruzado, la inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para la proteína BRAF35.

Los experimentos de GFP-Trap se realizaron utilizando perlas de GFP-trap y lisados celulares totales preparados a partir de células N1E-115 confluentes. Las proteínas unidas a las perlas se eluyeron y se separaron por tamaño usando SDS-PAGE y se analizaron por western blot. Los resultados confirman que las proteínas Dp71 y BRAF35 están asociadas, ya que se observa una banda de unión específica en el GFP-Trap de la fusión con Dp71, pero no en el GFP-Trap usando GFP sola (Figura 10A).

Para complementar este resultado, se realizó el ensayo complementario por inmunoprecipitación. Para esto se realizó un lisado celular total a partir de células N1E-115, las proteínas se pusieron a interactuar con anticuerpo anti BRAF35 y con un anticuerpo irrelevante, como control negativo, siguiendo la metodología mencionada en materiales y métodos. Las proteínas unidas a las perlas se eluyeron, se separaron por tamaño usando SDS-PAGE y se analizaron por western blot.

Como se muestra en la figura 10B, Dp71 se une a BRAF35, y si bien existe una señal de interacción inespecífica con el anticuerpo de especificidad irrelevante, o control negativo, es mucho mayor cuando se usa el anticuerpo específico anti-BRAF35 (Fig. 10B).

Los resultados de los ensayos GFP-Trap e inmunoprecipitación, muestran que la interacción *in vitro* sugerida por Artegiani y cols (2010) entre Dp71 y BRAF35 ocurre también *in vivo*, lo que podría implicar un papel funcional importante de la proteína Dp71 sobre la regulación de las funciones de las proteínas BRAF35 e iBRAF.

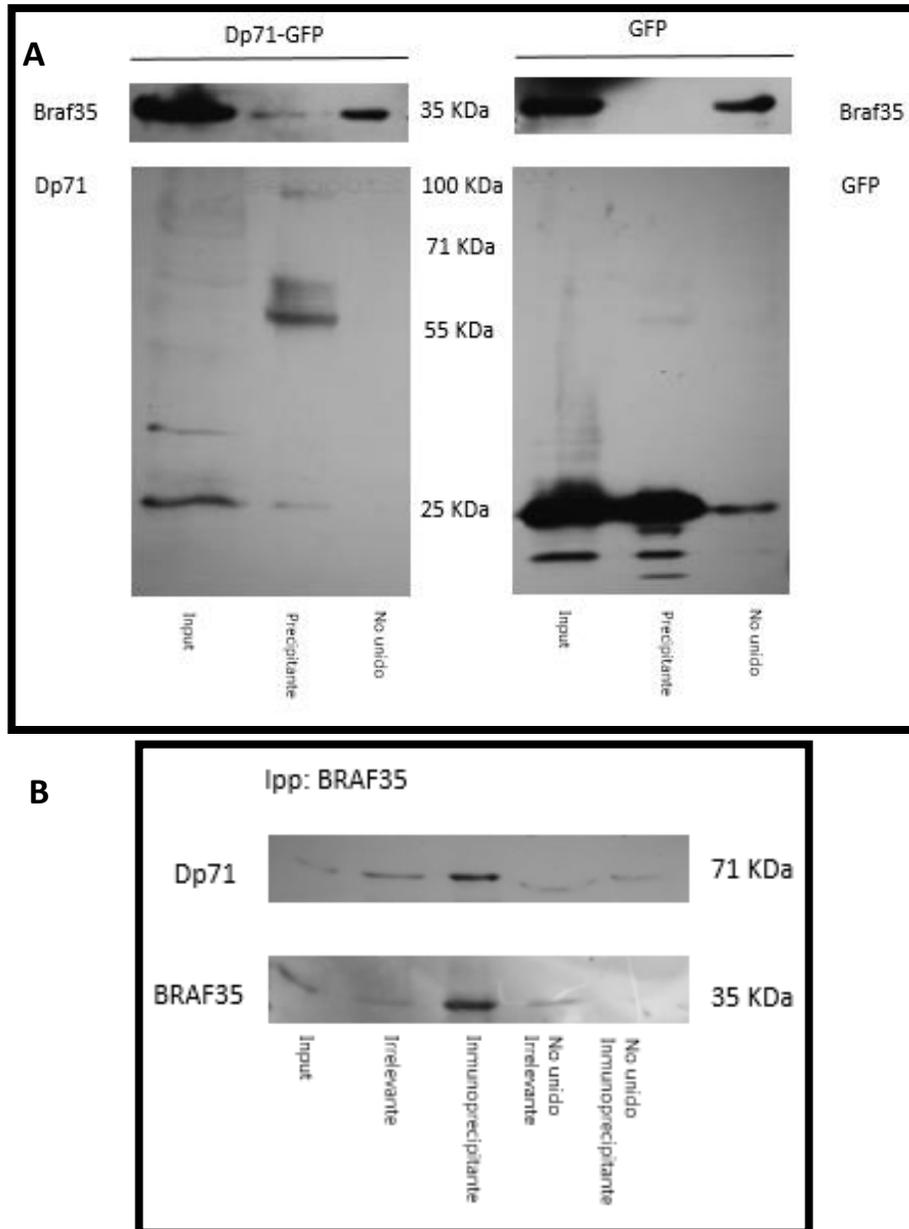


Figura 10. (A). Ensayo tipo GFP-trap usando la expresión de la proteína recombinante Dp71-GFP. Se puede observar la presencia de una banda específica de interacción en el precipitado de Dp71-GFP, misma banda que se encuentra ausente en el precipitado de GFP. Se observa la presencia de Dp71 fusionada a GFP (~98 kDa) y la proteína GFP sola (~27 kDa) (B) Ensayo de inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti-BRAF35. Se observa una banda correspondiente a Dp71 en el carril del inmunoprecipitado para BRAF35, la cual está casi ausente en el carril del anticuerpo irrelevante, lo que confirma la interacción de las dos proteínas.

Efecto de mutaciones en la distrofina Dp71 sobre la localización subcelular de iBRAF

Como primer paso a un acercamiento para verificar la importancia funcional de estas interacciones, particularmente Dp71-iBRAF, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y colocalización con dos mutantes de la distrofina Dp71, las cuales provocan una localización aberrante de esta distrofina. Dichas mutaciones se encuentran localizadas en los aminoácidos 272 y 299 de la Distrofina Dp71 y como se mencionó previamente, han sido reportadas en pacientes con DMD. La mutación 272, presenta un cambio de aminoácido en la posición 277, cisteína (C) por tirosina (Y), C272Y, que replica la mutación de un paciente que presentaba DMD, el cual mostró, por biopsia muscular, una disminución de la distrofina a solo el 20% en comparación a un individuo sano. La mutación 299, por otra parte, se presenta por la eliminación de un residuo de ácido glutámico en la posición 299, E299del, la cual fue reportada en un paciente que presentaba DMD y que tenía una disminución en la expresión de distrofina.

Las células N1E-115 fueron cultivadas y transfectadas con vectores previamente usados en nuestro grupo de trabajo, que expresan a la proteína Dp71 *wild type* y a las formas mutantes C272Y y E299del, fusionadas a GFP. Las células fueron posteriormente teñidas con el anticuerpo anti-iBRAF y analizadas por microscopía confocal (Figura 11). La sobreexpresión de GFP sola o de GFP-Dp71 no provocó alteraciones en las células N1E-115; la proteína GFP se localizó tanto en núcleo como en citoplasma, debido a que tiene un peso molecular de 27 kDa y no requiere transporte nuclear activo, mientras que, la fusión GFP-Dp71, si bien se observó más claramente en citoplasma, también presentó localización nuclear (Suarez-Sanchez, 2014). Por otra parte, las mutantes de Dp71 mostraron una clara deslocalización de la señal, formando agregados tanto en núcleo como en citoplasma. Adicionalmente, se observa también daño a la organización nuclear, ya que la tinción con DAPI muestra un desarreglo del ADN (Rugiero, Tesis de doctorado, en proceso).

En relación a la localización de iBRAF, en las células sin transfectar se puede observar su distribución normal concentrada en el núcleo, la cual es mantenida al sobreexpresar a la proteína GFP sola (control) y a la fusión GFP-Dp71. En los ensayos realizados con la mutante C272Y; sin embargo, se observa una total deslocalización de iBRAF, la cual disminuye en núcleo y se localiza hacia citoplasma. Por otro lado, en la mutante E299del, se observa una marcada disminución y desarreglo de iBRAF en el núcleo y también se deslocaliza hacia citoplasma (Figura 11A). Dichos resultados indican que la localización normal de Dp71 es necesaria para la correcta localización de iBRAF, por lo que la expresión de una forma mutante de Dp71 provoca la deslocalización de iBRAF, lo que podría afectar sus funciones.

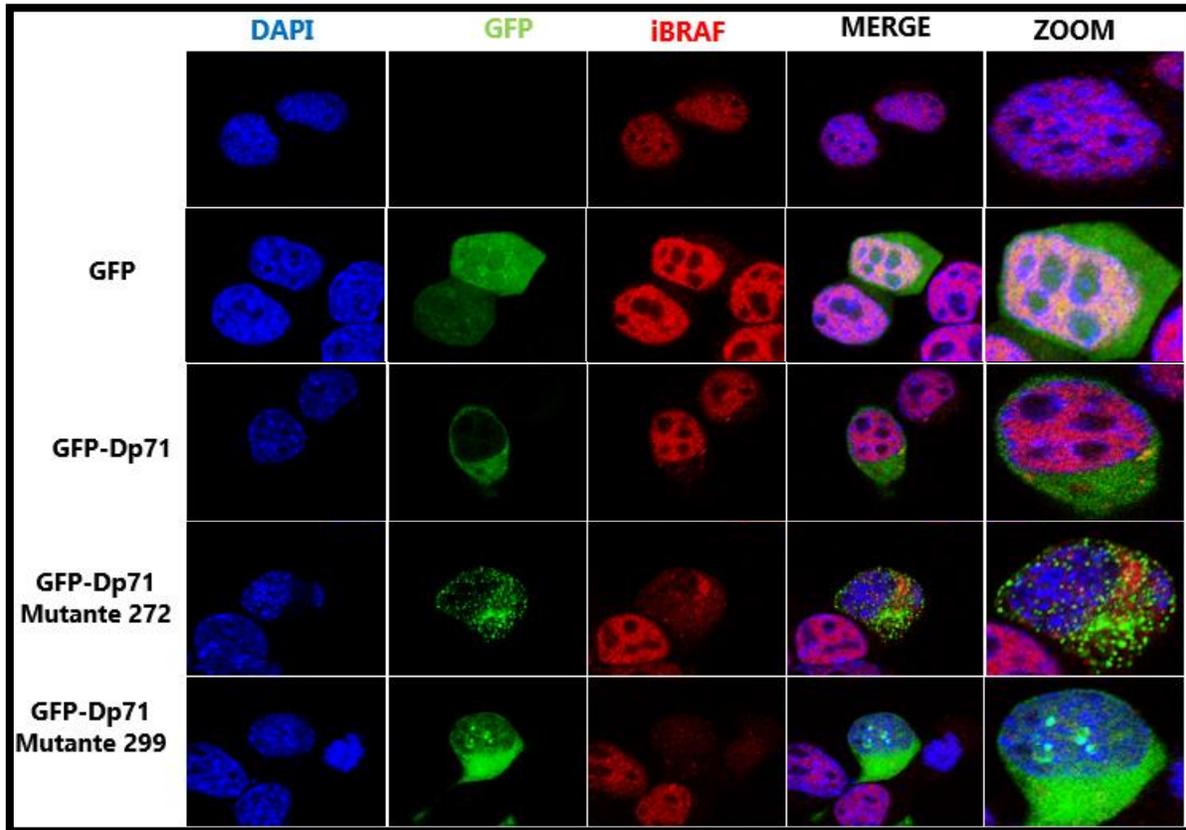


Figura 11. microscopía confocal de células N1E-115, células transfectadas con vectores que contiene una mutación en Dp71, se puede observar una desregulación en la localización de Dp71, además de esto se observa un daño en la organización nuclear y la deslocalización de la proteína iBRAF

Discusión

Previamente Villarreal-Silva y colaboradores (2011) han mostrado que la distrofina Dp71, principal producto del gen de la distrofina en sistema nervioso central, es esencial para el desarrollo y división celular, y que al inhibir la expresión de dicha proteína se ve afectada la diferenciación celular. Por otro lado, Artegiani y colaboradores (2010) han mostrado la interacción de la distrofina Dp71 con las proteínas BRAF35 e iBRAF, proteínas implicadas en los complejos represores/activadores de genes neurales específicos responsivos a RE-1, en un sistema de interacción con proteínas recombinantes. No obstante, los mecanismos moleculares implicados en dichos mecanismos no se encuentran aún claros y la interacción de Dp71 con BRAF35 e iBRAF no había sido demostrada *in vivo*.

Tomando en cuenta los trabajos antes realizados, nos enfocamos en mostrar las interacciones de la distrofina Dp71 con las proteínas BRAF35 e iBRAF, para poder conocer con mayor detalle el papel que juegan la Dp71 en la diferenciación neuronal, utilizando la línea celular N1E115 como modelo celular. Como primer paso, mostramos la expresión de Dp71, BRAF35 e iBRAF, y observamos un aumento en la expresión de la distrofina entre las células sometidas a 6 días de diferenciación con DMSO. Previamente, dicho aumento había sido demostrado para Dp71 por Morales-Lázaro y colaboradores (2010), quienes también demuestran un comportamiento similar al observado *in vivo* en sistema nervioso. Adicionalmente, mostramos la expresión de BRAF35 e iBRAF; la primera de ellas tuvo una ligera disminución en la línea celular diferenciada con respecto a la no diferenciada, lo que es consistente con su función, ya que esta es prioritaria en células no diferenciadas, pero no en las ya diferenciadas (Ceballos-Chávez, 2012). Para iBRAF, por su parte, se observa una expresión incrementada al inducirse la diferenciación, esto es congruente con lo mostrado por el grupo de trabajo de Ceballos-Chávez (2012), quien mostró un aumento en la expresión de iBRAF en diferenciación.

Mediante ensayos de inmunofluorescencia comprobamos la presencia de la distrofina Dp71, BRAF35 e iBRAF. Estos resultados, analizados mediante microscopia confocal, mostraron la colocalización a nivel nuclear de Dp71 con BRAF35. Al ser sometidas a diferenciación, esta colocalización se mantiene, pero ahora principalmente en el compartimento citoplasmático, en donde se ha mostrado que la proteína Dp71 puede tener una función como proteína de andamiaje importante para los procesos implicados en la diferenciación, como parte de las proteínas incluidas en la DAPC (Artegiani, 2010). La relocalización de BRAF35 a citoplasma podría estar favoreciendo la activación de genes neuronales específicos. Esto se debe a que, como se mencionó antes, BRAF35 forma parte del BHC que atrae HDAC promoviendo la desacetilación de histonas para silenciar la transcripción de genes neuronales (Lakowski, 2006; Hakimi, 2005); y al relocalizarse BRAF35 al compartimento citoplasmático en células diferenciadas, este mecanismo de silenciamiento se ve afectado, lo que contribuiría a iniciar la transcripción de dichos genes neuronales.

Por otro lado, en el análisis de inmunofluorescencia de la colocalización de la distrofina Dp71 con iBRAF se observó que en las células N1E115 no diferenciadas dicha interacción está establecida principalmente a nivel nuclear. Posterior a la

diferenciación, Dp71 se relocaliza a nivel de citoplasma principalmente, pero parte de esta proteína se mantiene en núcleo, sin embargo, iBRAF tras la diferenciación se mantiene principalmente a nivel nuclear, lo que es consistente con su función en células diferenciadas, ya que iBRAF es requerida en núcleo para impedir o inhibir la actividad de BRAF35 sobre genes neuronales (Wynder C. 2005). Tras realizar un análisis cuantitativo del índice de colocalización entre Dp71 e iBRAF, se observó que existe una colocalización tras la diferenciación, pero dicha colocalización es mayor previo a diferenciarse. Como antes se había mencionado iBRAF cumple un papel rompiendo la interacción de BRAF35 con el complejo BHC, además de esto atrae a MLL, metilando al ADN en sitios cercanos a promotores y promoviendo así la inducción de fenotipos neurales (Wynder, 2005). Lo anterior podría sugerir que, al relocalizarse a citoplasma, la proteína Dp71 libera a iBRAF, permitiendo que esta sustituya a BRAF35 y participe en la activación de los genes responsivos al complejo BHC.

Estos datos de localización subcelular tanto para BRAF35 como para iBRAF en el núcleo son consistentes con su función durante la diferenciación y la colocalización observada contribuye con la idea de que la interacción reportada previamente por Artegiani y cols (2010) puede también ocurrir *in vivo*. Adicionalmente, sugiere que, ante el proceso de diferenciación neuronal, al relocalizarse la Dp71 a citoplasma podría participar en la relocalización de BRAF35 a citoplasma, lo que en conjunto con la permanencia de iBRAF en el núcleo podría estar facilitando la liberación de los genes neuronales silenciados.

Para comprobar que la colocalización de Dp71 con BRAF35 deriva de una interacción proteica real, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación, que permitieron comprobar la interacción entre estas proteínas. Dichos resultados muestran que lo propuesto *in vitro* por Artegiani y colaboradores (2010) ocurre también *in vivo*. Esto a la vez permitiría pensar en la función de Dp71 como proteína de andamiaje, por lo que, además de atraer consigo a proteínas que forman parte del complejo DAPC, también podría atraer a BRAF35, lo que permitiría su participación en la regulación de genes implicados en la diferenciación neuronal. Sin embargo, es necesario realizar otros ensayos para demostrar el comportamiento de esta interacción en células diferenciadas, así como para evaluar la interacción de iBRAF con Dp71.

Para tener un enfoque más asociado a una posible afectación funcional realizamos transfección con mutantes de la distrofina Dp71 que cambian su patrón de localización normal. Se utilizaron dos vectores que contenían la información para codificar a una proteína Dp71 con mutaciones previamente reportadas en pacientes Duchenne, por un lado, C272Y y por otro E299del. En ambos casos, pudimos observar que existe una total deslocalización de iBRAF, además de que en nuestro laboratorio también se encontró daño a ADN observado en la tinción DAPI (Rugiero, tesis de doctorado). Esto lleva a pensar que una afectación en la localización normal de la Dp71 puede llegar a tener una implicación en la función de iBRAF y, en consecuencia, en el control de la transcripción de genes neuronales.

Es importante considerar que la mutante en la cual se observa la mayor deslocalización proteica, C272Y, se obtuvo a partir de un paciente que, además de presentar las características comunes asociadas a DMD, presentaba retraso mental (U. Lenk 2009). Si bien esto puede ser considerado un resultado preliminar, la evidencia previa muestra la implicación de estas proteínas en el correcto desarrollo neuronal, y el estudio de las mutantes de la distrofina Dp71 puede ser un nuevo panorama para comprender los mecanismos asociados a la afección cognitiva en DMD.

Conclusiones

Tomando en cuenta el conocimiento previo, se sabe que una de las funciones que cumple Dp71 es como proteína de andamiaje formando parte del DAPC; sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos también sugerir la unión de Dp71 a un complejo proteico involucrado en la regulación negativa de la expresión de genes neuronales que responden a RE1. Se observa que en las células que son llevadas a diferenciación existe un aumento en la expresión de la proteína iBRAF, y una disminución en la expresión de BRAF35, además, mediante ensayos de inmunofluorescencia se puede observar una relocalización de Dp71, así como de BRAF35 e iBRAF, manteniéndose esta última principalmente en el compartimento nuclear. Finalmente, la interacción comprobada con BRAF35 permitiría pensar en la participación de Dp71 en la regulación de genes implicados en diferenciación neuronal.

Perspectivas

Este trabajo es el comienzo del estudio de la interacción de Dp71 con las proteínas, BRAF35 e iBRAF, y deja en inicio un resultado positivo a seguir trabajando por esta línea, sin embargo, falta confirmar algunos aspectos de la misma, se deben realizar los ensayos de interacción Dp71-iBRAF mediante inmunoprecipitación, para poder confirmar la interacción que parecería viable por los resultados observados mediante inmunofluorescencia. Por otro lado, es necesario confirmar el papel de las mutantes de Dp71 en la localización de Braf35.

Bibliografía

Adler, J., & Parmryd, I. (2010). Quantifying colocalization by correlation: the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient. *Cytometry Part A*, 77(8), 733-742.

Artegiani, B., Labbaye, C., Sferra, A., Quaranta, M. T., Torreri, P., Macchia, G. & Macioce, P. (2010). The interaction with HMG20a/b proteins suggests a potential role for β -dystrobrevin in neuronal differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M109.

Ballas, N., & Mandel, G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Current opinion in neurobiology*, 15(5), 500-506.

Bessis, A., Champtiaux, N., Chatelin, L., & Changeux, J. P. (1997). The neuron-restrictive silencer element: a dual enhancer/silencer crucial for patterned expression of a nicotinic receptor gene in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(11), 5906-5911.

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.

Bruce, A. W., Donaldson, I. J., Wood, I. C., Yerbury, S. A., Sadowski, M. I., Chapman, M. & Buckley, N. J. (2004). Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28), 10458-10463.

Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D. J., Case, L. E., Clemens, P. R., Cripe, L., ... & Poysky, J. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *The Lancet Neurology*, 9(1), 77-93.

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*, 109(21), 8085-8090.

Chen, C., Ma, H., Zhang, F., Chen, L., Xing, X., Wang, S. & Luo, Y. (2014). Screening of Duchenne muscular dystrophy (DMD) mutations and investigating its mutational mechanism in Chinese patients. *PloS one*, 9(9), e108038.

Chen, Z. F., Paquette, A. J., & Anderson, D. J. (1998). NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nature genetics*, 20(2), 136.

Cotton, S., Voudouris, N. J., & Greenwood, K. M. (2001). Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Developmental medicine and child neurology*, 43(7), 497-501.

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, Cuisset JM, Kaplan JC, Héron D, Rivier F, Chelly J. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 15;18(20):3779-94.)

Daoud, F., Candelario-Martínez, A., Billard, J. M., Avital, A., Khelfaoui, M., Rozenvald, Y. & Chelly, J. (2009). Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PloS one*, 4(8), e6574.

David, Y., & Uri, N. (2013). Dp71 The most abundant non-muscle product of the Dystrophin gene.

Di Lazzaro, V., Restuccia, D., Servidei, S., Nardone, R., Oliviero, A., Profice, P., Mangiola, F., Tonali, P., Rothwell, J.C., 1998. Functional involvement of cerebral cortex in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21, 662–664.

Doorenweerd, N., Mahfouz, A., van Putten, M., Kaliyaperumal, R., t'Hoen, P. A., Hendriksen, J. G., ... & Kan, H. E. (2017). Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific reports*, 7(1), 12575.

Emery, A. E. (2002). Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscular Disorders*, 12(4), 343-349.

Gao, Q. Q., & McNally, E. M. (2015). The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Comprehensive Physiology*, 5(3), 1223–1239. doi:10.1002/cphy.c140048

García-Cruz, C., Merino-Jiménez, C., Ceja, V., Aragón, J., Siqueiros-Márquez, L., Reyes-Grajeda, J. P., & Montañez, C. (2019). The dystrophin isoform Dp71e Δ 71 is involved in neurite outgrowth and neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of proteomics*, 191, 80-87.

Goldberg, L. R., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Fidzianska, A., Duggan, D. J., Steinberg, L. S., & Hoffman, E. P. (1998). A dystrophin missense mutation showing persistence of dystrophin and dystrophin-associated proteins yet a severe phenotype. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 44(6), 971-976.

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.

Grimes, J. A., Nielsen, S. J., Battaglioli, E., Miska, E. A., Speh, J. C., Berry, D. L., ... & Kouzarides, T. (2000). The co-repressor mSin3A is a functional component of the REST-CoREST repressor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9461-9467.

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*, 99(11), 7420-7425.

Hinton VJ, De Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y (2000) Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology* 54: 2127–2132.

Hinton VJ, Fee RJ, Goldstein EM, De Vivo DC (2007) Verbal and memory skills in males with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 49: 123–128.

Juan-Mateu et al., *PLoS One* 10, e0135189 (2015); K. Becker et al., *Hum Mutat* 21, 651 Jun, 2003).

Kim BJ, Kang KM, Jung SY, Choi HK, Seo JH, Chae JH, Cho EJ, Youn HD, Qin J, Kim ST. Esco2 is a novel corepressor that associates with various chromatin modifying enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 25;372(2):298-304),

Lakowski, B., Roelens, I., & Jacob, S. (2006). CoREST-like complexes regulate chromatin modification and neuronal gene expression. *Journal of Molecular Neuroscience*, 29(3), 227-

Lee, J.S., Pfund, Z., Juhasz, C., Behen, M.E., Muzik, O., Chugani, D.C., Nigro, M.A., Chugani, H.T., 2002. Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study. *Muscle Nerve* 26, 506–512

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.

Lv, S.Y., Zou, Q.H., Cui, J.L., Zhao, N., Hu, J., Long, X.Y., Sun, Y.C., He, J., Zhu, C.Z., He, Y., Zang, Y.F., 2011. Decreased gray matter concentration and local

synchronization of spontaneous activity in the motor cortex in Duchenne muscular dystrophy. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 32, 2196–2200

Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velazquez, F., Depardon, F., & Mustre, M. (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience*, 118(4), 957-966.

Moizard, M. P., Toutain, A., Fournier, D., Berret, F., Raynaud, M., Billard, C. & Moraine, C. (2000). Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical evidence for Dp71 isoform point mutations screening. *European Journal of Human Genetics*, 8(7), 552.

Moraine Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *Am J Med Genet.* 1998 Oct 30;80(1):32-41

Morales-Lázaro, S. L., González-Ramírez, R., Gómez, P., Tapia-Ramírez, V., De León, M. B., & Cisneros, B. (2010). Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: opposite roles of Sp1 and AP2 α in Dp71 promoter activity. *Journal of neurochemistry*, 112(2), 474-485.

Nowak, K. J., & Davies, K. E. (2004). Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment: Third in Molecular Medicine Review Series. *EMBO reports*, 5(9), 872-876.

Pereboev, A. V., Ahmed, N., thi Man, N., & Morris, G. E. (2001). Epitopes in the interacting regions of β -dystroglycan (PPxY motif) and dystrophin (WW domain). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1527(1-2), 54-60.

Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., & Nudel, U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Human molecular genetics*, 8(1), 1-10.

Snow, W. M., Anderson, J. E., & Jakobson, L. S. (2013). Neuropsychological and neurobehavioral functioning in Duchenne muscular dystrophy: a review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(5), 743-752.

Suárez-Sánchez, R., & Cisneros, B. (2016). Dystrophin Dp71, a novel tumor suppressor? *Journal of Xiangya Medicine*, 1(1).

Sumoy, L., Carim, L., Escarceller, M., Nadal, M., Gratacos, M., Pujana, M. A. & Peral, B. (2000). HMG20A and HMG20B map to human chromosomes 15q24 and 19p13.3 and constitute a distinct class of HMG-box genes with ubiquitous expression. *Cytogenetic and Genome Research*, 88(1-2), 62-67.

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.

Taylor, P. J., Betts, G. A., Maroulis, S., Gilissen, C., Pedersen, R. L., Mowat, D. R., ... Buckley, M. F. (2010)

(U. Lenk et al., *Hum Mol Genet* 5, 973 (Jul, 1996); 65. K. M. Flanigan et al., *Hum Mutat* 30, 1657 (Dec, 2009)).

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.

Wynder, C., Hakimi, M. A., Epstein, J. A., Shilatifard, A., & Shiekhattar, R. (2005). Recruitment of MLL by HMG-domain protein iBRAF promotes neural differentiation. *Nature cell biology*, 7(11), 1113.

