

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA PROTEÍNA ANKK1 EN LA FIBRA  
MUSCULAR: IMPLICACIONES EN DISTROFIAS  
MUSCULARES**

**ESTRELLA RUBIO SOLSONA**

**Febrero de 2018**

**Dirigida por:  
Dr. Janet Hoenicka  
Dr. Francesc Palau**



## RESUMEN

En la presente Tesis Doctoral se muestra el estudio de la proteína Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1) en el linaje miogénico durante el desarrollo y en la edad adulta.

El gen *ANKK1* ha sido ampliamente relacionado con trastornos neuropsiquiátricos y endofenotipos dopaminérgicos en el cerebro. Sin embargo, la función de su proteína es todavía desconocida. La localización del gen *ANKK1* en un clúster genómico conservado a lo largo de la evolución que podría estar implicado en neurogénesis, y la expresión de su proteína en progenitores neurales y su relación con el ciclo celular, han relacionado este gen con el neurodesarrollo. ANKK1 pertenece a la familia Receptor-Interacting Proteins (RIP), cuyos miembros participan en la diferenciación de diversos tejidos, incluyendo el muscular. La observación de ANKK1 en miotúbulos embrionarios murinos nos llevó a plantearnos la hipótesis de la posible participación de esta proteína en el origen, el desarrollo y la regeneración muscular.

Nuestros resultados muestran que ANKK1 es una proteína que participa en la biología muscular. Se localiza en precursores miogénicos durante el desarrollo embrionario murino y en las células satélite del músculo adulto. Además, los estudios *in vitro* utilizando mioblastos murinos y humanos muestran un patrón específico de la dinámica de sus isoformas: las isoformas ANKK1 quinasa (ANKK1-k) y ANKK1 completa (ANKK1-fl) se expresan en mioblastos y células satélite (SCs) quiescentes, mientras que sólo ANKK1-fl está presente en miotúbulos y SCs activadas. El transporte núcleo-citoplasmático de ANKK1 en mioblastos durante la diferenciación temprana se bloquea mediante la adición de leptomicina B, lo que indica que su salida del núcleo está mediada por exportinas.

En el músculo adulto ANKK1 se expresa en las fibras de contracción rápida tipo II de metabolismo glicolítico. La activación de la vía glicolítica en mioblastos murinos incrementa la expresión de *Ankk1*. Todo ello confirma la relación entre la expresión de ANKK1 y el metabolismo glicolítico y explica la localización específica de la proteína en fibras musculares de contracción rápida. También se ha investigado la localización de ANKK1 en músculos de pacientes con diferentes distrofias musculares. Los mioblastos de pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) presentan una expresión alterada de ANKK1. La disminución de ANKK1 nuclear en estos mioblastos se asocia con un estadio celular más indiferenciado, definido por el incremento de expresión de PAX7. Paralelamente, en biopsias procedentes de pacientes con diferentes distrofias musculares, la expresión de ANKK1 se asocia con poblaciones celulares regenerativas, es decir, SCs y fibras regenerativas. En cuanto al estudio de su función, se ha investigado la participación de ANKK1 en el ciclo celular. La sobreexpresión de las variantes polimórficas de ANKK1 (A1-A2) en células HeLa incrementa la velocidad de progresión del ciclo celular, mientras que la sobreexpresión de la isoforma catalíticamente inactiva (K51R) la disminuye. En todos los casos, el porcentaje de células que alcanza la mitosis está reducido. Todo esto indica que la expresión de ANKK1 afecta tanto a la progresión del ciclo celular como al número de células que completan el ciclo.

Finalmente, hemos estudiado la actividad quinasa de ANKK1. En las condiciones estudiadas, no se ha detectado esta actividad *in vitro*. Sin embargo, dado que es una RIP quinasa y su dominio quinasa es homólogo al resto de los miembros de la familia RIP, no podemos descartar que ANKK1 presente dicha actividad.

En resumen, esta Tesis Doctoral muestra por primera vez la participación de la proteína ANKK1 en la biología muscular desde el desarrollo embrionario hasta el músculo del adulto. Sin duda, ANKK1 es una proteína candidata a ser estudiada como biomarcador de enfermedad muscular.

**Palabras clave:** ANKK1, células satélite, mioblastos, miotúbulos, miogénesis, fibras de contracción rápida, regeneración muscular, biomarcador.

## ABSTRACT

The present Doctoral Thesis shows the study of the Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1) protein in the myogenic lineage during development and in adulthood.

The *ANKK1* gene has been widely related to neuropsychiatric disorders and dopaminergic endophenotypes in the brain. However, the function of its protein is still unknown. The location of *ANKK1* gene in a genomic cluster conserved throughout the evolution may be involved in neurogenesis, and the expression of its protein in neural progenitors and its relationship with the cell cycle, have linked *ANKK1* gene to neurodevelopment. ANKK1 belongs to the Receptor-Interacting Proteins family (RIP), whose members participate in the differentiation of several tissues, including muscle tissue. The finding of the location of ANKK1 in murine embryonic myotubes led us to consider the hypothesis of the possible participation of this protein in muscles origin, development and regeneration.

Our results show that ANKK1 is a protein that participates in muscle biology. It is located in myogenic precursors during murine embryonic development and in adult muscle satellite cells. In addition, *in vitro* studies using murine and human myoblasts show a specific pattern of the dynamics of its isoforms: the isoforms ANKK1 kinase (ANKK1-k) and ANKK1 full-length (ANKK1-fl) are expressed in myoblasts and quiescent satellite cells (SCs), whereas only ANKK1-fl is present in myotubes and activated SCs. The nuclear-cytoplasmic shuttle of ANKK1 in myoblasts during early differentiation is blocked by the addition of leptomycin B, which indicates that its exit from the nucleus is mediated by exportins.

In the adult muscle ANKK1 is expressed in the Fast-Twitch muscle fibers type II with glycolytic metabolism. The activation of the glycolytic pathway in murine myoblasts increases *Ankk1* expression. All this confirms the relationship between the expression of ANKK1 and the glycolytic metabolism and explains the specific location of the protein in Fast-twitch muscle fibers. The location of ANKK1 in the muscles of patients with different muscular dystrophies has also been investigated. The myoblasts of patients with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) present an altered expression of ANKK1. The decrease in nuclear ANKK1 in these myoblasts is associated with a more undifferentiated cell stage, defined by the increase in the expression of PAX7. In parallel, in biopsies from patients with different muscular dystrophies, the expression of ANKK1 is associated with regenerative cell populations, that is to say, SCs and regenerating fibers. Regarding the study of its function, we have investigated the participation of ANKK1 in the cell cycle. The overexpression of the polymorphic variants of ANKK1 (A1-A2) in HeLa cells increases the rate of progression of the cell cycle, while overexpression of the catalytically inactive isoform (K51R) decreases it. In all cases, the percentage of cells that reach mitosis is reduced. All this indicates that the expression of ANKK1 affects both the progression of the cell cycle and the number of cells that complete the cycle.

Finally, we have studied the kinase activity of ANKK1. Under the conditions studied, this activity has not been detected *in vitro*. However, given that it is a RIP kinase and its kinase domain is homologous to the rest of the members of the RIP family, we cannot rule out that ANKK1 does not present this activity.

In summary, this Doctoral Thesis shows for the first time the participation of the ANKK1 protein in muscle biology from embryonic development to adult muscle. Thus, we propose ANKK1 as a candidate protein to be studied as a biomarker of muscular disease.

**Keywords:** ANKK1, satellite cells, myoblasts, myotubes, myogenesis, Fast twitch fibers, muscle regeneration, biomarker.

## RESUM

En la present tesi doctoral es mostra l'estudi de la proteïna Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1) en el llinatge miogènic durant el desenvolupament i en l'edat adulta.

El gen ANKK1 ha estat àmpliament relacionat amb trastorns neuropsiquiàtrics i endofenotips dopaminèrgics en el cervell. No obstant això, la funció de la seua proteïna és encara desconeguda. La localització del gen ANKK1 en un clúster genòmic conservat al llarg de l'evolució que podria estar implicat en neurogènesi, i l'expressió de la seua proteïna en progenitors neurals i la seua relació amb el cycle cel·lular, han relacionat aquest gen amb el neurodesenvolupament. ANKK1 pertany a la família Receptor-interacting Proteins (RIP), els membres de la qual participen en la diferenciació de diversos teixits incloent el muscular. L'observació d'ANKK1 en miotúbuls embrionaris murins ens va portar a plantejar-nos la hipòtesi de la possible participació d'aquesta proteïna en l'origen, el desenvolupament i la regeneració muscular.

Els nostres resultats mostren que ANKK1 és una proteïna que participa en la biologia muscular. Es localitza en precursors miogènics durant el desenvolupament embrionari murí i en les cèl·lules satèl·lit del múscul adult. A més, els estudis *in vitro* utilitzant mioblasts murins i humans mostren un patró específic de la dinàmica de les seues isoformes: les isoformes ANKK1 quinasa (ANKK1-k) i ANKK1 completa (ANKK1-fl) s'expressen en mioblasts i cèl·lules satèl·lit (SCs) quiescents, mentre que només ANKK1-fl està present en miotúbuls i SCs activades. El transport nucli-citoplasmàtic d'ANKK1 a mioblasts durant la diferenciació primerenca es bloqueja mitjançant l'addició de leptomicina B, el que indica que la seua eixida del nucli està mediada per exportines.

En el múscul adult ANKK1 s'expressa en les fibres de contracció ràpida tipus II de metabolisme glicolític. L'activació de la via glicolítica en mioblasts murins incrementa l'expressió d'*Ankk1*. Tot això confirma la relació entre l'expressió d'ANKK1 i el metabolisme glicolític i explica la localització específica de la proteïna en fibres musculars de contracció ràpida. També s'ha investigat la localització d'ANKK1 en músculs de pacients amb diferents distròfies musculars. Els mioblasts de pacients amb distròfia muscular de Duchenne (DMD) presenten una expressió alterada d'ANKK1. La disminució d'ANKK1 nuclear en aquests mioblasts s'associa amb un estadi cel·lular més indiferenciat, definit per l'increment d'expressió de PAX7. Paral·lelament, en biòpsies procedents de pacients amb diferents distròfies musculars, l'expressió d'ANKK1 s'associa amb poblacions cel·lulars regeneratives, és a dir, SCs i fibres regeneratives. En quant a l'estudi de la seua funció, s'ha investigat la participació d'ANKK1 en el cycle cel·lular. La sobreexpressió de les variants polimòrfiques d'ANKK1 (A1-A2) en cèl·lules HeLa incrementa la velocitat de progressió del cycle cel·lular, mentre que la sobreexpressió de la isoforma catalíticament inactiva (K51R) la disminueix. En tots els casos, el percentatge de cèl·lules que arriba a la mitosi està reduït. Tot això indica que l'expressió d'ANKK1 afecta tant la progressió del cycle cel·lular com al nombre de cèl·lules que completen el cycle.

Finalment, hem estudiat l'activitat quinasa d'ANKK1. En les condicions estudiades, no s'ha detectat aquesta activitat *in vitro*. No obstant això, atès que és una RIP quinasa i el seu domini quinasa és homòleg a la resta dels membres de la família RIP, no podem descartar que ANKK1 presente aquesta activitat.

En resum, aquesta tesi doctoral mostra per primera vegada la participació de la proteïna ANKK1 en la biologia muscular des del desenvolupament embrionari fins al múscul de l'adult. Sens dubte, ANKK1 és una proteïna candidata a ser estudiada com a biomarcador de malaltia muscular.

**Paraules clau:** ANKK1, cèl·lules satèl·lit, mioblasts, miotúbuls, miogènesi, fibres de contracció ràpida, regeneració muscular, biomarcador.

## AGRADECIMIENTOS

Como sabrá cualquier persona que haya hecho la tesis, o por lo menos a mí me ha pasado, el momento de escribir los agradecimientos es algo en lo que piensas casi desde el principio, y también piensas que nunca va a llegar. Y sin embargo aquí estoy, sin saber cómo ni por dónde empezar ni si un par de hojas serán suficientes para que la gente a la que estoy agradecida se convenza de que sin ellos, esto no habría sido posible.

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Fundación Isabel Gemio, por la financiación recibida para el desarrollo de esta Tesis doctoral en el marco del proyecto de investigación "**Proyecto de Investigación Terapéutica en Distrofia Muscular de Duchenne**".

Gracias a mis directores de tesis. Gracias a Paco y en especial a Janet por brindarme la oportunidad de trabajar en su equipo, un grupo multidisciplinar con gente de diez no solo en lo profesional, sino también en lo personal. Gracias por permitirme realizar la tesis con vosotros, en un proyecto tan nuevo y diferente a las líneas habituales del laboratorio, pero que ha acabado convirtiéndose en apasionante para mí y todo un reto profesional. Gracias por haber sido tan exigentes, porque el esfuerzo finalmente siempre vale la pena.

Gracias a Juan Vílchez, del Servicio de Neurología de la Fe, por su implicación en este proyecto tan bonito y también a Clara, con la que he empecé colaborando y terminamos siendo buenas amigas.

A lo largo de la tesis he pasado por muchos laboratorios en los que he ido conociendo a distintas personas, todas ellas aportando algo especial y logrando que esta etapa, de por sí tan dura, haya sido al mismo tiempo una etapa inolvidable. Gracias a mis tres primeras amigas del IBV, Manoli, Fátima y Diana, que me acogieron como una más desde el primer momento. Gracias por los momentos tanto en el lab como fuera de él, por los vermouths de los viernes (los viernes sin vosotras ya no son lo mismo), por vuestro apoyo y por creer siempre en mí. Gracias también a Luci, que no era del lab pero como si lo fuera, por ser tan auténtica; gracias a Belén que tanto nos ha enseñado a todos; a Arantxa, siempre tan agradable y dispuesta a ayudar; a David, que amenizaba las horas largas de laboratorio con canciones variopintas; a Ana, mi vecina de bancada, por nuestras múltiples conversaciones; a Edu, qué paciencia has tenido siempre, llegarás dónde quieras; a Lola, bellísima persona y excelente profesional; a Paula, siempre de buen humor, fuerte donde las haya; a Azahara, por nuestras horas de gimnasio liberando tensión y nuestras discusiones sobre el color del borde de las fotos; a Laura, por tener siempre una sonrisa para todos, sin maldad ninguna, ha sido muy bonito conocerte; a Pili, porque siempre te has portado genial conmigo y porque eres auténtica; a Vini, italiano de pies a cabeza, y Carmina, siempre tan sincera y al mismo tiempo tan simpática; a Ibo, por lo buena gente que es; a Amalia y Rodri, preciosa pareja y auténticos luchadores. Ese pequeño laboratorio del IBV hizo que todos fuéramos una piña.

El salto del IBV al CIPF supuso un gran cambio para todos nosotros, cambio que no habría sido ni la mitad de fácil si no hubieran estado allí esperándome Víctor y María con los brazos abiertos. Gracias a los dos por esos almuerzos y comidas y por tantas risas y buenos momentos; gracias Víctor por ser tan auténtico y tan top, y gracias María porque me llevo contigo una amiga para toda la vida. Gracias a Anapi, nuestras mañanitas al CIPF y lo auténtica que eres. Poco a poco el lab se fue repoblando, gracias a Estelita, eterno equipo I55, por hacer equipo conmigo y todo el apoyo que me has dado; a Paula por lo loca que está y los momentos graciosos que siempre aporta; a mis sub-becarias Arantxa y Helena, por su ayuda y su aprecio; a Irene, por dar siempre un tono irónico a las cosas; a Fátima-bebé por sus locuras de “mucho ruido y pocas nueces”; a todos aquellos que han pasado por el laboratorio temporalmente, que no me atrevo ni a nombrar por no dejarme a nadie, pero que han hecho que fuera un lugar por el que valía la pena levantarse por las mañanas. Por mucho que el grupo de hace tres años ya no tiene nada que ver con lo que es hoy, creo que toda esta gente, estemos donde estemos, de alguna manera siempre seremos “Los Raros”.

Se ve que echaba de menos el IBV porque tiempo después regresé. Allí ya había pasado unos cuantos años, ya que también hice mi trabajo fin de carrera allí con Domingo Baretino, que en paz descanse y al que también le debo mucho. Pero esta vez volví al laboratorio de Pascual donde todos me acogieron genial y me sentía como en casa; gracias a Pascual, por darme la oportunidad de hacer los ensayos quinasa que tantos quebraderos de cabeza nos han dado, y por ser siempre tan agradable y cercano; gracias a Carlos, por ser mi semi-jefe y por las eternas risas con él; gracias a Ada, porque lo tiene todo: graciosa, inteligente, buena persona, amiga; a Carmen, echo de menos nuestras tertulias cuando ya la noche se nos echaba encima; a Carla, Miguel, Rosa, Pablo, Eva, Ana, de verdad, las horas en vuestro laboratorio se pasaban como segundos.

Mi última etapa de la tesis se desarrolló en paralelo a mi incorporación en el Biobanco del CIBERER y posteriormente en el equipo de Orphanet, donde he aprendido una visión distinta de la investigación pura y dura y de las enfermedades raras, etapa de la que me llevo mucho aprendido, muy buenas experiencias y buenos compañeros. Gracias a Virginia, por darme la oportunidad de trabajar contigo, por tu apoyo y por las facilidades que siempre me has puesto; a Salva, al que le debo un porcentaje altísimo de la tesis, primero porque me ha ayudado un montón a nivel experimental, pero sobre todo a nivel personal y de apoyo moral. Sin ti esto no habría sido posible. Gracias por creer siempre en mí y por valorarme. Gracias a los compañeros de Orphanet, CIBER y FISABIO por todos los buenos ratos.

Gracias a mis amigas de Teruel, María, Noe, Cris y Clara; no creo que encuentre nunca mejores amigas que vosotras; gracias por hacerme ser como soy hoy, por apoyarme y creer tanto en mí y por formar parte de mi vida desde tiempos inmemoriales. Con vuestro apoyo habéis aportado un granito de arena a esta tesis. Gracias a María, Ire-peque, Ire-del, Leles, Andrea, porque hemos pasado muchos buenos momentos juntas y lo importante es que los seguimos pasando. Gracias a mis amigas de Mosqueruela, que son verdaderas amigas y siempre han dado

pequeños respiros a esta etapa, siempre dispuestas a reír y pasarlo bien. Gracias a Toni y Raquel, porque a pesar de que los astros se tienen que alinear para que cuadremos una fecha, siempre han hecho lo posible por verme; gracias a la gente de Alquerías, en poco tiempo se han convertido en verdaderos amigos. Gracias a mis eternos compis de piso, Estefi, más buena no se puede ser; Rosa, cuántas risas y conversaciones; Alex, siempre con sus frutitas y pescaditos. Gracias a mis amigos de la carrera, que aunque nos veamos poco porque cada uno está en un punto del mapa, hemos compartido y seguimos compartiendo muchas experiencias: Batir, única, es imposible no quererte; María, pequeña y grande a la vez; Charlie, te mereces el cielo con nosotras; Alba, siempre alegre; y Sara, genial amiga.

Qué decirle a mi familia que no sepa. Sin vosotros...nada. No me puedo imaginar nada sin vosotros. Gracias a mis tíos, primos, abuelos por siempre interesarse por mí o por mi trabajo. Gracias a mi hermana Lucía, que más bien es mi gemela, porque aunque tuviera mil hermanos, no podría querer a ninguno más que a ti, y a Rober, por tu paciencia con nuestras tonterías y por cuidar tanto de mi hermana; a Vega, cualquier momento duro de la Tesis se desvanecía cuando tus papis me enviaban una foto de tu primer diente o de tu primer gateo; también a la personita que está por venir, cada día menos de cuenta atrás la ilusión es mayor; a mis padres, porque siempre me han apoyado en todo, aunque suene a tópico, la vida ha sido enormemente fácil con ellos y no puedo imaginar unos padres mejores, siempre haciéndome sentir tan valiosa. Gracias al amor de mi vida, Vicente, que apareció al poco de haber empezado la tesis y también ha sido imprescindible para que pueda terminarla. Gracias por hacerme tan sumamente feliz y hacer que los problemas no sean problemas si estás a mi lado. Gracias por este precioso año que nos espera y por todos los demás.

Parece que esto ha llegado a su fin. Aunque sea yo hoy la que presento la tesis, la presento en nombre de toda la gente a la que he nombrado, porque esto ha sido un trabajo en equipo, y esto sólo ha sido el inicio de lo que voy a ser a partir de ahora. Gracias por convertirme en lo que soy. De verdad, gracias.



Rare diseases are **rare...but** rare disease patients are **numerous**

(Orphanet)



# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
1.1. ASPECTOS GENERALES DEL GEN ANKK1 .....	29
1.2. ASPECTOS GENERALES DE LA PROTEÍNA ANKK1 .....	30
1.3. ANKK1 ES UNA RIP QUINASA.....	32
1.3.1. GENERALIDADES DE LA FAMILIA DE LAS RIP QUINASAS .....	32
1.3.2. RIP1 .....	33
1.3.3. RIP2 .....	34
1.3.4. RIP3 .....	34
1.3.5. RIP4 .....	35
1.3.6. RIP5, ANKK1 .....	35
1.3.7. RIP6 .....	36
1.3.8. RIP7 .....	36
1.4. RELACIÓN DE ANKK1 CON PROCESOS DE DESARROLLO .....	37
1.4.1. ANKK1 Y NEURODESARROLLO .....	37
1.4.2. ANKK1 Y DESARROLLO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	38
1.5. ORIGEN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN VERTEBRADOS .....	41
1.5.1. FORMACIÓN DE LOS MÚSCULOS EN EL EMBRIÓN .....	41
1.5.2. MIOGÉNESIS PRIMARIA Y SECUNDARIA .....	43
1.6. GENERALIDADES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO ADULTO .....	43
1.6.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES .....	43
1.6.2. CLASIFICACIÓN .....	45
1.7. LA FIBRA MUSCULAR .....	45
1.7.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN .....	45
1.7.2. CLASIFICACIÓN .....	47
1.7.2.1. Según la isoforma de miosina de cadena pesada .....	47
1.7.2.2. Según la ruta de metabolismo energético .....	49
1.7.2.2.1. El sistema glicolítico anaerobio.....	49
1.7.2.2.2. El sistema oxidativo aerobio .....	50

1.8. LAS CÉLULAS SATÉLITE .....	51
1.8.1. MECANISMO DE REGENERACIÓN.....	51
1.8.2. BIOMARCADORES .....	52
1.8.3. CLASIFICACIÓN .....	53
1.8.4. MECANISMOS REGULADORES DE QUIESCENCIA Y ACTIVACIÓN..	53
1.9. DISTROFIAS MUSCULARES .....	56
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>67</b>
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	67
3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	67
3.1.1.1. Muestras embrionarias .....	67
3.1.1.2. Muestras postnatales .....	68
3.1.2. BIOPSIAS DE MÚSCULO HUMANO .....	69
3.1.3. CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	71
3.1.4. CULTIVOS CELULARES .....	71
3.1.4.1. Líneas celulares .....	71
3.1.4.2. Mantenimiento y preservación de los cultivos celulares .....	73
3.1.4.3. Diferenciación de los mioblastos murinos y humanos .....	73
3.1.4.4. Cultivo de mioblastos humanos a partir de biopsias musculares .....	73
3.2. TRATAMIENTOS Y ENSAYOS EN C2C12 Y RD .....	75
3.2.1. ESTUDIO METABÓLICO EN C2C12 .....	75
3.2.1.1. Inducción de la vía glicolítica .....	75
3.2.1.2. Ensayo de cuantificación del ácido láctico .....	75
3.2.1.3. Determinación del consumo de oxígeno .....	76
3.2.2. ESTUDIO DE DINÁMICA NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA EN C2C12: TRATAMIENTO CON LEPTOMICINA B .....	77
3.3. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS HeLa .....	77
3.3.1. TRANSFECCIÓN.....	77

3.3.2. SINCRONIZACIÓN .....	78
3.3.3. RECOGIDA DE CÉLULAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO .....	78
3.3.4. RECOGIDA DE CÉLULAS PARA WESTERN BLOT .....	78
3.4. ESTUDIOS DE ARN EN C2C12.....	79
3.4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN .....	79
3.4.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	79
3.4.3. PCR CUANTITATIVA.....	80
3.5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS .....	81
3.5.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	81
3.5.2. <i>WESTERN BLOT</i> .....	82
3.5.3. DEGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS .....	83
3.6. INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	84
3.6.1. INMUNOFLUORESCENCIA .....	84
3.6.1.1. Inmunofluorescencia de embriones .....	85
3.6.1.2. Inmunofluorescencia de células.....	85
3.6.1.3. Inmunofluorescencia de fibras aisladas en cultivo con sus células satélite asociadas .....	85
3.6.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	85
3.6.2.1. Inmunohistoquímica de músculo de ratón parafinado.....	85
3.6.2.2. Inmunohistoquímica de músculo humano no parafinado.....	86
3.6.2.3. Aspectos comunes .....	86
3.6.3. MICROSCOPIA .....	87
3.7. ANTICUERPOS .....	88
3.7.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	88
3.7.2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	90
3.8. CLONACIONES.....	91
3.8.1. VECTORES COMERCIALES.....	91
3.8.2. GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS .....	92
3.9. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD QUINASA.....	93
3.9.1. SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA OBTENER PROTEÍNA SOLUBLE .....	93

3.9.2. PREPARACIÓN DE LA RESINA Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE.....	94
3.9.3. SOBREENPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO: COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON GFP-TRAP .....	94
3.9.4. CONDICIONES DEL ENSAYO QUINASA.....	95
3.10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	96
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>99</b>
4.1. ANKK1 PARTICIPA EN LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA.....	99
4.1.1. ANKK1 SE EXPRESA EN MIOBLASTOS Y MIOTÚBULOS EMBRIONARIOS.....	99
4.1.2. LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE ANKK1 VARÍA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA .....	100
4.1.3. ANKK1 Y RELACIÓN CON MARCADORES MIOGÉNICOS.....	104
4.1.4. ANKK1 SE GLICOSILA EN TEJIDO NERVIOSO Y MUSCULAR.....	107
4.1.5. LEPTOMICINA B INHIBE LA EXPORTACIÓN NUCLEAR DE ANKK1 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA .....	110
4.2. ANKK1 ES UN MARCADOR DE CÉLULAS SATÉLITE Y DE SUBTIPO DE FIBRA EN EL MÚSCULO ADULTO .....	117
4.2.1. ANKK1 DISCRIMINA POBLACIONES QUIESCENTES Y ACTIVADAS DE CÉLULAS SATÉLITE.....	117
4.2.2. ANKK1 SE EXPRESA EN UN SUBTIPO DE FIBRAS MUSCULARES ADULTAS.....	122
4.2.3. EL METABÓLICO GLICOLÍTICO INFLUYE EN LA EXPRESIÓN DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA ANKK1 .....	123
4.2.3.1. Activación de la vía glicolítica mediante agentes inductores.....	123
4.2.3.2. Activación de la vía glicolítica en condiciones de hipoxia .....	126
4.3. ANKK1 SE EXPRESA EN MIOBLASTOS Y FIBRAS REGENERATIVAS DE PACIENTES CON DISTROFIAS MUSCULARES.....	130

4.3.1. LOS PACIENTES CON DMD PRESENTAN UNA MENOR PROPORCIÓN DE MIOBLASTOS ANKK1+ .....	130
4.3.2. DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS DE PACIENTES ANKK1 MUESTRA UNA DINÁMICA SIMILAR A OTRAS LÍNEAS CELULARES.....	133
4.3.3. ANKK1 SE EXPRESA EN FIBRAS REGENERATIVAS EN DISTROFIAS NEUROMUSCULARES .....	135
4.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ANKK1.....	137
4.4.1. ANKK1 Y SU RELACION CON EL CICLO CELULAR .....	137
4.4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE ANKK1 .....	143
4.4.2.1. ANKK1 no presenta actividad quinasa al sobreexpresarla en bacterias <i>E. coli</i> .....	143
4.4.2.2. ANKK1 no presenta actividad quinasa al sobreexpresarla en células HEK293T.....	146
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>153</b>
5.1. ANKK1 SE LOCALIZA EN PRECURSORES MIOGÉNICOS .....	153
5.2. ANKK1 EN EL MÚSCULO ADULTO Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO .....	157
5.3. LA EXPRESIÓN DE ANKK1 SE VE AFECTADA EN PROGENITORES MUSCULARES Y POBLACIONES REGENERATIVAS EN PACIENTES CON DISTROFIAS MUSCULARES.....	158
5.4. ANKK1 Y SU PARTICIPACIÓN EN PROCESOS CELULARES.....	159
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>165</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>169</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>195</b>



*Todos somos **raros**... todos somos **únicos***

*(Federación Española de Enfermedades Raras, Federación Española de Enfermedades  
Neuromusculares y Fundación Isabel Gemio)*



# **ABREVIATURAS**



# ABREVIATURAS

AAV: Virus adenoasociados  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario  
AMP: Adenosin monofosfato  
AMPK: Proteina quinasa activada por AMP  
ANKK1: *Ankyrin repeat and Kinase domain containing 1*  
ANKK1-k: isoforma ANKK1 quinasa (del inglés, *kinase*)  
ANKK1-fl: isoforma ANKK1 completa (del inglés, *full lenght*)  
ANKK1-ank: isoforma ANKK1 ankirina (del inglés, *ankyrin*)  
ARM: Armadillo  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero  
ATP: Adenosin trifosfato  
BSA: Albúmina de suero bovino  
CARD: Dominio de reclutamiento de caspasas  
CRM1: Exportina 1 (región de mantenimiento cromosómico 1)  
*Csnk2a2*: Gen que codifica para la polipéptido alfa prima de caseína quinasa 2  
Ct: Carboxilo-terminal  
D-GTP: D-glutamato-piruvato transaminasa  
D1: Receptor dopaminérgico 1  
D2: Receptor dopaminérgico 2  
DAB: 3,3' Tetrahidrocloruro de diaminobencidina  
DEPC: Dietil pirocarbonato  
DGC: Complejo de glicoproteínas asociado a distrofina  
DIK: *Delta-interacting protein kinase*  
DM: Distrofia miotónica  
DMD: Distrofia muscular de Duchenne  
DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*  
DMSO: Dimetilsulfóxido  
*DRD1*: Gen que codifica para el receptor dopaminérgico D1  
*DRD2*: Gen que codifica para el receptor dopaminérgico D2  
DTT: Ditiotreitól  
E: Estadio embrionario  
EDL: *Extensor Digitorum Longus*  
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético  
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares  
EST: *Expressed Sequence Tags*  
FBS: Suero fetal bovino

FDB: *Flexor Digitorum Brevis*  
FOXO: Factor de transcripción *Forkhead box*  
FSHD: Distrofia facioescapulohumeral  
GFP: Proteína verde fluorescente  
HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico  
HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos  
HRP: Peroxidasa de rábano  
HS: Suero de caballo  
ID: Interdominio  
IL-1: Interleuquina 1  
IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido  
IRAK: Quinasa asociada al receptor de interleuquina 1  
JAK: Janus quinasa  
JNK: Quinasa Jun N-terminal  
kb: Kilobase  
kDa: Kilodalton  
LDH: Lactato deshidrogenasa  
LMB: Leptomicina B  
LRR: Repeticiones ricas en leucina  
LRRK1: Proteína serina/treonina quinasa 1 con repeticiones ricas en leucina  
LRRK2: Proteína serina/treonina quinasa 2 con repeticiones ricas en leucina  
MAPK: Proteínas quinasa activadas por mitógenos  
MBP: Proteína básica de mielina  
MEM: Medio esencial mínimo  
MLKL: *Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein*  
MPCs: Células progenitoras musculares  
MRF: Factores de regulación miogénica  
MRF4: Factor miogénico 4  
MYF5: Factor miogénico 5  
MyHC: Miosina de cadena pesada  
MYOD: Factor 1 de diferenciación miogénica  
MYOG: Miogenina  
NAD: Nicotinamida-adenina dinucleótido  
NCAM: Molécula de adhesión celular neural  
NES: Señal de exportación nuclear  
NF- $\kappa$ B: Factor Nuclear kappa B  
NGS: Suero de cabra normal  
NLS: Señal de localización nuclear  
NOD: Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos  
Nt: Amino-terminal

NTAD: NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2  
PAX: *Paired domain transcription factor*  
PBS: Tampón fosfato salino  
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PFA: Paraformaldehído  
PKC: Proteína quinasa C  
PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo  
PS: Penicilina-estreptomina  
PSA: Penicilina-estreptomina-anfotericina B  
PSM: Mesodermo paraxial presomítico  
RHIM: Motivo de interacción homotípico de RIP  
RIP: Proteína de interacción con receptores  
RIPK: RIP quinasa  
Roc/COR: Proteínas del complejo de Ras / C-terminal de ROC  
SCs: Células satélite  
SDS: Dodecilsulfato sódico  
Ser/Thr: Serina/treonina  
SNP: Polimorfismo de nucleótido simple  
STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción  
TBS: Tampón TRIS salino  
TLR: Receptor tipo *Toll*  
TNF: Factor de necrosis tumoral  
TNF-R1: Receptor 1 de TNF  
TRIS: Tris (hidroximetil)- aminometano  
TTC12: *Tetratricopeptide repeat domain 12*  
*Tuba1a*: Gen que codifica para la  $\alpha$ -tubulina  
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular  
WD: Repeticiones de WD40  
Wnt: *Wingless/int*



*Share... Care... Cure.*

*(European Reference Networks)*



# **INTRODUCCIÓN**

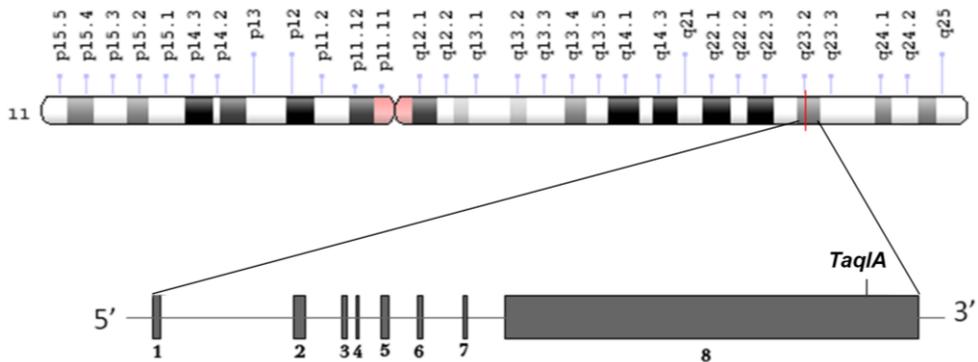


# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ASPECTOS GENERALES DEL GEN ANKK1

En 2002, Manning y colaboradores llevaron a cabo un estudio para catalogar las proteínas quinasa del genoma humano (definido como quinoma) e identificaron 518 genes putativos. Uno de ellos conocido como *SGK288* (Sugen Kinase 288), fue identificado posteriormente como *Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1)* mediante la búsqueda en bases de datos de *Expressed Sequence Tags (EST)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>) [1].

El gen *ANKK1* se localiza en el cromosoma 11q22-q23, consta de 12.6 kilobases (kb) y contiene 8 exones (Fig. 1). El producto de este gen es la proteína ANKK1, que forma parte de las serina/treonina (Ser/Thr) quinazas. El polimorfismo de nucleótido simple (SNP) *TaqIA* (rs1800497), localizado en el exón 8 de *ANKK1*, es la variante genética más ampliamente estudiada en relación con una gran variedad de condiciones psiquiátricas y rasgos de la personalidad.



**Figura 1. Localización y estructura del gen ANKK1.** En la parte superior se observa un esquema del cromosoma 11 y la localización del gen *ANKK1* se señala con una línea roja vertical. A partir de ese punto se amplía el esquema del gen *ANKK1*, con los ocho exones representados como cajas grises. Está señalado el SNP *TaqIA* en el exón 8. Figura superior: tomada de (<https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/11#diogram>). Figura inferior: representación estructural obtenida con el software SWISS-MODEL Workspace, <http://swissmodel.expasy.org>.

Este SNP consiste en un cambio de una Citosina (C) por una Timina (T), que da lugar a los respectivos alelos A2 (C) y A1 (T), y los genotipos resultantes son A1+ (heterocigotos y homocigotos para A1) y A1- (homocigotos para A2). El alelo A1 y su genotipo portador A1+ se han asociado con múltiples conductas adictivas tales como el alcoholismo [2], el consumo de cocaína [3], heroína [4], la adicción a nicotina [5], a opiáceos [4,6] y la ludopatía [7]. También se ha asociado con trastornos en la alimentación [8,9] y con la enfermedad de Parkinson [10,11]. Por su parte, el alelo A2 se ha asociado con otros trastornos psiquiátricos como esquizofrenia [12,13,14], el trastorno bipolar [15], el trastorno por déficit de

## Introducción

atención e hiperactividad [13], el autismo [12] y la psicosis esquizofrénica [16]. El SNP *TaqIA* también se ha relacionado con diferentes endofenotipos del sistema dopaminérgico, como la densidad del receptor dopaminérgico 2 (D2) [17], el aprendizaje de errores y cambios en el metabolismo cerebral [18] y rasgos farmacogenéticos [17]. Todos estos estudios sugieren una relación entre este SNP y aspectos del comportamiento y aprendizaje.

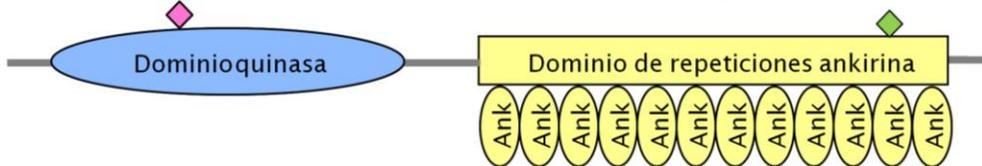
## 1.2. ASPECTOS GENERALES DE LA PROTEÍNA ANKK1

ANKK1, también conocida como Receptor-Interacting Protein 5 (RIP5), forma parte de la familia de las RIP quinasa, cuyos miembros se han incluido en esta familia debido al elevado grado de conservación de su dominio quinasa. La proteína predicha de ANKK1 según la base de datos de transcritos del Ensembl (<http://www.ensembl.org>) contiene 765 aminoácidos en humanos (*Ensembl peptide* ID: ENSP00000306678), 745 en ratón (ENSMUSG00000032257) y 746 en rata (ENSRNOP00000037036) (Fig. 2).

			DOMINIO QUINASA
<i>H sapiens</i>	1	-----MAADPTELRLIGSLPVFTRDDFEGDNRIVASGGFSQVQARHRRWRTEY	
<i>M musculus</i>	1	MVPHRRARLLNPMVAVGLAQQIGSLTVFTRDDFEEENHLVASGGFSKVFQARHKRWRTQY	
<i>R norvegicus</i>	1	MVPHRRARLLPDPMAVRELEQQIGSLTVFTRDDFEEENHLVASGGFSQVQARHKRWRTQY	
<i>H sapiens</i>	49	AIKCAPCLPPDAASDVNYLIEEAAKMKKI KFHIVSYIGVCKQPLGIVMEFMANGSLEK	
<i>M musculus</i>	61	AIKCSPLQKETTSSSEVTLCFEEAVKMEKIKFHIVSYIGVCKQPLGIVMEFMANGSLEK	
<i>R norvegicus</i>	61	AIKCSPLQKETTSSSEVSLCFEEAVKMEKIKFYIVSYIGVCKQPLGIVMEFMANGSLEK	
<i>H sapiens</i>	109	VLESTHSLCWKLRFRRIHETSLAMNFLHSIKPPLLHLDLKPNGNILLDSNMHVKISDFGLSK	
<i>M musculus</i>	121	TLPTHSLCWPLKLRRIHETSLAMNFLHSIKPPLLHLDLKPNGNILLDSNMHVKISDFGLSK	
<i>R norvegicus</i>	121	ILEPHTSLCWQLKFRRIHETSLAMNFLHSIKPPLLHLDLKPNGNILLDSNMHVKISDFGLSK	
<i>H sapiens</i>	169	WMEQSTRM <sup>Q</sup> YIERSALRGMLSYIPPEMFLESNKAPGPKYDVYSFAIVIEWELTQKKPYSG	
<i>M musculus</i>	181	WMEQSTQK <sup>Q</sup> YIERSALRGLT <sup>LSY</sup> IPPEMFLENKAPGPEYDVYSFAIVIEWELTQKKPYAG	
<i>R norvegicus</i>	181	WMEQSTQK <sup>Q</sup> YIERSALRGLT <sup>LSY</sup> IPPEMFLENKAPGPEYDVYSFGIVVWEI <sup>LT</sup> QKKPYAG	
<i>H sapiens</i>	229	FNM <sup>MM</sup> ITIRVAAGMRPSLQPVSDQWFSEAOQMVDLMKRCWDQDPKKR <sup>PCFLDIT</sup> ETID <sup>IL</sup>	
<i>M musculus</i>	241	LN <sup>MM</sup> TIIIRVAAGMRPSLQDVSD <sup>EW</sup> EEVHOMVNLKMRWDQDPKKR <sup>PCFLNVA</sup> VT <sup>DM</sup> L	
<i>R norvegicus</i>	241	LN <sup>MM</sup> TIIIRVAAGMRPSL <sup>HDVSA</sup> EWEEA <sup>H</sup> OMVNLKMRWDQDPKKR <sup>PCFLN</sup> VI <sup>ET</sup> DM <sup>L</sup>	
<i>H sapiens</i>	289	L <sup>SL</sup> LFQSRVAVFESKALARKVSKLSL <sup>RQ</sup> PG-EV <sup>N</sup> EDISQELM <sup>TD</sup> TDS <sup>GN</sup> YIKKRAIQ <sup>LS</sup> DRK	
<i>M musculus</i>	301	L <sup>SL</sup> LFQSPMTDPGCEALTKQVSKCPSLSOPH-KV <sup>S</sup> KEVNOEIA <sup>TD</sup> VSS <sup>DL</sup> SKWILQ <sup>LS</sup> DSK	
<i>R norvegicus</i>	301	L <sup>SL</sup> LFQTPVADPEYALTRKVS <sup>YK</sup> SSLSQPHR <sup>KV</sup> SKEVNOEIA <sup>TD</sup> S <sup>DD</sup> SLKWI <sup>QL</sup> LSDSK	
<i>H sapiens</i>	348	NL <sup>V</sup> PRDEELCIYENKVTPLHFLVAQSSVEQV <sup>RRLLA</sup> HEVDVDCQ <sup>T</sup> ASGY <sup>T</sup> PL <sup>L</sup> LIAAQDQ <sup>Q</sup>	ANKIRINA 2
<i>M musculus</i>	360	SLV <sup>ASD</sup> ----VYENRV <sup>T</sup> PLHFLVAGGSLEQV <sup>RRLLS</sup> HDVDCQ <sup>T</sup> ASGY <sup>T</sup> PL <sup>L</sup> LIAAQDQ <sup>Q</sup>	
<i>R norvegicus</i>	361	SLV <sup>PSD</sup> ----IYENKVTPLHFLVARG <sup>S</sup> LEQV <sup>RRLLS</sup> HEVDVDCQ <sup>T</sup> ASGY <sup>T</sup> PL <sup>L</sup> LIAAQDQ <sup>Q</sup>	
<i>H sapiens</i>	408	PDL <sup>C</sup> ALLLAHGADANRVEDDGWAPLHFAAQNGDDGTAR <sup>LLLD</sup> HGACVDAQ <sup>RE</sup> EGW <sup>T</sup> PL <sup>HL</sup>	ANKIRINA 4
<i>M musculus</i>	416	PDL <sup>C</sup> ALLLAHGADTNLADE <sup>D</sup> GWAPLHFAAQNGDDHTAR <sup>LLLD</sup> HGALVNA <sup>RE</sup> HEGW <sup>T</sup> PL <sup>HL</sup>	
<i>R norvegicus</i>	417	PDL <sup>C</sup> ALLLAHGADTNLADE <sup>D</sup> GWAPLHFAAQSGDDHTAR <sup>LLLD</sup> HGALVNA <sup>RE</sup> HEGW <sup>T</sup> PL <sup>HL</sup>	
<i>H sapiens</i>	468	AAQ <sup>NN</sup> FENVARLLVSRQADPNLHEAEGK <sup>T</sup> PLHVAAYFGHVSIVK <sup>LLT</sup> SQGAELDAQ <sup>QRNL</sup>	ANKIRINA 6
<i>M musculus</i>	476	AAQ <sup>NN</sup> FENVARLLVSRQADLS <sup>PH</sup> EAEGK <sup>T</sup> PLHVAAYFGHIVK <sup>LLT</sup> SQGAELDAQ <sup>QRNL</sup>	
<i>R norvegicus</i>	477	AAQ <sup>NN</sup> FENIARLLVSRQADLN <sup>PC</sup> EAEGK <sup>T</sup> PLHVAAYFGHIVK <sup>LLT</sup> SQGAELDAQ <sup>QRNL</sup>	
<i>H sapiens</i>	528	RT <sup>PL</sup> HLAVERGKVR <sup>AI</sup> QHLLKSGAV <sup>PD</sup> ALDQSGY <sup>GPLH</sup> TAAARG <sup>KY</sup> ILCKM <sup>LLR</sup> YGASLE	ANKIRINA 7
<i>M musculus</i>	536	RT <sup>PL</sup> HLAVERGKVR <sup>AI</sup> QHLLKCGAL <sup>PD</sup> ALDHSY <sup>GPLH</sup> TAAARG <sup>KD</sup> ILFKM <sup>LLR</sup> YGASLE	
<i>R norvegicus</i>	537	RT <sup>PL</sup> HLAVERGKVR <sup>AI</sup> QHLLKRGAL <sup>PD</sup> VLDHNGYS <sup>PLH</sup> TAAARG <sup>KY</sup> ILFKM <sup>LLR</sup> HGASLE	
<i>H sapiens</i>	588	L <sup>PT</sup> QCGWTPLHLAAYK <sup>GHLE</sup> IIHLLAES <sup>HAN</sup> MALGAVN <sup>WT</sup> PLHLAAR <sup>HGEE</sup> AVVSALLO	ANKIRINA 8
<i>M musculus</i>	596	L <sup>RT</sup> QCGWTPHLA <sup>T</sup> YK <sup>GHLE</sup> IIHQ <sup>LAK</sup> SHVDL <sup>DAL</sup> GSMQW <sup>T</sup> PLHLA <sup>A</sup> FQ <sup>GE</sup> EGV <sup>M</sup> LALLO	ANKIRINA 9
<i>R norvegicus</i>	597	L <sup>CT</sup> QCGWAPHLA <sup>T</sup> YK <sup>GHLE</sup> IIHLLAK <sup>S</sup> HADL <sup>DAL</sup> GSMQW <sup>T</sup> PLHLA <sup>A</sup> FQ <sup>GE</sup> EGM <sup>M</sup> LALLO	
<i>H sapiens</i>	648	CGAD <sup>FN</sup> AAR <sup>EQ</sup> SGWTPLHLAVQR <sup>ST</sup> FLSVIN <sup>LE</sup> HHANV <sup>HAN</sup> KVGT <sup>PH</sup> LAAL <sup>LK</sup> GN <sup>TAI</sup>	ANKIRINA 10
<i>M musculus</i>	656	CGAN <sup>FN</sup> AAR <sup>EQ</sup> SGWTPHLHLAV <sup>H</sup> KG <sup>T</sup> FLGITH <sup>LE</sup> YGAD <sup>I</sup> HAC <sup>N</sup> KVGT <sup>PH</sup> LAAL <sup>LK</sup> GN <sup>TAI</sup>	
<i>R norvegicus</i>	657	CGAN <sup>FN</sup> AAR <sup>EQ</sup> SGWTPHLHLAV <sup>H</sup> KG <sup>T</sup> FLGIV <sup>H</sup> LEH <sup>GD</sup> AVHAC <sup>N</sup> KVGT <sup>PH</sup> LAAL <sup>LK</sup> GN <sup>TAI</sup>	
<i>H sapiens</i>	708	LK <sup>VL</sup> VEAG <sup>QL</sup> DVQGV <sup>SCT</sup> PLQ <sup>LAL</sup> RS <sup>RK</sup> OGIMS <sup>F</sup> LEGKE <sup>PSVAT</sup> LGG <sup>S</sup> KPGA <sup>E</sup> MEI	ANKIRINA 12
<i>M musculus</i>	716	LK <sup>VL</sup> VKAA <sup>AV</sup> DVQGV <sup>SCT</sup> PLQ <sup>LAI</sup> H <sup>SPK</sup> -----	
<i>R norvegicus</i>	717	LK <sup>VL</sup> VKAC <sup>AR</sup> LDAK <sup>D</sup> GVG <sup>T</sup> PLQ <sup>LAL</sup> RS <sup>LK</sup> -----	

**Figura 2. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos predicha de la proteína ANKK1 según la base de datos Ensembl en humanos (*Homo sapiens*), en ratón (*Mus musculus*) y en rata (*Rattus norvegicus*). El sombreado indica una identidad del 100% de la secuencia de aminoácidos. Los dominios están subrayados y los sitios polimórficos están señalados por una estrella (adaptado de Hoenicka *et al.*, 2010 [19]).**

A nivel estructural, ANKK1 está constituida por un dominio Ser/Thr quinasa en su extremo amino-terminal (Nt, codificado por los 6 primeros exones), un interdominio (ID, codificado por el exón 7) y un dominio de repeticiones de tipo ankirina en el extremo carboxilo-terminal (Ct, codificado por el exón 8), existiendo 11 repeticiones de ankirina en ratón y rata y 12 en humanos (Fig. 3).



**Figura 3. Estructura de la proteína ANKK1.** Se muestra el dominio quinasa en el extremo amino terminal (Nt) de ANKK1 y el dominio de repeticiones ankirina en el Ct. Está señalada la sustitución aminoacídica (E713K) que produce el SNP *TaqIA* con un rombo verde. Con un rombo morado se señala el sitio activo predicho del dominio quinasa, residuo característico de las Ser/Thr quinasa (representación estructural adaptada del software SWISS-MODEL Workspace, <http://swissmodel.expasy.org>).

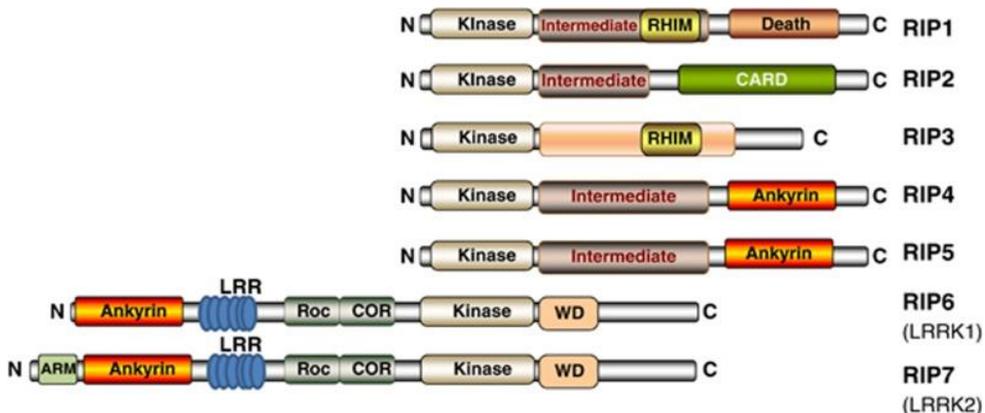
Las Ser/Thr quinasa median respuestas a través de la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de Ser/Thr de otras proteínas y a menudo forman parte de cascadas de transducción de señal. Por su parte, los dominios ankirina son motivos muy comunes de interacción entre proteínas y juegan un papel crucial en la unión de las proteínas que los contienen a sus sustratos [20,21]. Se trata de módulos de 33 aminoácidos que se repiten en tándem al menos cuatro veces. Su presencia en las proteínas puede estar relacionada con diversas funciones, tales como el inicio de la transcripción, la regulación del ciclo celular, el transporte de iones, la maquinaria del citoesqueleto y cascadas de transducción de señal.

Se han descrito polimorfismos del gen *ANKK1* que producen un cambio de aminoácido tanto en el dominio quinasa como en el dominio de repeticiones de ankirina. Tal es el caso del polimorfismo *TaqIA*, que supone un cambio de un aminoácido glutámico (ácido, carga negativa) por una lisina (básico, carga positiva) en la posición 713 (E713K), localizado en la repetición número 11 de la ankirina de la proteína ANKK1 (Fig. 3) [1]. Se desconoce si este cambio podría afectar a la estructura de la proteína, ya que ambos aminoácidos son polares. Sin embargo, teniendo en cuenta que varía la carga de la proteína y que se localiza en el dominio putativo de interacción de ANKK1 con su sustrato, esta variación podría afectar a la afinidad de ANKK1 por otras proteínas, y por lo tanto afectar a su función [1]. Además, el polimorfismo *TaqIA* se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el SNP *rs.7118900*, localizado en la región codificante del dominio quinasa, que produce un cambio de alanina (A2) a treonina (A1) en la posición 239, lo que crea un nuevo sitio de fosforilación *in silico* [19].

### 1.3. ANKK1 ES UNA RIP QUINASA

#### 1.3.1. GENERALIDADES DE LA FAMILIA DE LAS RIP QUINASAS

Las proteínas quinasa, todas ellas referidas en su conjunto como el quinoma (formado por más de 500 proteínas) se han clasificado en familias en base a la similitud de sus dominios quinasa conservados [22,23]. Una rama del quinoma lo constituye la familia de las RIP (Fig. 4).



**Figura 4. Organización en dominios de la familia de las RIP quinazas.** Representación esquemática de los diferentes dominios encontrados en la familia de las RIP. RHIM: motivo de interacción homotípico de RIP; CARD: dominio de reclutamiento de caspasas; LRR: repeticiones ricas en leucina; Roc/COR: proteínas del complejo de Ras/Ct de Roc; WD: repeticiones de WD40; ARM: armadillo (tomada de Humphries *et al.*, 2015 [24]).

La familia RIP está constituida por siete miembros que se caracterizan por tener un dominio quinasa homólogo muy conservado y exhiben sus principales diferencias en el extremo Ct (a excepción de RIP6 y RIP7 que difieren del resto por la presencia de repeticiones ricas en leucina en su región Nt). Las RIP quinazas se han relacionado con diferentes funciones, tales como la regulación de la supervivencia y muerte celular, la proliferación y la diferenciación vía transducción de señales en una gran variedad de tejidos y tipos celulares. Además, desempeñan un importante papel en situaciones de estrés celular en respuesta a distintos factores ambientales, tales como patógenos, inflamación, programas de diferenciación celular y daño celular en respuesta a señales intracelulares y extracelulares [25]. Las proteínas RIP intervienen en diferentes vías de señalización, destacando la ruta del factor nuclear Kappa B (NF- $\kappa$ B) y de las proteínas quinazas activadas por mitógenos (MAPK); Jun Nt quinasa (JNK), p38 y quinasa regulada por señales extracelulares [26]. Esta familia también se ha relacionado con la familia de las quinazas asociadas al receptor de Interleuquina-1 (IL-1) [27], que han sido ampliamente estudiadas en relación a la señalización mediada por IL-1 y el receptor tipo *Toll* (TLR) [28].

En los últimos años se ha puesto en evidencia el papel de las proteínas RIP en necroptosis e inflamación, siendo RIP1 el iniciador y RIP3 el mediador esencial aguas abajo de RIP1 del proceso de necroptosis [29,30,31]. La necroptosis juega un papel crítico en la patogénesis de diferentes enfermedades neurodegenerativas. Tal es el caso de la enfermedad de Gaucher en la que la deficiencia de RIPK3 mejora sustancialmente el curso clínico de un modelo murino de la enfermedad, incrementando la supervivencia, coordinación motora y reduciendo los daños cerebrales y hepáticos [32]. Asimismo, RIPK1/RIPK3 juegan un papel crítico en la degeneración axonal progresiva en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica [33], por lo que la inhibición de RIPK1 podría suponer una diana terapéutica para diferentes enfermedades neurodegenerativas. RIP2 también se ha relacionado con enfermedades inflamatorias, ya que la señalización mediada por las proteínas que contienen los dominios de oligomerización por unión de nucleótidos (NOD1/2)-RIP2 desencadena la patogénesis de la esclerosis múltiple en modelos murinos [34], mientras que RIP2 también participa en la inflamación alérgica mediante la activación de NF- $\kappa$ B y expresión de genes proinflamatorios [35]. La deficiencia de RIP2 se ha asociado además con una mejoría de la hipertrofia cardíaca, la inflamación y la fibrosis a través de la modulación de múltiples rutas de señalización [36]. Estos estudios revelan una conexión funcional de diferentes proteínas RIP en los procesos de necroptosis e inflamación que son habituales en diferentes tipos de patologías.

Además de las funciones comunes de las RIP quinasas, la presencia de regiones y dominios variados en los diferentes miembros de esta familia hace posible que estas proteínas ejerzan otras funciones alternativas.

### 1.3.2. RIP1

Fue el primer miembro identificado de la familia. Cuenta con un dominio quinasa en su extremo Nt, un ID con un dominio de interacción homotópica (RHIM) que permite el reclutamiento de complejos de señalización y un dominio de muerte en su extremo Ct (Fig. 4). La unión del factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  a su receptor TNF-R1 dará lugar a la formación de varios complejos secuenciales, en los que RIP1 será un elemento fundamental [37]: el primer complejo conlleva la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de proteínas anti-apoptóticas [38,39], induciendo rutas pro-inflamación y pro-supervivencia. Cuando la caspasa-8 corta a RIP1 en su extremo Ct, el producto de la escisión bloquea la activación de NF- $\kappa$ B y se forma el segundo complejo que induce la apoptosis [40]. Si se bloquea la apoptosis, RIP1 interacciona con RIP3 y forman el complejo del necrosoma junto con *Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein* (MLKL) que conducirá a la necrosis programada [29,30,31], siendo fundamental la actividad quinasa de ambas proteínas RIP para este proceso [29,41]. Hallazgos recientes han revelado que RIPK1 además tiene un papel en la inhibición de la necroptosis y por tanto limita, no solo promueve la inflamación, pudiendo ejercer funciones pro- o anti-apoptóticas según el estadio embrionario [42]. De hecho, los ratones que expresan RIPK1 catalíticamente inactiva son viables pero su actividad quinasa se requiere

para la necroptosis [43]. RIP1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos, en los que se encarga de regular la muerte celular y mantener la homeostasis.

### 1.3.3. RIP2

Fue descrita por primera vez por tres grupos independientes como una RIP quinasa que tiene un papel en la activación de NF- $\kappa$ B y apoptosis [44,45,46]. Además del dominio quinasa en su extremo Nt, RIP2 cuenta con un ID y un dominio de reclutamiento y activación de caspasas [47] (Fig. 4). Su actividad quinasa es dispensable para activar NF- $\kappa$ B pero se requiere para activar ERK y para estabilizar a la propia RIP2 [48,49]. RIP2 juega un papel clave en la inmunidad innata y adaptativa [50,51]. Tras la activación mediada por péptidos bacterianos específicos, las proteínas NOD1/2 interaccionan con RIP2 vía su dominio CARD para inducir la activación de NF- $\kappa$ B y regular respuestas inmunes innatas, por lo que ejerce un papel protector en la inmunidad de mucosas y homeostasis. Se ha descrito que la ausencia de RIP2 resulta en la alteración de la expresión de mediadores proinflamatorios, la reducción de la infiltración de neutrófilos y el incremento de la carga bacteriana en modelos de infección pulmonar [52,53], si bien es cierto que en algunos casos la mediación de la respuesta anti-bacteriana por RIP2 puede ser dañina para el huésped, incrementando la respuesta inflamatoria tras una infección secundaria por *Escherichia coli* [54].

Se ha identificado una variante de *splicing* de RIP2 que codifica la proteína RIP2- $\beta$  [55]. Esta variante presenta una porción del extremo Nt con el dominio quinasa, y carece del ID y del dominio CARD, y se ha relacionado con una pérdida de activación con respecto a diferentes moléculas, entre ellas NF- $\kappa$ B.

Asimismo, RIP2 juega un papel clave en la diferenciación del músculo esquelético [56]. Inicialmente se describió que RIP2 es un punto de control en la miogénesis esquelética, ya que su expresión disminuye durante la diferenciación de mioblastos murinos en cultivo y mioblastos primarios, y su sobreexpresión produce un incremento de la proliferación y una inhibición de la diferenciación [56]. Más tarde se confirmaron estos hallazgos, cuando se halló que su disminución en mioblastos murinos es un prerrequisito para su correcta diferenciación puesto que la inhibición de su expresión incrementa la diferenciación miogénica tanto en mioblastos normales C2C12 como humanos de Rhabdomyosarcoma [57]. También se ha encontrado su expresión en miocitos cardiacos, en los que podría tener un papel en el corazón estresado isquémico [47]. Todos estos datos confirman la importante función de esta proteína en un contexto de desarrollo y diferenciación de tejido muscular.

### 1.3.4. RIP3

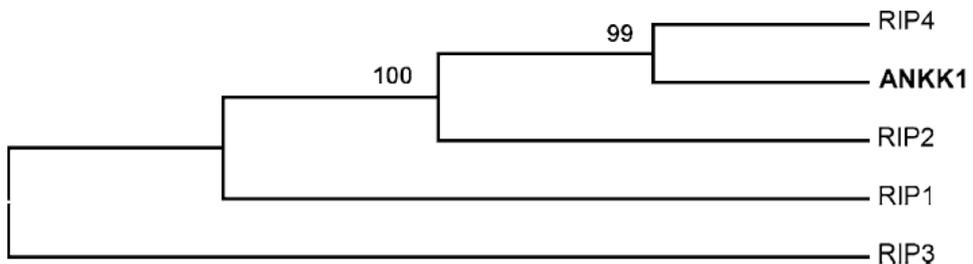
La proteína RIP3 cuenta con un dominio quinasa, carece de ID y cuenta con un dominio RHIM en su extremo Ct (Fig. 4). La sobreexpresión de RIP3 puede inducir

apoptosis y activación de NF- $\kappa$ B [58,59,60,61]. Además, la actividad quinasa de RIP3 y su dominio de interacción RHIM se requieren para la señalización por necrosis [29]. Hallazgos recientes han puesto en evidencia que la actividad quinasa de RIPK3 es esencial para la necroptosis, aunque también regula si la célula activa caspasa-8 y por tanto muere por apoptosis [62]. Por todo esto, RIP3 comparte funciones con RIP1 en cuanto a la regulación de la homeostasis y la muerte celular.

### 1.3.5. RIP4

Esta proteína se describió por primera vez como una proteína quinasa C de interacción a proteína  $\delta$  (PKC-DIK) ya que es una quinasa que interacciona con PKC [63,64]. Es la RIP quinasa más similar a RIP5/ANKK1, dado que ambas presentan un dominio quinasa en su extremo Nt con una elevada homología de secuencia, un ID y múltiples repeticiones de tipo ankirina en el extremo Ct (Fig. 4), siendo la homología total entre ambas del 35%. La sobreexpresión de RIP4 induce la activación de NF- $\kappa$ B y de la vía JNK [65,66]. De manera similar a RIP1, RIP4 es cortada por caspasas durante apoptosis, resultando en la inhibición de su actividad de promover la señalización de NF- $\kappa$ B [65]. RIP4 se requiere para la diferenciación de queratinocitos [67], siendo una proteína clave en la regulación del desarrollo epidérmico y la homeostasis. A diferencia de RIP1 y RIP2, ambas actividades de RIP4 dependen de su actividad quinasa [65].

En este punto cabe destacar que, si bien todos los miembros de la familia RIP están muy relacionados desde un punto de vista estructural, las anteriormente descritas presentan una mayor homología y proximidad filogenética con ANKK1 (Fig. 5).



**Figura 5. Relación filogenética entre la proteína ANKK1 y las proteínas RIP quinasas.** Las secuencias aminoacídicas se compararon utilizando NJ algoritmos (Kumar *et al.*, 2001, [68]), (adaptada de Ponce *et al.*, 2009 [69]).

### 1.3.6. RIP5, ANKK1

El estudio del quinoma reveló la existencia de una proteína RIP muy similar a RIP4 teniendo en cuenta la organización de su dominio quinasa y su dominio de repeticiones de ankirina (Fig. 4). La organización estructural similar de ambas

proteínas podría sugerir una función relacionada. Esta proteína ha sido el objeto principal de estudio de la presente Tesis Doctoral.

### 1.3.7. RIP6

Al igual que RIP4 y ANKK1, las proteínas RIP6 y RIP7 se caracterizan por la presencia de un dominio quinasa y de repeticiones de ankirina, pero a diferencia de las anteriores, estas repeticiones se localizan en el extremo Nt. RIP6 y RIP7 cuentan además con dominios adicionales tales como repeticiones ricas en leucina (LRR) (de ahí sus respectivos nombres LRRK1 y LRRK2), un dominio de proteínas del complejo de Ras/Ct de Roc (Roc/COR) y repeticiones WD40 (WD) (Fig. 4).

### 1.3.8. RIP7

Además de la organización característica de los dominios previamente descrita y próxima a RIP6, RIP7 presenta un dominio armadillo (ARM) añadido en su extremo Nt (Fig. 4). La elevada similitud en la organización estructural de ambas proteínas sugiere funciones biológicas conservadas. Se ha encontrado un ortólogo de RIP6 y RIP7 en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*, a diferencia del resto de miembros de esta familia que únicamente se han descrito en vertebrados. Estas proteínas se correlacionan con una susceptibilidad a la enfermedad de Parkinson [70,71,72,73]. LRRK2 está involucrada en la proliferación, migración y diferenciación neuronal y en la morfogénesis de otros tejidos no neuronales [74]. Hallazgos recientes han revelado que RIP7 modula la intensidad de la señalización de NOD1/2-RIP2, ya que esta proteína es necesaria para la fosforilación óptima de Rip2 bajo la activación de Nod2 [75]. Este estudio revela que RIP7 es un regulador positivo de RIP2 y promueve la inducción de citoquinas inflamatorias a través de la vía NOD1/2-RIP2.

En resumen, las proteínas RIP no solo comparten su arquitectura estructural, sino también una serie de rasgos funcionales, regulando la homeostasis de muchos tejidos y estando a menudo interconectadas en diferentes procesos y rutas de señalización. Cabe destacar que varios miembros de la familia de las RIP están involucrados en la diferenciación de distintos tejidos: RIP2 regula la diferenciación de mioblastos, RIP4 ejerce un papel en la diferenciación de queratinocitos mientras que RIP7 regula la diferenciación neuronal y la morfogénesis de otros tejidos. RIP5 sigue siendo la proteína más desconocida de esta familia, no obstante, su elevada homología estructural con RIP4 sugiere la posible implicación de ANKK1 en este tipo de procesos.

## 1.4. RELACIÓN DE ANKK1 CON PROCESOS DE DESARROLLO

### 1.4.1. ANKK1 Y NEURODESARROLLO

Los primeros estudios de expresión de ANKK1 revelaron que su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se expresa en placenta y médula espinal, aunque inicialmente no se encontró su expresión en cerebro, cerebelo, hígado fetal o médula espinal [1]. Pocos años después se publicaron dos estudios en los que se identificaron varios péptidos mediante espectrometría de masas que podrían corresponder a ANKK1: en el primer estudio se identificaron varios péptidos correspondientes tanto al dominio quinasa como al dominio de ankirinas de ANKK1 en plasma humano [76]. Dos años después se realizó un análisis del fosfoproteoma en células HeLa (línea celular derivada de cáncer de cervix humano) en el que se detectó la treonina de la posición 694 de ANKK1 como sitio putativo de fosforilación [77]. Estos estudios confirmaban que ANKK1 es una proteína susceptible de fosforilación que se expresa en humanos.

A raíz de estos estudios y hasta la fecha, nuestro grupo ha estudiado el patrón de expresión de ANKK1 tanto a nivel de ARN como a nivel de proteína con el fin de elucidar la función biológica de esta proteína. En 2010, se encontraron evidencias *in silico* de la existencia de tres putativas isoformas de ANKK1 en humanos, ratones y ratas: ANKK1 completa (ANKK1-fl, con el dominio RIP quinasa y el dominio de repeticiones ankirina), ANKK1-quinasa (ANKK1-k, sólo el dominio RIP quinasa) y ANKK1-ankirina (ANKK1-ank, sólo el dominio de ankirinas) [19]. La expresión putativa de tres isoformas sugiere diferentes funciones biológicas para cada una de ellas. En este trabajo, nuestro grupo encontró la expresión de ANKK1 en diferentes tejidos a nivel de ARNm, y a nivel de proteína demostró la expresión de la isoforma quinasa y sus posibles formas modificadas post-traduccionalmente. Se demostró además que ANKK1 se expresa en las células astrogliales del sistema nervioso central, tanto en humanos como en ratones, y también se expresa en la glía radial, que son las células que sirven de guía a las neuronas migratorias durante el desarrollo del sistema nervioso central [78]. Estos hallazgos demostraban por primera vez la expresión de ANKK1 en sistema nervioso central en desarrollo y adulto.

Un año después, se encontraron las primeras evidencias funcionales definidas por *TaqIA* [79]. Se observaron diferentes niveles basales de expresión de las isoformas quinasa que contenían el alelo A1, A2 o la proteína mutante catalíticamente inactiva con un cambio de una Lisina (K) por una Arginina (R) en la posición 51 (K51R), así como la diferente respuesta de cada isoforma tras la adición del agonista dopaminérgico apomorfina. Poco después encontramos por primera vez la regulación opuesta de *Ankk1* ante el estímulo con diferentes agonistas dopaminérgicos [80]. Recientemente se determinó la expresión variable y regulada de ANKK1 durante el desarrollo del cerebro de ratón en los periodos prenatal, postnatal y en la edad adulta [81]. En este último trabajo se demostró por primera vez la correlación entre ANKK1 y el ciclo celular, ya que se producía un incremento de la isoforma ANKK1 nuclear durante la mitosis. Además, se observó

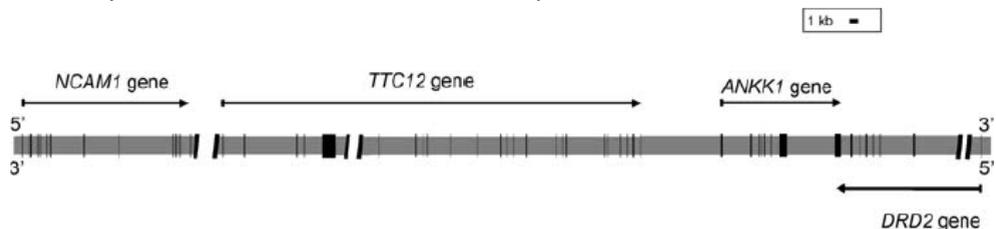
que la sobreexpresión de ANKK1 afectaba a las fases G1 y M del ciclo celular en diferentes líneas celulares, y el efecto observado era diferente en función del tratamiento con apomorfina y de la isoforma de ANKK1 sobreexpresada. Adicionalmente, este estudio demostraba la participación de ANKK1 en la fase M del ciclo celular tanto en la neurogénesis como en progenitores neurales con capacidad de autorrenovación en cerebro anterior de embriones murinos. Estos hallazgos sugerían que la regulación de la expresión de ANKK1 podría tener un impacto en la progresión del ciclo celular durante el desarrollo del sistema nervioso central.

Por lo tanto, los resultados hasta la fecha sugieren un papel clave de esta proteína en un contexto de neurodesarrollo, así como su relación funcional con el sistema dopaminérgico, que daría explicación a los estudios de asociación genética de ANKK1 y diferentes condiciones psiquiátricas.

#### 1.4.2. ANKK1 Y DESARROLLO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO

Como se ha desarrollado previamente, existe un conjunto de evidencias que apunta a la relación de ANKK1 con procesos de neurodesarrollo. Sin embargo, la asociación de una serie de hallazgos que se describen a continuación, junto con recientes descubrimientos de nuestro laboratorio, sugiere que el papel de ANKK1 no se limita al sistema nervioso central, sino que podría tener un papel en un contexto de desarrollo otros tejidos, concretamente del músculo esquelético:

1) En un contexto genómico, el gen ANKK1 se localiza en un clúster conservado en vertebrados de 521 kb, junto con los genes que codifican la molécula de adhesión celular neural (NCAM1), tetratricopeptide repeat domain 12 (TTC12) y el receptor dopaminérgico D2 (DRD2) [82] (Fig. 6), denominado NTAD. De hecho, el SNP TaqIA se localiza a 10 kb del codón de parada de DRD2.



**Figura 6. Representación esquemática del clúster de genes NTAD de 521 kb en el cromosoma 11q22–q23, que contiene los genes NCAM1, TTC12, ANKK1 y DRD2.** Las flechas indican la pauta de lectura abierta. Las regiones codificantes y no codificantes se muestran en cajas verticales negras y líneas horizontales grises, respectivamente (tomada de Ponce *et al.*, 2009 [69]).

NCAM1 codifica una glicoproteína de superficie implicada en procesos de neurodesarrollo y juega un papel clave en la plasticidad sináptica y en la diferenciación neuronal [83,84]. TTC12 codifica una proteína con dominios de repeticiones tetratricopéptido y repeticiones ARM que podría funcionar como anclaje de complejos multiproteicos de señalización [85,86]. Se desconoce su función fisiológica, pero se sabe que estos dominios ARM junto con la dopamina

interactúan en la vía de *Wingless-int* (Wnt), pudiendo tener un papel en un contexto de neurodesarrollo [86]. *DRD2* codifica una molécula clave en la fisiopatología de una gran variedad de trastornos psiquiátricos, siendo *TaqIA* marcador de variantes funcionales tanto en *ANKK1* como en *DRD2*.

Además del papel bien establecido de NCAM1 en neurogenesis, esta proteína también se ha relacionado ampliamente con procesos de miogénesis y regeneración de músculo esquelético, lo que extiende el papel para los genes incluidos en este clúster genómico más allá del neurodesarrollo y apunta a su implicación en la especificación de otros tejidos.

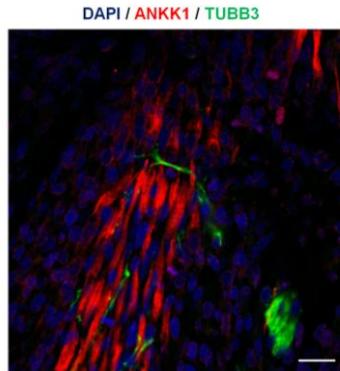
NCAM1 se expresa en células miogénicas activadas durante la proliferación y la diferenciación hasta la formación de fibras regenerativas en humanos [87], también en ratas [88], mientras que está principalmente expresada en estadios iniciales de diferenciación en mioblastos murinos [89]. Además, se ha descrito que NCAM1 marca poblaciones no proliferativas de células adultas miogénicas comprometidas a diferenciación en cultivos primarios derivados de músculo de ratón [90] y se expresa activamente en fibras en regeneración en diferentes patologías neuromusculares [91,92]. Estos hallazgos, junto con la proximidad genómica entre *ANKK1* y *NCAM1*, apuntan a la posible participación de *ANKK1* en procesos celulares relacionados con el desarrollo y regeneración de músculo esquelético.

2) Como se ha detallado previamente, RIP2 es un importante regulador de la proliferación y diferenciación mioblástica, siendo su reducción un requisito para su correcta diferenciación [56,57]. En este último trabajo además estudian la expresión en mioblastos humanos y murinos de los cuatro miembros de la familia RIP con mayor similitud estructural a *ANKK1*. En mioblastos murinos C2C12 en proliferación se detectó la expresión de *Rip1*, *Rip2*, *Rip3* y *Rip4*, siendo los niveles basales de *Rip2* y *Rip3* más elevados; tras la diferenciación, la expresión de todos ellos disminuía en mayor o menor medida, siendo esta reducción más considerable de nuevo en *Rip2* y *Rip3* y, coincidiendo con resultados previos en el caso de *Rip1* y *Rip2* [56,57]. El estudio en diferentes líneas procedentes de mioblastos humanos de Rhabdomyosarcoma mostró resultados variables, ya que no se detectó la reducción de *RIP1* y *RIP2* tras la diferenciación y ni siquiera se halló la expresión de *RIP3* y *RIP4* en estas líneas. Los autores ya apuntaron a la expresión de *RIP5* (*ANKK1*) en mioblastos humanos. La similitud estructural de *ANKK1* con estos cuatro miembros de su familia podría sugerir que esta proteína también se exprese en precursores de músculo esquelético y esté implicada en este tipo de procesos.

3) A pesar de que hasta la fecha toda la literatura relacionada con *ANKK1* se ha centrado en cerebro, no podemos dejar de lado el hecho de que *ANKK1* se expresa en muchos otros tejidos: Neville y colaboradores [1] detectaron su expresión en placenta y médula espinal, mientras que estudios llevados a cabo por nuestro grupo [19] encontraron su expresión además en hígado, pulmones, hueso, bazo y corazón. A raíz de los estudios de desarrollo, encontramos además que *ANKK1* se expresa en las regiones donde se localizan los precursores

## Introducción

musculares derivados de los somitas en el embrión (Fig. 7), estructuras que se encargarán del desarrollo y formación de los futuros músculos adultos.



**Figura 7. Inmunofluorescencia de embrión murino E14.5 mostrando el patrón de expresión de ANKK1 en los primordios musculares que darán lugar a los músculos del tronco.** Se observan los núcleos teñidos con DAPI, ANKK1 (rojo) y el marcador neuronal  $\beta$ 3-Tubulina (TUBB3, verde). Escala: 25  $\mu$ m.

Estas observaciones, junto con los antecedentes previamente mencionados a lo largo de este apartado, plantean la posibilidad de que ANKK1 esté relacionada con procesos de desarrollo y diferenciación de músculo esquelético. Por este motivo, resulta interesante estudiar esta relación ya que el conocimiento de la expresión de ANKK1 en nuevos tejidos podría ayudar a elucidar el papel biológico de esta proteína.

## 1.5. ORIGEN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO EN VERTEBRADOS

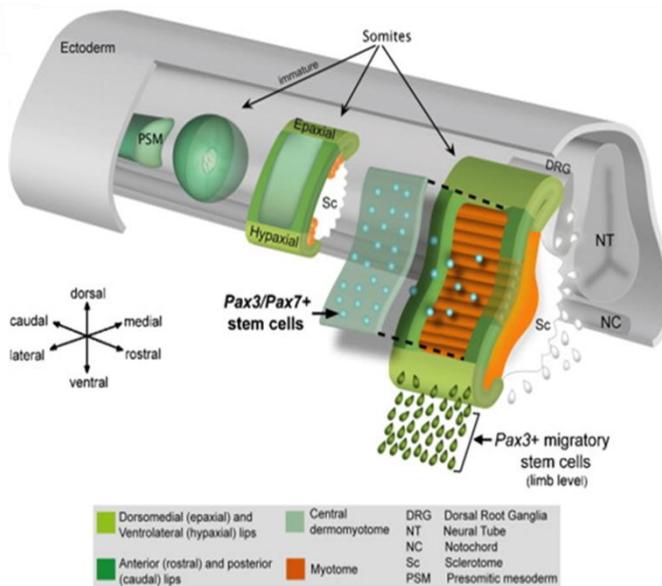
### 1.5.1. FORMACIÓN DE LOS MÚSCULOS EN EL EMBRIÓN

La mayor parte de los músculos del cuerpo y algunos músculos de la cabeza se originan a partir del mesodermo paraxial presomítico (PSM), que se segmenta en unas estructuras embrionarias conocidas como somitas dispuestas a ambos lados del tubo neural y notocorda [93]; mientras que el resto de músculos de la cabeza se originan a partir del mesodermo paraxial de la cabeza (localizado anterior al primer somita formado) y del mesodermo precordial [93].

En modelo murino, el primer somita se forma a día embrionario (E) E8 (Fig. 8). Durante la gastrulación, las futuras células precursoras somíticas van rellenando el mesodermo presomítico (esfera epitelial rodeada por un núcleo mesenquimal), conformando así la unidad somítica. Los somitas se producen continuamente en pares a cada lado del neuraxis hasta unos días después de la mitad de la gestación (E13.5) [93]. Durante el curso de la maduración somítica, el compartimento ventral (adyacente a la notocorda) se dispersa primero en células esclerotomales, que darán lugar a tejidos como hueso y cartílago, mientras que la región dorsal del somita retiene un dermomiótomo epitelial que contribuirá a la formación de músculo esquelético, dermis dorsal y costillas distales (Fig. 8). Este dermomiótomo sirve en parte como fuente de células progenitoras musculares (MPCs): los progenitores en el labio dorsomedial del dermomiótomo son los primeros en comprometerse a la miogénesis. Estos migran bajo el dermomiótomo para la formación del miótomo subyacente (primera masa muscular que se forma, [94]) donde diferencian hacia miocitos mononucleados que están asociados a los ejes anterior (rostral) y posterior (caudal) del somita. Los progenitores del labio ventrolateral siguen al primero, contribuyen al crecimiento del miótomo y migran para la formación de masas musculares más distales.

Las MPCs que migran al miótomo forman un compartimento de células principalmente post-mitóticas que diferencian directamente a músculo esquelético bajo el epitelio del dermomiótomo. Inicialmente, se generan miótomos separados: epaxial (dorsal, adyacente al tubo neural y notocorda, dará lugar a los músculos de la espalda) e hipaxial (ventral, dará lugar al resto de la musculatura y extremidades). A medida que los miótomos epaxial e hipaxial se desarrollan, se fusionan para formar una capa continua de miótomo, que constituirá el primer tejido muscular embrionario (Fig. 8).

## Introducción



**Figura 8. Modelo de formación de músculo esquelético a partir de MPCs en embrión murino.** El PSM se segmenta en somites. La región dorsal de los somites (dermomyotomo) contiene MPCs que migran por debajo de este para formar el miotomo y forman miocitos mononucleados. Las MPCs que expresan PAX3/PAX7 de la porción central del dermomyotomo (representado como una capa suprayacente desplazada) alcanzan el miotomo para asegurar el crecimiento muscular, suponiendo los primeros esbozos de los músculos del tronco. Los progenitores del labio ventrolateral migran para establecer los músculos de las extremidades. En el ratón estos expresan PAX3 pero no PAX7. No todos los ganglios de la raíz dorsal (DRGs) están indicados; sólo se ilustran somites representativos a lo largo del eje rostro-caudal; las yemas epiteliales nacientes esféricas del PSM mesenquimal se localizan más caudalmente; el miotomo y esclerotomo extienden su anchura a cada somita; una vez los somites se disocian, las miofibras se fusionan a lo largo del eje rostro-caudal de los bordes de los somites previos. DRG: ganglios de la raíz dorsal; NT: Tubo neural; NC: Notocorda; Sc: Esclerotomo; PSM: Mesodermo presomítico (tomada de Sambasivan *et al.*, 2007 [95]).

La migración es por lo tanto un proceso clave para conseguir una correcta morfogénesis durante el desarrollo embrionario. La migración de una célula individual se regula de manera intrínseca y consiste en cuatro pasos [96]:

1. **Polarización:** orientación de la célula hacia la dirección de la migración. Es un proceso complejo muy coordinado que afecta a toda la extensión celular y en la que el citoesqueleto ejerce un papel clave.
2. **Protrusión:** formación de prolongaciones en el eje activo. Los filamentos de actina se polarizan en el eje de avance y empujan a la membrana hacia la dirección de la migración.
3. **Adhesión:** las prolongaciones así formadas deben unirse a las matrices celulares adyacentes para estabilizarse, que a su vez servirán de soporte a la célula para avanzar. Las integrinas tienen un papel clave en la adhesión focal.
4. **Retracción:** a medida que la célula avanza, el eje retractor se repliega para permitir el avance celular. La liberación de las adhesiones focales de este eje permite mantener la polaridad del eje activo e iniciar un nuevo ciclo migratorio.

La migración de una célula aislada se asemeja notablemente a la de un colectivo de células [97]. La migración celular colectiva es la capacidad de un grupo de células para moverse juntas y simultáneamente, afectando el comportamiento de unas a otras ya sea a través de conexiones estables o transitorias [98]. La migración colectiva requiere coordinación y cooperación entre las células migratorias y tiene una gran importancia a la hora de orquestar complejos eventos morfogénicos durante el desarrollo embrionario.

### **1.5.2. MIOGÉNESIS PRIMARIA Y SECUNDARIA**

La fusión de mioblastos durante la embriogénesis ocurre en dos estadios conocidos como miogénesis primaria y secundaria [99], que resultará en músculos individuales compuestos por múltiples miofibras. Durante la miogénesis primaria, los mioblastos embrionarios se fusionan para formar las fibras primarias (células musculares multinucleadas que aparecen temprano en el desarrollo embrionario). Algunos días después aumenta la prevalencia de los mioblastos fetales (células progenitoras musculares proliferativas presentes en el desarrollo tardío del embrión), que se fusionan entre ellos para formar las miofibras secundarias, desarrollándose cerca de las miofibras primarias [100]. Al final del desarrollo, el músculo alcanza un estado maduro y aparece un tercer tipo de célula precursora muscular, la célula satélite (SC) [101]. Los mioblastos derivados de SCs serán los responsables del crecimiento y regeneración del músculo esquelético adulto [102,103,104].

## **1.6. GENERALIDADES DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO ADULTO**

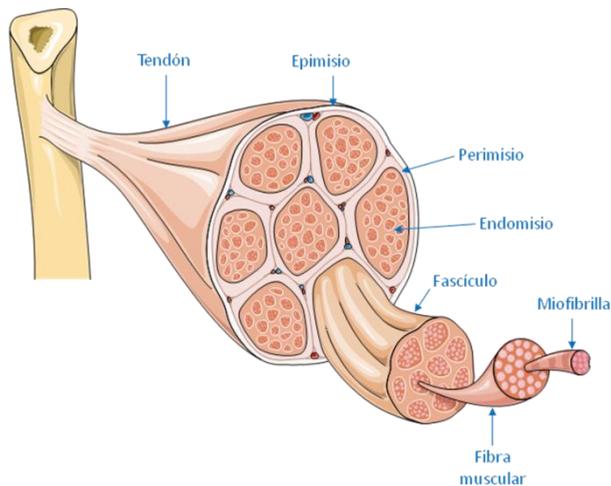
### **1.6.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES**

El músculo esquelético adulto es un tejido post-mitótico altamente organizado, jerarquizado y estructurado, que supone alrededor del 40% del peso corporal. Tiene una capacidad extraordinaria de regeneración en respuesta a herida o ejercicio, teniendo las SCs un papel esencial en este proceso.

El músculo está rodeado por el epimisio (Fig. 9), una matriz de tejido conectivo formado por fibras de colágeno reticuladas que se prolongan hasta los extremos distal y proximal y conforman los tendones. En las inmediaciones del tejido conectivo se localizan los vasos sanguíneos y fibras nerviosas que aumentan su tamaño a medida que salen del músculo. La vascularización es esencial para el funcionamiento muscular, para el intercambio metabólico de nutrientes y oxígeno y eliminación de sustancias de desecho (ácido láctico, CO<sub>2</sub>). En cuanto a la inervación muscular, cada fibra está en contacto con una terminación nerviosa que regula su actividad y que transmite las órdenes procedentes del sistema nervioso central.

## Introducción

Los músculos están organizados en paquetes musculares o fascículos encapsulados por una nueva capa de tejido conectivo, el perimisio. A su vez, los fascículos musculares agrupan conjuntos de entre 20-80 fibras musculares, rodeadas por una fina capa de tejido conectivo llamada endomisio (Fig. 9). La fibra muscular o miofibra es la unidad contráctil más pequeña del músculo. En la mayor parte de músculos esqueléticos, los fascículos contienen dos o más tipos de fibras, aunque en un músculo completo suele predominar un tipo específico de fibra.



**Figura 9. Estructura del músculo esquelético.** Esquema de la estructura del músculo esquelético, rodeado por el epimisio y organizado en fascículos de fibras que a su vez están rodeadas por el perimisio. Las fibras musculares están recubiertas por el endomisio y están compuestas por las miofibrillas, que son las unidades básicas de contracción muscular (adaptado de Medical Art (Servier: [https://smart.servier.com/smart\\_image/tendon-anatomy/](https://smart.servier.com/smart_image/tendon-anatomy/))).

El tejido muscular posee una serie de propiedades que le permiten llevar a cabo sus funciones específicas:

- **Excitabilidad:** capacidad de responder a estímulos.
- **Contractibilidad:** capacidad de contraerse ante un estímulo. Se trata de una propiedad única del tejido muscular.
- **Elasticidad:** propiedad física del músculo que permite a las fibras acortarse y recuperar su longitud tras un estiramiento.
- **Extensibilidad:** capacidad de estiramiento de las fibras.
- **Plasticidad:** capacidad de modificar su estructura en función del trabajo, esto es, de adaptar la prevalencia de un tipo específico de fibra.

Estas propiedades hacen que la función principal del músculo sea la producción del movimiento de órganos y segmentos óseos [105], ya sea para locomoción o respiración. Según su función específica, se clasifica en músculo cardíaco, liso y esquelético o estriado, siendo este último el causante de los movimientos de los segmentos óseos.

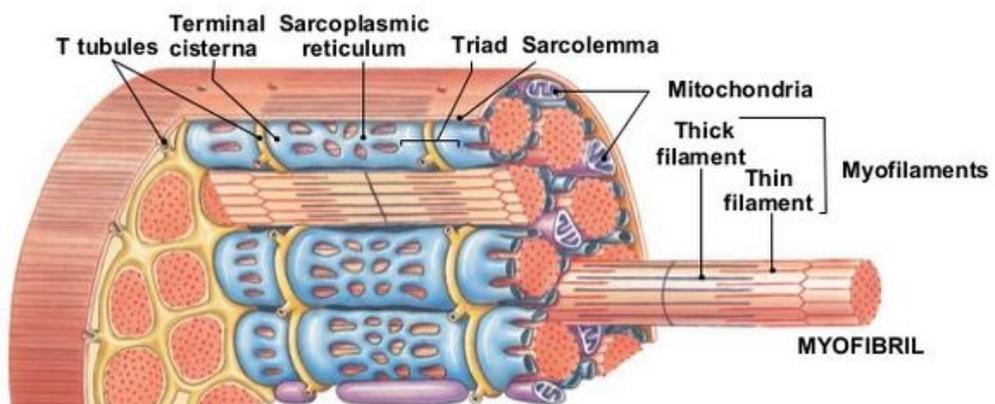
## 1.6.2. CLASIFICACIÓN

Los músculos esqueléticos a su vez se pueden clasificar atendiendo al tipo de movimiento en el que participan (agonistas y antagonistas), al número de articulaciones que atraviesan (uniarticulares o biarticulares), a su distribución con respecto al tendón (fusiformes, multipenados, etc.) o a su forma (plano, circular, ancho, largo o corto) [105]. Hay 640 músculos esqueléticos únicos, funcional y anatómicamente diferentes según su origen embrionario, posición (forma de los músculos y patrón de inserciones óseas), propiedades fisiológicas (velocidad de acortamiento y resistencia a fatiga), rutas reguladoras miogénicas, requerimientos energéticos, tamaño de las unidades motoras (número de fibras motoras que cada motoneurona inerva) y propiedades funcionales de las mismas. Otros subniveles de heterogeneidad del músculo esquelético lo proporcionan los diferentes tipos de fibras musculares y la pluralidad de las SCs, que se describen en los apartados posteriores. La diversidad muscular, del tipo de fibra y de las SCs puede afectar a la susceptibilidad de diferentes músculos y fibras a enfermedades y a la distinta capacidad de regeneración muscular.

## 1.7. LA FIBRA MUSCULAR

### 1.7.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN

La fibra muscular es cada una de las células que conforma un músculo. Se trata de una célula alargada, con longitud variable desde milímetros a centímetros, y de sección transversal casi circular y diámetro entre 10 y 100  $\mu\text{m}$  (Fig. 10). Es una célula multinucleada cuyos núcleos se disponen en la periferia, y resulta de la fusión de mioblastos durante el desarrollo embrionario y crecimiento postnatal o de las SCs durante la regeneración adulta.

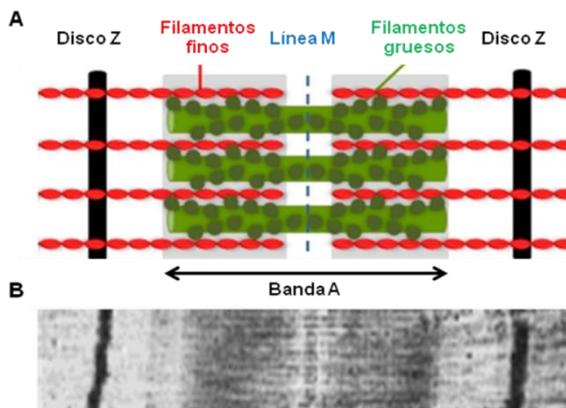


**Figura 10. Anatomía de una fibra muscular esquelética** (Figura tomada de StudyBlue, Universidad de Kansas: <https://www.studyblue.com/notes/n/skeletal-muscle-histology/deck/7534470>).

## Introducción

La fibra muscular está rodeada por el sarcolema, membrana bilipídica en la que se alojan una serie de canales que permiten el paso de iones. Con el fin de que los estímulos externos puedan penetrar en la fibra, el sarcolema presenta invaginaciones tubulares que constituyen un sistema de túbulos longitudinales y transversales denominados túbulos T. El sarcoplasma es el citoplasma de la célula muscular, donde residen los orgánulos esenciales para la función celular. Dentro de los orgánulos que ejercen un papel en el proceso de contracción se encuentra el retículo sarcoplásmico, que rodea los túbulos T y forma estructuras que acumulan grandes cantidades de calcio y permite el paso del potencial de acción necesario para la contracción. Otro orgánulo crucial son las mitocondrias o sarcosomas, que transforman la energía vía la formación de Adenosin trifosfato (ATP), y junto con las gotas lipídicas y el glucógeno cubren el aporte metabólico para la función muscular. El componente fundamental del citoesqueleto de las fibras musculares son las miofibrillas, con 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, responsables de la apariencia estriada del músculo. Se disponen longitudinalmente a lo largo de la fibra y están constituidas por proteínas encargadas de la contracción. Las miofibrillas están formadas fundamentalmente por dos tipos de miofilamentos: filamentos gruesos (formados por moléculas de miosina) y finos (formados por moléculas de actina) que se organizan en sarcómeros, unidad mínima funcional contráctil básica y repetitiva.

La observación del sarcómero bajo diferentes técnicas microscópicas [26] permitió definir las proteínas que contiene. Cada sarcómero está delimitado por los discos Z (banda oscura) (Fig. 11). Esta estructura está compuesta principalmente por  $\alpha$ -actinina, desmina, vimetina, y junto con nebulina proporciona soporte posicional a los filamentos de actina. La banda I (banda clara) está compuesta principalmente por filamentos de actina y rodea al disco Z. Estos filamentos de actina se expanden a una banda oscura anisótropa conocida como banda A (Fig. 11), que está dividida por la zona H. Esta banda está compuesta por filamentos gruesos de miosina y está interrumpida por una banda más oscura, la banda M, que solo contiene filamentos de miosina (Fig. 11). Expandiéndose del disco Z a la banda M hay un filamento de titina (conectina), que no solo proporciona soporte estructural pero también sirve de ensamblaje de la maquinaria contráctil [106].



**Figura 11. Representación esquemática del sarcómero.** (A) Ilustración de las partes elementales de un sarcómero. (B) Imagen de microscopía electrónica de un sarcómero (adaptada de Torre *et al.*, 2014 [107]).

Las miosinas son las principales proteínas sarcoméricas del músculo esquelético. Se trata de moléculas hexaméricas que consisten en dos subunidades de cadena pesada y cuatro subunidades de cadena ligera; el dominio globular Nt de la cabeza contiene sitios de unión para actina y ATP. Existen diferentes isoformas de miosina de cadena pesada (MyHC) que permitirán la clasificación de las fibras musculares.

## 1.7.2. CLASIFICACIÓN

Las fibras musculares presentan un elevado nivel de especialización y fueron inicialmente clasificadas según sus propiedades citoarquitectónicas, criterios establecidos por primera vez por Brooke y Kaiser [108]. Hoy en día se pueden clasificar en dos grandes grupos en función de los siguientes criterios:

- La expresión de isoformas específicas de MyHC.
- Las rutas de metabolismo energético que utilizan.

### 1.7.2.1. Según la isoforma de miosina de cadena pesada

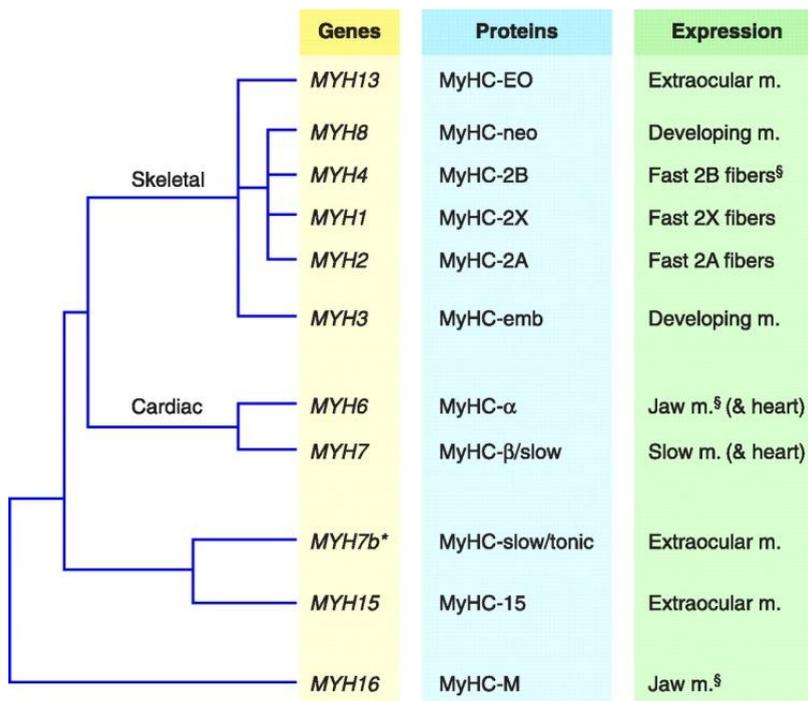
Atendiendo a la presencia de isoformas específicas de MyHC, actualmente en mamíferos se pueden distinguir cuatro tipos de fibras musculares esqueléticas [109]:

- Fibras lentas o tipo I: expresan MyHCI, codificada por el gen *MYH7* (Fig. 12). Esta isoforma se expresa tanto en músculo esquelético como en músculo cardíaco.
- Fibras rápidas o tipo II: expresan MyHCII, a su vez se dividen en los siguientes subtipos [110]:
  - Tipo IIA: expresan MyHC-IIA, codificada por el gen *MYH2*.
  - Tipo IIX: expresan MyHC-IIX, codificada por el gen *MYH1* [111].
  - Tipo IIB: expresan MyHC-IIB, codificada por el gen *MYH4* (Fig. 12)

Estas cuatro poblaciones de fibras se pueden encontrar en muchas especies de mamíferos, incluidos ratones y ratas, mientras que en la mayoría de los músculos humanos, sólo las tipo I, IIA y IIX están presentes [112]. Se especula que MyHC-IIB no se expresa a nivel de proteína, aunque se ha detectado su ARNm en músculos humanos especializados [113,114] y en las extremidades de pacientes que sufren Distrofia Muscular de Duchenne [115], lo que podría sugerir que en humanos, el gen que codifica para MyHC-IIB se podría reactivar en músculo esquelético que sufre procesos de degeneración/regeneración.

Además de las MyHCs específicas de músculo esquelético, se pueden encontrar otras isoformas de MyHC en músculo adulto:

- MyHCs del desarrollo: MyHC embrionaria (eMyHC) y MyHC perinatal/neonatal (nMyHC), localizadas particularmente en músculos en regeneración (codificadas por *MYH3* y *MYH8*, respectivamente [113] (Fig. 12).
- MyHCs específicas de músculos concretos: MyHC- $\alpha$  (isoforma específica cardíaca), MyHC-extraocular (isoforma especializada de los músculos extraoculares codificada por *MYH13*) [116,117,118]; en los últimos años se han identificado genes adicionales de MyHC sarcoméricas: MyHC tónica lenta, MyHC15 (ambas expresadas en los músculos extraoculares) codificadas por *MYH7b* y *MYH15* [119]; MYHC16 expresada en mandíbula [120,121] (Fig. 12).



**Figura 12. Panel completo de los genes de MYH sarcomérica en mamíferos con los correspondientes productos proteicos y su patrón de expresión.** La relación evolutiva entre los genes *MYH* se indica en el árbol filogenético a la izquierda. El espacio y la longitud de las ramas no reflejan la escala real. Únicamente las fibras musculares extrafusales se tienen en cuenta para el patrón de expresión. <sup>§</sup> Expresión sólo en mamíferos. MYH7b\*, también referido como *MYH14*, se expresa tanto en músculos lentos como en corazón a nivel de transcrito, pero únicamente en músculos extraoculares a nivel de proteína. (Esquema modificado de Rossi *et al.*, 2010 [119] en Schiaffino y Reggiani 2011 [122]).

En humanos, las diferentes isoformas de MyHC se pueden expresar en fibras únicas (fibras tipo I, IIA y IIX), o bien se pueden expresar en diferentes proporciones en fibras híbridas (I/IIA – IIA/IIX – I/IIA/IIX – IIX/IIB) [123]. Las fibras híbridas pueden representar una transición hacia una isoforma dependiente de un estímulo [124]. La proporción de fibras híbridas depende de diferentes factores, como la edad (menor proporción en ancianos, [125]), el género (menor proporción

en mujeres), o la actividad física (menor proporción en personas con entrenamiento de resistencia [125]).

### 1.7.2.2. Según la ruta de metabolismo energético

La isoforma específica de MyHC que expresa una fibra muscular, y en particular su actividad ATPasa, determina el ratio de contracción de la misma [108,126]. Atendiendo a las características contráctiles y morfológicas y al sistema energético predominante para la obtención de energía, las fibras musculares se clasifican en dos grandes grupos:

- Fibras de contracción lenta, oxidativas o fibras rojas: Generalmente son fibras de pequeño diámetro, inervadas por una densa red de capilares y se les denomina “rojas” por tener elevados niveles de mioglobina. Son resistentes a fatiga y se basan en el metabolismo oxidativo para obtener energía, por lo que tienen un elevado número de mitocondrias con crestas compactas, alto contenido enzimático oxidativo, bajos niveles de glucógeno y enzimas glicolíticas. Presentan baja actividad miosina ATPasa.
- Fibras de contracción rápida, glicolíticas o blancas: Normalmente se trata de fibras de mayor diámetro, que están inervadas por una red menos densa de capilares y tienen bajos niveles de mioglobina. Son menos resistentes a fatiga y obtienen la energía del glucógeno almacenado y la fosfocreatina, empleando preferentemente un metabolismo glicolítico para la obtención de energía, ya que tienen pocas mitocondrias y bajo contenido enzimático oxidativo. Presentan elevada actividad miosina ATPasa.

Las fibras tipo I son oxidativas, las fibras tipo IIb son glicolíticas, mientras que las fibras tipo IIa (rojas o intermedias) presentan características comunes con las fibras tipo I en cuanto a resistencia a fatiga, metabolismo oxidativo y contenido en mioglobina, sin embargo contienen abundante glucógeno y mayor número de mitocondrias, lo que asegura una adecuada producción de ATP para compensar el aumento de la hidrólisis del mismo en este tipo de fibras de contracción rápida.

A continuación se describen brevemente las características principales de los sistemas de obtención de energía de cada tipo de fibra muscular.

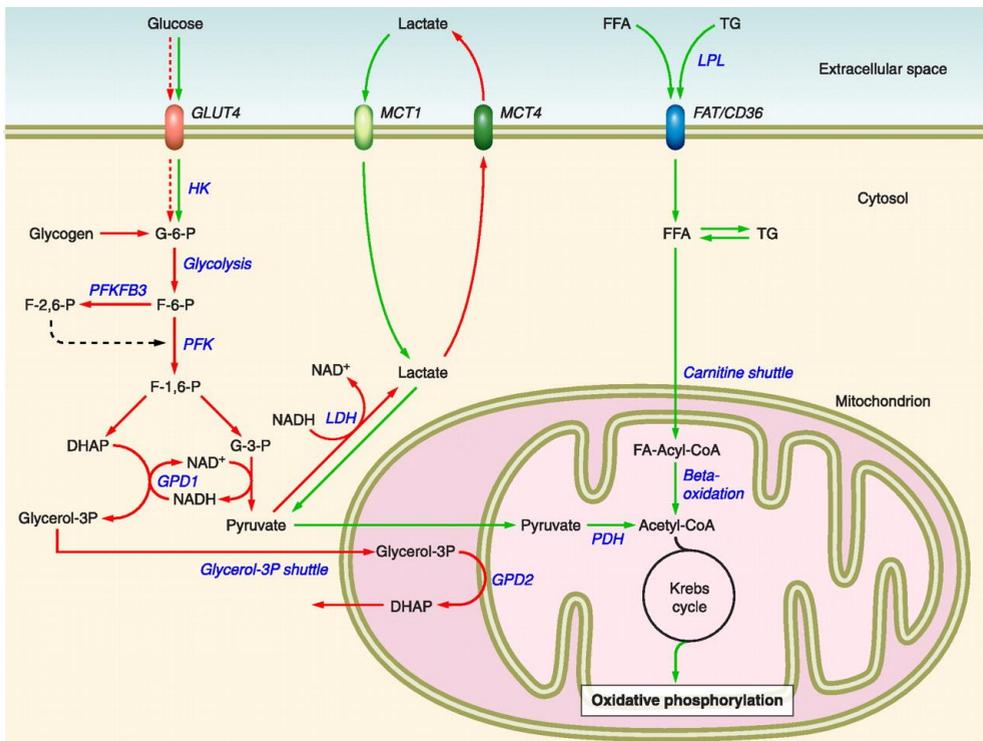
#### 1.7.2.2.1. El sistema glicolítico anaerobio

La producción de energía vía glicólisis tiene lugar en el sarcoplasma del músculo esquelético, por el metabolismo de los carbohidratos (en forma de glucosa sanguínea o de glucógeno muscular) a piruvato [127], liberándose energía en forma de ATP que permitirá la contracción (Fig. 13). La glicólisis es un sistema ineficiente, ya que por cada molécula de oxígeno se producen dos moléculas de ATP para la contracción, no obstante, dada la elevada concentración de enzimas glicolíticos así como la velocidad de estas reacciones, se consigue generar rápidamente mucha energía para la acción muscular. En este proceso también se

genera ácido láctico, que será retirado por las fibras musculares glicolíticas a las fibras oxidativas, donde el lactato podrá ser oxidado en la mitocondria.

### 1.7.2.2.2. El sistema oxidativo aerobio

Se trata de un sistema energético muy importante en el cuerpo humano, ya que es la principal fuente de energía de muchas actividades. Se lleva a cabo en las mitocondrias, donde se produce la fosforilación oxidativa para la producción de ATP. La fosforilación oxidativa incluye el ciclo de Krebs (también llamado ciclo del ácido cítrico o ciclo de los ácidos tricarbónicos) y la cadena de transporte de electrones (Fig. 13). La energía se obtiene tanto a partir de los carbohidratos (glucosa y glucógeno) como de las grasas (triglicéridos y ácidos grasos). Se trata de un sistema muy eficiente, ya que a partir de una molécula de glucosa se obtienen 36 moléculas de ATP (18 veces más que en el sistema anaerobio). Además de proporcionar energía para la contracción muscular, el sistema aerobio se emplea para mantener la homeostasis celular en el tejido muscular, mediante el procesamiento del ácido láctico a través del ciclo de Krebs.



**Figura 13. Esquema de las diferencias en el metabolismo de glucosa, lactato y ácidos grasos entre fibras rápidas y lentas.** Las rutas prevalentes en las fibras rápidas o lentas se muestran en flechas rojas o verdes, respectivamente. DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GLUT4, transportador de glucosa 4; F-6-P, fructosa-6-fosfato; F-2,6-P, fructosa-2,6-bisfosfonato; G-3-P, gliceraldehído-3-fosfato; G-6-P, glucosa-6-fosfato; GPD1, glicerolfosfato deshidrogenasa 1 (citoplasmática); GPD2,

glicerolfosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial); HK, hexoquinasa; LDH, lactato deshidrogenasa; MCT1, transportador de ácido monocarboxílico 1; MCT4, transportador de ácido monocarboxílico 4; PDH, piruvato deshidrogenasa; PFK, fosfofructoquinasa 1; PFKFB3, 6-fosfofructo-2-quinasa; TG, triglicéridos (tomada de Schiaffino y Reggiani, 2011 [122]).

Desde el punto de vista estructural, energético y funcional, las fibras musculares proporcionan un segundo nivel de heterogeneidad al músculo esquelético. A esta variabilidad hay que añadir la heterogeneidad de las células progenitoras de músculo, las SCs, que se encargan del crecimiento y reparación muscular y de cuyas propiedades dependerá principalmente la capacidad regenerativa de los músculos que las contienen.

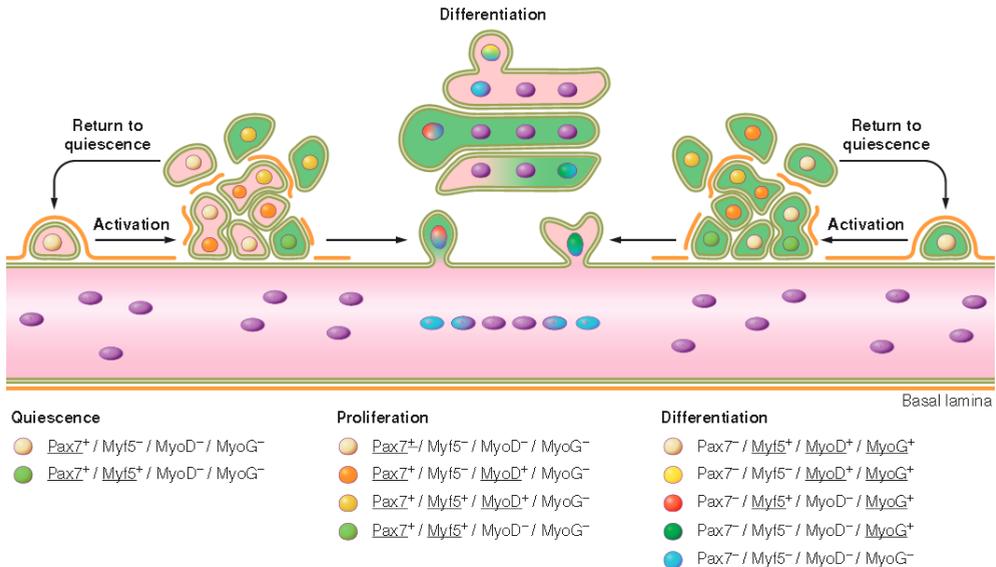
### **1.8. LAS CÉLULAS SATÉLITE**

Las SCs fueron descubiertas por Alexander Mauro en 1961 [128]. Las SCs suponen en torno al 30-35% en todas las fibras musculares de ratón postnatal, pero en adultos disminuyen a un 2.5-6% [129,130]. Basado en análisis de microscopía electrónica, las SCs se localizan entre la lámina basal y adyacentes al sarcolema de las fibras musculares, y se encuentran en un estado mitóticamente quiescente [128].

#### **1.8.1. MECANISMO DE REGENERACIÓN**

Inicialmente, las SCs son mitóticamente quiescentes (fase G0) y residen en un nicho sublaminaar. Cuando se produce una herida o daño muscular, se altera el nicho que rodea a la SC, conduciendo al deterioro de la lámina basal y a la activación de la SC, su salida del estado quiescente e inicio de la proliferación. Después de varias rondas de proliferación, las SCs proliferativas (células precursoras miogénicas o mioblastos) comienzan a formar sincitios de miofibras contráctiles, que finalmente diferencian a miocitos y se fusionan sobre las fibras existentes para reparar el músculo dañado [131]. Mientras forman las nuevas fibras, una fracción minoritaria de SCs se autorrenueva y vuelve al estadio quiescente [132] (Fig. 14). Esta capacidad es responsable del mantenimiento de un subconjunto de SCs preparado para participar en la regeneración repetitiva del músculo. Dado que las SCs son capaces de generar un gran número de SCs y mionúcleos en músculo en regeneración y puesto que son autosuficientes como fuente de células miogénicas [132] se puede afirmar que funcionan como verdaderas células madre de músculo.

## Introducción



**Figura 14. Activación de SCs, diferenciación y fusión.** El programa miogénico está coordinado por factores transcripcionales que regulan la progresión desde la quiescencia, activación, proliferación y diferenciación/autorrenovación de las SCs. Las SCs quiescentes expresan *Pax7* y *Myf5* pero no *MyoD* o *MyoG*. La SC proliferativa y su progenie se refieren a menudo como MPC o mioblasto adulto, los cuales expresan los factores de transcripción *MyoD* y *Myf5*. Tras varias rondas de proliferación, los mioblastos adultos comienzan a diferenciar mediante la regulación a la baja de *Pax7*. El inicio de la diferenciación terminal y la fusión comienzan con la expresión de *MyoG*, que junto con *MyoD* activan genes específicos de músculo que producen proteínas estructurales y contráctiles. Durante la regeneración, las SCs activadas tienen la capacidad de volver a la quiescencia para mantener una población de reserva de SCs, capacidad que es crucial para la integridad muscular a largo plazo. *Pax7*: gen que codifica para la proteína *Paired domain transcription factor family 7*; *Myf5*: gen que codifica para el Factor miogénico 5; *MyoD*: gen que codifica para el factor 1 de diferenciación miogénica; *MyoG*: gen que codifica la proteína Miogenina (tomada de Yin *et al.*, 2013 [133]).

### 1.8.2. BIOMARCADORES

El programa transcripcional que regula el mantenimiento de las SCs en un estadio de células miogénicas indiferenciadas depende de los factores de transcripción *Pax3* y *Pax7*. *Pax3* se expresa inicialmente en el PSM durante el desarrollo y se requiere para la formación de los músculos hipaxiales (incluyendo los de las extremidades), la supervivencia y la migración [134] y su presencia en SCs adultas depende del tipo muscular [135]. Tiene un papel clave en mantener la proliferación y prevenir la diferenciación miogénica temprana y muerte por apoptosis [136], y es regulado a la baja durante la activación de SCs. Por su parte, *Pax7* codifica para el principal factor de transcripción que define este tipo celular, siendo fundamental para el crecimiento del músculo postnatal [137] y, una vez las SCs residen en el músculo adulto, para el mantenimiento de su estado indiferenciado y el desarrollo, supervivencia y regeneración de la población de reserva [138] (Fig. 14). *PAX7* se expresa por tanto en SCs quiescentes y activadas.

Además de la familia de proteínas PAX, se han descrito muchos otros marcadores de SCs (Anexo 1) sin embargo estas proteínas individuales no se expresan exclusivamente en SCs.

Asimismo, existen cuatro factores de regulación miogénica (MRFs) *basic hélix-loop-helix*: *MyoD1*, *Myf5*, *MRF4* y *MyoG*, que se expresan secuencialmente para coordinar el proceso de regeneración muscular (Fig. 14) [139]. La regulación al alza de *Myf5* seguida de *MyoD* mediada por *Pax7*, ambos expresados en la fase proliferativa de la SC, se requiere para la determinación miogénica [140,141], mientras que *Mrf4* y *MyoG* actúan aguas abajo para dirigir el avance hacia la diferenciación terminal y salida del ciclo celular [142].

### 1.8.3. CLASIFICACIÓN

Las SCs se caracterizan por su elevada heterogeneidad, que se evidencia en función de diversos aspectos:

- Estadio postnatal (joven vs adulto).
- Posición anatómica: las SCs son heterogéneas en función del músculo en el que se encuentran, lo que se podría correlacionar con su origen embrionario (somático vs no somático). Se encuentran además diferencias entre SCs según si el músculo es de contracción lenta o rápida, ya que las SCs podrían generar exclusivamente fibras rápidas cuando proceden de un músculo de contracción rápida, mientras que podrían generar tanto fibras lentas como rápidas cuando proceden de un músculo de contracción lenta [143,144,145].
- Morfología: existen SCs más redondeadas y con un mayor ratio núcleo/citoplasma y bajo número de mitocondrias (en estadio más quiescente) y SCs más grandes, con más citoplasma y orgánulos (más comprometidas a diferenciación miogénica) [146].
- Velocidad de división celular: las SCs de división más lenta son capaces de autorrenovarse a largo plazo, mientras que las SCs de división más rápida están comprometidas al linaje miogénico sin la producción de progenie de autorrenovación [147]. En este sentido, la subpoblación más comprometida podría participar en la regeneración del músculo herido antes que la subpoblación más progenitora [148].
- Actividad metabólica: durante la transición del estado quiescente al proliferativo, las SCs experimentan una reprogramación metabólica desde la oxidación de ácidos grasos hacia la glicólisis [149].
- Nivel de Pax7: se distingue una subpoblación con bajo contenido en Pax7 (más quiescente, actividad metabólica reducida y entrada retardada en el ciclo celular tras estimulación) frente a una subpoblación con elevado contenido en Pax7 (entra más rápidamente al ciclo celular) [150].

### 1.8.4. MECANISMOS REGULADORES DE QUIESCENCIA Y ACTIVACIÓN

Para una correcta homeostasis muscular se requiere un balance entre la diferenciación de SCs y la autorrenovación, este último mecanismo regulado de dos maneras diferentes en la división celular: una división asimétrica (una

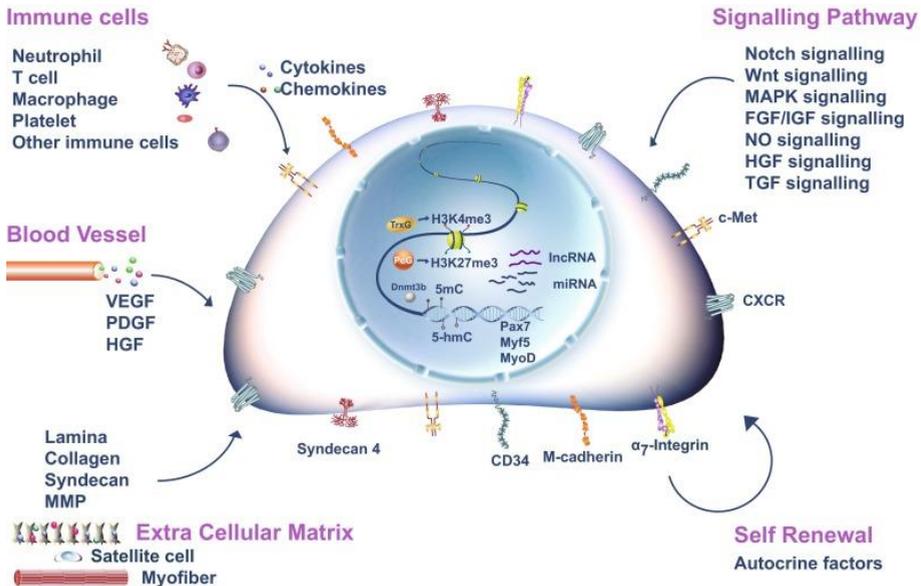
población mayoritaria de células genera células hijas comprometidas al linaje miogénico, mientras que una pequeña subpoblación da lugar a células hijas autorrenovadoras) y una división simétrica, en la que la célula madre da lugar a dos células hijas idénticas.

Los mecanismos fundamentales para el mantenimiento de la quiescencia de SCs se han relacionado con la señalización Notch, ruta que parece ser clave para la autorrenovación de SCs [151]; la familia de factores de transcripción *Forkhead box* (FOXO), siendo FOXO3 crucial para el mantenimiento de la quiescencia y autorrenovación [152]; y el decaimiento de determinados transcritos de ARN, particularmente la regulación a la baja de *MyoD* previene la entrada de SCs al programa miogénico [153], entre otros. Se trata de mecanismos de regulación post-traduccionales que de alguna manera son redundantes y dependen de subpoblación.

Cuando se produce un daño muscular (ya sea a causa de herida, hipertrofia fisiológica, atrofia de desuso o denervación), se producen cambios en el nicho de la SC así como cambios intrínsecos que promueven su activación. La activación de SCs se regula a diferentes niveles (Fig. 15):

- Disrupción de la lámina basal y de las fibras musculares: la alteración del nicho de la SC produce la rotura de la red de colágeno-laminina que ancla las SCs [154], lo que promueve la afluencia de calcio y la liberación del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) desde la matriz extracelular [155,156,157]. Las fibras dañadas también producen factores [158], desencadenando todos estos eventos la activación de las SCs quiescentes y la entrada en el ciclo celular (Fig. 15).
- Infiltración de células inmunológicas: en respuesta a herida así como en enfermedades degenerativas musculares, se produce la infiltración de grandes cantidades de células inmunológicas, iniciada por la invasión temprana de neutrófilos y seguida por la infiltración de macrófagos [159,160,161]. Estos liberan citoquinas que atraen más células inflamatorias que a su vez liberan factores que promueven la activación y proliferación de SCs [162,163] (Fig. 15).
- Vasos sanguíneos: la disrupción de los vasos sanguíneos produce la liberación de moléculas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o HGF, que promueven la activación y proliferación de SCs, mientras que la restauración de los vasos sanguíneos señala a las SCs el retorno al estado quiescente [164] (Fig. 15).
- Activación/inhibición de rutas de señalización: la inhibición de la ruta Notch activa p38 $\alpha$ /MAPK [165], resultando en el incremento de la expresión de *MyoD* y consecuente entrada en el ciclo celular. La elevada proliferación es necesaria para la reparación muscular, pero debe limitarse en el punto en el que cada célula hija deba determinarse (bien hacia quiescencia o hacia diferenciación terminal). La vía Wnt/ $\beta$ -catenina se activa temporalmente durante regeneración, pero después se regula a la baja para limitar la respuesta regenerativa [166]. Finalmente, mediante la ruta Janus quinasa/transductor de señal y activador de la transcripción (JAK-STAT) se interfiere en la expresión de *MyoD* para promover la diferenciación [167].

Para la salida del ciclo celular y el retorno a la quiescencia se requiere la inhibición de quinasas dependientes de ciclinas, tales como Sprouty1, que se expresa en células *Pax7+* quiescentes, se regula a la baja en mioblastos pero incrementa de nuevo al volver a la quiescencia, promoviendo la salida del ciclo celular inhibiendo la ruta ERK [168] (Fig. 15).



**Figura 15. Regulación de la activación de SCs.** Los marcadores específicos de superficie de las SCs están indicados en la membrana celular. Los factores de transcripción clave involucrados en la activación de SCs están indicados en el núcleo. Las rutas de señalización esenciales para la activación de SCs están indicadas. Los principales componentes del microambiente que afectan a la activación de SCs incluyen componentes de la matriz extracelular y tipos celulares adyacentes (células inmunes y vasos sanguíneos) y están ilustrados en la figura (tomada de Fu *et al.*, 2015 [169]).

A grandes rasgos, se podría decir que los factores que regulan los niveles de *Pax7* y *MyoD* podrían ser cruciales para guiar a las SCs en la transición entre la quiescencia y la activación.

De los apartados anteriores se deduce que los músculos esqueléticos presentan una elevada heterogeneidad a todos los niveles del desarrollo. Por una parte, las SCs presentan elevada heterogeneidad en cuanto a origen embrionario, posición anatómica, metabolismo y propiedades funcionales. A nivel de fibra muscular, encontramos diferentes tipos de fibras con propiedades, metabolismo y funciones variadas. El músculo completo presenta gran heterogeneidad en cuanto a posición anatómica, tipo de movimiento, propiedades fisiológicas y propiedades funcionales de las unidades motoras. Esta elevada diversidad a distintos niveles puede afectar tanto a la capacidad regenerativa como a la susceptibilidad de los diferentes músculos y fibras a distintas patologías musculares, siendo estas propiedades de especial importancia en las distrofias musculares.

## 1.9. DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades musculares degenerativas causadas por mutaciones en proteínas con funciones variadas como el mantenimiento de la estructura del sarcolema [170], de la envoltura nuclear [171,172,173], glicosilación post-traduccional [174] o unión a ARN [175,176]. Cada distrofia afecta específicamente a un subconjunto de músculos esqueléticos dado que éstos presentan diferencias biológicas que los predisponen a patologías concretas. En la Tabla 1 se resumen diferentes tipos de distrofias musculares que afectan a diversos grupos de músculos y son causadas por distintas proteínas. A continuación se describen las características de la distrofia muscular de Duchenne por ser la más frecuente entre este grupo de patologías.

Tipo de distrofia	Principales músculos afectados	Principales genes y/o proteínas afectadas	Referencias
Distrofia muscular de Duchenne y Becker	Músculo esquelético: extremidades (pantorrilla, muslos, brazos, hombros), diafragma, pélvico; y músculo cardíaco.	Distrofina	[177,178]
Miopatía distal	Músculos voluntarios próximos a manos y pies	19 proteínas, entre ellas, desmina, titina, disferlina, nebulina, caveolina 3, etc.	[179,180]
De cinturas	Tronco superior y pierna alta	Titina, Sarcoglicano, Fukitina, Lamina A/C o proteínas de procesamiento de ARN	[181,182,183]
Emery-Dreifuss	Extremidades y corazón	Lamina A/C	[184]
Facioescapulohumeral	Faciales y brazos	<i>FGR1, FGR2, ANT1, DUX4, DUX4c</i>	[185]
Miotónica	Cabeza, extremidades y diafragma	<i>DMPK</i> o <i>ZNF9</i>	[186,187,188]
Oculofaríngea	Craniofaciales	<i>PABPN1</i>	[175,189,190]
Congénita	Extremidades, cuello, lumbares, intercostales, diafragma, glúteos, paravertebrales.	<i>COL6A1, COL6A2, COL6A3, SEPN1</i>	[174,191,192, 193]

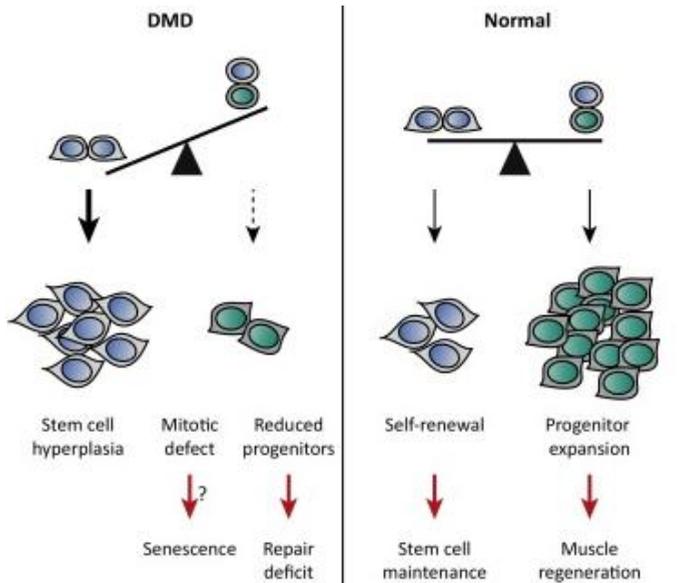
**Tabla 1. Clasificación de los principales tipos de distrofias musculares.** Se resumen los principales músculos afectados en cada distrofia, los principales genes y/o proteínas afectadas así como algunas referencias bibliográficas importantes en el campo. FGR1: proteína Feline Gardner-Rasheed Sarcoma Viral Oncogene Homolog 1; FGR2: proteína FGR2; ANT1: Translocasa de nucleótidos de Adenina tipo 1; DMPK: Proteína quinasa de Distrofia Miotónica; ZNF9: Proteína que contiene dominios de dedos de zinc; PABPN1: Proteína de unión a poliadenilato nuclear; COL1A1: Proteínas de colágeno tipo 1; COL1A2: Proteína de colágeno tipo 2; COL1A3: Proteína de colágeno tipo 3; SEPN1: Selenoproteína 1.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la distrofia muscular más prevalente, afectando a uno de cada 3600 varones nacidos en el mundo [194]. Se produce por mutaciones en el gen de la distrofina del cromosoma X [170]. La edad media de diagnóstico es a los 4 años, cuando aparecen los primeros síntomas [195]. La DMD se caracteriza por una pérdida muscular progresiva, disminución de la fuerza muscular (la pérdida de ambulación suele ocurrir a los 10 años) y función cardiopulmonar alterada (se suele manifestar a los 10 años siendo ya prevalente a los 20), esta última constituyendo la principal causa de muerte de los pacientes, con una esperanza de vida inferior a 30 años. La distrofia muscular de Becker es una forma más leve de distrofia muscular, con una prevalencia de 1 de cada 18518 casos, y suele aparecer más tarde [194].

El gen de la distrofina es el más grande descrito en humanos y el ARNm de la isoforma completa se expresa principalmente en músculo esquelético y cardíaco. En músculo sano, la proteína distrofina se localiza en el subsarcolema a lo largo de la longitud de la miofibra y se une al complejo de glicoproteínas asociado a distrofina (DGC) presente en la membrana plasmática y compuesto por proteínas como distroglicano, sarcoglicano y óxido nítrico sintasa. La función principal de la distrofina es la estabilización de las fibras durante la contracción por la unión a actina-F y  $\beta$ -distroglicano, actuando como proteína puente de anclaje [27].

Las mutaciones de pérdida de función en el gen de la distrofina interrumpen el marco abierto de lectura de su ARNm y conllevan la pérdida de expresión de la proteína. Esto conduce a la disrupción del complejo DGC, la inestabilidad de la membrana que incrementa la susceptibilidad a herida y la necrosis de miofibras. Además, el potencial regenerativo está comprometido y el tejido muscular comienza a ser sustituido por fibroadiposo [27].

El primer modelo que explicaba la progresión de la patología argumentaba un agotamiento de la reserva de SCs como consecuencia de los ciclos repetitivos de degeneración/regeneración [196,197]. Este modelo sugiere que las SCs son incapaces de sobrellevar la elevada demanda regenerativa en un contexto de distrofia muscular. Sin embargo, muchos estudios describen un incremento del número de SCs en músculo distrófico, y específicamente en músculos tipo I de pacientes avanzados [198], lo que sugiere que la capacidad regenerativa alterada del músculo distrófico no puede simplemente deberse a un agotamiento de las SCs. Estudios recientes demuestran que, en condiciones normales, las SCs expresan elevados niveles de distrofina, la cual juega un papel esencial en la regulación de su polaridad y de la división asimétrica [199]. En ausencia de distrofina, hay una reducción en el número de divisiones asimétricas y se producen divisiones anómalas que conducen a una disminución de la cantidad de progenitores miogénicos y a un fallo en la regeneración (Fig. 16). Esto conlleva una catástrofe mitótica de las SCs y un defecto en la senescencia que conduce a un estado irreversible de arresto del ciclo celular. Es por ello que se encuentra un elevado número de SCs en DMD, aunque estas podrían ser disfuncionales en cuanto a la reparación muscular. Estos hallazgos sugieren que el desgaste muscular en DMD no se produce únicamente por la fragilidad de las miofibras, sino que es también exacerbado por la disfunción de las SCs.



**Figura 16. Tipos de división celular de las células madre satélite.** Las SCs pueden autorrenovarse vía divisiones simétricas o asimétricas. La división simétrica a lo largo del eje planar (con respecto a la miofibra) genera dos células madre hijas. La división asimétrica a lo largo del eje ápico-basal da lugar a una célula madre y a una célula progenitora miogénica (adaptada de Chang *et al.*, 2016 [200]).

Actualmente no existe cura para DMD y la intervención actual se basa en la prevención y el manejo de las complicaciones. La terapia estándar son los corticoesteroides, y actualmente son los únicos agentes farmacológicos con beneficios documentados, a pesar de sus múltiples efectos adversos (ganancia de peso, osteoporosis, síntomas gastrointestinales y desórdenes metabólicos, entre otros). Las opciones terapéuticas disponibles que están actualmente siendo investigadas se resumen en el Anexo 2, basadas fundamentalmente en la terapia génica utilizando virus, la terapia celular o bien el uso de oligonucleótidos antisentido.

Las miopatías hereditarias y otros trastornos adquiridos musculares tienen la peculiaridad de que no sólo afectan de manera diferente a distintos paquetes musculares, sino que además también afectan preferentemente a tipos específicos de fibras musculares esqueléticas. Se resumen estos trastornos y los efectos en cada tipo de fibra en la Tabla 2.

Disorder	Fiber-Type Effects
Duchenne muscular dystrophy	Type 2X fibers first to degenerate
Facioscapulohumeral muscular dystrophy	Maximum force-generating capacity reduced in type 2 fibers. Increased proportion of type 1 fibers
Myotonic dystrophy type 1 (DM1)	Type 1 fiber atrophy and high frequency of type 1 fibers with central nuclei. Force generation reduced more in type 1 fibers
Myotonic dystrophy type 2 (DM2)	Type 2 fiber atrophy, type 2 fiber hypertrophy, and high frequency of type 2 fibers with central nuclei
Congenital fiber type disproportion	Predominant proportions of type 1 fibers that are consistently much smaller than type 2 fibers
Myosinopathies	<i>MYH7</i> mutations can cause smaller diameter type 1 fibers. <i>MYH2</i> mutations lead to loss of type 2A fibers
Pompe disease	In mouse model, type 2 fibers smaller with massive autophagic build-up
Obesity and type 2 diabetes	Reduced proportions of type 1 fibers and increased proportions of type 2X fibers
Muscle inactivity (spinal cord injury, bed rest)	Type 1 fiber atrophy. Fiber-type shift from type 1 and 2A to 2X
Aging/sarcopenia	Type 2 fiber loss and atrophy. Smaller diameter type 2 fibers
Heart failure, chronic obstructive pulmonary disease	Fiber-type shift from type 1 to type 2 (limb muscles). Fiber-type shift from type 2 to type 1 (diaphragm)

**Tabla 2. Trastornos musculares con efectos en distintos tipos específicos de fibras musculares esqueléticas** (adaptada de Talbot y Maves 2016 [201]).

En el caso de DMD, las fibras Tipo II degeneran y se pierden antes en estos pacientes, mientras que las fibras Tipo I se ven afectadas relativamente tarde [202]. Sin embargo, las fibras Tipo I remanentes en los pacientes DMD no son normales, ya que coexpresan eMyHC o nMyHC junto con miosina lenta, indicando que estas fibras han sufrido varias rondas de degeneración y regeneración [202,203]. Como se observa en la Tabla 2, existen diferencias en las fibras predominantemente afectadas según el trastorno muscular, encontrándose casos en los que se da una mayor susceptibilidad al daño de las fibras tipo II, como en la distrofia facioescapulohumeral (FSHD) y un incremento de las fibras tipo I [204], mientras que en el caso de la distrofia miotónica (DM) el tipo de fibra más afectado depende del subtipo de DM (DM1 o DM2) [205,206].

Las distrofias musculares, por tanto, conllevan una afectación muscular que actúa a todos los niveles de heterogeneidad muscular, ya que afectan a distintos paquetes musculares, repercuten en la proporción y tipo de fibras musculares y producen una descompensación de las SCs, conduciendo a un daño muscular recurrente y a un proceso regenerativo alterado. Con todos estos antecedentes y teniendo en cuenta que ANKK1 se expresa en los precursores embrionarios de músculo que son capaces de generar músculo adulto, en este trabajo hemos abordado la caracterización de la expresión de ANKK1 a lo largo del desarrollo muscular para estudiar finalmente la contribución de esta proteína en la progresión de patologías neuromusculares.



*Las enfermedades raras no son tan raras.  
Lo raro es que no las veas.*

*(Federación Española de Enfermedades Raras)*

.....

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos, en la presente Tesis Doctoral nos planteamos la siguiente hipótesis:

**ANKK1 es una proteína relacionada con el desarrollo del sistema nervioso. La detección en miotúbulos embrionarios indica que también tiene un papel relevante en un contexto de origen, desarrollo y regeneración muscular.**

Para demostrar esta hipótesis y conocer la biología celular de ANKK1, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Caracterización de la expresión de ANKK1 en precursores miogénicos y en tejido muscular esquelético adulto.
- Estudio de la expresión de isoformas de ANKK1 durante la proliferación y la diferenciación miogénica.
- Estudio de la expresión de ANKK1 en biopsia muscular de pacientes con distrofias musculares.
- Análisis de isoformas de ANKK1 en el ciclo celular.
- Análisis de la actividad quinasa de ANKK1.



*Nadie es lo suficientemente normal como para tener derecho a decidir lo que se considera normal.*

*(Organización Smiles A. C)*



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales de experimentación utilizados en la presente Tesis Doctoral se custodiaron en tres instalaciones diferentes. Todos los ratones se mantuvieron en un fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad, con alimento y agua *ad libitum*.

Los embriones utilizados para los estudios de inmunofluorescencia procedían de ratones mantenidos en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid), con la aprobación del Comité de Ética del mismo Hospital. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/cAnNHsd de 2-3 meses, que se mantuvieron a temperatura y humedad constantes ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $60\pm 5\%$ ).

Los animales utilizados para la obtención de miofibras en cultivo se mantuvieron en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV), con la aprobación del Comité Ético del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los animales empleados para los experimentos de *Western Blot* e inmunohistoquímica se mantuvieron en el Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), con la aprobación del Comité de Experimentación del CIPF. En ambos casos se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de 2-3 meses que se mantuvieron a  $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.1.1.1. Muestras embrionarias

Para los estudios embrionarios, se cruzaron hembras BALB/cAnNHsd con machos (2:1) durante 16 horas, desde las 17.00 horas de la tarde hasta las 9.00 horas de la mañana siguiente. A continuación las hembras se separaron para el seguimiento de la gestación, considerando como estadio embrionario (E) 0.5 el mediodía de ese día.

Las ratonas preñadas se sacrificaron por decapitación bajo anestesia con halotano al 5%. Se utilizó material de acero de microcirugía (Quirumed) para la disección. Los embriones se extrajeron de la bolsa embrionaria y se separaron de su placenta. Para el análisis por inmunofluorescencia, los embriones fueron inmediatamente embebidos en OCT (Tissue-Tek®) y congelados en nitrógeno líquido. Se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se enviaron al departamento de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Madrid), donde se cortaron en secciones de  $10\ \mu\text{m}$  y se montaron en portaobjetos de vidrio recubiertos de Polilisina (Sigma-Aldrich). El pretratamiento de las placas con Polilisina consistió en la adición de este agente 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se realizaron 3 lavados con agua MilliQ estéril autoclavada. Una vez secas, las placas se dejaron en la cabina con luz ultravioleta 10 minutos antes de su uso.

### 3.1.1.2. Muestras postnatales

Para la obtención de miofibras y tejido muscular para los ensayos de inmunohistoquímica y *Western Blot*, se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Para uniformidad, en este trabajo se han utilizado músculos de las extremidades inferiores (sóleo, gastrocnemio, *Flexor Digitorum Brevis* (FDB)). Tras el sacrificio, se rociaron las extremidades con etanol al 70%. Los siguientes pasos se realizaron en una cabina cerrada para evitar contaminaciones.

Para la extracción del sóleo y del gastrocnemio, el ratón se fijó sobre la parte anterior, realizando la incisión en la parte posterior de la extremidad inferior, por debajo de la rótula. Los pasos seguidos para la disección son idénticos a los del FDB que se detallan a continuación. Los músculos así extraídos se fijaron con 4% paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich) a 4°C durante 24 horas, se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 1X y se embebieron en etanol al 70% hasta su procesamiento. Las muestras fueron transferidas al procesador automático de tejidos (MYR STP120) donde se realizaron las siguientes inmersiones:

Reactivo	Tiempo
Etanol 70%	1 hora
Etanol 96%	3 horas
Etanol 96%	1.5 horas
Etanol 100%	2 horas
Etanol 100%	6 horas
Xilol	1.5 horas
Xilol	2.5 horas
Parafina	2.5 horas
Parafina	2 horas

Las muestras se colocaron en una cubeta con parafina a 60° y se montaron los bloques con un centro formador de bloques (MYR EC350), compuesto por una cubeta con parafina caliente, otra con un dispensador de parafina también caliente y una placa refrigeradora donde se enfrían los bloques. Los bloques se cortaron a 5 µm de grosor con el microtomo (MICROM HM340E), se extendieron en un baño a 40°C, se recogieron con un portaobjetos tratado con Polilisina y se depositaron sobre una placa a 40°C. Así, se almacenaron a temperatura ambiente hasta su uso.

Para la extracción de proteínas del sóleo, el tejido se recogió en tubos de microcentrífuga de 2 ml y fondo plano y se introdujeron en hielo seco inmediatamente después de la extracción. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la extracción del FDB, se realizó una incisión a lo largo de la línea media del animal y se retiró la piel siguiendo el protocolo descrito anteriormente [207]. Se colocó el ratón apoyado sobre la parte posterior, fijando la extremidad anterior que iba a ser diseccionada diagonalmente. La piel se separó del tejido conectivo utilizando un escalpelo, por encima de la articulación del tobillo en línea recta a lo largo del centro de la parte ventral del pie hasta los dedos. El FDB, que es el músculo más superficial de la parte trasera del pie, quedaba así expuesto. Se

colocó el ratón apoyado sobre la parte anterior y se separó el FDB del tejido conectivo levantándolo con el escalpelo insertado horizontalmente bajo el músculo y cortando los tendones. Se colocó el músculo en placas con *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Gibco) atemperado a 37°C. Una vez limpio, se procedió a la digestión mecánica y enzimática para la obtención de miofibras con SCs asociadas, siguiendo un protocolo previamente descrito [207]. Inicialmente se prepararon placas con DMEM, 1% penicilina-estreptomicina-anfotericina B (PSA) (Sigma Aldrich) y 10% suero de caballo (HS, Sigma Aldrich) y se mantuvieron en el incubador hasta su uso. Una vez los músculos FDB se limpiaron con PBS 1X, se llevó a cabo una digestión enzimática, al colocarlos en una placa con una solución de DMEM 1% PSA y 0.2% colagenasa IV (MP Biomedicals) previamente filtrada con un filtro de 0.2 µm de tamaño de poro. Se incubaron durante 2.5 horas a 37°C, agitando suavemente cada 20 minutos. Tras la digestión enzimática, los músculos fueron transferidos a una placa con DMEM 1% PSA y 10% HS y se procedió a la digestión mecánica. Se llevaron a cabo dos fases de digestión mecánica de 4 minutos, con puntas de mayor a menor tamaño en cada digestión respectivamente. Tras la primera digestión, se recogió el músculo remanente sin digerir y se colocó en una segunda placa con ese mismo medio, dejando las fibras que se liberan en la primera fase en suspensión, para que las siguientes digestiones no las fragmenten, hasta lograr disgregar todo el músculo. Tras finalizar la digestión, se realizó una purificación por gravedad. Para ello, se depositó la solución con las fibras en un tubo de 15 ml con 9 ml de DMEM 1% PSA y 2% HS, dejando que las fibras de mayor tamaño precipitasen por gravedad, durante 15 minutos. Se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en medio de cultivo para FDB: DMEM 1% PSA 20% suero de ternera fetal (FBS, Sigma Aldrich), previamente inactivado a 55 °C durante 30 minutos, y 1% HS, y se sembraron 1.5 ml por pocillo en placas de 6 pocillos con cubreobjetos para la posterior inmunofluorescencia, previamente pretratadas con 1mg/ml Matrigel (BD Biosciences). Para el pretratamiento se añadió la solución de Matrigel en DMEM durante 10 minutos en hielo, seguidamente se retiró y se dejó secar 1 hora en el incubador, y posteriormente se dejó en la cabina con la tapa abierta 10 minutos. Los cubreobjetos con las miofibras se fijaron para estudios de inmunofluorescencia.

### 3.1.2. BIOPSIAS DE MÚSCULO HUMANO

Las biopsias de músculo humano (deltoides y cruádriceps) utilizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de individuos sin distrofias y pacientes con distrofias musculares del Servicio de Neurología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, extraídas por el Dr. Juan Jesús Vílchez, con la aprobación del Comité de Ética de dicho hospital y de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki (2013). Todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado escrito para la recogida de muestras y posteriores análisis. Este trabajo está enmarcado en el proyecto de investigación terapéutica en Distrofia muscular de Duchenne "Biología, fisiopatología y terapia de las células satélite en músculo esquelético", financiado por la Fundación Isabel Gemio.

## Material y métodos

Las biopsias recién extraídas se transportaron al laboratorio en una gasa humedecida por los extremos con suero fisiológico. Para el cultivo de mioblastos, las muestras se recogieron en el momento de la biopsia y se procesaron el mismo día. Para los estudios de histología, las biopsias se sumergieron 30 segundos en isopentano previamente enfriado en nitrógeno líquido y a continuación se almacenaron en crioviales en nitrógeno líquido hasta su uso. Se realizaron secciones transversales de las biopsias en criostato con un grosor de 7 µm y se depositaron sobre portaobjetos que fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

En la Tabla 3 se resume la información proporcionada por el Servicio de Neurología sobre los pacientes:

Código	Tipo de muestra	Edad al realizar la biopsia	Sexo	Diagnóstico patológico
M-12-106	Cuádriceps	1	Hombre	Sin alteraciones histológicas
M-15-194	Cuádriceps	42	Mujer	Sin alteraciones histológicas
M-09-088	Deltoides	33	Mujer	<a href="#">Distrofia miotónica de Steinert ORPHA:273</a> : No necrosis, inflamación ni fibrosis. Presencia de núcleos centrales.
M-09-044	Deltoides	45	Mujer	<a href="#">Distrofia miotónica de Steinert ORPHA:273</a> : Núcleos centrales y variabilidad en el tamaño de fibras.
M-14-002	Cuádriceps	8	Hombre	Distrofia muscular con abundante inflamación (la secuenciación confirma <a href="#">Distrofia muscular de Duchenne ORPHA:98896</a> ).
M-13-071	Tibial anterior	10	Hombre	<a href="#">Distrofia muscular de Duchenne ORPHA:98896</a>
M-09-048	Deltoides	30	Mujer	<a href="#">Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva tipo 2A ORPHA:267</a> : Signos de distrofia muscular (atrofia, hipertrofia, redondeamiento de fibras). Sin necrosis ni fagocitosis. La arquitectura de fascículos está bien. La mayoría de fibras son oxidativas.
M-08-10	Deltoides	26	Mujer	<a href="#">Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva tipo 2B ORPHA:268</a> : Muchos núcleos centrales. No inflamación.
M-09-148	Deltoides	57	Hombre	<a href="#">Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva tipo 2B ORPHA:268</a> : Centralización nuclear frecuente (1-6 núcleos).
M-11-054	Gemelo medial	36	Hombre	<a href="#">Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva tipo 2Q ORPHA:254361</a>
M-08-083	Deltoides	61	Mujer	<a href="#">Distrofia facioescapulohumeral ORPHA:269</a> : Gran predominio fibras tipo I. Se observa vacuolización y anomalías mitocondriales.

**Tabla 3. Información sobre las biopsias musculares humanas utilizadas para el estudio histológico.** En la tabla se indica, de izquierda a derecha, el código del paciente, el tipo de músculo, la edad del paciente en el momento de la biopsia, el sexo y el diagnóstico patológico con el código ORPHA correspondiente a la enfermedad.

### 3.1.3. CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Se han utilizado 2 cepas bacterianas de *Escherichia coli* en este trabajo para la replicación y obtención de diferentes plásmidos: la cepa DH5 $\alpha$  [genotipo *F'endA1 hsdR17 (rK- mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 $\Delta$  (LacIZYA-argF) U169 deoR ( $\Phi$ 80dlac  $\Delta$ (lacZ)M15]* y la cepa BL21 (*F ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) [malB<sup>+</sup>]<sub>K-12</sub>( $\lambda$ <sup>S</sup>)*). Las bacterias se crecieron en medio completo LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro sódico (NaCl) 5 g/L) a 37°C en sólido o líquido. El medio se suplementó con kanamicina 100  $\mu$ g/ $\mu$ L o ampicilina 100  $\mu$ g/ $\mu$ L según el plásmido utilizado una vez transformadas las bacterias, para seleccionar las portadoras del plásmido que confiere resistencia a este antibiótico. La cepa BL21 se creció en presencia de cloranfenicol 33  $\mu$ g/ $\mu$ L. La manipulación de bacterias siempre se llevó a cabo en condiciones de esterilidad, empleando un mechero Bunsen.

### 3.1.4. CULTIVOS CELULARES

#### 3.1.4.1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas para este trabajo se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) (Tabla 4):

Línea celular	Número	Origen	Morfología
C2C12	CRL-1772	Murino (músculo)	Mioblasto (adherente)
Rhabdomyosarcoma (RD)	CCL-136	Humano (músculo)	Células fusiformes y células grandes multinucleadas (adherente)
HEK293T	CRL-3216	Humano (riñón)	Epitelial (adherente)
HeLa	CCL-2	Humano (cérvix)	Epitelial

**Tabla 4. Líneas celulares utilizadas en la Tesis Doctoral.** En la tabla se indica el nombre de la línea celular, el número ATCC, el origen (especie y tejido) y la morfología celular.

C2C12: subclon producido por Blau y colaboradores [208] de la línea celular de mioblastos murinos establecida a partir de músculo de las extremidades inferiores de un ratón adulto normal C3H [209]. Esta línea es capaz de diferenciar rápidamente, formando miotúbulos contráctiles y produciendo proteínas

## Material y métodos

características de músculo. Proporciona un buen modelo para el estudio *in vitro* de los procesos de diferenciación celular.

Las células se crecieron en frascos de cultivo en presencia de medio completo: DMEM suplementado con 10% FBS, 1% de L-glutamina y 100 µg/ml de penicilina/estreptomicina (PS). El medio fue renovado cada tres días. Las células se mantuvieron a 37°C en aire saturado de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en un incubador termostatzado y con regulación de flujo de CO<sub>2</sub>. La manipulación de las células se llevó a cabo en esterilidad en cabinas de flujo laminar.

Para el experimento en condiciones de hipoxia, las células C2C12 se sembraron a la confluencia correspondiente en cada ensayo (50% en el estudio de proliferación, 80% en el estudio de diferenciación), se les añadió el medio de cultivo correspondiente en cada caso y se mantuvieron en un incubador a 37°C en condiciones de bajo oxígeno (2% O<sub>2</sub>) el tiempo estipulado en cada estudio.

Rhabdomyosarcoma (RD): línea celular derivada de una biopsia de una niña caucásica de 7 años con rhabdomyosarcoma pélvico previamente tratada con ciclofosfamida y radiación y encontrado que tenía enfermedad refractaria [210]. Muestra una histología embrionaria (fusión negativa) y 51 cromosomas hiperdiploides, y presenta amplificación del oncogen MYC, mutación Q61H de NRAS y mutación en homocigosis de TP53 [211]. Además, tiene capacidad para diferenciar parcialmente *in vitro*.

Las células se crecieron en DMEM completo suplementado con 2% solución de medio esencial mínimo (MEM) de vitaminas y 2% solución MEM de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich). Estos cultivos se mantuvieron a 37°C en aire saturado de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en un incubador termostatzado y con regulación de flujo de CO<sub>2</sub>.

HEK293T: es un derivado altamente transfectable de la línea celular epitelial 293, razón por la que en esta Tesis se ha utilizado para la sobreexpresión de proteínas.

Para el cultivo de células HEK293T fue necesario el pretratamiento de las placas y los cubreobjetos en las que iban a ser sembradas con Polilisina 1X. Estas células se crecieron en medio de cultivo DMEM completo y se mantuvieron a 37°C en aire saturado de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en un incubador termostatzado y con regulación de flujo de CO<sub>2</sub>.

HeLa: son células epiteliales adherentes derivadas de una mujer de 31 años con adenocarcinoma de cérvix. Estas células son altamente transfectables, por lo que en este trabajo se han empleado para la sobreexpresión de proteínas y posterior sincronización celular.

Las células se crecieron en DMEM completo y se mantuvieron en a 37°C en aire saturado de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en un incubador termostatzado y con regulación de flujo de CO<sub>2</sub>.

#### **3.1.4.2. Mantenimiento y preservación de los cultivos celulares**

La descongelación de los crioviales de las diferentes líneas celulares se llevó a cabo sumergiendo el vial durante 30 segundos en un baño a 37°C. El contenido del criovial se llevó a volumen final de 10 ml con medio completo y se centrifugó a 300 g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió en 1 ml de medio completo y se sembró en un frasco T25 para su posterior expansión.

Los cultivos celulares utilizados para medir el consumo de oxígeno, obtención de ARN o citometría de flujo se procesaron del mismo modo: las células se lavaron con PBS 1X a 37°C, se levantaron con tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich) 3 minutos a 37°C y se recogieron en medio completo. Se centrifugaron a 300 g durante 3 minutos y el *pellet* se resuspendió en el medio que cada procedimiento especifica. Los cultivos celulares utilizados para obtener extractos proteicos se lavaron con PBS 1X a 4°C y se levantaron con un rascador de células. Se centrifugaron a 300 g 3 minutos y el *pellet* se resuspendió en el tampón de lisis correspondiente. Los cultivos celulares utilizados para inmunofluorescencia se sembraron sobre placas con cubreobjetos circulares.

Para la congelación de los diferentes cultivos celulares, las células se tripsinizaron tal y como se ha descrito previamente y el *pellet* se resuspendió en medio completo suplementado con 5% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich) que se añadió a los crioviales (1 ml por criovial). Los crioviales se transportaron a los ultracongeladores a -80°C en los contenedores para congelación (Mr. Frosty, Nalgene) a los que previamente se les había añadido isopropanol tal y como indican las instrucciones del fabricante y se habían enfriado a -80°C. Tras 24 horas, los crioviales se transfirieron a un tanque de nitrógeno líquido en el que se mantuvieron hasta su posterior utilización.

#### **3.1.4.3. Diferenciación de los mioblastos murinos y humanos**

Para la diferenciación de los mioblastos murinos C2C12 se cambió el medio de crecimiento por medio de diferenciación, consistente en DMEM con 2% HS 1% PS [212].

Para la diferenciación de la línea celular RD se sustituyó el medio de cultivo por DMEM suplementado con 2 µM de insulina (Sigma-Aldrich) 2% HS 1% PS [213]. Tras 24 horas, se añadió 5 µM de ácido retinoico (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo.

En todos los casos se añadió el medio de diferenciación correspondiente cuando las células alcanzaron un 70-80% confluencia y se cambió el medio cada 3 días hasta un total de 6 días post-inducción.

#### **3.1.4.4. Cultivo de mioblastos humanos a partir de biopsias musculares**

A lo largo de la realización de la presente Tesis Doctoral se ha puesto a punto el cultivo de mioblastos humanos a partir de biopsias musculares recogidas en el

## Material y métodos

Servicio de Neurología del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Tabla 5), con la aprobación del Comité de Ética de dicho hospital y de acuerdo con los principios éticos de la Declaración de Helsinki (2013). Todos los pacientes proporcionaron consentimiento informado escrito para la recogida de muestras y posteriores análisis.

Código	Tipo de muestra	Edad al realizar la biopsia	Sexo	Diagnóstico patológico	Exón delecionado
M-14-073 → B1	Deltoides	5	Hombre	HiperCKemia	-
M-13-055 → DMD1	Tibial anterior	10	Hombre	DMD	48-50
M-13-071 → DMD2	Tibial anterior	10	Hombre	DMD	48-50
M-13-095 → DMD3	Tibial anterior	7	Hombre	DMD	52

**Tabla 5. Información sobre los pacientes cuyas biopsias musculares se utilizaron en la presente Tesis Doctoral para el cultivo de mioblastos.** La tabla muestra información sobre el código asignado al paciente, el músculo de origen, la edad en el momento de la biopsia, el sexo y el diagnóstico patológico de los individuos a partir de los cuales se obtuvieron los mioblastos humanos. Se indica también el exón/exones delecionados en el gen de la distrofina en los pacientes DMD.

Los medios preparados para este procedimiento se filtraron con un filtro de 0.22 µm. Las biopsias se recogieron en 30 ml de *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) (Sigma-Aldrich) 1% PSA. La biopsia se transfirió a una placa de 60 mm con 5 ml HBSS 1% PSA, donde se limpió la grasa, el tejido conectivo y la sangre con unas pinzas finas y un escalpelo. Una vez limpia, se diseccionó en piezas de 3 mm que se transfirieron a una placa con 5 ml de medio de acondicionamiento (37.5% FBS 1.25% PSA en MEM199) y se dejaron 24 horas en el incubador. Los pasos sucesivos se detallan a continuación:

**Pre-incubación:** las piezas de músculo fueron transferidas a una placa de 60 mm y se colocaron espaciadas 0.5 cm unas de otras. Se mezclaron 5 ml de medio de acondicionamiento y 1.25 ml plasma humano (Sigma-Aldrich), se filtraron y añadieron sobre la placa de las biopsias. Esta placa se incubó 6-8 días, con el fin de estimular el crecimiento de fibroblastos y reducir su proporción en los sucesivos pases.

**Explante:** Pasado este tiempo, las biopsias fueron transferidas a una nueva placa de 60 mm con HBSS 1% PSA y se desechó la placa original. Se cortó el músculo en piezas de 1 mm para estimular la regeneración. Se prepararon placas que contenían 0.5 ml de plasma humano y 1 ml de gelatina 1.5% (Sigma-Aldrich) e inmediatamente después se colocó el tejido. Se añadieron unas gotas de medio de crecimiento de mioblastos para recubrir las biopsias (DMEM 20% MEM199 (v/v) 10% FBS, complementado con 1 mg/ml insulina (Sigma-Aldrich), 0.025 µg/ml FGF (Sigma-Aldrich) y 0.025 µg/ml EGF (Sigma-Aldrich) y se incubaron 30 minutos a 37°C. A continuación, se añadieron 5 ml de medio a la placa. Se incubaron 6-8 días y cuando la confluencia celular era del 60%, se repitió el paso de explante (en el músculo de origen pediátrico es posible repetir esto hasta 5 veces).

La manipulación de las biopsias musculares y los cultivos derivados se llevó a cabo en esterilidad en cabinas de flujo laminar. Las biopsias y células se mantuvieron a 37°C en aire saturado de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en un incubador termostatizado y con regulación de flujo de CO<sub>2</sub>.

Para la diferenciación de los mioblastos humanos obtenidos a partir de biopsias musculares, se cambió el medio de crecimiento por otro con la misma composición a excepción de la insulina y los factores de crecimiento. En todos los casos se añadió el medio de diferenciación correspondiente cuando las células alcanzaron un 70-80% confluencia y se cambió el medio cada 3 días hasta un total de 6 días.

## 3.2. TRATAMIENTOS Y ENSAYOS EN C2C12 Y RD

### 3.2.1. ESTUDIO METABÓLICO EN C2C12

#### 3.2.1.1. Inducción de la vía glicolítica

Para la activación de la vía glicolítica con agentes inductores, las células C2C12 se trataron a una confluencia del 50% durante 24 horas utilizando dos agentes diferentes en paralelo:

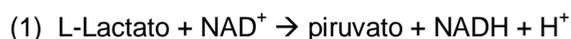
Glucosa: está descrito que la presencia de glucosa en el medio de cultivo promueve el cambio metabólico de las células hacia un fenotipo glicolítico [214]. Para este tratamiento, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM suplementado con 30 mM de glucosa (Sigma-Aldrich).

Berberina: se trata de un alcaloide botánico que se ha descrito que incrementa el consumo de glucosa a través de la activación de la glicólisis [215]. El medio de cultivo se sustituyó por DMEM suplementado con 0.25% de albúmina de suero bovino (BSA), 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml de PS. A continuación, las células fueron tratadas con Berberina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 30 µM.

#### 3.2.1.2. Ensayo de cuantificación del ácido láctico

Para cuantificar los niveles de ácido L-láctico, se recogió 1 ml del medio de las células previamente tratadas 24 horas con el agente inductor de la vía glicolítica correspondiente y se procesó según las instrucciones del fabricante del kit *L-lactic acid assay kit* (K-LATE, Megazyme, Biocon). La cuantificación del ácido L-láctico requiere dos reacciones enzimáticas. En la primera reacción catalizada por L-lactato deshidrogenasa (L-LDH), el L-lactato se oxida a piruvato por nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) (1).

(L-LDH)



## Material y métodos

Dado que el equilibrio de la reacción yace a favor del ácido L-láctico y NAD<sup>+</sup>, se requiere una reacción posterior para captar el producto del piruvato. Esto se consigue por la conversión de piruvato a D-alanina y 2-oxoglutarato, con la enzima D-glutamato-piruvato transaminasa (D-GTP) en presencia de un largo exceso de D-glutamato [216].

### (D-GPT)

#### (2) Piruvato + D-glutamato → D-alanina + 2-oxoglutarato

La cantidad de NADH se midió por el incremento de la absorbancia a 340 nm, siendo ese valor estequiométrico con la cantidad de L-lactato. El ensayo se realizó en un espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Hts counter (Perkin Elmer Life Sciences) en placas de 96 pocillos de plástico, pipeteando en cada pocillo las siguientes soluciones:

	Blanco	Muestra	Estándar
Agua destilada	0.160 ml	0.150 ml	0.150 ml
Muestra	-	0.010 ml	-
Solución estándar Ácido L-láctico	-	-	0.010 ml
Tampón (con D-glutamato y azida sódica, pH 10)	0.050 ml	0.050 ml	0.050 ml
Solución 2 (NAD <sup>+</sup> )	0.010 ml	0.010 ml	0.010 ml
Suspensión 3 (GTP)	0.002 ml	0.002 ml	0.002 ml

Una vez mezclado, se obtuvieron los valores de las absorbancias de las soluciones tras 3 minutos. La reacción comenzó tras la adición a cada pocillo de 0.002 ml de la suspensión 4 (L-LDH). Se mezclaron los pocillos de nuevo y se leyó la absorbancia de las soluciones al final de la reacción (aproximadamente 10 minutos). El cálculo de la cantidad de ácido L-láctico se realizó de la siguiente manera:

$$\text{g/L} = (\Delta A \text{ muestra} / \Delta A \text{ estándar}) * \text{g/L estándar} * F$$

Siendo  $\Delta A$  muestra la diferencia entre la absorbancia de la muestra y el blanco,  $\Delta A$  estándar la diferencia entre la absorbancia del estándar y el blanco y F el factor de dilución. Los valores obtenidos se expresaron en ratios, estableciendo el control correspondiente como ratio 1. Se realizaron al menos 3 réplicas biológicas por condición.

### 3.2.1.3. Determinación del consumo de oxígeno

Para la cuantificación del consumo de oxígeno de las células C2C12 se utilizó el electrodo de oxígeno tipo-Clark (Rank Brothers) a 37°C con un agitador magnético, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este electrodo consiste en un cátodo de Pt y un ánodo de Ag inmersos en una solución de cloruro potásico y

separados de la muestra por una membrana de teflón permeable únicamente al oxígeno. Cuanto más oxígeno hay en la muestra, éste atraviesa la membrana y se genera más corriente entre los electrodos de Pt y Ag. Por tanto, la corriente generada es proporcional a la cantidad de oxígeno de la muestra. Las células se contaron y se resuspendieron en 1 ml de medio de crecimiento e inmediatamente se midió el consumo de oxígeno en el electrodo de Clark, que había sido previamente calibrado. La medida del consumo de oxígeno se da en  $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} 10^6 \text{ cells}^{-1}$ . Se realizaron al menos 7 réplicas biológicas por condición.

### **3.2.2. ESTUDIO DE DINÁMICA NÚCLEO-CITOPLASMÁTICA EN C2C12: TRATAMIENTO CON LEPTOMICINA B**

Para bloquear la exportación de proteínas nucleares vía la exportina 1 (CRM1), se adaptó un protocolo previamente descrito [217]. Para ello, se trataron los mioblastos C2C12 al 70% de confluencia con 2 ng/ml Leptomicina B (Sigma-Aldrich). Como control, se indujo la diferenciación de mioblastos y se fijaron/recogieron células a 24 y 48 horas post-inducción. Los mioblastos control se trataron con un vehículo (metanol: agua diluido 1:3 y filtrado con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ ), ya que es en ese medio donde está diluida la Leptomicina B. En paralelo, se realizaron los siguientes tratamientos.

- En una placa se añadió el medio de diferenciación al mismo tiempo que la Leptomicina B y se recogieron las células tras 24 horas.
- En una placa se añadió medio de diferenciación durante 24 horas, después se añadió Leptomicina B y se recogieron las células a 48 horas.

### **3.3. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS HeLa**

#### **3.3.1. TRANSFECCIÓN**

Para el análisis del ciclo celular, se sembraron células HeLa al 60% de confluencia en placas de cultivo de 35 mm. Se sembraron 3 placas por condición y tiempo. Todos los medios con los tratamientos empleados en este procedimiento se prepararon en el momento de uso y se filtraron con un filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ .

Pasadas 24 horas de la siembra se transfectaron las células con 2  $\mu\text{g}$  del plásmido o constructo correspondiente en cada caso y 5  $\mu\text{L}$  de Fugene 6 (Roche) en medio Opti-MEM (Gibco), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas se comprobó en el microscopio de fluorescencia la eficiencia de la transfección.

Se utilizó el plásmido pEGFP-N1 y los constructos previamente generados de las isoformas ANKK1-k variantes A1 y A2 (pEGFP-ANKK1-A1 y pEGFP-N1-ANKK1-A2) y la mutante para la actividad quinasa (pEGFP-ANKK1-A1-K51R), que añade en pauta en su extremo Ct la secuencia de la proteína verde fluorescente GFP.

### 3.3.2. SINCRONIZACIÓN

Tras 24 horas de la transfección, se inició el proceso de sincronización. Inicialmente, se realizó el bloqueo con Timidina 2.5 mM (Sigma-Aldrich) en DMEM completo 25 horas. Seguidamente se liberó del bloqueo con Timidina realizando 3 lavados rápidos con DMEM solo a temperatura a 37°C, y después se añadió DMEM completo. Tras 12 horas, se hizo un doble bloqueo con Afidicolina 5 µg/ml (Sigma-Aldrich) diluida en DMSO y preparada en DMEM completo. Se bloquearon las células 24 horas y se liberó el bloqueo con 3 lavados con DMEM solo, añadiendo después DMEM completo a todas las placas. En ese punto, se recogieron 3 placas y se definieron como tiempo 0, punto en el que la mayoría de las células estarán sincronizadas en la fase G0/G1 del ciclo celular. Se recogieron células en intervalos de 2 horas. Después de 4 horas, se añadió Nocodazol 40 ng/ml (Sigma-Aldrich) para retener a las células en la fase G2/M. Se continuó recogiendo células cada 2 horas durante un periodo total de 14 horas.

### 3.3.3. RECOGIDA DE CÉLULAS PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

Para análisis por citometría de flujo, se recogió el medio de las células y se colocó en un tubo de 15 ml. Se lavaron las células con PBS 1X y se tripsinizaron. Se recogieron en medio fresco que se añadió al mismo tubo y se centrifugaron a 400 g 3 minutos. A partir de este punto todas las centrifugaciones fueron a 4°C. Se lavó el *pellet* con 1 ml PBS 1X frío (5 min 400 g) y al *pellet* resultante se le añadieron 500 µl de PBS frío gota a gota por la pared del tubo y al mismo tiempo agitando a velocidad media con un agitador de tubos. Después se añadieron 500 µl de PFA 1% (Aname) y se mantuvieron 15 minutos en hielo. Se centrifugaron 5 min a 400 g y se lavaron de nuevo con PBS 1X. El *pellet* se resuspendió en etanol 70% a -20°C, y se dejó a -20°C al menos 1 hora. Pasado ese tiempo, se centrifugó 5 minutos a 400 g y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de solución de yoduro de propidio a concentración final de 5 µg/ml y Ribonucleasa A (ThermoFisher Scientific) 10 µg/ml. Se incubó la suspensión celular toda la noche a 4°C en oscuridad. Al día siguiente, se analizaron las células en un citómetro de flujo FC500 MCL (Beckman-Coulter, CA). Los ensayos se realizaron por triplicado y se recogieron al menos 10.000 eventos de células transfectadas. Los resultados se analizaron con el programa FlowJo v7.6.5 (TreeStar, OR).

### 3.3.4. RECOGIDA DE CÉLULAS PARA WESTERN BLOT

Para la obtención de proteína total, se retiró el medio de cultivo en un tubo aparte. Las células se levantaron en hielo con un rascador de células, se añadieron al tubo con el medio de cultivo y se centrifugaron a 600 g. El *pellet* celular se lavó con PBS 1X y se resuspendió en tampón de lisis A (NaCl 250 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0.1% y NaF 50 mM) con un cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail, Roche) en tubos de 1.5 ml. Las muestras se incubaron 10 minutos a 4°C en agitación y a continuación se

centrifugaron a 16000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante corresponde el extracto total de proteínas.

### 3.4. ESTUDIOS DE ARN EN C2C12

#### 3.4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

La extracción de ARN se llevó a cabo empleando TRIzol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante y en una campana de extracción previamente esterilizada con luz ultravioleta. El *pellet* celular se recogió en 1 ml de TRIzol a temperatura ambiente. A cada muestra se le añadió 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente, se dejó 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 11600 g 15 minutos a 4°C. A continuación se recogió la fracción superior transparente que se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Se añadió 0.5 ml de isopropanol y se agitó vigorosamente. Se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 11600 g durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se añadió 1ml de etanol al 75% centrifugándose a 5000 g durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el *pellet* 1 hora en campana. El *pellet* resultante se resuspendió en agua-dietil pirocarbonato (DEPC). El ARN se almacenó a -80°C tras medir su concentración en un espectrofotómetro NanoDrop (Spectrophotometer ND-100) y comprobar el correcto ratio 260/280.

#### 3.4.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA

Para llevar a cabo la transcripción reversa del ARN se utilizó *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante:

ARN	2 µg
Maxima Enzyme Mix	2 µl
Mezcla de reacción 5X	4 µl
Agua libre de nucleasas	Hasta 20 µl

Tras la preparación de la mezcla, se programó el termociclador (Verity, Applied Biosystems) con las siguientes temperaturas:

10 minutos	25°C
30 minutos	50°C
5 minutos	85°C
4°C	

## Material y métodos

Al finalizar el proceso de retrotranscripción, se cuantificó del ADN complementario (ADNc) recién sintetizado mediante el NanoDrop, con el fin de determinar tanto la concentración como el grado de pureza de la muestra. El ADNc se almacenó hasta su uso a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4.3. PCR CUANTITATIVA

Los ensayos de reacción en cadena de la polimersa (PCR) cuantitativa se llevaron a cabo empleando el termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para la detección de los niveles de expresión de los genes analizados se utilizó el kit *FastStart Universal SYBR Green Master Rox* (Roche). Los valores basales de amplificación se obtuvieron a partir del umbral otorgado por el programa por defecto, el cual se mantuvo constante con el fin de normalizar el número de ciclos para cada muestra. Para calcular las cantidades relativas de cada producto se utilizaron tanto el método de la curva estándar como el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , y al observar que las diferencias de los resultados obtenidos por ambos métodos eran inapreciables, se utilizaron para la este trabajo los datos de la curva estándar tal y como se ha descrito previamente [19,218]. Se realizaron siempre tanto las réplicas técnicas como biológicas por triplicado. Los niveles de expresión de los genes se normalizaron utilizando el valor obtenido para dos genes dentro de cada muestra analizada:  $\alpha$ -Tubulina (*Tuba1a*) y polipéptido alfa prima de caseína quinasa 2 (*Csnk2a2*). Los valores se muestran sin unidades, para comparar las cantidades relativas de ARNm de cada muestra. Los oligonucleótidos empleados en la amplificación se muestran a continuación (Tabla 6):

GEN	Gi (Nº de acceso)	Oligonucleótido 5´-3´	Inicio	Fin	Tamaño (pb)
<i>Ankk1</i>	146198787	TCCGATTTTGGCCTGTCCAAG	549		
<i>Ankk1</i>	146198787	AGATGACAATTGCAAAGCTGTAC		692	166
<i>Tuba1a</i>	133892260	GAACCCACGGTCATCGATGAAG	258		
<i>Tuba1a</i>	133892260	CTGTGCACTGGTCAGCCAGC		419	181
<i>Csnk2a2</i>	164519099	GTAAAAATTCTCAAGCCAGTGAAG	574		
<i>Csnk2a2</i>	164519099	GCTGGTGTCTTTGACACAGGG		684	131

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCRq.** En esta tabla se muestran, de izquierda a derecha, el nombre de los genes analizados, el número de acceso del gen en el National Center for Biotechnology Information (NCBI), las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para PCRq en sentido 5´-3´, así como la posición en la secuencia del primer y el último nucleótido del oligonucleótido y el tamaño del fragmento amplificado. PCRq: PCR cuantitativa.

La mezcla de la reacción consta de:

	Ankk1	$\alpha$ -Tuba1a	Csnk2a2
ADNc	2000 ng	100 ng	100 ng
Oligonucleótido sentido 10 $\mu$ M	0.9 $\mu$ l	0.45 $\mu$ l	0.45 $\mu$ l
Oligonucleótido antisentido 10 $\mu$ M	0.9 $\mu$ l	0.45 $\mu$ l	0.45 $\mu$ l
Syber Green Master Mix	12 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l
Agua MilliQ	Hasta 30 $\mu$ l	Hasta 10 $\mu$ l	Hasta 10 $\mu$ l

El programa de ciclos utilizado se muestra a continuación:

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Activación	10 min	95°C	1
Desnaturalización	30 segundos	95°C	35
Templado	1 minuto	58°C	35
Extensión	30 segundos	72°C	35

### 3.5. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.5.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para obtener un extracto total de proteínas a partir de tejido muscular se añadió tampón de lisis B (NaCl 150 mM, Tris HCl 20 mM, EDTA 5 mM, 10% glicerol) y 1% NP40 (Nonidet P40, Fluka) con el cóctel de inhibidores de proteasas 1X y se disgregó el tejido utilizando un homogeneizador eléctrico. A continuación se centrifugó a 1000 g 10 minutos a 4°C para eliminar el debris celular insoluble.

Para la obtención de proteína total a partir de las diferentes líneas celulares, las células se levantaron en hielo con un rascador de células y se centrifugaron a 600 g. El *pellet* celular se lavó con PBS 1X y se resuspendió en tampón de lisis A (NaCl 250 mM, Tris HCl 50 mM pH 7.4, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0.1% y NaF 50 mM) con el cóctel de inhibidores de proteasas en tubos de 1.5 ml. Las muestras se incubaron 10 minutos a 4°C en agitación y a continuación se centrifugaron a 16000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante comprendió el extracto total de proteínas.

Para la obtención de fracciones enriquecidas en proteínas de núcleo y citoplasma respectivamente, el *pellet* celular se resuspendió en tampón de lisis B y se centrifugó 30 minutos a 16000 g a 4°C. El sobrenadante se retiró a un nuevo tubo (fracción citoplasmática) y el *pellet* resultante se resuspendió en el tampón de lisis nuclear (tampón B con 10% dodecilsulfato sódico (SDS)). Las células se sonicaron 2 veces durante 15 segundos con un periodo de 45 segundos entre cada sonicación y así se obtuvo la fracción nuclear. Los diferentes extractos proteicos fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

## Material y métodos

La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo con el *Pierce BCA Protein Assay kit* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron diluciones seriadas de BSA a partir de muestras estándar, obteniéndose una ecuación de una recta patrón. A partir de esa recta se infirieron las concentraciones de las diferentes muestras de proteína. Las medidas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 590 nm en el espectrofotómetro Victor 1420 Multilabel Hts counter (Perkin Elmer Life Sciences).

### 3.5.2. WESTERN BLOT

Para el procedimiento de *Western Blot* se utilizó el sistema de electroforesis *Miniprotein Electroforesis System* (BioRad). Se prepararon 40 µg de cada muestra añadiendo el volumen adecuado de tampón de carga reductor 4X (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 8% (v/v), Glicerol 40%, β-Mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0.004%) y si era necesario, agua MilliQ. Las muestras se hirvieron 3 minutos a 95°C y se cargaron en un gel de acrilamida/bisacrilamida (Tabla 7). Se utilizó *Precision Plus Ultra Protein Ladder* (Abcam) como marcador de pesos moleculares. La primera fase de entrada y concentración de muestras en el gel se realizó a un voltaje constante de 70V, mientras que la segunda fase de separación de proteínas se realizó a 100V.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman) para la posterior inmunodetección. Para ello se utilizó un sistema de electrotransferencia líquida (BioRad). La transferencia se llevó a cabo a 50V constantes durante 1.5 horas a 4°C. Para realizar la inmunodetección de las proteínas de interés, la membrana se incubó toda la noche a 4°C y en agitación suave con solución de bloqueo (leche desnatada en polvo 5% en tampón TRIS salino-Tween20 (TBS-T) al 0.1%, Tabla 7). Seguidamente se incubó la membrana con el anticuerpo primario (diluido en leche 1% TBS-T 0.1%) en agitación suave a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T 0.1%. Tras los lavados la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (diluido en leche 1% TBS-T 0.1%) durante 1 hora en agitación suave y temperatura ambiente. La membrana fue a continuación lavada 3 veces con TBS-T 0.1% seguido de un lavado con TBS 1X. Finalmente las proteínas fueron detectadas por quimioluminiscencia con *Clarity Western ECL Substrate kit* (Bio Rad) y las membranas se revelaron en películas (Hyperfilm ECL, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para realizar la densitometría de las bandas se utilizó el programa informático ImageJ v1.37 (National Institutes of Health, USA).

Para la deshibridación de los anticuerpos unidos a las proteínas en la membrana se preparó tampón de deshibridación (Tris HCl 62.5 mM pH 7.5, 2% SDS y 100 mM de β-mercaptoetanol). Las membranas se incubaron 30 minutos a 55°C en agitación media en tampón de deshibridación y a continuación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada a temperatura ambiente y agitación fuerte. La membrana se bloqueó 1 hora y se incubó con el anticuerpo primario

pertinente, o bien se almacenó en bolsitas selladas de plástico con TBST a 4°C hasta su posterior utilización.

Tampón	Composición	Volumen
Gel separador al 9% acrilamida-bisacrilamida	Agua destilada	4.98 ml
	Acrilamida-bisacrilamida 40% (29:1)	2.33 ml
	Tris pH 8.8 1.5 M	2.53 ml
	SDS (20%)	100 µl
	Persulfato amonico (10%)	100 µl
	TEMED	6 µl
Gel concentrante al 5% acrilamida-bisacrilamida	Agua destilada	3.4 ml
	Acrilamida-bisacrilamida 40% (29:1)	830 µl
	Tris pH 6.8 1M	630 µl
	SDS (20%)	50 µl
	Persulfato amonico (10%)	50 µl
	TEMED	4 µl
Tampón de carrera de electroforesis 1X	Glicina	14.4 g
	Tris base	3.03 g
	SDS 20%	5 ml
	Agua destilada	Hasta 1L
Tampón de transferencia 1X	Glicina	11.52 g
	Tris base	2.42 g
	Metanol	100 ml
	SDS (20%)	250 µl
	Agua destilada	Hasta 1L
Solución de teñido con azul de Coomassie	Coomassie Brilliant Blue	0.25 g
	Agua destilada	45 ml
	Metanol	45 ml
	Ácido acético	10 ml
Solución de desteñido de azul de Coomassie	Agua destilada	45 ml
	Metanol	45 ml
	Ácido Acético	10 ml
TBS 10X (ajustar a pH 7.4)	Cloruro sódico	80 g
	Cloruro potásico	2 g
	Tris Base	30 g
	Agua destilada	Hasta 1L

**Tabla 7. Composición de las soluciones utilizadas para el análisis por Western blot.** En la tabla se detalla, de izquierda a derecha, el nombre del tampón y su concentración, los reactivos que componen el tampón y el volumen preparado de cada uno de ellos.

### 3.5.3. DEGLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

Para la deglicosilación de los extractos proteicos se utilizó el *Protein Deglycosilation Mix* (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diluyeron 100 µg de extracto de proteína en 18 µl de agua MilliQ. Se añadieron 2 µl del tampón de *Glycoprotein Denaturing Buffer* 10X y se desnaturalizaron las proteínas hirviendo 10 minutos a 100°C. El extracto se enfrió en hielo y se centrifugó 10 segundos. Se añadieron a la reacción 5 µl de *G7 Reaction Buffer* 10X, 5 µl de NP-40 10%, 15 µl de agua MilliQ y 5 µl del cóctel de deglicosilación enzimática y se incubó la reacción a 37°C durante 4 horas. A

continuación se añadió el tampón de carga y las muestras se analizaron por *Western Blot*.

### 3.6. INMUNOFLUORESCENCIA E INMUNOHISTOQUÍMICA

#### 3.6.1. INMUNOFLUORESCENCIA

En la Tabla 8 se resumen las condiciones de fijación, permeabilización, bloqueo, incubación con los anticuerpos primarios y secundarios y el procedimiento de montaje para los distintos tipos de muestras utilizados en la presente Tesis Doctoral (embriones, células y miofibras en cultivo). En los sucesivos apartados se detallarán aspectos específicos para cada tipo de muestra.

Muestra	Fijación / Permeabilización	Bloqueo	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Montaje
Embrión	- PFA 4% 20 min a RT	5% NGS 1% BSA en PBS 1X, 2 horas a RT	Preparado en S.I (1/3 solución de bloqueo en PBS 1X), 2 noches a 4°C	-3 lavados PBS 1X -Preparado en S.I, 2 horas a RT en oscuridad	-3 lavados PBS 1X -Se coloca una gota de Fluoromount G + DAPI sobre el embrión y se coloca el cubreobjetos encima
Células	-PFA 4% 20 min a RT -1 lavado PBS 1X -Metanol -20°C 20 min	5% NGS 1% BSA en PBS 1X, 1 hora a RT	Preparado en S.I (1/3 solución de bloqueo en PBS 1X), 1 hora a RT	-3 lavados PBS 1X. -Preparado en S.I, 1 hora a RT en oscuridad	-3 lavados PBS 1X -Se coloca una gota de Fluoromount G + DAPI sobre el portabobjetos y se transfiere el cubreobjetos con las células dispuestas hacia el medio de montaje
Fibras en cultivo	-PFA 4% 20 min a RT -1 lavado PBS 1X -Metanol -20°C 10 min -Secado al aire 15 min	5% NGS 1% BSA en PBS 1X, toda la noche a 4°C	Preparado en S.I (1/3 solución de bloqueo en TBS 1X), 1 noche a 4°C	-3 lavados TBST 1X. -Preparado en S.I, 1 hora a RT en oscuridad	-3 lavados TBST 1X, 1 lavado TBS 1X -Se coloca una gota de Fluoromount G + DAPI sobre el portabobjetos y se transfiere el cubreobjetos con las miofibras dispuestas hacia el medio de montaje

**Tabla 8. Condiciones de inmunofluorescencia para cada tipo de muestra.** RT: temperatura ambiente; NGS: suero de cabra normal; S.I: solución de incubación; min: minutos.

Los aspectos comunes para cada tipo de muestra se resumen a continuación:

1. A partir del bloqueo, los sucesivos pasos se llevaron a cabo en cámaras húmedas con papel Whatman y *Parafilm*, encima del cual se colocaron las muestras (cubreobjetos / portabobjetos).

2. Todos los pasos de lavado se realizan a 4°C.
3. Tras el montaje, las preparaciones se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y después se almacenaron a 4°C hasta su visualización al día siguiente en el microscopio.

### **3.6.1.1. Inmunofluorescencia de embriones**

Para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia de embriones fijados en portaobjetos se emplearon las muestras descritas en el apartado 3.1.1.1. Los portaobjetos con el tejido previamente almacenados a -80°C se mantuvieron 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron 3 veces con PBS 1X antes de la fijación. A partir del bloqueo, las incubaciones se realizaron rodeando las secciones con un líquido hidrofóbico (Super Pap Pen Liquid Blocker, Ted Pella).

### **3.6.1.2. Inmunofluorescencia de células**

Para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia de cultivos celulares se utilizaron las muestras descritas en el apartado 3.1.4. Las células se crecieron sobre cubreobjetos circulares de 13 mm colocados sobre placas de cultivo. Tras la fijación, o bien se continuó con el protocolo de inmunofluorescencia, o bien se almacenaron a 4°C en PBS-azida sódica 0.1% hasta su posterior utilización.

### **3.6.1.3. Inmunofluorescencia de fibras aisladas en cultivo con sus células satélite asociadas**

Para llevar a cabo los ensayos de inmunofluorescencia de miofibras aisladas en cultivo montadas sobre cubreobjetos se emplearon las muestras descritas en el apartado 3.1.1.2.

## **3.6.2. INMUNOHISTOQUÍMICA**

Los estudios de inmunohistoquímica se realizaron con músculo de ratón parafinado y con biopsias de músculo humano congelado. El tratamiento inicial de las muestras es diferente pero a continuación el procedimiento es común tal y como se detalla a continuación.

### **3.6.2.1. Inmunohistoquímica de músculo de ratón parafinado**

Los cortes de músculo de ratón almacenados a temperatura ambiente se trataron de la siguiente manera:

## Material y métodos

Estufa 65°C	20 minutos
Xilol 1	10 minutos
Xilol 2	10 minutos
Etanol 100% 1	10 minutos
Etanol 100% 2	10 minutos

### 3.6.2.2. Inmunohistoquímica de músculo humano no parafinado

Los cortes de músculo humano almacenados a -20°C se atemperaron 10 minutos a 4°C. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS 1X a 4°C y se fijaron con PFA 4% 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se realizaron 3 nuevos lavados con PBS 1X.

### 3.6.2.3. Aspectos comunes

Las secciones se bloquearon con metanol: agua oxigenada a una proporción 29:1 (v/v) 25 minutos en oscuridad. Se lavaron de nuevo con PBS 1X y se desbloqueó la fijación de PFA 4% para exponer los grupos enmascarados con el aldehído. Para los anticuerpos anti-ANKK1, se utilizó colagenasa IV 0.2% en DMEM para el desenmascaramiento antigénico, previamente atemperado 5 minutos a 37°C, y se añadieron 2 gotas sobre las secciones, que se incubaron a 37°C durante 40 minutos, seguido de un lavado con PBS 1X 5 minutos. Para el resto de anticuerpos, el desbloqueo se realizó con citrato sódico 10 mM a 90°C al baño maría 10 minutos, se atemperó 30 minutos y se hizo un lavado con agua destilada 5 minutos. Después del lavado, se bloquearon las muestras, con una solución de BSA 3% FBS 10% en PBS 1X durante 40 minutos, y se incubó con el anticuerpo primario disuelto en BSA 1% PBS toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las secciones con PBS 1X y se añadió el anticuerpo secundario biotinilado disuelto en BSA 1% PBS. Se preparó el reactivo *VECTASTAIN Elite ABC kit* (Vector) 30 minutos antes de usarlo a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de los lavados con PBS 1X, se añadió el ABC 30 minutos en oscuridad:

PBS 1X	100 µL
Reactivo A	2 µL
Reactivo B	2 µL

Tras realizar los lavados con PBS 1X, se preparó *DAB Peroxidase Substrate Kit*, 3,3'-diaminobenzidine (Vector) en el momento de uso.

Agua destilada	600 $\mu$ L
Tampón pH 7.5	6 $\mu$ L
Agua oxigenada	6 $\mu$ L
DAB	12 $\mu$ L

Se observaron las secciones al microscopio y para cada anticuerpo se determinó el tiempo a partir del cual se detectaba señal, momento en el cual se detuvo la reacción con agua destilada. A continuación se realizó la contra-tinción con hematoxilina 30 segundos, se lavó con agua para eliminar el exceso de tinción y se procedió a la deshidratación, realizando 6 pases consecutivos con etanol de menor a mayor proporción (50, 70, 96 y 2 pases de 100%). Para finalizar, se sumergieron los cortes en xilol y se montaron las preparaciones añadiendo una gota de DPX sobre los cubreobjetos.

### 3.6.3. MICROSCOPIA

En los estudios de inmunohistoquímica las imágenes se tomaron utilizando el microscopio vertical DMR, mientras que las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron utilizando el microscopio confocal SP8 scanning laser confocal microscope (Leica Microsystems). Para cada imagen tomada dentro de un mismo estudio se mantuvieron las condiciones de potencia de láser, adquisición y compensación del detector y apertura del poro. Se utilizó el modo de escaneo secuencial para evitar el traspaso de señal entre canales. Las secciones de tejido o células de control negativo (sin incubación con anticuerpos primarios) se utilizaron para el ajuste del fondo antes de adquirir las imágenes.

En los experimentos de cuantificación de los patrones de fluorescencia observados, siempre se contabilizaron al menos 100 células a partir de 3 experimentos independientes en cada condición para calcular una media de los patrones observados. Las imágenes se analizaron y procesaron (proyecciones de máxima intensidad de series Z) utilizando el programa ImageJ v1.37. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se realizó transformando las imágenes a 8 bits.

### 3.7. ANTICUERPOS

#### 3.7.1. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo	Inmunógeno	Inmunidad	Procedencia referencia	y	Técnica y dilución
Anti- $\beta$ -Actina	Peptido correspondiente al Nt de $\beta$ -actina ligeramente modificado (DDDIAALVIDNGSK).	Monoclonal de ratón (clon AC-15)	Sigma-Aldrich (A1978)		WB 1:8000
Anti- $\alpha$ -Actinina	Anti- $\alpha$ -Actinina (sarcomérica) deriva del hibridoma EA-53 producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de BALB/c inmunizados con $\alpha$ -actinina purificada de ratón.	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich (A7732)		IF tejido y células 1:200
Anti-ANKK1	Reconoce una region de ANKK1 humana entre los aminoácidos 290-370.	Policlonal de conejo anti-humano	(LSBio, Inc.)		IHQ 1: 500
Anti-Desmina Clon D33	Reconoce la proteína desmina, clon D33. Marca células del músculo liso y estriado.	Monoclonal de ratón	Dako (M0760)		IF células 1:200
Anti-Distrofina	Polipéptido sintético consistente en los últimos 17 aminoácidos del extremo Ct de la secuencia humana de distrofina.	Monoclonal de ratón	Novocastra (NCL-DYS2)		IF tejido 1:20
Anti-Ciclina A (C-19)	Reconoce un epítipo que mapea en el extremo Ct de ciclina A de origen murino.	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology (sc-596)		WB 1:1000
Anti-Ciclina B1 (H-20)	Reconoce un epítipo del extremo Ct de ciclina B1 de origen humano.	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology (sc-594)		WB 1:500
Anti-GFP [9F9.F9]	Este anticuerpo reconoce tanto proteína verde fluorescente (GFP) endógena como recombinante.	Monoclonal de ratón	Abcam (ab1218)		WB 1:2000
Anti-6X His [HIS.H8]	Reconoce proteínas recombinantes o sobreexpresadas en células marcadas o etiquetadas con Histidinas.	Monoclonal de ratón	Abcam (ab18184)		WB 1:4000
Anti-JunB		Monoclonal de ratón	Prestado amablemente por la Dra. Rosa Farrás (CIPF)		WB 1:2500

Anti-Lamina A/C (636)	Este anticuerpo reconoce una preparación de Lamina de origen porcino. Laminas A y C son idénticas en los primeros 566 aminoácidos, con lamina C difiriendo en dos aminoácidos del Ct.	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc-7292)	WB 1:4000
Anti-MyHCI	Detecta específicamente la miosina lenta de músculo esquelético.	Monoclonal de ratón	Clone NOQ7.5.4D, Invitrogen (MA1-24941)	IF tejido y células 1:50 IHQ 1:200
Anti-MyHCII	Reconoce un epítipo de la miosina de cadena pesada. Marca las moléculas de miosina rápida (tipo II) y neonatal.	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich (M4276)	IHQ 1:200
Anti-eMyHC (miosina embrionaria)	Derivado del hibridoma producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de ratón inmunizado.	Monoclonal de ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), (F1.652-s).	IF tejido 1:80 IHQ 1:20
Anti-nMyHC (miosina neonatal)	Reconoce la miosina neonatal aislada de músculo de pollo.	Monoclonal de ratón	B103 (DSHB)	IHQ tejido 1:20
Anti-MyoD 5.8A	Anticuerpo generado contra MyoD recombinante de origen murino con un epítipo de los aminoácidos 180-189.	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology (sc-32758)	IF tejido y células 1:200 WB 1:2000
Anti-Pax7	Aminoácidos: 352-523. Producido a partir de proteína de pollo recombinante en <i>E. coli</i> .	Monoclonal de ratón	DSHB (Pax7-c)	IF tejido y células 1:50 WB 1:500
Anti- $\alpha$ -Sarcoglicano	Proteína de fusión que contiene los aminoácidos 217-289 de la secuencia de conejo.	Monoclonal de ratón	Novocastra (NCL-a-SARC)	IF tejido y células 1:200
Anti-STk	Péptido sintético frente a un epítipo en el dominio Ser/Thr quinasa de ANKK1.	Policlonal de conejo anti ratón, rata y humano	Producción propia [19]	WB 1:800 IF 1:100
Anti-STk2	Péptido sintético frente a un epítipo en el extremo Nt de ANKK1.	Policlonal de conejo anti ratón	Producción propia [19]	WB 1:2000 IF 1:200
Anti-STk3	Péptido sintético frente a un epítipo en el extremo Ct de ANKK1.	Policlonal de conejo anti-ratón	Producción propia	WB 1:800 IF 1:200

## Material y métodos

Anti- $\alpha$ -Tubulina (clon DM1)	Deriva del hibridoma producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de ratón inmunizado. Se utilizó tubulina purificada de cerebro de pollo como inmunógeno.	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich (T9026)	WB 1:10000
Anti-beta III Tubulina (TUBB3)	Anticuerpo generado contra un péptido del extremo Ct de la beta III tubulina. Es un marcador específico de neuronas.	Monoclonal de ratón	Promega (G7121)	IF tejido 1:7000

**Tabla 9. Anticuerpos primarios.** En la tabla se indica, por orden alfabético, el nombre del anticuerpo (la proteína que reconoce), el inmunógeno, la especie en la que es generado, la procedencia, referencia y casa comercial y la técnica o técnicas en las que se ha utilizado y la dilución de uso. WB: *Western Blot*, IF: Inmunofluorescencia, IHQ: Inmunohistoquímica.

### 3.7.2. ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo	Procedencia	Técnica y dilución
Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP)	Pierce (Thermo Scientific) (31430)	WB 1:10000
Anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado a HRP	Jackson ImmunoResearch (111-035-003)	WB 1:10000
Anticuerpo policlonal de cabra anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 594	Jackson ImmunoResearch (111-585-144)	IF tejido 1:700 IF células 1:1000
Anticuerpo policlonal de cabra anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488	Invitrogen (A10667)	IF tejido 1:700 IF células 1:1000
Anticuerpo policlonal de burro anti-conejo conjugado a Alexa Fluor 594	Jackson ImmunoResearch (711-585-152)	IF tejido 1:700 IF células 1:1000
Anticuerpo policlonal de burro anti-ratón conjugado a Alexa Fluor 488	Invitrogen (A10667)	IF tejido 1:700 IF células 1:1000
Anticuerpo policlonal de burro anti-conejo conjugado a biotina	Jackson ImmunoResearch (711-065-152)	IHQ tejido 1:1000
Anticuerpo policlonal de burro anti-ratón conjugado a biotina	Jackson ImmunoResearch (715-065-151)	IHQ tejido 1:1000

**Tabla 10. Anticuerpos secundarios.** En la tabla se indica el nombre del anticuerpo (la especie en la que fue generado, la especie del epítipo que reconoce, la enzima/fluoróforo/molécula al que está conjugado), la procedencia (casa comercial y referencia), la técnica o técnicas en las que se ha utilizado y la dilución. WB: *Western Blot*, IF: Inmunofluorescencia, IHQ: Inmunohistoquímica.

### 3.8. CLONACIONES

#### 3.8.1. VECTORES COMERCIALES

Los vectores comerciales utilizados en la presente Tesis Doctoral se describen a continuación:

**pET-21-a:** Se trata de un vector de expresión bacteriana que tiene una secuencia en el Nt con una etiqueta de T7 más una etiqueta de Histidinas en el Ct (Fig. 17A). Su marcador de selección es ampicilina. Este vector y los constructos derivados generados en la presente Tesis Doctoral se utilizaron para la sobreexpresión y posterior ensayo químicamente en bacterias.

**pEGFP-N1:** Vector comercial para expresiones transitorias que posee la proteína GFP (Fig. 17B). Este vector permite la clonación en Ct de proteínas en pauta con GFP de modo que puede ser rápidamente detectada con microscopía de fluorescencia y permite la visualización de células *in vivo*.

**pEGFP-C1:** A diferencia de pEGFP-N1, este vector permite la clonación en Nt de proteínas en pauta con GFP (Fig. 17C). Tanto pEGFP-N1 como pEGFP-C1 y los constructos derivados se utilizaron para la sobreexpresión y posterior ensayo químicamente en células HEK293T, y su marcador de selección es kanamicina.

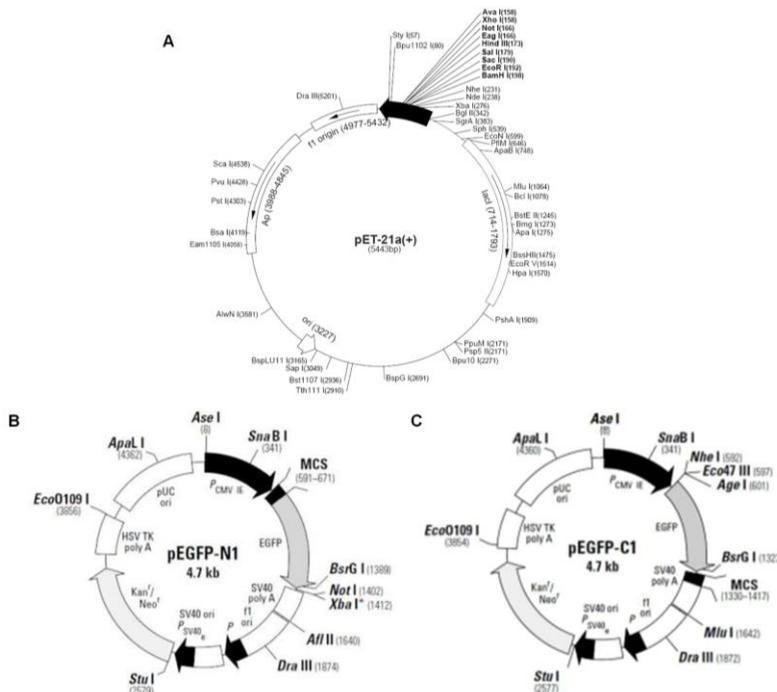


Figura 17. Vectores comerciales utilizados en este trabajo sobre los que se introdujeron los insertos correspondientes y se generaron nuevos constructos. Se muestra el esquema de los vectores (A) pET-21-a, (B) pEGFP-N1 y (C) pEGFP-C1. Los sitios de restricción están indicados. MCS,

## Material y métodos

sitio de clonación múltiple; EGFP: Proteína verde fluorescente mejorada; Kan: gen de resistencia a kanamicina.

### 3.8.2. GENERACIÓN DE CONSTRUCTOS

Los constructos generados en la presente Tesis Doctoral se amplificaron a partir de los correspondientes vectores originales que contenían el inserto de interés mediante PCR. Se diseñaron oligonucleótidos que contenían un sitio de restricción para la posterior digestión e introducción en pauta en el vector de destino. Tras la amplificación por PCR se purificó el ADN para eliminar las sales con *GeneClean Turbo* (MP Biomedicals) y se procedió a la digestión con enzimas de restricción, tanto de los plásmidos que contenían el inserto como los vectores de destino. La ligación se realizó utilizando el *Quick Ligation™ Kit* (NEB) y después de purificar de nuevo el ADN con GeneClean, se transformaron las bacterias como se detalla más adelante. A continuación se muestra una tabla de los constructos generados en la presente Tesis Doctoral.

Nombre	Origen	Oligonucleótidos
pET-21-a-ANKK1-A1	pCDNA3-ANKK1-A1	1-2
pET-21-a-ANKK1-A2	pCDNA3-ANKK1-A2	1-2
pET-21-a-ANKK1-K51R	pCDNA3-ANKK1-K51R	1-2
pET-21-a-ANKK1-H2	pCDNA3-ANKK1-H1	3-4
pEGFP-N1-ANKK1-H1	pCDNA3-ANKK1-H1	5-6
pEGFP-C1-ANKK1-H1	TOPO-ANKK1-H1	7-6

**Tabla 11. Plásmidos generados y clonados en los vectores de destino.** En la tabla se detalla, de izquierda a derecha, el nombre del constructo, el ADNc de origen y los oligonucleótidos con los que se ha clonado (la secuencia de los oligonucleótidos se muestra en el Anexo 3).

Para introducir los plásmidos en las bacterias, estas se transformaron por electroporación. Los plásmidos pET-21-a se introdujeron en la cepa BL21, mientras que los pEGFP en la cepa DH5 $\alpha$ . Las bacterias se expusieron, en presencia del plásmido, a un pulso de 1700V que produce la entrada del ADN en la célula. Inmediatamente después las bacterias se recuperaron 1 hora en presencia de LB sin antibiótico a 37°C y se sembraron en placas de LB con el correspondiente antibiótico. Las colonias que crecieron en medio sólido se cultivaron después en LB líquido para proceder a la extracción del plásmido (*Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit*, GE Healthcare). Para cada constructo, se realizaron al menos dos digestiones con enzimas de restricción (una para liberar el inserto y la otra con un sitio de corte dentro del inserto) y se comprobó en un gel de agarosa que el inserto estaba presente y la orientación del mismo era adecuada. Una vez comprobado, se secuenciaron los insertos para comprobar que no había cambios en la secuencia. Tras comprobar que la secuencia era correcta, se extrajo el ADN plasmídico (*NucleoBond Xtra Midi*, Macherey-Nagel) y se generaron glicerizados para disponer de bacterias transformadas almacenadas.

### 3.9. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD QUINASA

#### 3.9.1. SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA OBTENER PROTEÍNA SOLUBLE

Para la sobreexpresión de proteínas en bacterias se utilizó la cepa BL21, resistente a cloranfenicol. Se evaluaron una serie de condiciones (concentración de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), temperaturas y tiempos de inducción, presencia o ausencia de etanol en el medio, co-expresión con el plásmido que contenía las chaperonas GroEL y GroEs (pBB541, Addgene) y se establecieron las condiciones óptimas tal y como se detalla a continuación. Se transformaron las bacterias con los constructos pET-21-a conteniendo el inserto que se deseaba sobreexpresar y con el plásmido GroEL/GroES para favorecer el posterior plegamiento de la proteína y minimizar la formación de cuerpos de inclusión. Las bacterias así transformadas se cultivaron en 100 ml de medio líquido LB con 100  $\mu$ g/ $\mu$ l de ampicilina y 33  $\mu$ g/ $\mu$ l de cloranfenicol. Cuando la densidad óptica era aproximadamente de 0.7 y las bacterias estaban en crecimiento exponencial, se realizó la inducción con IPTG 0.1 mM a 12°C toda la noche, y se añadió 2% etanol al medio de cultivo en el momento de la inducción. Se recogió una muestra (M) de bacterias antes (M1) y después (M2) de la inducción. Las bacterias así inducidas se centrifugaron y el *pellet* se resuspendió en tampón de sonicación 1 (cóctel de inhibidores de proteasas 1X, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 2 mM en PBS), se agitaron y se sonicaron durante 10 segundos 15 veces, con intervalos de 30 segundos. Después de la sonicación, se añadió Tritón X-100 1% y se agitaron 15 minutos a 4°C. Se centrifugó a 10000 g a 4°C en tubos Corex, se recogió el sobrenadante (M3), que contiene la fracción soluble de proteína y el *pellet* de bacterias (fracción insoluble de proteína o cuerpos de inclusión, M4). Se retiró una alícuota de cada una de las fracciones, se le añadió el correspondiente volumen de tampón de carga de proteínas 2X (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0.004% y 31 mg/ml de Ditiotreitól (DTT) en agua destilada) y se hirvió 3 minutos a 95°C para posteriormente cargarlas en un gel de acrilamida al 10%. Tras separar las muestras en el gel de acrilamida, este se tiñó con solución de azul de Coomassie en agitación 30 minutos, se hicieron varios lavados con agua destilada y se añadió la solución de desteñido que se dejó toda la noche. Paralelamente, se realizó un *Western Blot* con el anticuerpo anti-His para comprobar que la bacteria está expresando las proteínas correspondientes que se han introducido con la etiqueta de histidinas en el extremo Ct.

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la producción de proteína soluble, se crecieron las bacterias en 1 L de medio líquido LB para producir la proteína a gran escala y se realizó la inducción. El *pellet* de bacterias se resuspendió en el tampón de sonicación 2 (50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 100 mM imidazol, 1X cóctel de inhibidores de proteasas y 2 mM PMSF, pH 7). Se sonicaron las bacterias y se centrifugaron, sin adición de Tritón X-100, 10 minutos a 10000 g. Se empleó todo el sobrenadante para el siguiente paso.

### 3.9.2. PREPARACIÓN DE LA RESINA Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SOLUBLE

Para la purificación de la proteína sobreexpresada se utilizó resina *Talon Metal Affinity* (Clontech) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 500  $\mu$ l de resina en un tubo y se centrifugó 2 minutos a 1000 g, se retiró el sobrenadante y la resina se resuspendió en tampón de equilibrado (tampón de sonicación 2 sin el cóctel de inhibidores de proteasas y PMSF). El sobrenadante de proteína soluble se filtró, se añadió a la resina y se dejó toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente se centrifugó 5 minutos a 1000 g y se guardó 1 ml de sobrenadante (M5) como control de la proteína no retenida en la resina. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con el tampón de equilibrado, centrifugando 2 minutos a 1000 g y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió y se retiró una alícuota a la que se añadió tampón de carga de proteínas 2X y se hirvió para separarla en un gel de acrilamida.

La resina con las proteínas retenidas se centrifugó 2 minutos a 1000 g, se resuspendió en tampón de equilibrado y se añadió a la columna de separación. Se hicieron 2 lavados con tampón de equilibrado y se añadió el tampón de elución (tampón de equilibrado con imidazol 50 mM) para liberar la proteína retenida en la resina (M6). Se hizo un lavado con tampón de equilibrado y se retiró una fracción de resina a la que se añadió tampón de carga 2X (para comprobar si tras la elución quedó proteína retenida, M7).

### 3.9.3. SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO: COINMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON GFP-TRAP

Para sobreexpresar las proteínas en células de mamífero se transformaron células HEK293T con los plásmidos pEGFP y los constructos derivados ya generados o clonados en la presente Tesis Doctoral. Las células se sembraron en placas de 100 mm y se transfectaron. Se eliminó el medio de cultivo y se añadió PBS a 4°C. Las células se levantaron y se transfirieron a un tubo de 1.5 ml previamente enfriado. Se centrifugaron 3 minutos a 500 g a 4°C y el *pellet* se lavó 2 veces con PBS 1X frío. El *pellet* se resuspendió en tampón de lisis (Tris-HCl pH 7.5 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0.5 mM, fluoruro sódico (NaF), 2.5 mM, 50% glicerol, Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2.5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0.2 mM, 1 pastilla de inhibidores de proteasas, PMSF 1 mM, NP-40 0.5%) y se homogeneizó empleando una jeringa. Se incubó 20 minutos en hielo, mezclando cada 5 minutos 10 veces con la jeringa. Se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se ajustó el volumen a 500  $\mu$ l con tampón de lavado (tampón de lisis sin PMSF ni NP-40). Por otra parte, se equilibraron 20-30  $\mu$ l de la resina *GFP-Trap beads* (Chromotek) añadiendo tampón de dilución. Se centrifugó 2 minutos a 4°C y 2500 g y se repitió el lavado 2 veces más. En el último lavado se aspiró todo el sobrenadante y se añadió tampón de dilución. Se añadió el extracto celular (previamente se guardó una alícuota del extracto y se le añadió tampón de carga de proteínas 2X) a la resina previamente

equilibrada y se incubó a 4°C durante 10 minutos y agitación constante. Tras la incubación, se centrifugó a 2700 g 2 minutos a 4°C y se guardó una alícuota de sobrenadante (fracción no unida a la resina). Se desechó el resto de sobrenadante y se lavó 2 veces con tampón de lavado frío. Tras el último lavado, el *pellet* se resuspendió en tampón de carga 2X (fracción unida a la resina). Las muestras con tampón de carga se hirvieron 3 minutos a 95°C y se separaron en un gel de acrilamida.

### 3.9.4. CONDICIONES DEL ENSAYO QUINASA

Una vez se dispone de la proteína eluída de la resina correspondiente (Talon para bacterias, GFP-Trap para células de mamífero) se prepara un gel de acrilamida al 15% con concentraciones crecientes de ABS, para estimar la cantidad de proteína de la que disponemos para hacer el ensayo de actividad quinasa. El ensayo se realizó en distintas condiciones:

Reactivos	Protocolo A	Reactivos	Protocolo B
Quinasa putativa	500 ng	Quinasa putativa	500 ng
Sustrato	1000 ng	Sustrato	1000 ng
Tris-HCl pH 7.5	10 mM	HEPES	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	MgCl <sub>2</sub>	50 mM
MnCl <sub>2</sub>	3 mM	DTT	5 mM
ATP	37 μM	ATP	37 μM
ATP γ <sup>-32p</sup>	10 μCi	ATP γ <sup>-32p</sup>	10 μCi

**Tabla 12. Condiciones de los ensayos de actividad quinasa.** En la tabla se detallan los reactivos y la concentración final de los mismos empleados para los diferentes ensayos de actividad quinasa (Protocolo A y B, respectivamente).

El sustrato empleado fue, o bien Histona H3, o bien la proteína básica de mielina (MBP) (Invitrogen). Se incluyó un control positivo de la reacción con la proteína quinasa activada por Adenosin monofosfato (AMPK), utilizando AMP como sustrato. Los experimentos con ATP radiactivo se llevaron a cabo en una sala acondicionada para tal fin en el Instituto de Biomedicina de Valencia, en colaboración y bajo la supervisión del Dr. Pascual Sanz. Se utilizaron cajas de metacrilato para el transporte de muestras radiactivas, pantallas protectoras y dosímetros para medir la radiactividad en todo momento y los líquidos que pudieran contener ATP radiactivo se eliminaron en el recipiente correspondiente. La mezcla de reacción se incubó 30 minutos a 30°C, se añadió tampón de carga de proteínas 2X, y se hirvieron las muestras 3 minutos a 95°C. Al día siguiente se cargaron en un gel de acrilamida al 15% y 75 mm de grosor y se separaron durante 1.5 horas a 125 V. Se incluyeron extractos con sustrato (para comprobar la actividad quinasa) y extractos sin sustrato (para comprobar la capacidad de autofosforilación), además de un control positivo de la reacción. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie 30 minutos en agitación y a continuación se lavó 3

## Material y métodos

veces durante 10 minutos con solución de desteñido. A continuación se hicieron 2 lavados de 20 minutos con glicerol al 20% para que el gel se mantuviera hidratado y no se fragmentara en el posterior secado. Para el secado del gel, se colocó sobre un papel de filtro humedecido con glicerol y se cubrió con *film*. El gel se secó en el equipo model 583 *Gel Dryer* (BioRad) durante 2 horas y se visualizaron las bandas mediante autorradiografía utilizando películas de revelado (Hyperfilm ECL, Amersham).

### 3.10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para la búsqueda *in silico* de sitios putativos de glicosilación en la secuencia de aminoácidos ANKK1 se utilizó el portal web bioinformático ExpASy, y específicamente sus herramientas NetOGlyc, NetNGlyc y NetCglyc.

Para el análisis de las putativas señales de exportación nuclear (NES) en la secuencia de aminoácidos se utilizó el servidor NetNES v1.1 (Center For Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark) y para el análisis de las señales de localización nuclear (NLS) se utilizó el programa NUCDISC (del servidor PSORT II, <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>). Los datos de salida fueron tablas o gráficos en los que se indicaba la localización de los sitios buscados en la secuencia de la proteína, y a cada uno de ellos se les asigna una puntuación acorde a su significación estadística.

### 3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism v5. Se determinó la distribución normal de los datos cuando fue necesario mediante la prueba estadística de Kolmogórov-Smirnov. Los experimentos celulares se analizaron, bien utilizando la prueba *t* de Student, o bien Análisis de varianza unidireccional (*one-way* ANOVA) utilizando el test de comparación múltiple de Tuckey. Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar y los valores *p* inferiores a 0.05 se consideraron significativos.

*No tenemos la solución a todos los problemas del mundo en nuestras manos. Pero, frente a los problemas del mundo, tenemos nuestras manos.*

*(Teresa de Calcuta)*



# **RESULTADOS**



## 4. RESULTADOS

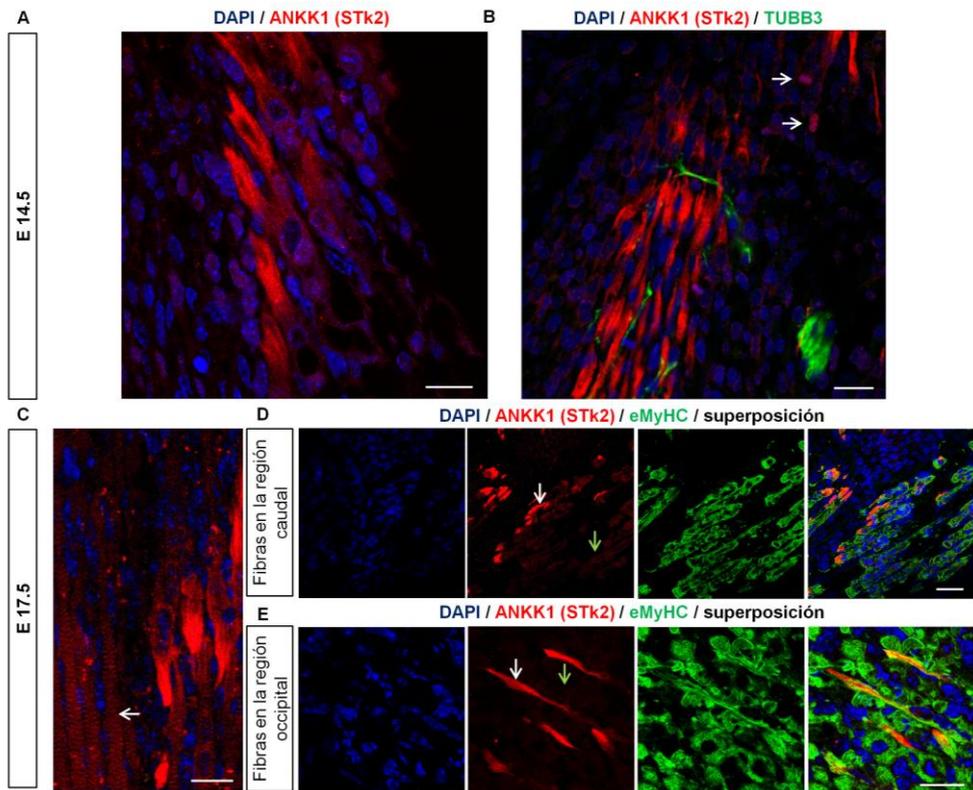
### 4.1. ANKK1 PARTICIPA EN LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

#### 4.1.1. ANKK1 SE EXPRESA EN MIOBLASTOS Y MIOTÚBULOS EMBRIONARIOS

El estudio previo de la expresión de ANKK1 durante el neurodesarrollo permitió la observación de estructuras con morfología de miotúbulos que eran positivas para esta proteína. Este fue el punto de partida de este trabajo. Para conocer la expresión de ANKK1 en precursores musculares se analizaron por inmunofluorescencia, utilizando los anticuerpos STk2 (ANKK1) y  $\alpha$ -eMyHC como marcador de mioblastos embrionarios, secciones sagitales de embriones murinos en estadios E14.5 y E17.5. Nuestro estudio se centró en mioblastos y miotúbulos embrionarios localizados en primordios musculares derivados de somitas (Fig. 18).

ANKK1 se expresa en el citoplasma de mioblastos y miotúbulos embrionarios con un patrón polarizado (Fig. 18). En el embrión E14.5, estadio hasta el que los mioblastos embrionarios migran y se fusionan para formar las fibras primarias, la señal de ANKK1 se detectó en una subpoblación de mioblastos que, dada su morfología alargada, sugería su participación en procesos de migración (Fig. 18A,B). Estas células se encontraban distribuidas a lo largo del neuraxis, desde las regiones más caudales que darán lugar a diferentes músculos del tronco y las extremidades a las regiones más occipitales que darán lugar, entre otros músculos, a la lengua. En ningún caso se observó la expresión de ANKK1 en el núcleo de los mioblastos o miotúbulos embrionarios, aunque sí se detectaron algunos núcleos ANKK1+ (Fig. 18B). En los miotúbulos multinucleados en estadio más diferenciado (E17.5) se encontró además un patrón de expresión de ANKK1 en las bandas Z (Fig. 18C, flecha blanca). Los análisis de doble marcaje con eMyHC en E17.5, etapa en la que acaba de finalizar la miogénesis secundaria y da comienzo la etapa fetal tardía, revelaron que ANKK1 se expresa en una subpoblación de precursores miogénicos multinucleados, que podrían constituir las fibras musculares que conforman el primer tejido muscular embrionario maduro. En los primordios musculares de la región occipital, que darán lugar a la musculatura de la lengua, la expresión de ANKK1 era positiva en aquellas fibras con una morfología particularmente elongada, en comparación con las células eMyHC+ ANKK1- (Fig. 18D: fibras de los primordios musculares de la región caudal; Fig. 18E: fibras de los primordios musculares de la región occipital).

## Resultados



**Figura 18. ANKK1 se expresa en mioblastos y miotúbulos en estadio embrionario E14.5 y 17.5.** Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 4 capas de 1µm de grosor cada uno. Se observa el marcaje de DAPI, ANKK1 (rojo), los diferentes marcadores celulares (verde) y la superposición de las imágenes de inmunofluorescencia en secciones sagitales de embrión E14.5 (A,B) y E17.5 (C-E). (A) ANKK1 se expresa en mioblastos embrionarios. Escala: 25 µm. (B) Los miotúbulos ANKK1+ están en contacto con precursores neurales TUBB3+. Dos núcleos ANKK1+ se detectaron (flechas blancas). Escala: 25 µm. (C) En E17.5, ANKK1 muestra una expresión polarizada en algunos miotúbulos embrionarios, y un patrón bandeado (flecha blanca) en otros. Escala: 25 µm. (D) Colocalización de ANKK1 y eMyHC en las fibras de los primordios musculares localizados en las regiones caudal y (E) occipital (flechas blancas). Las flechas verdes muestran miotúbulos ANKK1-. Escala: 50 µm.

### 4.1.2. LA EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DE ANKK1 VARÍA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

Para conocer la expresión de ANKK1 durante el proceso de diferenciación miogénica, se utilizaron las líneas celulares C2C12 y RD (Rhabdomyosarcoma). La línea murina C2C12 fue originalmente establecida a partir del músculo adulto y muestra muchas similitudes con los mioblastos fetales por lo que es un buen modelo para el estudio de la dinámica de la expresión de ANKK1 durante la progresión miogénica. La línea tumoral humana RD se utilizó por su capacidad de diferenciar parcialmente *in vitro* hacia miotúbulos.

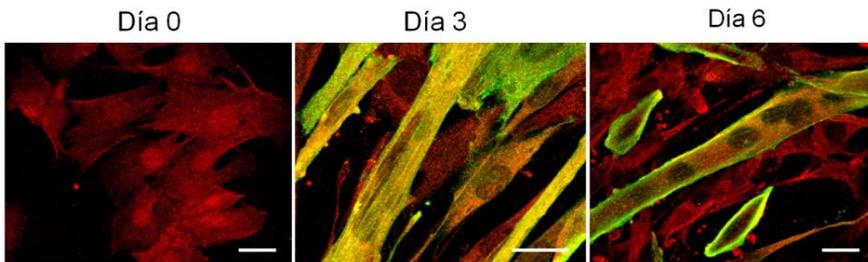
Se estudió la expresión de ANKK1 en proliferación (Día 0, D0) y tras 3 (D3) y 6 (D6) días post-inducción de diferenciación para la formación de miotúbulos. El patrón de expresión celular se analizó mediante inmunofluorescencia con los anticuerpos STk2 y  $\alpha$ -Actinina (marcador citoplasmático expresado en músculo esquelético y cardíaco).

ANKK1 se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma de los mioblastos murinos y humanos (Fig. 19). La señal de ANKK1 en el núcleo es muy intensa en la mayoría de mioblastos encontrándose una menor proporción de núcleos con intensidad de expresión de ANKK1 más leve e idéntica a la del citoplasma. La línea C2C12 (Fig. 19A) presentó a D3 células fusionándose y expresando  $\alpha$ -Actinina, y a D6 ya se observaban miotúbulos multinucleados. En los mioblastos RD (Fig. 19B), a pesar de no encontrar miotúbulos multinucleados, se observó un incremento en el número de células expresando  $\alpha$ -actinina, así como cambios morfológicos evidentes (en proliferación las células son grandes y redondeadas, mientras que tras la diferenciación se vuelven alargadas y fusiformes) (Fig. 19).

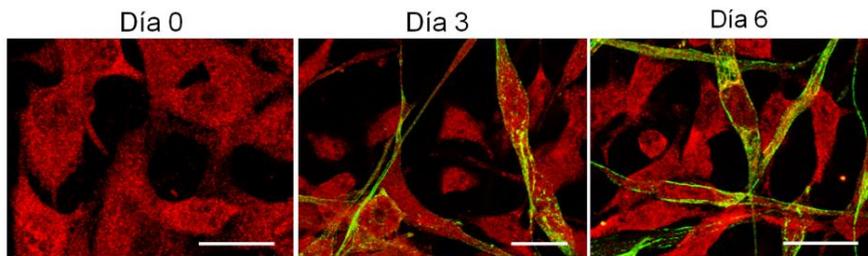
El análisis de expresión de ANKK1 reveló algunas diferencias entre ambas líneas celulares, ya que la expresión basal de ANKK1 en los núcleos de los mioblastos humanos no era tan elevada como en los mioblastos murinos. No obstante, tanto en C2C12 como en RD se producía a lo largo de la diferenciación miogénica una disminución de la señal de ANKK1 nuclear hasta su exclusión en los miotúbulos diferenciados, al mismo tiempo que se producía un incremento de la señal de ANKK1 en el citoplasma (Fig. 19).

#### A C2C12

#### ANKK1 (STk2) / $\alpha$ -Actinina



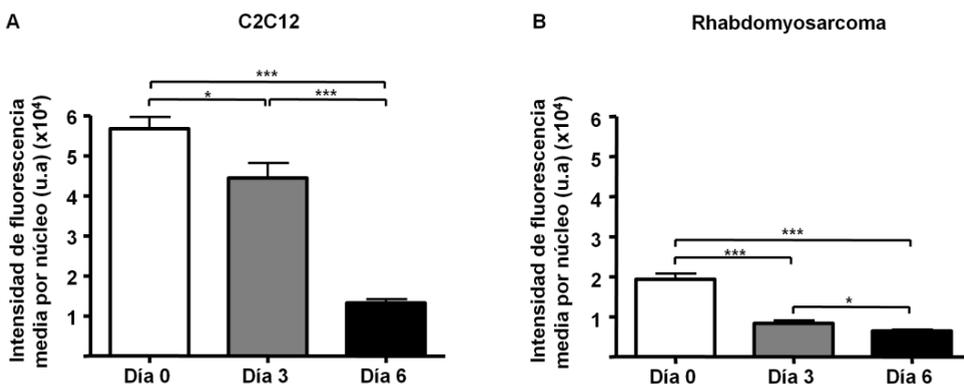
#### B Rhabdomyosarcoma



## Resultados

**Figura 19. ANKK1 nuclear disminuye durante la diferenciación miogénica de mioblastos murinos C2C12 y humanos RD.** Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se muestra la superposición del marcaje de ANKK1 (rojo) y el marcador  $\alpha$ -Actinina (verde). **(A)** Se estudiaron mediante inmunofluorescencia mioblastos en proliferación (D0) y tras la inducción de diferenciación (D3-D6) de C2C12 y **(B)** RD. Escala: 25  $\mu\text{m}$ .

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear mediante ImageJ v1.37 confirmó las observaciones previas tanto en C2C12 como en RD (Fig. 20). En ambas líneas celulares, se detectaron niveles elevados de ANKK1 nuclear en las células en proliferación, y una disminución significativa de la señal de ANKK1 tanto a D3 (C2C12, D0 vs D3:  $p=0.0147$ ; RD, D0 vs D3:  $p<0.0001$ ) como a D6 (C2C12, D0 vs D6:  $p<0.0001$ ; D3 vs D6:  $p<0.0001$ ; RD, D0 vs D6:  $p<0.0001$ ; D3 vs D6:  $p=0.0179$ ), siendo más pronunciada a D6 en mioblastos C2C12 y a D3 en RD.



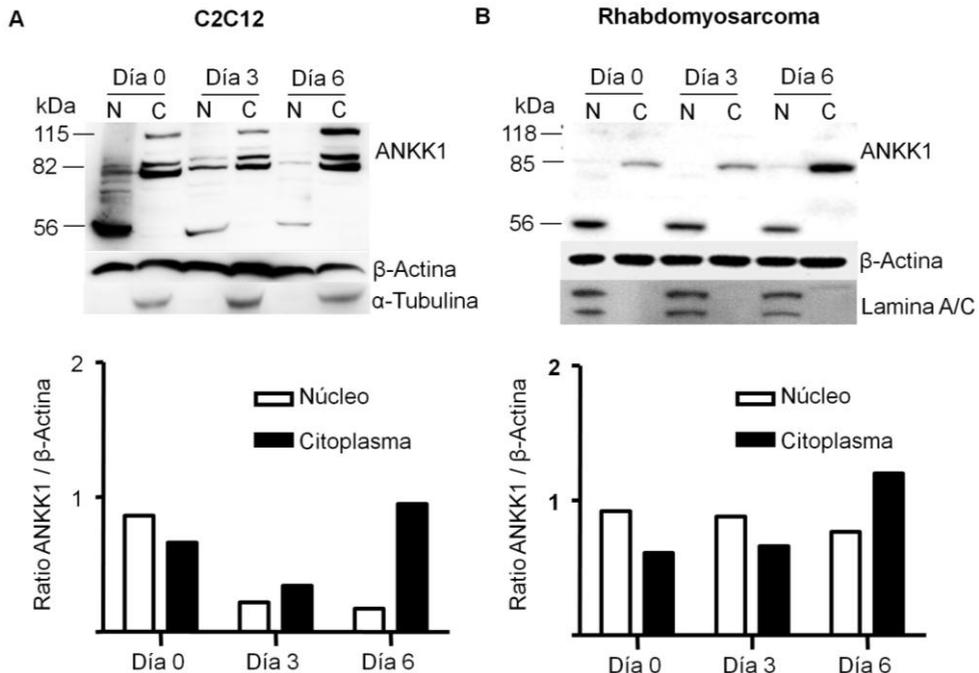
**Figura 20. La señal de ANKK1 nuclear disminuye significativamente durante la diferenciación miogénica en mioblastos murinos C2C12 y humanos RD.** **(A)** Se analizó la intensidad de fluorescencia de ANKK1 en proliferación (D0) y tras la inducción de diferenciación (D3-D6) en el núcleo de mioblastos murinos C2C12 y **(B)** humanos RD (N=3). u.a: unidades arbitrarias.

Para caracterizar los cambios en el patrón de expresión celular de ANKK1, se obtuvieron extractos proteicos enriquecidos en la fracción nuclear y la fracción citoplasmática de cada uno de los días (D0, D3 y D6) para su análisis mediante *Western Blot* con el anticuerpo STk2. Se utilizaron los marcadores  $\alpha$ -tubulina (citoplasmático) y/o lamina A/C (nuclear) para identificar el enriquecimiento de las fracciones, y  $\beta$ -actina como control de carga (Fig. 21).

Los resultados mostraron que ANKK1 presenta un perfil proteico específico de estadio en el citoplasma y en el núcleo. En ambas líneas celulares, se detecta la isoforma ANKK1-k en el núcleo (la banda de ~56- kDa) y la isoforma ANKK1-fl en el citoplasma (la banda de ~82-84- kDa). Coincidiendo con los resultados de los estudios de inmunofluorescencia, en mioblastos C2C12 la isoforma nuclear se expresa a niveles elevados en proliferación (D0) y disminuye a D3 y a D6 post-diferenciación (Fig. 21A). Se encontraron además bandas citoplasmáticas adicionales de ~86 y ~115- kDa, que podrían tratarse de isoformas de ANKK1 modificadas a nivel post-traduccional. Se observa una leve disminución a D3 de

las isoformas citoplasmáticas y a D6 vuelve a incrementar su expresión con respecto al nivel basal.

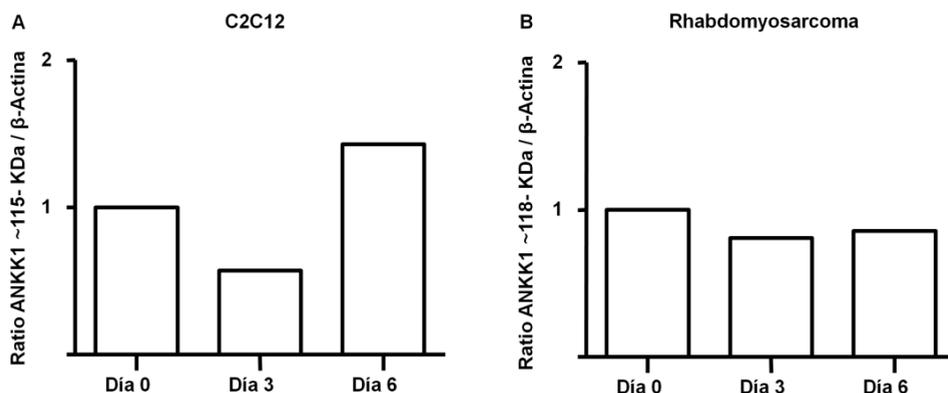
El estudio de las isoformas de ANKK1 en los mioblastos humanos RD mostró resultados similares a las células C2C12 en cuanto al patrón de expresión a lo largo del proceso de diferenciación (Fig. 21B): ANKK1-k nuclear se expresa a niveles elevados en proliferación y disminuye gradualmente a D3 y a D6, mientras que ANKK1-fl citoplasmática incrementa progresivamente su expresión a lo largo de la diferenciación.



**Figura 21. La isoforma ANKK1-k disminuye en el núcleo de mioblastos durante diferenciación mientras que la isoforma ANKK1-fl incrementa en el citoplasma. (A)** Western Blot (N=1) y cuantificación de fracciones enriquecidas en proteínas del núcleo y citoplasma en proliferación (D0) y tras la inducción de diferenciación (D3-D6) de células C2C12 y **(B)** RD. Se determinó la expresión de ANKK1 con el anticuerpo STk2 y los marcadores  $\alpha$ -tubulina y lamina A/C, respectivamente. Se representaron los ratios entre ANKK1 y  $\beta$ -actina.

En la membrana de los extractos proteicos de RD, también se detectó otra banda citoplasmática de mayor peso molecular que ANKK1-fl (~118- kDa) (Anexo 4). Se analizaron los niveles de la isoforma de elevado peso molecular en ambas líneas celulares (Fig. 22). En C2C12 se observó una disminución de la banda a D3 y un incremento a D6, por encima de los niveles basales. En RD también se observó una disminución a D3, siendo esta más leve que en C2C12 y manteniéndose prácticamente invariable a D6.

## Resultados



**Figura 22.** La isoforma ANKK1 de elevado peso molecular aumenta sus niveles tras la diferenciación de mioblastos C2C12 mientras que disminuye tras la diferenciación de mioblastos RD. (A) Cuantificación (N=1) de la banda de ANKK1 (~115-118 KDa) de las fracciones enriquecidas en proteínas del citoplasma en proliferación (D0) y tras la inducción de diferenciación (D3-D6) de células C2C12 y (B) RD. Se representaron los ratios entre ANKK1 y β-actina.

### 4.1.3. ANKK1 Y RELACIÓN CON MARCADORES MIOGÉNICOS

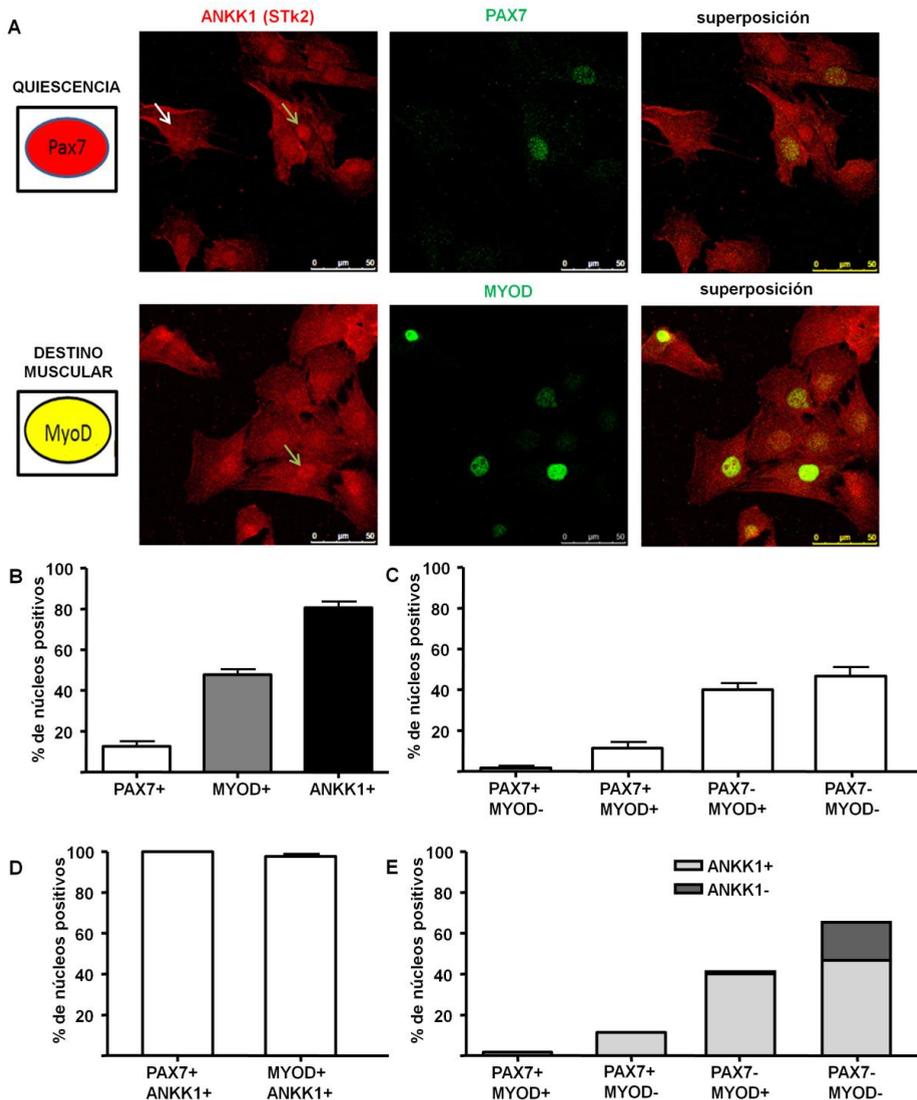
Para el estudio de la coexpresión de ANKK1 y otros marcadores tempranos de diferenciación miogénica se cultivaron mioblastos murinos C2C12 a baja confluencia para su análisis mediante inmunofluorescencia con el anticuerpo STk2, α-Pax7 (marcador de quiescencia o activación temprana) y α-MyoD (marcador de destino muscular) (Fig. 23A).

En proliferación se observaron dos subpoblaciones de mioblastos definidas por la expresión de ANKK1 nuclear: mioblastos con núcleos ANKK1+ cuya intensidad es mayor que la intensidad de ANKK1 citoplasmática (Fig. 23A, flechas verdes) frente a mioblastos con idéntica expresión de ANKK1 en núcleo y citoplasma (Fig. 23A, flechas blancas).

Dado el patrón de expresión característico de ANKK1 en el núcleo, se realizó el recuento de núcleos que expresan ANKK1+ y los marcadores PAX7 y MYOD (Fig. 23). El análisis del porcentaje de mioblastos en proliferación positivos para cada marcador individual (Fig. 23A) reveló que 12.54% de los mioblastos expresan PAX7, 47.68% expresan MYOD y, en este contexto, 80.51% expresan ANKK1+ a nivel nuclear. Se determinó la coexpresión de PAX7 y MYOD entre sí, para caracterizar las subpoblaciones de mioblastos del subclon de C2C12 (Fig. 23B): 1.8% de los mioblastos expresan PAX7 pero no MYOD; 11.44% expresan PAX7 y MYOD; 40.12% expresan MYOD pero no PAX7, mientras que 46.77 % de los mioblastos no expresan ninguno de los dos marcadores. Por lo tanto, se trata de un subclon de mioblastos C2C12 inmortalizados con bajos niveles endógenos de Pax7, tal y como otros autores han descrito previamente [220].

También se determinó la proporción de mioblastos PAX7+ o MYOD+, respectivamente, que era a su vez ANKK1+ (Fig. 23C). Se observó que el 100%

de las células PAX7+ era ANKK1+ y el 97.6% de las células MYOD+ era ANKK1+. A partir de los resultados previos, se infirieron las subpoblaciones de mioblastos definidas por la presencia/ausencia de los factores de regulación miogénica temprana PAX7 y MYOD (Fig. 23D) que además expresan ANKK1+ nuclear: los mioblastos PAX7+ (tanto MYOD- como MYOD+) expresan ANKK1+ en todos los casos; los mioblastos PAX7- MYOD+, que suponen un 40.12% de la población total, expresan en su mayoría ANKK1+ (39.15% frente a 0.96%); mientras que los mioblastos PAX7- MYOD-, que suponen un 46.77% de la población total, se dividen en 28.11% que expresan ANKK1+ frente a 18.66% que no la expresan.

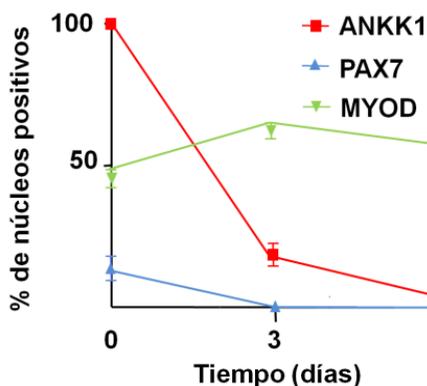


## Resultados

**Figura 23. ANKK1 se expresa preferentemente en el núcleo de mioblastos que expresan los marcadores de quiescencia (PAX7) y activación temprana (MYOD).** (A) Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se observa el marcaje de ANKK1 (rojo), los marcadores PAX7 y MYOD (verde) y la superposición de los dos canales. Se señalan núcleos ANKK1+ con una señal mayor (flechas verdes) o igual (flechas blancas) que el marcaje citoplasmático. (B-D) Cuantificación de los patrones de fluorescencia para cada marcador (N=3). (B) Recuento de los núcleos positivos para cada marcador individual en proliferación: PAX7, MYOD y ANKK1, respectivamente. (C) Caracterización de las subpoblaciones del cultivo según la presencia o ausencia de los marcadores PAX7 y MYOD. (D) Recuento de núcleos que coexpresan PAX7 y ANKK1, y MYOD y ANKK1, respectivamente. (E) Inferencia de los núcleos ANKK1+ para cada subpoblación caracterizada en (B), según los resultados obtenidos en (C).

Para correlacionar la expresión de ANKK1 con el grado de diferenciación miogénica, se realizó un análisis de colocalización mediante inmunofluorescencia y un posterior recuento de los núcleos positivos para ANKK1 (independientemente del nivel de intensidad) y los marcadores PAX7 y MYOD durante la diferenciación de mioblastos C2C12 (Fig. 24).

En proliferación, la señal de ANKK1 colocaliza con células PAX7+ (13.82%) y MYOD+ (45.4%). Tras la inducción de diferenciación, se observa a D3 una disminución de la señal de ANKK1 en el núcleo (D0 vs D3:  $p < 0.0001$ ) que coincide con el decaimiento de PAX7 (18.62% y 0, respectivamente) mientras que MYOD incrementa (D0 vs D3:  $p = 0.0067$ , 62.29%). A D6, ANKK1 se reduce a 3.94% de las células (D0 vs D6:  $p < 0.0001$ ; D3 vs D6:  $p = 0.0433$ ) al mismo tiempo que MYOD disminuye al 54.4% (D0 vs D6:  $p = 0.1285$ ; D3 vs D6:  $p = 0.0365$ ) (Fig. 24).



**Figura 24. La disminución de ANKK1 durante diferenciación se correlaciona con la reducción de PAX7 a D3 y de MYOD a D6.** Se representa el porcentaje de núcleos positivos para ANKK1 (línea roja), PAX7 (línea azul) y MYOD (línea verde).

#### 4.1.4. ANKK1 SE GLICOSILA EN TEJIDO NERVIOSO Y MUSCULAR

La observación en los *Western Blot* de una banda citoplasmática de elevado peso molecular reconocida por el anticuerpo STk2 sugería una posible modificación de la proteína ANKK1. Por ello, se realizó una búsqueda *in silico* de posibles modificaciones post-traduccionales de las proteínas ANKK1 humana y murina (Fig. 25) que pudieran explicar este aumento en el tamaño, específicamente, sitios de glicosilación. Se distinguen tres tipos de glicosilación atendiendo al átomo del aminoácido que se une a la cadena de carbohidratos: C-, N-, y O-glicosilación. La predicción de los sitios putativos de glicosilación en la secuencia aminoácidos de ANKK1-fl se realizó con el programa ExPASy y con los servidores NetNGlyc v1.0, NetOGlyc v4.0 y NetCGlyc v1.0. El programa anota sitios de glicosilación identificados experimentalmente para mamíferos.

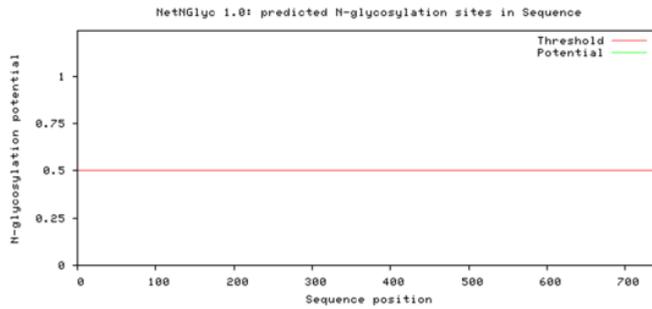
El análisis con el servidor NetNGlyc no mostró sitios putativos de N-glicosilación en la secuencia de ANKK1 murina (Fig. 25A), mientras que en la secuencia de ANKK1 humana se localizaron dos sitios putativos de N-glicosilación (Fig. 25B), únicamente superando uno de ellos el valor umbral de 0.5, que da una estimación del potencial de glicosilación (0.67). La secuencia consenso se localiza en los aminoácidos de la posición 103-105 (dominio quinasa de la proteína), siendo el aminoácido 103 (asparagina) susceptible de N-glicosilación.

El análisis con el servidor NetOGlyc mostró dos secuencias consenso susceptibles de ser O-glicosiladas y superando el valor umbral (0.68) en la secuencia de ANKK1 murina (Fig. 25C), en los aminoácidos 321 y 325 (Ser en ambos casos), localizados en el interdominio de la proteína. En el caso de ANKK1 humana, también se encontraron dos secuencias candidatas superando el valor umbral (0.68 y 0.59, respectivamente) en los aminoácidos 12 y 245 (Ser en ambos casos) localizados dentro del dominio quinasa en el extremo Nt (Fig. 25D).

El análisis con el servidor NetCGlyc no predijo ningún sitio de C-manosilación que superara el valor umbral en ninguna de las secuencias de ANKK1 humana y murina (Fig. 25E-F).

**ANKK1 murina**

**A N-GLICOSILACIÓN**

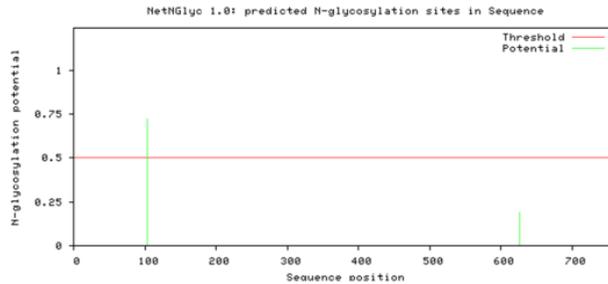


**B O-GLICOSILACIÓN**

#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	321	321	0.685406	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	325	325	0.687215	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	327	327	0.269425	.	.	

**C C-MANOSILACIÓN**

#	seqname	source	feature	start	end	score	+/-	?
#	-----							
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	37	37	0.182	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	56	56	0.258	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	129	129	0.162	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	181	181	0.217	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	229	229	0.190	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	265	265	0.173	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	280	280	0.167	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	352	352	0.217	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	438	438	0.213	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	471	471	0.226	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	603	603	0.198	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	636	636	0.200	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	669	669	0.309	.	.
Sequence		netCglyc-1.0b	C-manno	702	702	0.202	.	.
#	-----							

**ANKK1 humana****D****N-GLICOSILACIÓN****E****O-GLICOSILACIÓN**

#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	6	6	0.353696	.	.	.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	12	12	0.677796	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	17	17	0.264879	.	.	.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	30	30	0.180174	.	.	.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	221	221	0.0848187	.	.	.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	227	227	0.0427663	.	.	.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	245	245	0.594717	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	250	250	0.425322	.	.	.
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	255	255	0.323686	.	.	.

**F****C-MANOSILACIÓN**

#	seqname	source	feature	start	end	score +/-	?
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	25	25	0.219	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	44	44	0.223	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	117	117	0.165	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	169	169	0.203	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	217	217	0.180	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	253	253	0.183	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	268	268	0.168	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	429	429	0.253	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	462	462	0.240	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	594	594	0.223	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	627	627	0.254	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	660	660	0.358	.	.
Sequence	netCglyc-1.0b	C-manno	693	693	0.191	.	.

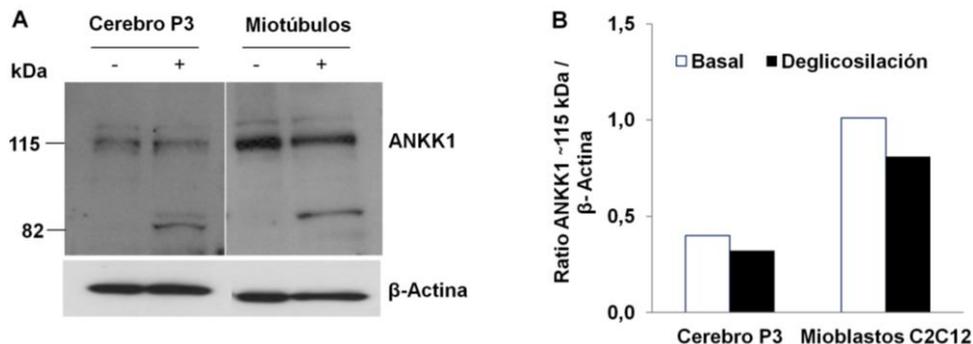
**Figura 25. Las proteínas ANKK1 humana y murina son susceptibles de sufrir glicosilación.** Se muestran los resultados del análisis con los servidores NetNGlyc 1.0, NegOGlyc 4.0 y NetCglyc 1.0. En las gráficas de N-glicosilación, se muestra la longitud de la secuencia de aminoácidos en el eje X y el potencial de glicosilación en el eje Y. Cada línea vertical azul reconoce una secuencia consenso de glicosilación localizada en la secuencia de la proteína ANKK1. La línea roja horizontal marca el umbral por encima del cual es posible que ocurra la glicosilación, pero por debajo del cual es improbable. Los servidores de O-glicosilación y C-manosilación dan un resultado en formato de tabla que indica la posición de la secuencia del sitio putativo de glicosilación y le asigna una puntuación por encima de la cual el aminoácido es susceptible de ser glicosilado. **(A)** No hay sitios putativos de N-glicosilación en la secuencia de ANKK1 murina, **(B)** pero sí se han identificado dos sitios putativos de O-glicosilación (recuadros rojos). **(D)** En la secuencia de ANKK1 humana, se ha localizado un sitio putativo de N-glicosilación y **(E)** dos de O-glicosilación (recuadros rojos). **(C, F)** En ningún caso se han localizado sitios putativos de C-manosilación.

Para el análisis experimental de la glicosilación de ANKK1 se realizó el tratamiento de extractos proteicos con una combinación de PNGasa F y exoglicosidasas que eliminan los N- y O-glicanos de las proteínas, mediante la utilización de un kit comercial. Se utilizaron muestras en las que estaba caracterizada la presencia de la banda de ANKK1 de elevado peso molecular: cerebro de ratón postnatal a D3 y

## Resultados

miotúbulos C2C12 tras la inducción de diferenciación (D6). Los resultados fueron visualizados mediante *Western Blot* utilizando el anticuerpo STK3 (Fig. 26).

Este estudio reveló que en los extractos sin deglicosilar se observaba una banda de ~115- kDa (Fig. 26A). Tras la deglicosilación, esta banda disminuye de los extractos deglicosilados, mientras que aparece una banda de ~82- kDa (Fig. 26A), correspondiente al peso molecular de ANKK1-fl sin modificaciones. La densitometría de la banda de ~115- kDa confirma la disminución observada en los extractos deglicosilados (Fig. 26B).



**Figura 26. ANKK1-fl sufre la modificación post-traduccional de glicosilación. A)** Western Blot (N=1) y **(B)** cuantificación de las proteínas antes (-) y después de la deglicosilación *in vitro* de extractos de cerebro postnatal (D3) y miotúbulos C2C12 diferenciados (D6). Las proteínas se separaron durante más tiempo para una mayor separación de las bandas. Se determinó la expresión de ANKK1 con el anticuerpo STK3 y se representó el ratio con respecto a  $\beta$ -Actina.

### 4.1.5. LEPTOMICINA B INHIBE LA EXPORTACIÓN NUCLEAR DE ANKK1 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN MIOGÉNICA

Anteriormente, se han descrito evidencias *in silico* de la presencia de NLS y NES en la proteína ANKK1 humana [79]. En este trabajo se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de ANKK1 murina con el programa NUCDISC y el servidor NETNES v1.1. Este análisis reveló la presencia de secuencias NLS y NES únicas y homólogas al comparar con la proteína humana (Fig. 27). Además de las secuencias conservadas entre ambas especies, en la proteína ANKK1 murina se encontró una NLS única que se extendía desde los aminoácidos 3 a 9 (PHRARRL).

<i>M. musculus</i>	1	MV <b>PHRARR</b> LNPMAVGP <b>LAQQ</b> L <b>GS</b> LTVFTRDD <b>FEE</b> WHLVASGGFSKV <b>FQAR</b> <b>HKR</b> WRTQYA	
		NLS1	KINASE DOMAIN NLS2
<i>H. sapiens</i>	1	-----MAAD <b>P</b> TELRL <b>GS</b> LPV <b>F</b> TRDD <b>FEG</b> WRLVASGGFSQ <b>V</b> FQAR <b>HR</b> RWRTEYA	
<i>M. musculus</i>	62	<b>I</b> KCS <b>P</b> CLQ <b>K</b> ETTS <b>S</b> EV <b>T</b> CL <b>F</b> EEAV <b>K</b> ME <b>K</b> IK <b>F</b> QH <b>I</b> VS <b>I</b> Y <b>G</b> V <b>C</b> K <b>Q</b> PL <b>G</b> IV <b>M</b> EF <b>M</b> AS <b>G</b> SL <b>E</b> KT <b>L</b>	
<i>H. sapiens</i>	50	<b>I</b> K <b>C</b> AP <b>C</b> LP <b>P</b> DA <b>S</b> SD <b>V</b> NY <b>L</b> IE <b>E</b> AA <b>K</b> M <b>K</b> K <b>I</b> K <b>F</b> QH <b>I</b> VS <b>I</b> Y <b>G</b> V <b>C</b> K <b>Q</b> PL <b>G</b> IV <b>M</b> EF <b>M</b> ANG <b>S</b> L <b>E</b> K <b>V</b> L	
<i>M. musculus</i>	123	PTHSLCW <b>P</b> L <b>K</b> L <b>R</b> I <b>I</b> H <b>E</b> T <b>S</b> L <b>A</b> M <b>N</b> F <b>L</b> H <b>S</b> <b>I</b> K <b>P</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>L</b> K <b>P</b> G <b>N</b> I <b>L</b> L <b>D</b> N <b>M</b> H <b>V</b> K <b>I</b> S <b>D</b> F <b>G</b> L <b>S</b> K <b>W</b> M <b>E</b>	
		NES	
<i>H. sapiens</i>	110	STHSLCW <b>K</b> L <b>R</b> F <b>I</b> I <b>H</b> E <b>T</b> S <b>L</b> A <b>M</b> N <b>F</b> L <b>H</b> S <b>I</b> K <b>P</b> <b>P</b> <b>L</b> <b>L</b> <b>H</b> <b>L</b> <b>D</b> <b>L</b> K <b>P</b> G <b>N</b> I <b>L</b> L <b>D</b> S <b>N</b> M <b>H</b> V <b>K</b> I <b>S</b> D <b>F</b> G <b>L</b> S <b>K</b> W <b>M</b> E	
<i>M. musculus</i>	184	<b>Q</b> S <b>T</b> Q <b>K</b> Q <b>Y</b> I <b>E</b> R <b>S</b> A <b>L</b> R <b>G</b> T <b>L</b> S <b>Y</b> I <b>P</b> P <b>E</b> M <b>F</b> L <b>E</b> N <b>N</b> K <b>A</b> G <b>P</b> E <b>Y</b> D <b>V</b> Y <b>S</b> F <b>A</b> I <b>V</b> I <b>E</b> I <b>L</b> T <b>Q</b> K <b>K</b> P <b>Y</b> A <b>G</b> L <b>N</b> M <b>M</b>	
<i>H. sapiens</i>	171	<b>Q</b> S <b>T</b> R <b>M</b> Q <b>Y</b> I <b>E</b> R <b>S</b> A <b>L</b> R <b>G</b> M <b>L</b> S <b>Y</b> I <b>P</b> P <b>E</b> M <b>F</b> L <b>E</b> S <b>N</b> K <b>A</b> G <b>P</b> K <b>Y</b> D <b>V</b> Y <b>S</b> F <b>A</b> I <b>V</b> I <b>E</b> L <b>L</b> T <b>Q</b> K <b>K</b> P <b>Y</b> S <b>G</b> F <b>N</b> M <b>M</b>	
<i>M. musculus</i>	245	T <b>I</b> I <b>R</b> V <b>A</b> A <b>G</b> M <b>R</b> P <b>S</b> L <b>Q</b> D <b>V</b> S <b>D</b> E <b>W</b> P <b>E</b> E <b>V</b> H <b>Q</b> M <b>V</b> N <b>L</b> M <b>K</b> R <b>C</b> W <b>D</b> Q <b>D</b> <b>P</b> K <b>K</b> R <b>P</b> C <b>E</b> L <b>N</b> V <b>A</b> V <b>E</b> T <b>D</b>	299
		NLS3	
<i>H. sapiens</i>	232	M <b>I</b> I <b>R</b> V <b>A</b> A <b>G</b> M <b>R</b> P <b>S</b> L <b>Q</b> P <b>V</b> S <b>D</b> Q <b>W</b> P <b>S</b> E <b>A</b> Q <b>M</b> V <b>D</b> L <b>M</b> K <b>R</b> C <b>W</b> D <b>Q</b> D <b>P</b> K <b>K</b> R <b>P</b> C <b>E</b> L <b>D</b> I <b>T</b> I <b>E</b> T <b>D</b>	286

**Figura 27. La proteína ANKK1 murina presenta NES conservados y NLS conservados y únicos con respecto a ANKK1 humana.** Análisis de alineamiento de las secuencias predichas de aminoácidos para el dominio quinasa de ANKK1 en *Mus Musculus* (GenBank: AA145079.1) y *Homo sapiens* (NP\_848605.1) y la identificación de NLS y NES. El sombreado indica una identidad de secuencia del 100%. El dominio quinasa está subrayado. Los aminoácidos altamente hidrofóbicos en NES están marcados en negrita.

El análisis *in silico* sugería que la exclusión nuclear de ANKK1 en los miotúbulos podía estar mediada por NES. Para estudiar la dinámica subcelular de ANKK1 durante el proceso de diferenciación, se estudió el efecto de Leptomicina B sobre los mioblastos murinos C2C12, un agente que inhibe la exportina 1, requerida para la exportación nuclear de proteínas que contienen NES, como es el caso de ANKK1 [79]. Se indujo la diferenciación de mioblastos y se añadió Leptomicina B durante 24 horas en distintos momentos del proceso de diferenciación (24-48 horas). Se fijaron células para inmunofluorescencia con los anticuerpos STk2 y  $\alpha$ -Actinina, y paralelamente se recogieron células para *Western Blot*.

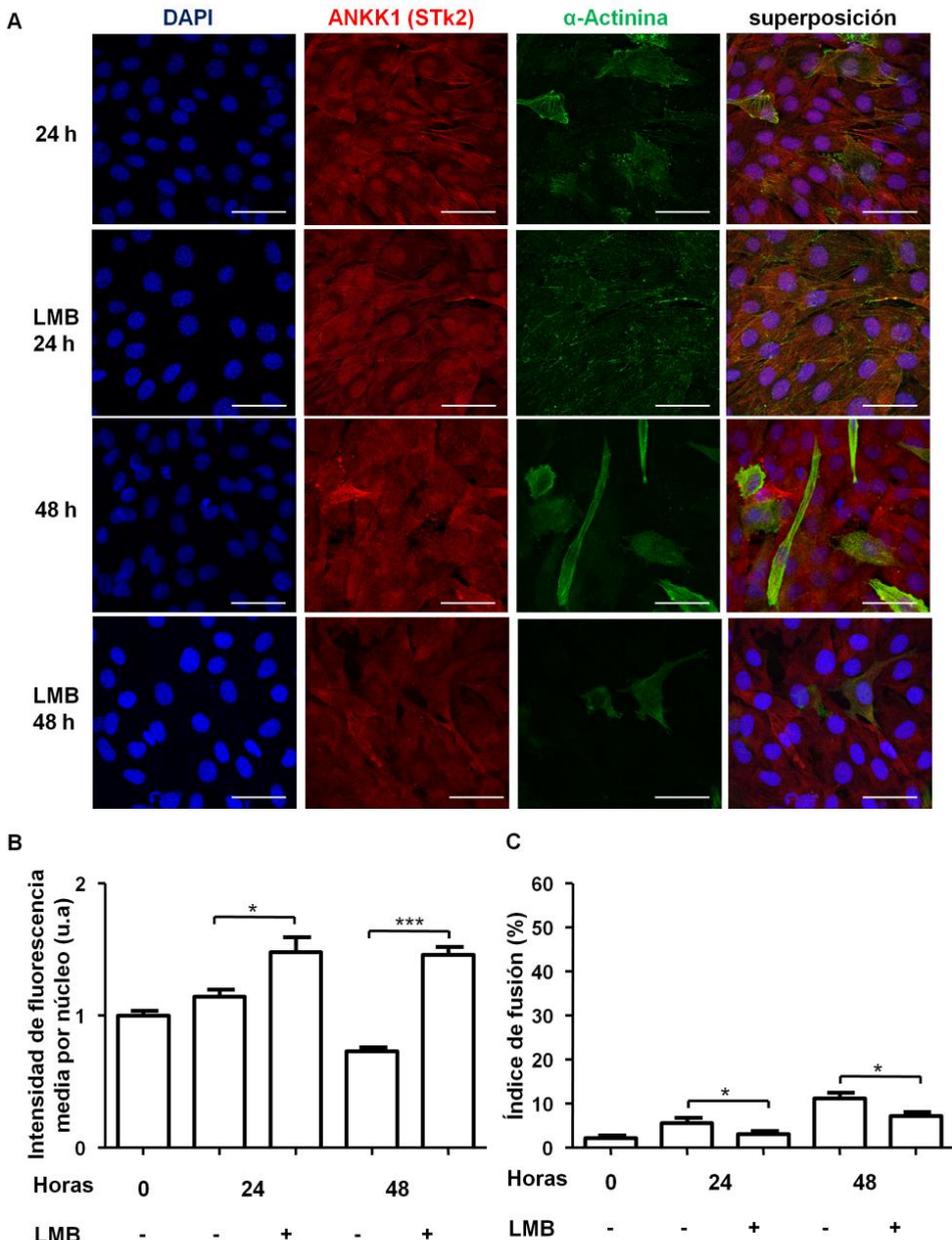
Las imágenes de fluorescencia mostraron el patrón característico de expresión de ANKK1 (Fig. 28A): núcleos muy intensos en estadios iniciales de diferenciación y disminución de la intensidad en el núcleo a medida que avanza el proceso. El marcaje con  $\alpha$ -Actinina permitió realizar un seguimiento visual de la diferenciación. En los cultivos tratados con Leptomicina B se podía apreciar un incremento de los niveles de ANKK1 en el núcleo en relación a sus respectivos cultivos control que presentaban un mayor número de células  $\alpha$ -Actinina+ (Fig. 28A).

Para cuantificar el efecto de Leptomicina B sobre la expresión de ANKK1 en mioblastos en diferenciación, se midió la intensidad de fluorescencia nuclear de ANKK1 (Fig. 28B) y se determinó el índice de fusión (número células  $\alpha$ -Actinina positivas frente al total de células), que es un estimador del grado de diferenciación miogénica (Fig. 28C).

## Resultados

La cuantificación de la señal de fluorescencia de ANKK1 nuclear (Fig. 28B) mostró que ANKK1 nuclear disminuye significativamente tras 48 horas post-diferenciación frente a 24 horas en ausencia de tratamiento con Leptomicina B (24 vs 48h:  $p=0.0096$ ). Tras el tratamiento con Leptomicina B, tanto a 24 (24 vs LMB 24h:  $p=0.0117$ ) como a 48 horas (48 vs LMB 48h:  $p<0.0001$ ), se produce una retención significativa de ANKK1 en el núcleo comparado con la ausencia de tratamiento.

El estudio del grado de diferenciación miogénica (Fig. 28C) reveló, coincidiendo con los resultados del estudio de diferenciación, un incremento significativo del índice de fusión con el tiempo de inducción de diferenciación en ausencia de Leptomicina B (0 vs 24 h:  $p=0.0112$ ; 0 vs 48 h:  $p<0.0001$ ; 24 vs 48 h:  $p=0.005$ ). Tras el tratamiento con Leptomicina B también se produce una disminución significativa del índice de fusión (24 vs LMB 24 h:  $p=0.0441$ ; 48 vs LMB 48 h:  $p=0.0150$ ).



**Figura 28. Leptomicina B bloquea la exportación de ANKK1 del núcleo de mioblastos C2C12 y produce una disminución del índice de fusión. (A)** Inmunofluorescencia de mioblastos murino C2C12 tras inducción de diferenciación (24, 48 horas) y tratamiento con 2 ng/ml LMB 24 horas antes de la fijación. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 0.5  $\mu$ m de grosor cada uno. Se muestra el marcaje de núcleos con DAPI, ANKK1 (rojo),  $\alpha$ -Actinina (verde) y la superposición de los canales. Escala: 50  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ANKK1 nuclear (STk2)

## Resultados

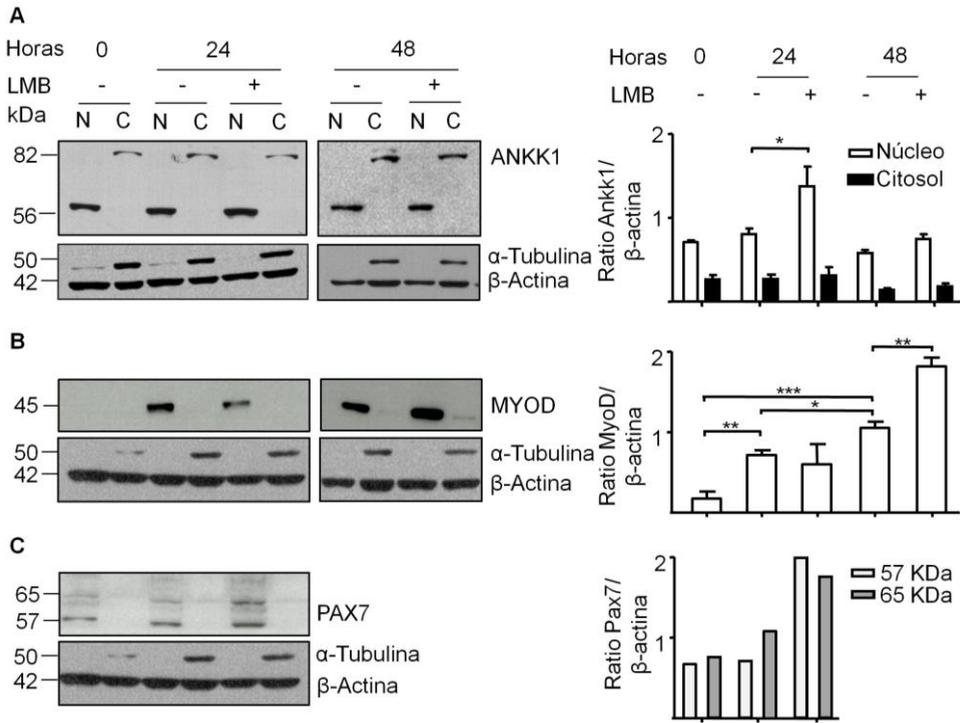
y (C) determinación del índice de fusión mediante el recuento de células  $\alpha$ -Actinina+. u.a: unidades arbitrarias; LMB: Leptomicina B.

La retención significativa de ANKK1 en el núcleo observada por inmunofluorescencia también se estudió mediante Western Blot. Se utilizaron fracciones enriquecidas en proteínas nucleares y citoplasmáticas de C2C12, se analizó el efecto de Leptomicina B sobre la expresión de ANKK1 utilizando el anticuerpo STk2 y se determinó la expresión de PAX7 y MYOD (Fig. 29).

Los resultados revelaron que, coincidiendo con los resultados previos, ANKK1 nuclear incrementa tras el tratamiento con Leptomicina B, alcanzando este valor significación estadística a las 24 horas de tratamiento (24 vs LMB 24h:  $p=0.0336$ ) (Fig. 29A), por lo que esta proteína era muy sensible al tratamiento con Leptomicina B. En ningún caso se encontraron cambios significativos en los niveles de la isoforma citoplasmática de ANKK1 (24 vs LMB 24h:  $p=0.7158$ ); 48 vs LMB 48h:  $p=0.3455$ ).

El estudio de expresión de MYOD reveló que, coincidiendo con resultados previos, los niveles de MYOD incrementan tras la inducción de diferenciación en ausencia de tratamiento (0 vs 24h:  $p=0.007$ ; 0 vs 48h:  $p=0.0016$ ; 24 vs 48h:  $p=0.0248$ ) (Fig. 29B). Después de 24 horas de diferenciación, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de MYOD en presencia de Leptomicina B, pero sí a 48 horas (48 vs LMB 48h:  $p=0.0041$ ), sugiriendo una menor sensibilidad de esta proteína al tratamiento.

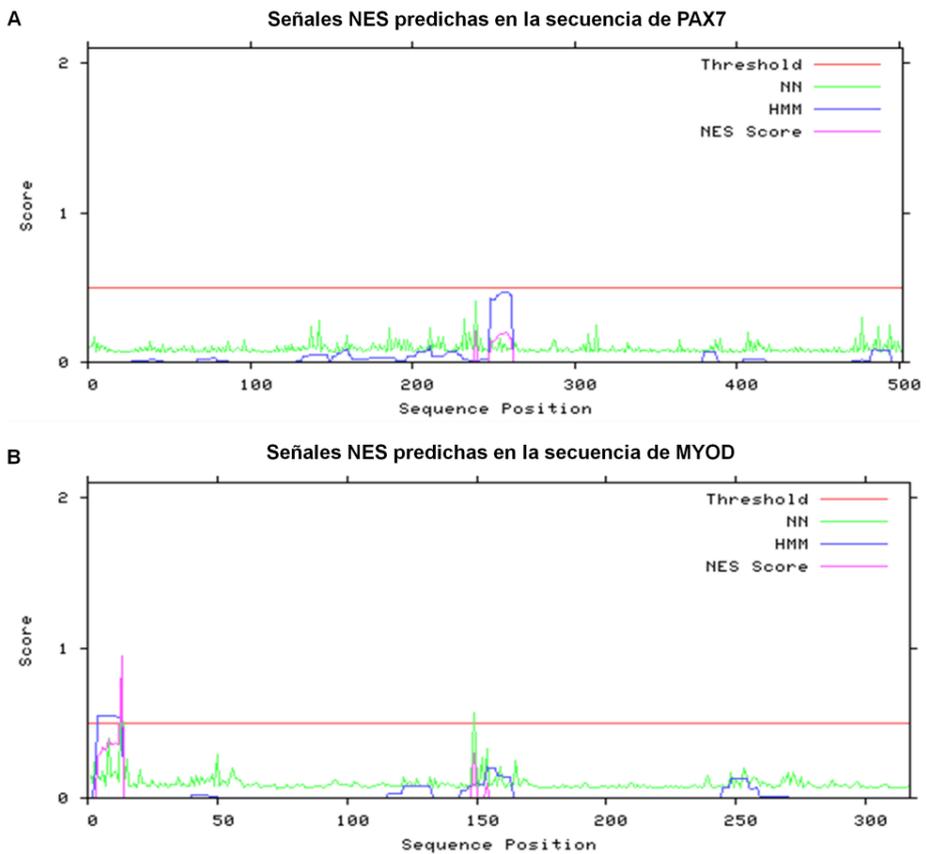
Un estudio independiente de la expresión de PAX7 reveló un incremento de los niveles de esta proteína tras el tratamiento con Leptomicina B a 24 horas (banda de 57KDa) (Fig. 29C), mientras que a 48 horas ya no fue posible su detección. El anticuerpo anti-PAX7 reconoció una banda adicional de aproximadamente ~65-KDa que podría corresponder a una modificación post-traducciona l de esta proteína y también estaba incrementada tras el tratamiento con Leptomicina B.



**Figura 29. Leptomicina B bloquea la exportación de ANKK1 y MYOD en mioblastos C2C12 en diferentes momentos de la diferenciación.** *Western Blot* y cuantificación de fracciones enriquecidas en proteínas del núcleo y citoplasma en proliferación (D0) y tras 24 y 48 h de diferenciación en presencia (+) o ausencia (-) de LMB. **(A)** Se determinó la expresión de ANKK1 con el anticuerpo STk2 (N=3) **(B)** MYOD (N=3) y **(C)** PAX7 (N=1) y los marcadores α-Tubulina y Lamina A/C, respectivamente. Se representaron los ratios entre ANKK1 y β-Actina.

Paralelamente, también se realizó la búsqueda de secuencias NES en PAX7 y MYOD murinas (Fig. 30) utilizando el servidor NetNES 1. Como se aprecia en las gráficas, PAX7 no presenta una señal NES en su secuencia (Fig. 30A) mientras que MYOD presenta una señal NES que supera el valor umbral de 0.5 (0.946, Fig. 30B).

## Resultados



**Figura 30. La secuencia de aminoácidos de MYOD murina presenta una secuencia NES predicha.** (A) Se realizó un análisis *in silico* de NES en las secuencias de las proteínas murinas de PAX7 (NCBI: NP\_035169.1) y (B) MYOD (GenBank: AAA39798.1). Se muestran los resultados del análisis con el servidor NetNES 1. Se representa la longitud de la secuencia de aminoácidos en el eje X y el potencial de glicosilación en el eje Y. La línea roja horizontal marca el umbral por encima del cual es posible que ocurra la glicosilación, pero por debajo del cual es improbable.

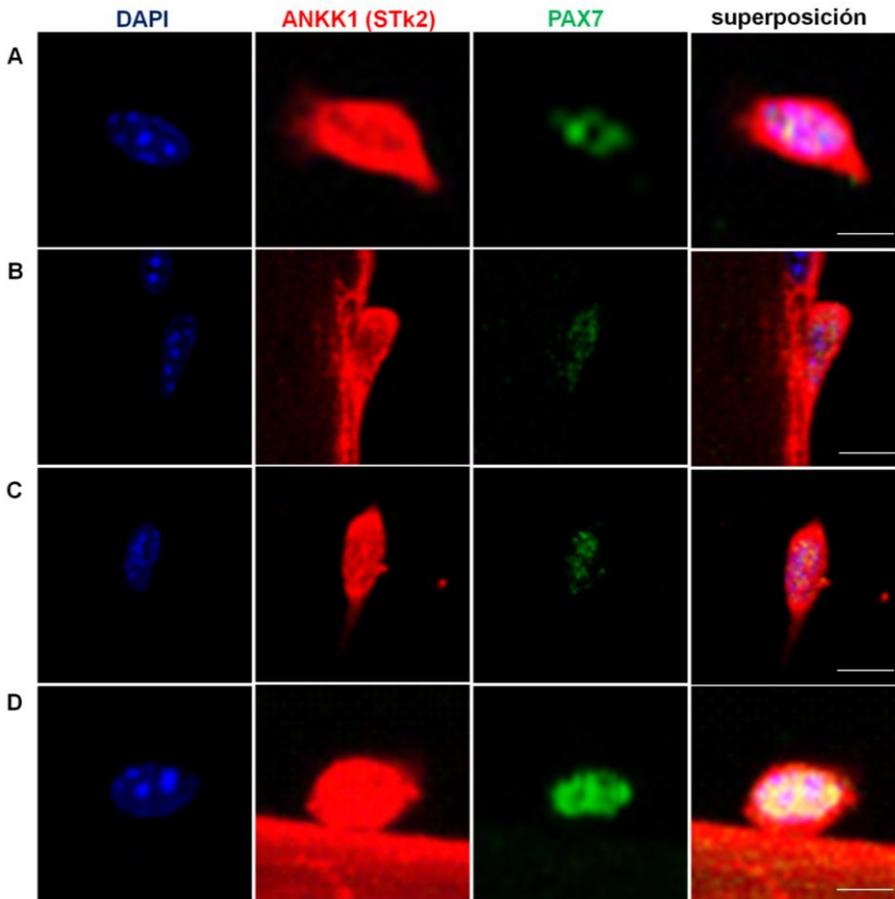
## **4.2. ANKK1 ES UN MARCADOR DE CÉLULAS SATÉLITE Y DE SUBTIPO DE FIBRA EN EL MÚSCULO ADULTO**

### **4.2.1. ANKK1 DISCRIMINA POBLACIONES QUIESCENTES Y ACTIVADAS DE CÉLULAS SATÉLITE**

Una vez determinada la expresión de ANKK1 en el estadio embrionario y durante el desarrollo, a continuación se estudió la expresión de esta proteína en las células con potencial regenerativo muscular de la edad adulta, las SCs. Para ello, se obtuvieron miofibras en cultivo con SCs asociadas derivadas del músculo FDB de ratones de 2-3 meses de edad de la cepa C57BL/6. Se llevó a cabo un protocolo de digestión enzimática y mecánica leve del músculo. Las miofibras se fijaron sobre cubreobjetos y se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de ANKK1 con el anticuerpo STk2 en SCs, definidas por el marcador de quiescencia o activación temprana PAX7.

Los estudios de colocalización mostraron que ANKK1 se expresa en el 100% de las células PAX7+ encontradas en los cultivos (N=25), y por consiguiente, en todas las SCs (Fig. 31). Sin embargo, como se puede apreciar en las imágenes, la expresión de ANKK1 varía en estas células y distingue dos subpoblaciones, encontrándose un patrón de expresión fundamentalmente citoplasmático en el 72% de las SCs (N=18) (Fig. 31A-B), y un enriquecimiento de ANKK1 en el núcleo del 28% de las SCs (N=7) (Fig. 31C-D). Las imágenes de las SCs de la Figura 31 con sus fibras asociadas se pueden apreciar en el Anexo 5.

## Resultados

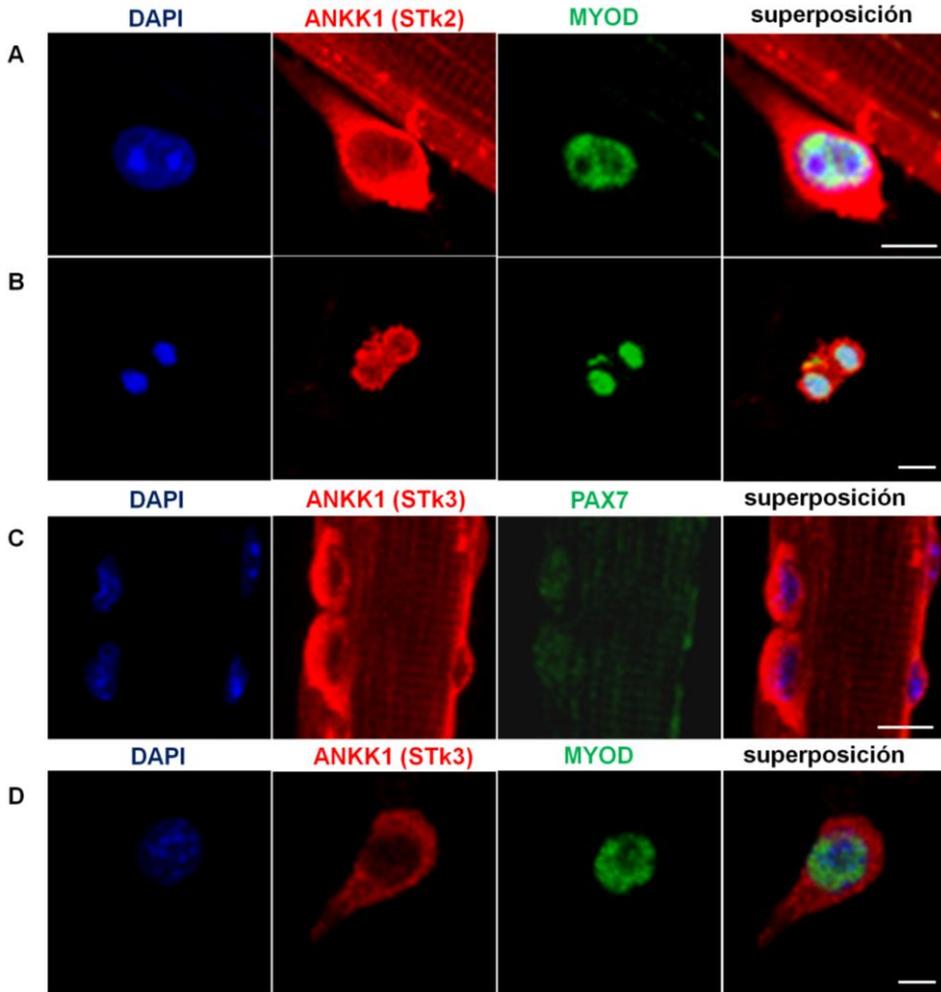


**Figura 31. ANKK1 se expresa en las SCs de músculo de ratón adulto.** Se estudió expresión de ANKK1 en SCs en cultivo asociadas al músculo esquelético FDB mediante inmunofluorescencia. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 8 capas de 1  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se muestran 4 SCs obtenidas tras el cultivo de fibras FDB. Se observa el marcaje de DAPI, ANKK1 detectada con el anticuerpo STk2 (rojo), PAX7 (verde) y la superposición de las imágenes. **(A,B)** ANKK1 se expresa preferentemente en el citoplasma de algunas SCs y **(C,D)** en el núcleo de otras. Escala: 5  $\mu\text{m}$ .

Para evaluar si la localización de ANKK1 en el núcleo de SCs se correlaciona con su estado de activación tal y como sucede en mioblastos en cultivo en proliferación, se estudió la coexpresión de ANKK1 con el marcador de destino muscular MYOD (Fig. 32A,B). Se estudió también la coexpresión de PAX7 y MYOD con ANKK1 utilizando el anticuerpo STk3, que reconoce un epítipo ubicado en ANKK1-fl y en ANKK1-ank, pero no en ANKK1-k (Fig. 32C,D).

El estudio de coexpresión de ANKK1 (STk2) y MYOD mostró que las SCs del cultivo que expresan MYOD tienen una expresión fundamentalmente citoplasmática de ANKK1 (N=5) (Fig. 32 A,B). El estudio de coexpresión de STk3 con los marcadores PAX7 y MYOD reveló que, independientemente del marcador

que define el estado de activación de la SC, ya sea PAX7 (N=7) o MYOD (N=4), ANKK1 se expresa a nivel citoplasmático en estas células, en ningún caso encontrando su localización a nivel nuclear (Fig. 32C,D). Las imágenes de las SCs de la Figura 32 con sus fibras asociadas se pueden apreciar en el Anexo 6.



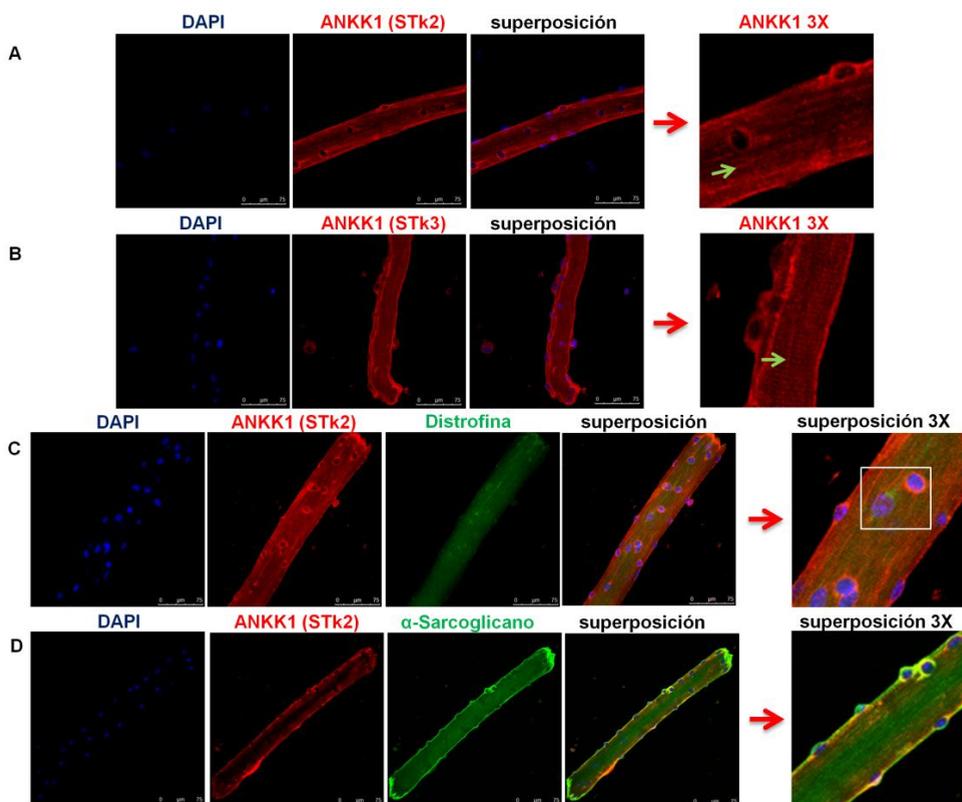
**Figura 32. ANKK1 nuclear está ausente de las SCs activadas mientras que ANKK1-fl se expresa en el citoplasma de SCs quiescentes y activadas.** Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia de SCs en cultivo. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de  $1\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se observa el marcaje de DAPI, ANKK1 detectada con los anticuerpos STk2 (A-B) y STk3 (C-D) (rojo), los marcadores MYOD (A-B,D) y PAX7 (C) en verde y la superposición de las imágenes.

ANKK1 no sólo se expresaba en SCs adultas, sino que también estaba presente en las fibras musculares (Fig. 33, Anexos 5,6). Para la caracterización de la

## Resultados

expresión de ANKK1 en las fibras se utilizaron los anticuerpos STk2 y STk3, y se realizó un doble marcaje con distrofina (proteína de localización subsarcolémica) y  $\alpha$ -sarcoglicano (proteína de localización sarcolémica), respectivamente (Fig. 33).

El patrón de expresión de ANKK1 en las fibras musculares detectado con los anticuerpos STk2 y STk3 es idéntico (Fig. 33A,B), observándose en ambos casos un patrón de expresión de ANKK1 tanto longitudinal como transversal a la fibra muscular (flechas verdes). La proteína siempre se encuentra ausente de los mionúcleos, encontrándose una expresión perinuclear de ANKK1. El estudio de coexpresión de ANKK1 con Distrofina (Fig. 33C) muestra la colocalización de ambas proteínas a nivel perinuclear en la mayor parte de los núcleos, mientras que ocasionalmente se detecta algún núcleo sin marcaje perinuclear de ANKK1 (recuadro blanco). El análisis del doble marcaje de ANKK1 con  $\alpha$ -Sarcoglicano muestra que la señal de ANKK1 subyace a la de  $\alpha$ -Sarcoglicano, localizado este último en el sarcolema (Fig. 33D).

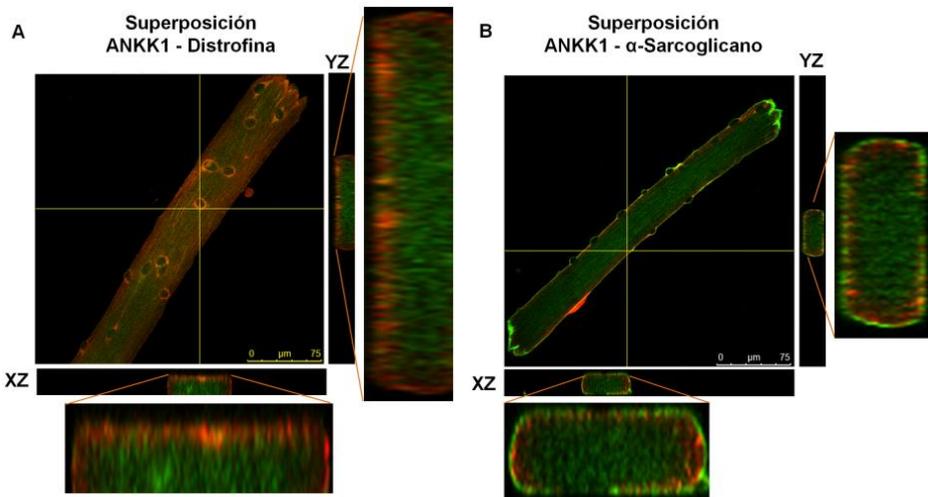


**Figura 33. ANKK1 se expresa en las fibras musculares adultas a nivel subsarcolémico.** Se analizó la expresión de ANKK1 en fibras FDB en cultivo mediante inmunofluorescencia. Las imágenes corresponden a proyecciones en Z; (A-B) 15 capas de 0.5  $\mu$ m; (C-D) 10 capas de 1  $\mu$ m. Se observa el marcaje de DAPI, ANKK1 con los anticuerpos STk2 y STk3 (rojo), Distrofina y  $\alpha$ -Sarcoglicano (verde) y la superposición. A la derecha seguida de una flecha roja se muestra una ampliación 3X de las imágenes de ANKK1. (A-B) ANKK1 muestra un patrón de expresión tanto longitudinal como transversal

a la fibra muscular (flechas verdes). **(C)** ANKK1 colocaliza con Distrofina mientras que **(D)** su expresión es subyacente a la de Sarcoglicano.

Para determinar con mayor precisión la localización de ANKK1 en la fibra muscular, se realizó la proyección ortogonal de la superposición de las capas de STk2 con los anticuerpos anti-Distrofina y anti- $\alpha$ -Sarcoglicano, respectivamente (Fig. 34). Este complemento del programa ImageJ v1.37 permite determinar si dos proteínas colocalizan (se observa en amarillo tanto la proyección en Z como los ejes XZ e YZ) o si por el contrario no colocalizan (en la proyección en Z se observa en amarillo pero al obtener los ejes XZ e YZ se observan los colores rojo y verde por separado).

El estudio de la proyección ortogonal de ANKK1 con distrofina mostró que el marcaje de ANKK1 es suprayacente al marcaje de distrofina, localizada en el subsarcolema (Fig. 34A). Sin embargo, la proyección ortogonal de ANKK1 con  $\alpha$ -sarcoglicano, ubicada en el sarcolema de la fibra muscular, reveló un marcaje de ANKK1 subyacente a esta proteína (Fig. 34B).

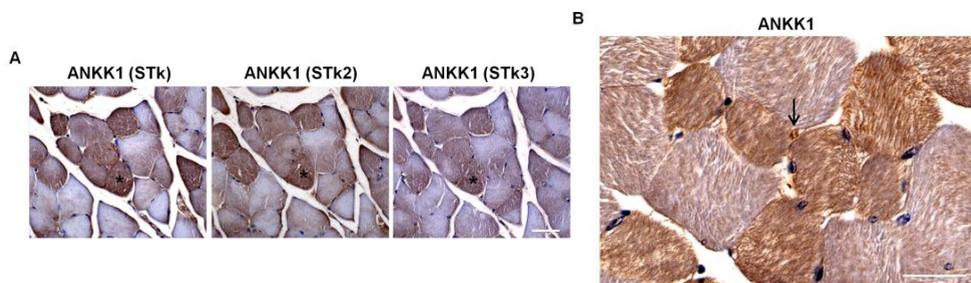


**Figura 34. La expresión de ANKK1 en la fibra muscular es subyacente a la localización de  $\alpha$ -sarcoglicano y suprayacente a la localización de distrofina.** Se realizó la proyección ortogonal de la superposición de las imágenes de ANKK1 (STk2) con distrofina y  $\alpha$ -sarcoglicano, respectivamente, utilizando el programa ImageJ v1.37. Para ello, se ha realizado la superposición de todas las capas del canal de STk2 y de la correspondiente proteína en estudio: **(A)** Distrofina y **(B)**  $\alpha$ -sarcoglicano. Se ha escogido un punto de una de las capas en el que aparentemente había colocalización de ambas proteínas (observado en color amarillo) y se han obtenido los ejes XZ e YZ para determinar si la colocalización es real o artefactual (N=3).

#### 4.2.2. ANKK1 SE EXPRESA EN UN SUBTIPO DE FIBRAS MUSCULARES ADULTAS

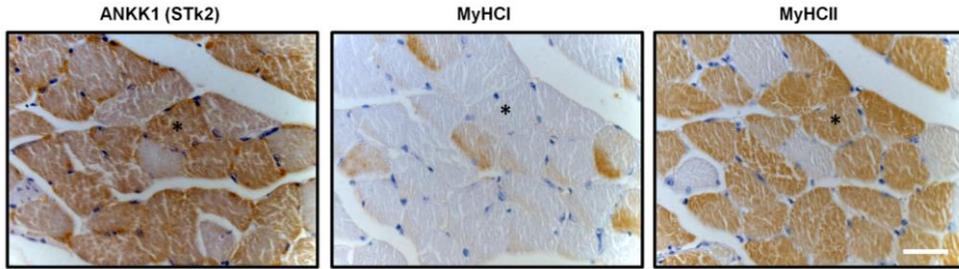
Con el fin de definir el patrón de expresión de ANKK1 en el tejido muscular adulto, se utilizaron secciones transversales de músculo parafinado de ratón (gastrocnemio) y se realizó un marcaje mediante inmunohistoquímica con los anticuerpos STk, STk2 y STk3 respectivamente (Fig. 35).

El estudio con los tres anticuerpos en secciones seriadas de músculo mostró que ANKK1 exhibe un patrón de expresión idéntico en todos los casos, encontrándose un marcaje ANKK1+ en el citoplasma de una proporción de fibras (Fig. 35A). ANKK1 no se expresaba en todas las fibras musculares, ya que también se encontraron fibras ANKK1- (Fig. 35B). Además del patrón de expresión característico observado en las fibras, se encontró que, de acuerdo con la ausencia de la proteína previamente observada en núcleos de miotúbulos embrionarios y en cultivo, ANKK1 estaba ausente de los mionúcleos de las fibras musculares adultas. Se encontró algún núcleo positivo (Fig. 35B, flecha negra), que podría tratarse, por su localización anatómica, de SCs.



**Figura 35. ANKK1 se expresa en el citoplasma de una población de fibras musculares adultas.** Se realizó un análisis de la expresión de ANKK1 con los anticuerpos STk, STk2 y STk3 en secciones transversales de gastrocnemio de ratón mediante inmunohistoquímica. **(A)** La colocalización de STk, STk2 y STk3 reveló un patrón de expresión idéntico ANKK1+. La misma fibra está señalada en las diferentes secciones (asterisco negro). **(B)** ANKK1 se expresa en el citoplasma de algunas fibras y en SCs (flecha negra). Escala: 50  $\mu$ m.

Para determinar si ANKK1 se expresa en un tipo específico de fibra (fibras tipo I vs fibras tipo II), se realizaron inmunohistoquímicas de secciones seriadas de gastrocnemio (N=3, 100 fibras analizadas por músculo) utilizando los anticuerpos STk2,  $\alpha$ -MyHCI (marcador de fibras lentas) y  $\alpha$ -MyHCII (marcador de fibras rápidas) (Fig. 36). Los resultados mostraron que ANKK1 se expresa mayoritariamente en fibras tipo II (91.7%, N=272 fibras), aunque se encontró en algún caso fibras de tipo II ANKK1- (9.3%, N=28 fibras), (Fig. 36). Sin embargo, en ningún caso se encontró la expresión de ANKK1 en fibras tipo I (N=35 fibras) (Fig. 36). La colocalización de ANKK1 con fibras tipo II también se observó en otros músculos como sóleo y tríceps (Anexo 7).



**Figura 36. ANKK1 se expresa mayoritariamente en fibras MyHCII+ y está ausente de fibras MyHCI+.** Se realizó un análisis mediante inmunohistoquímica de secciones seriadas transversales de gastrocnemio de ratón con los anticuerpos STk2, MyHCI y MyHCII. La misma fibra está señalada en las diferentes secciones (asterisco negro). Escala: 50  $\mu$ m.

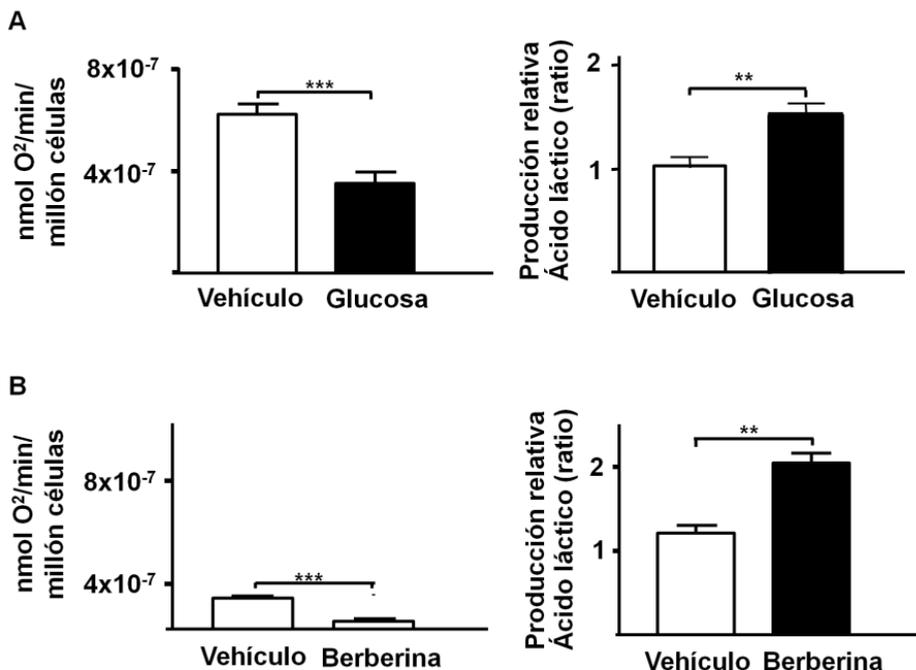
### 4.2.3. EL METABÓLICO GLICOLÍTICO INFLUYE EN LA EXPRESIÓN DEL GEN Y DE LA PROTEÍNA ANKK1

#### 4.2.3.1. Activación de la vía glicolítica mediante agentes inductores

La ausencia de ANKK1 en fibras tipo I en el músculo adulto, caracterizadas por un metabolismo oxidativo sugería una posible relación entre la presencia de ANKK1 y un metabolismo glicolítico. Para este análisis, se trataron los mioblastos C2C12 en proliferación durante 24 horas con dos agentes inductores de la vía glicolítica, respectivamente: 30 mM glucosa y 30  $\mu$ M del alcaloide botánico Berberina.

En primer lugar se comprobó que la vía glicolítica se estaba activando adecuadamente mediante la medición del consumo de oxígeno y la cuantificación de la producción de ácido láctico en el medio celular. El tratamiento con glucosa y Berberina, respectivamente, producía una disminución significativa del consumo de oxígeno (Control vs glucosa:  $p=0.0005$ ; Control vs Berberina:  $p=0.0003$ ) y un incremento significativo de la producción de ácido láctico (Control vs glucosa:  $p=0.0053$ ; Control vs Berberina:  $p=0.0080$ ) (Fig. 37). Estos datos confirmaban la correcta activación de la vía glicolítica en mioblastos C2C12.

## Resultados



**Figura 37. Glucosa y Berberina activan la glicólisis en mioblastos C2C12 en proliferación. (A)** Determinación del consumo de oxígeno (N=7) y cuantificación de la producción de ácido láctico (N=3) tras el tratamiento con glucosa 30 mM y **(B)** Berberina 30 μM. Para determinar el consumo de oxígeno, se contaron las células, se resuspendieron en 1 ml de medio y se midió el consumo de oxígeno en el electrodo de Clark. Para cuantificar la producción de ácido láctico, se tomó 1 ml del sobrenadante de las células y se cuantificó el ácido láctico producido mediante un kit enzimático. min: minutos.

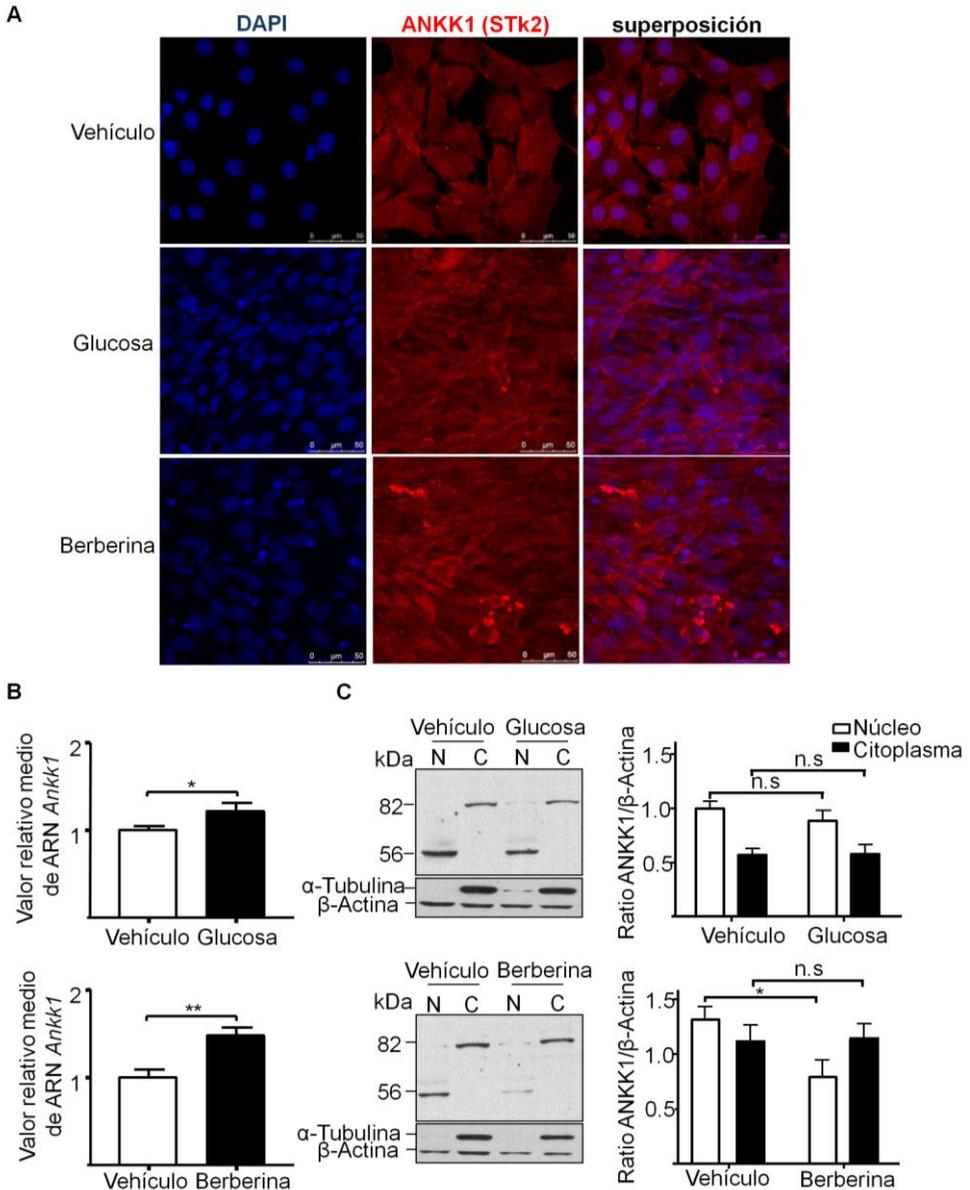
A continuación se estudió el efecto de la activación de la vía glicolítica sobre la morfología de los mioblastos en proliferación y se determinó la expresión del ARNm de *Ankk1* mediante PCR cuantitativa y de la proteína ANKK1 mediante inmunofluorescencia y *Western Blot* (Fig. 38).

La morfología de los mioblastos C2C12 se vio alterada tras la inducción de la vía glicolítica con ambos agentes inductores (Fig. 38A). Los mioblastos muestran una morfología fusiforme y desorganizada; en el caso de Berberina, se observan además agregados celulares.

El análisis de la expresión de ARNm se realizó con una pareja de oligonucleótidos que amplifica un fragmento ubicado entre los exones 2 y 3 del transcrito de *Ankk1*, región codificante correspondiente al dominio quinasa de la proteína. Este estudio reveló que la activación de la vía glicolítica, tanto mediada por glucosa como por Berberina, produce un incremento significativo de los niveles de *Ankk1* (Control vs glucosa: p=0.0428; Control vs Berberina: p=0.0021) (Fig. 38B).

A continuación se comprobó si el incremento en la expresión del ARNm de *Ankk1* observado en mioblastos glicolíticos se acompañaba de cambios a nivel de proteína (Fig. 38C). Mientras que el tratamiento con glucosa no produjo variaciones en los niveles de las isoformas ANKK1-k (Control vs glucosa:

$p=0.3599$ ) y ANKK1-fl (Control vs glucosa:  $p=0.9418$ ) de ANKK1 con respecto al control, el tratamiento con Berberina provocó una disminución significativa de ANKK1-k nuclear (Control vs Berberina:  $p=0.0392$ ), sin embargo, no se encontraron cambios en ANKK1-fl citoplasmática (Control vs Berberina:  $p=0.8918$ ).



**Figura 38. La expresión de *Ankk1* se incrementa tras la activación de la vía glicolítica. (A)** Los mioblastos C2C12 se trataron durante 24 horas con los agentes inductores de la vía glicolítica glucosa 30 mM y Berberina 30  $\mu$ M, respectivamente, y se estudió la expresión de ANKK1 mediante

## Resultados

inmunofluorescencia. **(B)** Se obtuvo ARN en cada condición y determinó la expresión de *Ankk1* por PCR cuantitativa (N=3). Se normalizó la expresión de *Ankk1* con los genes *α-Tuba1a* y *Csnk2a2* y se representó el ratio de expresión. **(C)** *Western Blot* (N=4) y **(D)** cuantificación de las fracciones enriquecidas en proteínas del núcleo y citoplasma. Se determinó la expresión de ANKK1 y del marcador  $\alpha$ -Tubulina. Se representaron los ratios entre ANKK1 y  $\beta$ -Actina.

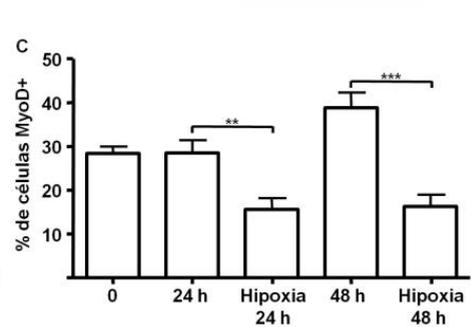
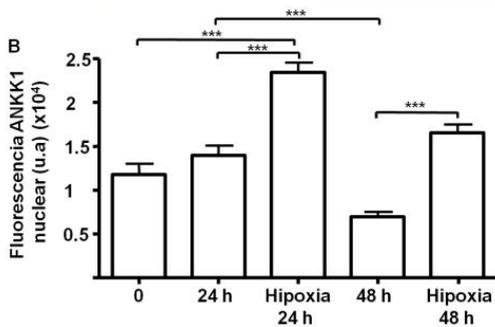
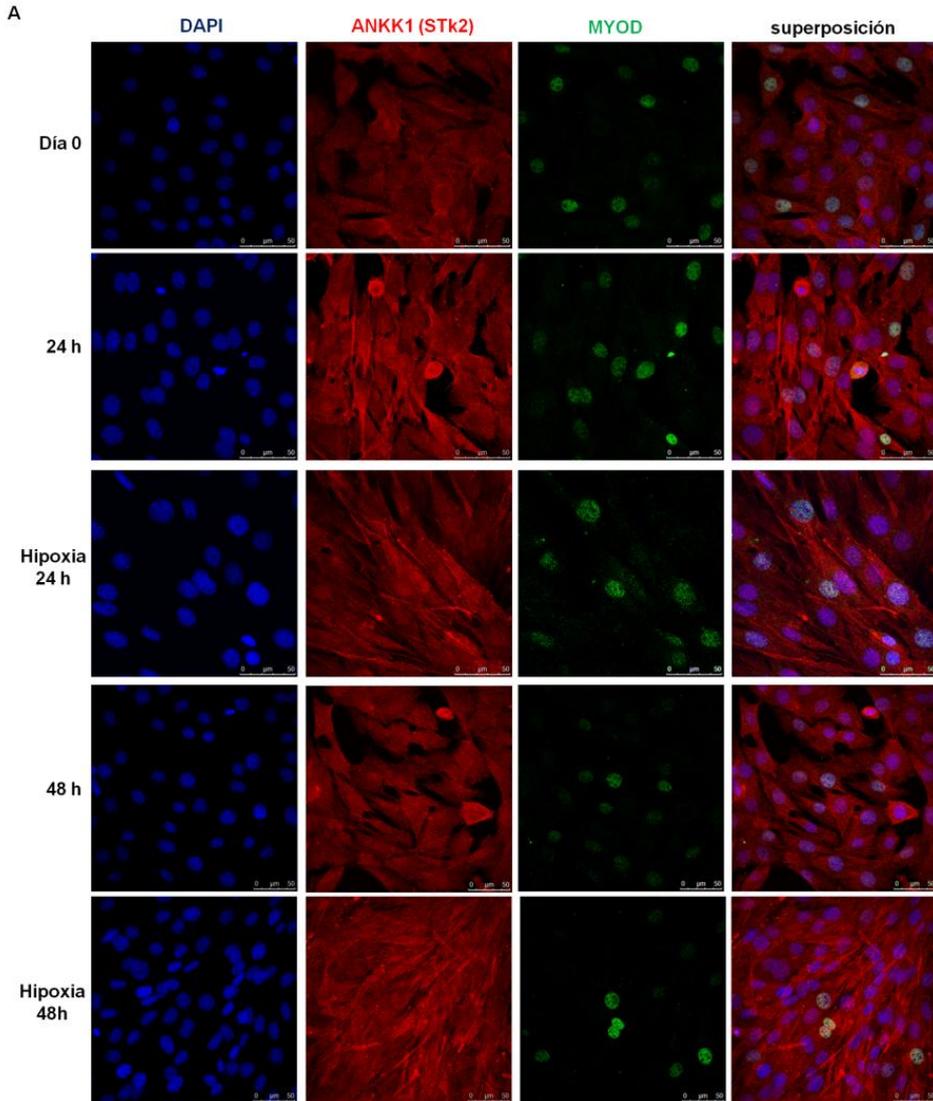
### 4.2.3.2. Activación de la vía glicolítica en condiciones de hipoxia

Para estudiar el efecto del estado metabólico sobre la expresión de ANKK1, se cultivaron mioblastos C2C12 en proliferación en condiciones hipóxicas (2% oxígeno) y se estudió la expresión de ANKK1 mediante inmunofluorescencia, utilizando MYOD para conocer además el estado de activación de estos mioblastos (Fig. 39).

El crecimiento en hipoxia en los mioblastos C2C12 producía alteraciones morfológicas de las células, que empezaban a manifestarse a 24 horas y se hacían evidentes a 48 horas. En estas condiciones, las células perdían su aspecto habitual y adquirían una morfología fusiforme, disponiéndose unas al lado de otras con un patrón desorganizado. Se observó una mayor expresión de ANKK1 en el núcleo tras la inducción de hipoxia, siendo también elevada su expresión en el citoplasma a 48 horas, mientras que se podía apreciar un menor número de núcleos positivos para MYOD en estas condiciones (Fig. 39A).

La cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear de ANKK1 (Fig. 39B) reveló una reducción significativa de la intensidad de fluorescencia en condiciones normóxicas con el tiempo (24 vs 48 h:  $p=0.002$ ). El cultivo de C2C12 en condiciones hipóxicas presentaba un incremento significativo de la intensidad de fluorescencia de ANKK1 nuclear con respecto a los controles (Normoxia vs Hipoxia 24h:  $p<0.0001$ ; Normoxia vs Hipoxia 48 h:  $p<0.0001$ ).

De acuerdo con la disminución de ANKK1 observada en normoxia, el número de células MYOD+ incrementó con el tiempo en las células control (Fig. 39C). El incremento observado de ANKK1 nuclear en hipoxia estaba acompañado de una disminución significativa del número de células MYOD+ tanto a 24 horas (Normoxia vs Hipoxia 24h:  $p=0.0024$ ) como a 48 horas frente a sus respectivos controles (Normoxia vs Hipoxia 48h:  $p<0.0001$ ), correlacionándose con los resultados previos del estudio de diferenciación.



## Resultados

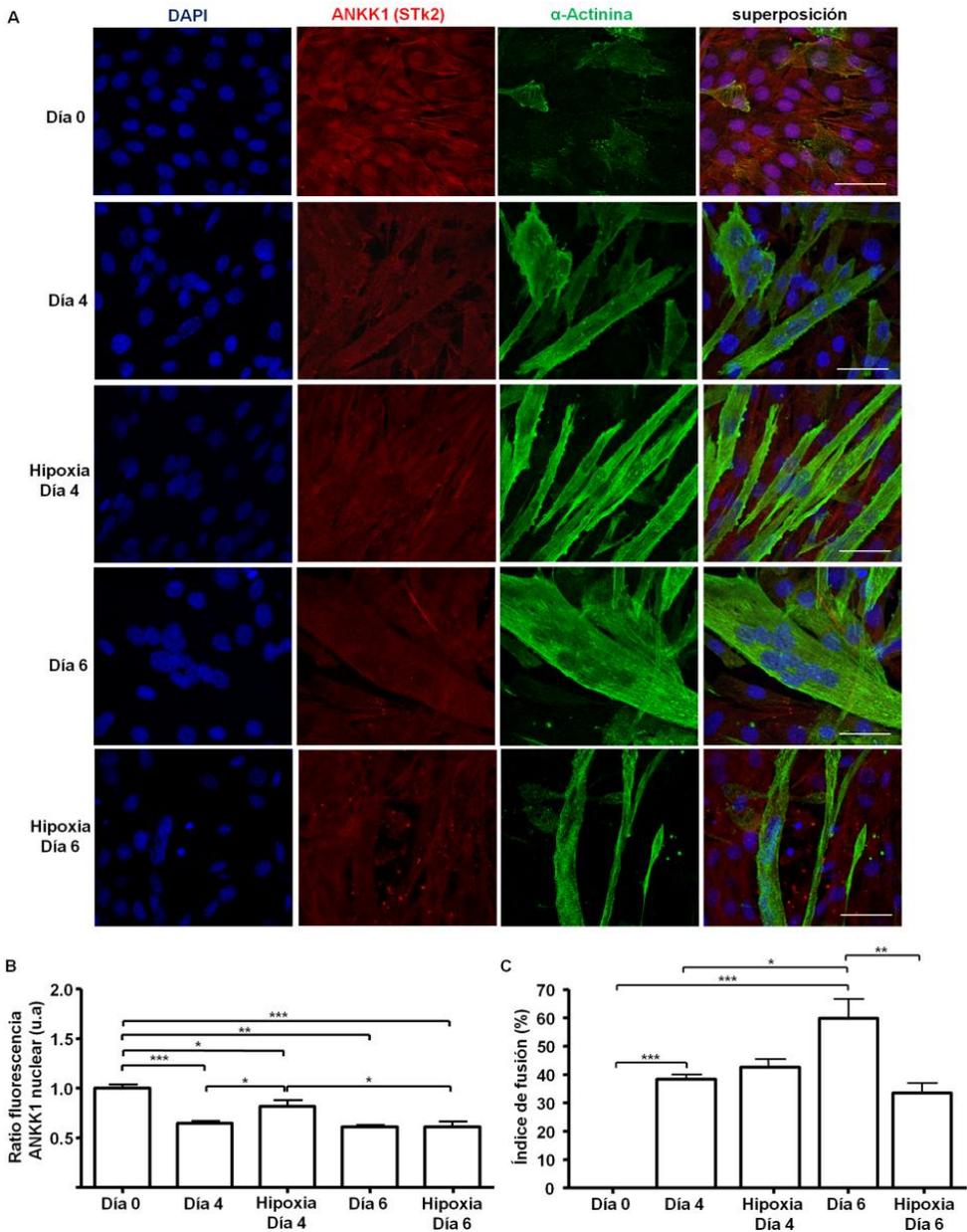
**Figura 39. La señal de ANKK1 nuclear incrementa en condiciones de hipoxia al tiempo que se reduce el porcentaje de mioblastos MYOD+.** (A) Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia en mioblastos C2C12 proliferativos en normoxia e hipoxia durante 24 y 48 horas. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se muestra el marcaje de los núcleos con DAPI, ANKK1 (rojo), MYOD (verde) y la superposición de los canales (N=3). (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear y (C) recuento de los núcleos MYOD+. u.a: unidades arbitrarias; h: horas.

A continuación se analizó cómo afectaban las condiciones de hipoxia a la expresión de ANKK1 en estadios avanzados del proceso de diferenciación. Se indujo la diferenciación de los mioblastos C2C12 y se fijaron células a distintos tiempos (D4-D6). Se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de ANKK1 con el anticuerpo STk2 y de la proteína  $\alpha$ -Actinina como control de diferenciación (Fig. 40A).

En condiciones hipóxicas, los mioblastos en diferenciación y miotúbulos presentan una morfología anómala, observándose células alargadas y desorganizadas a D4 y miotúbulos atróficos y presencia de abundantes agregados celulares a D6 (Fig. 40A). La elevada confluencia celular dificultaba la observación de patrones de expresión característicos de ANKK1 en las diferentes condiciones.

Por ello, se cuantificó la expresión de ANKK1 nuclear (Fig. 40B) y se determinó el índice de fusión (Fig. 40C). Tal y como se ha observado previamente, en condiciones normóxicas la expresión de ANKK1 disminuye significativamente en el núcleo tras la inducción de diferenciación (D0 vs D4:  $p < 0.0001$ ; D0 vs D6:  $p = 0.0014$ ) (Fig. 40B). A D4, observamos un incremento de ANKK1 en hipoxia con respecto al control normóxico (D4 vs Hipoxia D4:  $p = 0.0439$ ), mientras que a D6 no encontramos diferencias (D6 vs Hipoxia D6:  $p = 1$ ).

Al analizar el índice de fusión (Fig. 40C), en primer lugar se comprueba que en los controles normóxicos la diferenciación tiene lugar adecuadamente, ya que se produce un incremento significativo progresivo del índice de fusión a medida que avanza el programa miogénico (D0 vs D4:  $p < 0.0001$ ; D0 vs D6:  $p < 0.0001$ ; D4 vs D6:  $p = 0.0294$ ). En condiciones hipóxicas, a D4 no se aprecian diferencias significativas con respecto a normoxia (D4 vs Hipoxia D4:  $p = 0.2674$ ), mientras que a D6 se observa una disminución significativa del índice de fusión (D6 vs Hipoxia D6:  $p = 0.0088$ ).



**Figura 40. Las condiciones hipóxicas durante diferenciación de C2C12 incrementan la expresión de ANKK1 nuclear y disminuye el índice de fusión en miotúbulos. (A)** Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia de mioblastos C2C12 tras la inducción de diferenciación (D4-D6) en condiciones normóxicas e hipóxicas. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 0.5  $\mu$ m de grosor cada uno. Se muestra el marcaje de los núcleos con DAPI, ANKK1 (rojo),  $\alpha$ -Actinina (verde) y la superposición de los canales (N=3). Escala: 50  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ANKK1 nuclear y **(C)** determinación del índice de fusión. u.a: unidades arbitrarias.

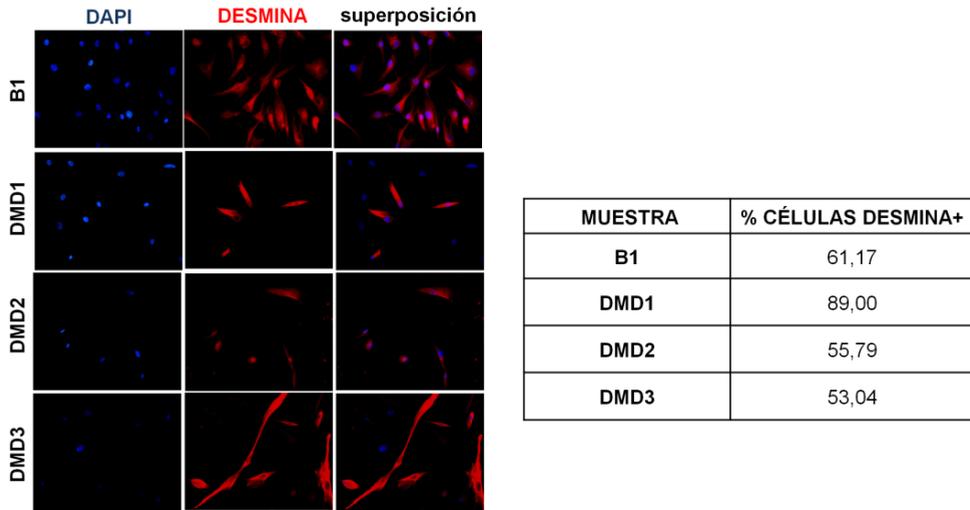
### **4.3. ANKK1 SE EXPRESA EN MIOBLASTOS Y FIBRAS REGENERATIVAS DE PACIENTES CON DISTROFIAS MUSCULARES**

Hasta ahora hemos determinado que ANKK1 se localiza en precursores musculares durante el desarrollo (mioblastos embrionarios) y en la edad adulta (SCs), es decir, se expresa en células que presentan propiedades regenerativas en distintos momentos del desarrollo. De hecho, hemos demostrado que su expresión se correlaciona con la de los factores de transcripción PAX7 y MYOD, que regulan las etapas iniciales del proceso miogénico. Por todo ello, a continuación quisimos investigar si la expresión de ANKK1 estaba afectada en mioblastos humanos distróficos en los que hay un defecto en la regeneración, así como en muestras clínicas de diversas patologías neuromusculares en las que se encuentran fibras regenerativas debido al daño muscular persistente.

#### **4.3.1. LOS PACIENTES CON DMD PRESENTAN UNA MENOR PROPORCIÓN DE MIOBLASTOS ANKK1+**

En primer lugar se estudió el patrón de expresión de ANKK1 en mioblastos de pacientes con distrofias musculares en los que hay un proceso regenerativo alterado. Para ello se utilizaron mioblastos humanos de un control no distrófico (B1) y de tres pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD1, DMD2, DMD3) y se comprobó que su pureza era adecuada: las células en cultivo se fijaron en cubreobjetos, se marcaron con el anticuerpo anti-Desmina (marcador de citoesqueleto exclusivo de células del linaje muscular) y se realizó un recuento de células positivas para este marcador (Fig. 41).

Los resultados mostraron una pureza considerable de los mioblastos en cultivo, superando el 50% en todos los casos. Puesto que el cultivo no es puro, en adelante los ensayos de inmunofluorescencia para realizar la cuantificación de mioblastos que expresan ANKK1 se realizaron con un doble marcaje con desmina, de modo que los recuentos de núcleos ANKK1 se relativizaron a las células desmina+. Para la inmunofluorescencia con PAX7 y MYOD, se realizó el recuento de núcleos positivos para cada marcador frente al total de núcleos y ese valor se relativizó al promedio de células desmina+ para cada muestra en cuestión.



**Figura 41. El procesamiento de las biopsias de músculo humano generó un rendimiento adecuado de mioblastos en cultivo.** Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia para determinar el grado de pureza de mioblastos humanos de pacientes no distróficos (B1) y distróficos (DMD1, DMD2, DMD3) en cultivo (N=1, 100 células). Las células obtenidas a partir de las biopsias musculares se fijaron sobre cubreobjetos y se estudió la expresión de desmina (rojo). Se muestra el marcaje de núcleos con DAPI y la superposición de los canales. La tabla muestra el porcentaje de células desmina+.

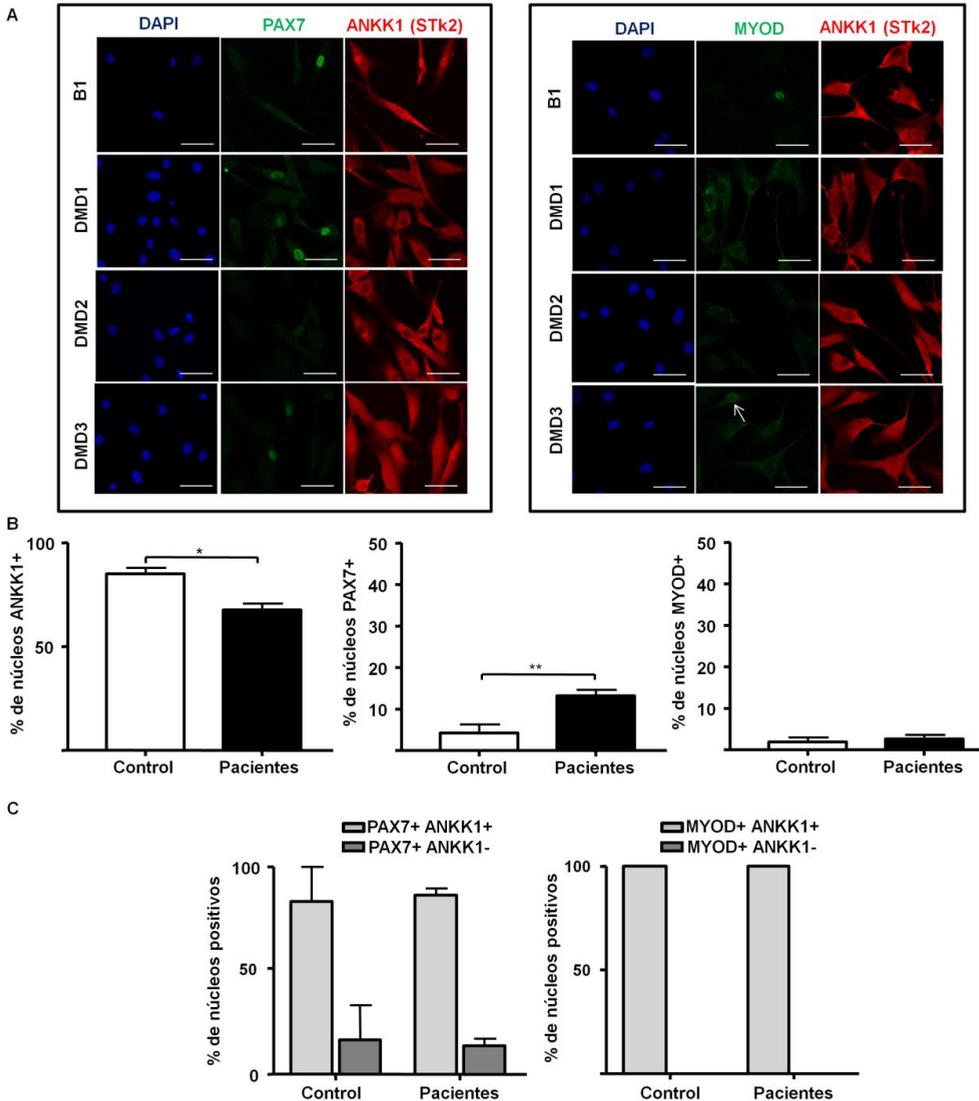
A continuación se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión de ANKK1, PAX7 y MYOD (Fig. 42A). En todos los mioblastos estudiados se encontró la expresión de ANKK1 a nivel nuclear y a nivel citoplasmático. En el individuo no distrófico se encontraron núcleos positivos muy intensos para ANKK1 y núcleos positivos con menor intensidad de expresión, de manera similar a lo que se había observado en los modelos celulares previamente estudiados. En los pacientes con distrofias musculares se encontró heterogeneidad en la expresión de ANKK1, siendo característica la ausencia de ANKK1 en el núcleo de muchas células (especialmente en DMD1 y DMD2) y encontrándose un mayor número de núcleos positivos en DMD3.

El recuento de núcleos positivos para cada marcador se realizó comparando los resultados obtenidos en el individuo control frente a los pacientes en su conjunto, con el fin de obtener un valor estimado de la tendencia de ANKK1 en mioblastos de pacientes con distrofias musculares. Los resultados revelaron que los pacientes tienen una menor proporción de mioblastos que expresan ANKK1+ en el núcleo (Control vs Pacientes:  $p=0.0221$ ), una mayor proporción de mioblastos PAX7+ (Control vs Pacientes:  $p=0.0031$ ), mientras que no se encontraron diferencias en el número de células MYOD+ (Control vs Pacientes:  $p=0.7105$ ) (Fig. 42B), aunque en este último caso se observaron diferencias en cuanto a intensidad de marcaje, siendo ésta más leve en los pacientes con distrofias musculares.

A continuación se caracterizaron las subpoblaciones de células PAX7+ y MYOD+ respectivamente en función de la presencia o ausencia de ANKK1 nuclear, con el

## Resultados

fin de determinar si había diferencias entre el control y pacientes (Fig. 42C). Este análisis reveló que, dentro de la población PAX7+, 83.3% de las células era ANKK1+ en el control frente a 86.25% en los pacientes. Con respecto a la población MYOD+, tanto en el control como en los pacientes el 100% de los mioblastos eran ANKK1+ (Fig. 42C). Estos resultados revelan que no hay diferencias entre pacientes y controles en cuanto a la expresión de ANKK1 en las subpoblaciones PAX7+ y MYOD+, respectivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el porcentaje de células PAX7+ y MYOD+ es reducido en estas muestras.



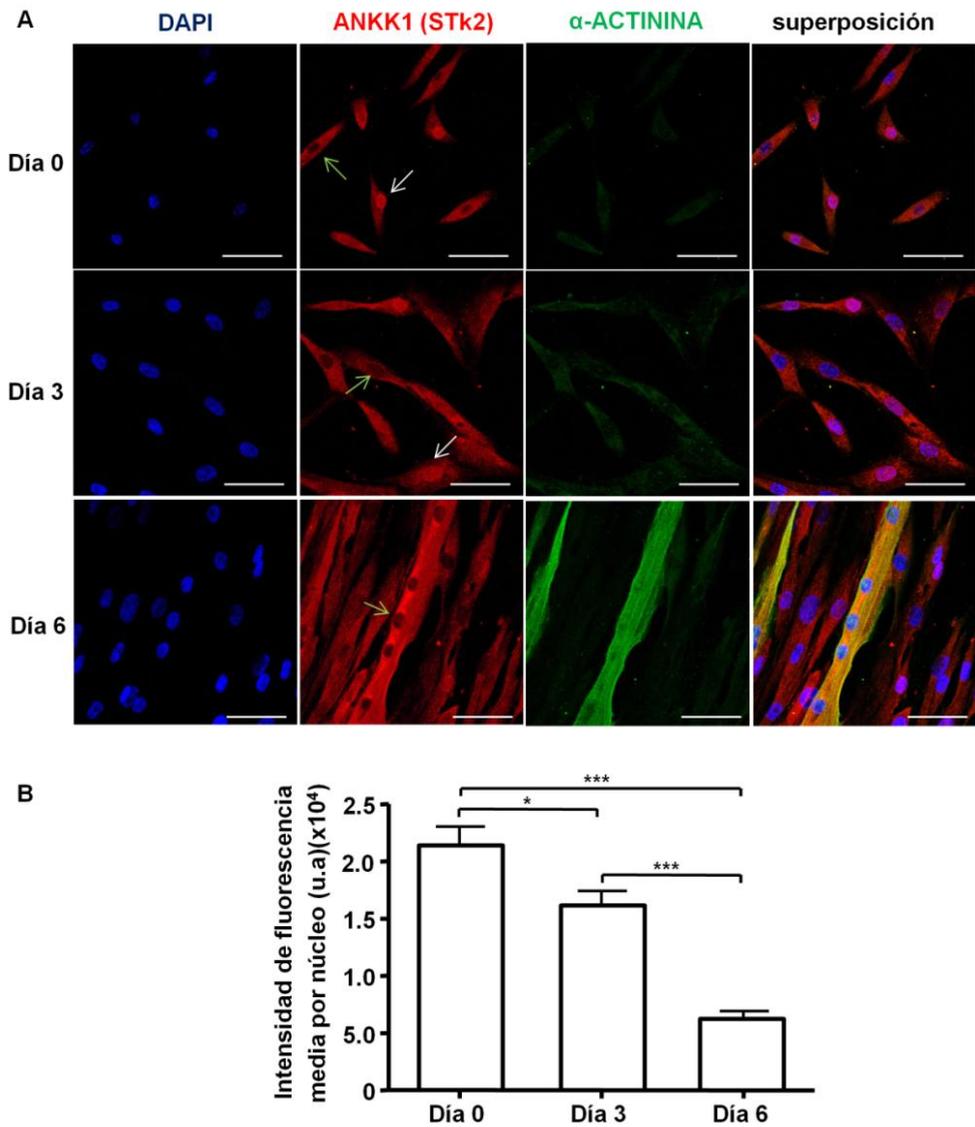
**Figura 42. ANKK1 nuclear está reducido en mioblastos de pacientes con distrofias musculares al tiempo que PAX7 está incrementado.** Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia de mioblastos humanos no distróficos (B1) y distróficos (DMD1, DMD2, DMD3) en proliferación. **(A)** Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor cada una. Se muestra el marcaje de ANKK1 (rojo) y los marcadores PAX7 (panel izquierdo) y MYOD (panel derecho) en verde. Escala: 50  $\mu\text{m}$ . **(B)** Cuantificación del número de núcleos positivos para ANKK1, PAX7 y MYOD (N=3). Los valores se han relativizado al porcentaje de células Desmina+ de cada cultivo. **(C)** Caracterización de las subpoblaciones PAX7+ y MYOD+ respectivamente según la presencia o ausencia de ANKK1 nuclear.

### 4.3.2. DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS DE PACIENTES ANKK1 MUESTRA UNA DINÁMICA SIMILAR A OTRAS LÍNEAS CELULARES

La expresión de ANKK1 en mioblastos en proliferación estaba alterada en los mioblastos de individuos con Distrofia Muscular de Duchenne, por lo que quisimos estudiar si también se encontraban cambios en la expresión de la proteína durante el proceso de diferenciación. Para este estudio se utilizaron los mioblastos del paciente DMD3 por su mayor capacidad de proliferación (los mioblastos DMD1 y DMD2 mostraban un crecimiento muy ralentizado). Los mioblastos DMD3 se fijaron en cubreobjetos en proliferación (D0) y a distintos tiempos post-inducción de diferenciación (D3 y D6). Las células se marcaron también con  $\alpha$ -Actinina como marcador de miotúbulos diferenciados (Fig. 43).

En los mioblastos DMD3 en proliferación se encontraron núcleos ANKK1+ (flechas blancas) y ANKK1- (flechas verdes) (Fig. 43A), tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Después de 3 días en medio de diferenciación, se sigue observando heterogeneidad en cuanto a la expresión de ANKK1 nuclear, aunque se observan menos núcleos positivos a medida que las células se van aproximando y fusionando entre sí. Finalmente a D6, se observa la ausencia total de ANKK1 en los miotúbulos diferenciados y un patrón citoplasmático de expresión de ANKK1 muy intenso. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia nuclear de ANKK1 (Fig. 43B) muestra una disminución significativa durante la diferenciación (D0 vs D3:  $p=0.0333$ ; D0 vs D6:  $p<0.0001$ ; D3 vs D6:  $p<0.0001$ ), dinámica equivalente a la observada en los modelos celulares estudiados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

## Resultados



**Figura 43. ANKK1 nuclear disminuye durante la diferenciación de mioblastos distróficos.** Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia de mioblastos humanos distróficos (DMD3) en proliferación (D0) y tras la inducción de diferenciación (D3 y D6). **(A)** Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 16 capas de 0.5  $\mu$ m de grosor cada uno. Se muestra la superposición del marcaje de ANKK1 (rojo) y el marcador  $\alpha$ -Actinina (verde). Escala: 50  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de ANKK1 nuclear. u.a.: unidades arbitrarias.

#### **4.3.3. ANKK1 SE EXPRESA EN FIBRAS REGENERATIVAS EN DISTROFIAS NEUROMUSCULARES**

Para estudiar la localización histológica de ANKK1 en las fibras musculares adultas de pacientes con distrofias musculares, se utilizaron las muestras procedentes de controles sin distrofia y pacientes con distintos tipos de distrofias musculares, y se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con un anticuerpo  $\alpha$ -ANKK1 comercial, dado que ninguno de los anticuerpos  $\alpha$ -ANKK1 de producción propia funcionó en tejido humano. Se utilizaron secciones seriadas para definir además la expresión de ANKK1 en fibras que expresan una combinación de eMyHC/nMyHC, que reconoce fibras en regeneración. Se realizó un análisis descriptivo exhaustivo de toda la sección muscular para conocer la expresión de ANKK1 en fibras regenerativas de diferentes tipos de distrofias musculares (Fig. 44).

Al igual que se había observado en el modelo murino, la expresión de ANKK1 en músculo humano adulto ocurre en un subgrupo de fibras, tanto en los controles como en los pacientes con distrofias musculares. En el caso de los controles, como era de esperar, en ningún caso se encontraron fibras en regeneración.

En los pacientes con Distrofia Miotónica de Steinert, caracterizados por la ausencia de proteína quinasa de Distrofia Miotónica funcional, se detectó la expresión de ANKK1 en un subgrupo de fibras, si bien es cierto que no se encontraron fibras en regeneración en ningún caso. Lo mismo se observó en el paciente con Distrofia Muscular de Cinturas autosómica recesiva tipo 2Q (LGMD2Q), caracterizado por una deficiencia de la proteína Plectina, que también expresaba ANKK1 en un subgrupo de fibras pero no mostraba fibras en regeneración.

Los pacientes con Distrofia muscular de Duchenne (DMD), caracterizados por la ausencia de proteína Distrofina funcional, presentaban un elevado número de fibras en regeneración, que siempre expresaba ANKK1 (100%).

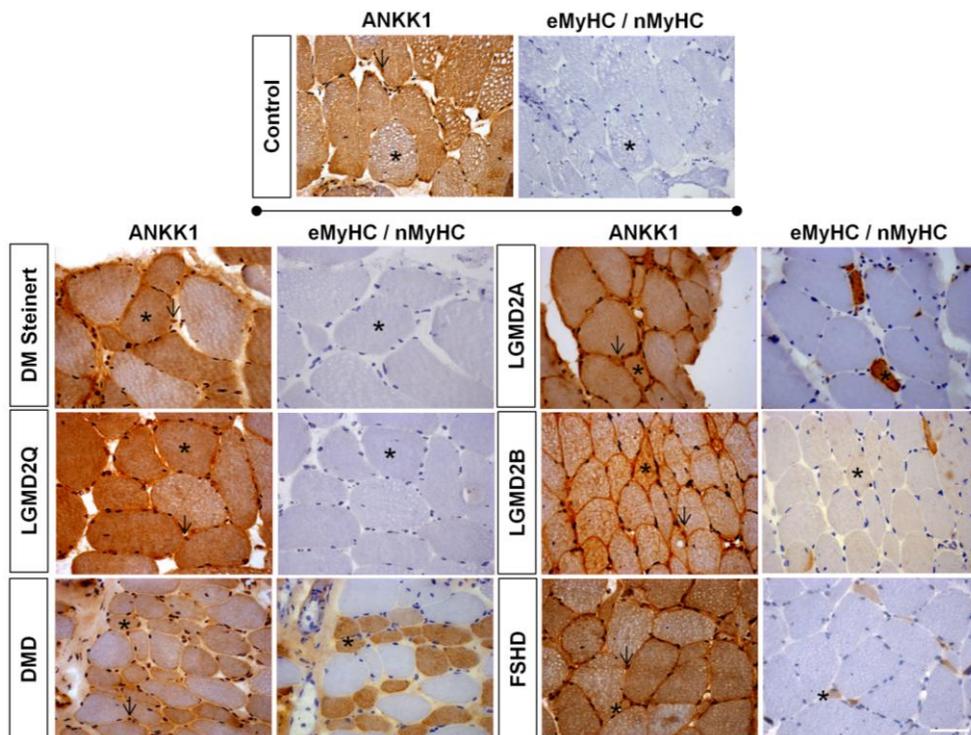
En los pacientes con Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva tipo 2A (LGMD2A), caracterizada por la ausencia de proteína calpaína funcional, se encontraron fibras en regeneración que también expresaban ANKK1 con elevada intensidad (100%).

Se estudió la expresión de ANKK1 en un paciente con Distrofia muscular de cinturas autosómica recesiva 2B (LGMD2B), caracterizada por una deficiencia de la proteína Disferlina. En este paciente se encontró de nuevo la expresión de ANKK1 en todas las fibras en regeneración (100%).

La expresión de ANKK1 en un paciente con Distrofia facioescapulohumeral (FSHD), que puede ser producida por la deficiencia de diferentes proteínas, también se correspondía mayoritariamente con las fibras en regeneración, ya que el 71.43% de dichas fibras expresaba además ANKK1.

## Resultados

En resumen, las fibras regenerativas de los pacientes analizados con distrofias musculares con patologías de distinta etiología tienen en común la expresión mayoritaria y generalizada de ANKK1.



**Figura 44. ANKK1 se expresa en fibras regenerativas de pacientes con distrofias musculares.** Se realizó un análisis mediante inmunohistoquímica de secciones transversales de deltoides, cuádriceps y tibial anterior de músculo humano con los anticuerpos anti-ANKK1 y eMyHC/nMyHC. Los asteriscos negros señalan la misma fibra en cortes seriados. Las flechas negras señalan núcleos ANKK1+. Escala: 50  $\mu$ m.

Además del marcaje característico de ANKK1 en las fibras musculares, en todos los casos se detectó la expresión de ANKK1 en una determinada proporción de núcleos (Tabla 13). La proporción de núcleos positivos para ANKK1 era baja en los controles (entre el 5-7% del total), mientras esta proporción era más elevada en los pacientes con distrofias musculares, encontrando heterogeneidad entre pacientes y patologías: los pacientes con DM de Steinert, LGMD2A, LGMD2B y Distrofia facioescapulohumeral tenían en torno al 10-25% de núcleos ANKK1+, mientras que la proporción más elevada la mostraron los pacientes con DMD (20-45%) y LGMD2Q (> 50%) (Tabla 13).

Patología	Nº biopsia	% núcleos ANKK1+
<b>CONTROLES</b>		
Control	M-15-194	7.73
Control	M-12-106	5.88
<b>PACIENTES CON Distrofias Musculares</b>		
DMD	M-14-002	25.74
	M-13-071	42.36
DM Steinert	M-09-88	11.45
	M-09-44	13.94
LGMD2A	M-09-048	10.9
LGMD2B	M-08-10	23.15
	M-09-148	22.3
LGMD2Q	M-11-054	53.8
FSHD	M-08-83	18.12

**Tabla 13. Cuantificación del porcentaje de núcleos ANKK1+ en biopsias humanas de controles y pacientes con distrofias musculares.** En la tabla se indica, de izquierda a derecha, la patología, el código del paciente y el porcentaje de núcleos ANKK1+.

#### 4.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ANKK1

##### 4.4.1. ANKK1 Y SU RELACION CON EL CICLO CELULAR

Recientemente nuestro grupo reportó el estudio de la relación entre ANKK1 y el ciclo celular en líneas establecidas y telencéfalo embrionario de ratón [81]. En este trabajo hemos estudiado el efecto de la sobreexpresión de variantes genéticas de ANKK1 sobre la progresión del ciclo en células sincronizadas en la fase G0/G1. Para ello, se transfectaron cultivos de células HeLa con los constructos de las isoformas ANKK1-k variantes A1 y A2 (pEGFP-N1-ANKK1-A1 y pEGFP-N1-ANKK1-A2) y la mutante para la actividad quinasa K51R (pEGFP-N1-ANKK1-K51R), que añaden en pauta en su extremo Ct la secuencia de la proteína fluorescente GFP. Se utilizaron dos variantes polimórficas de ANKK1 puesto que previamente se describieron evidencias de su diferente funcionalidad [79]. La variante A2 contiene una alanina en la posición 239 frente a la variante A1 que contiene una treonina, creando un nuevo sitio de fosforilación *in silico* [19]. Este cambio es producido por el SNP rs.7118900, que se encuentra en desequilibrio de ligamiento con el SNP TaqIA.

Una vez transfectadas, las células se sincronizaron en la fase G0/G1 del ciclo mediante un doble bloqueo con Timidina seguido de Afidicolina, con un periodo de recuperación después del primer bloqueo. Tras la sincronización y liberación del segundo bloqueo, las células avanzan sincrónicas a lo largo del ciclo celular.

## Resultados

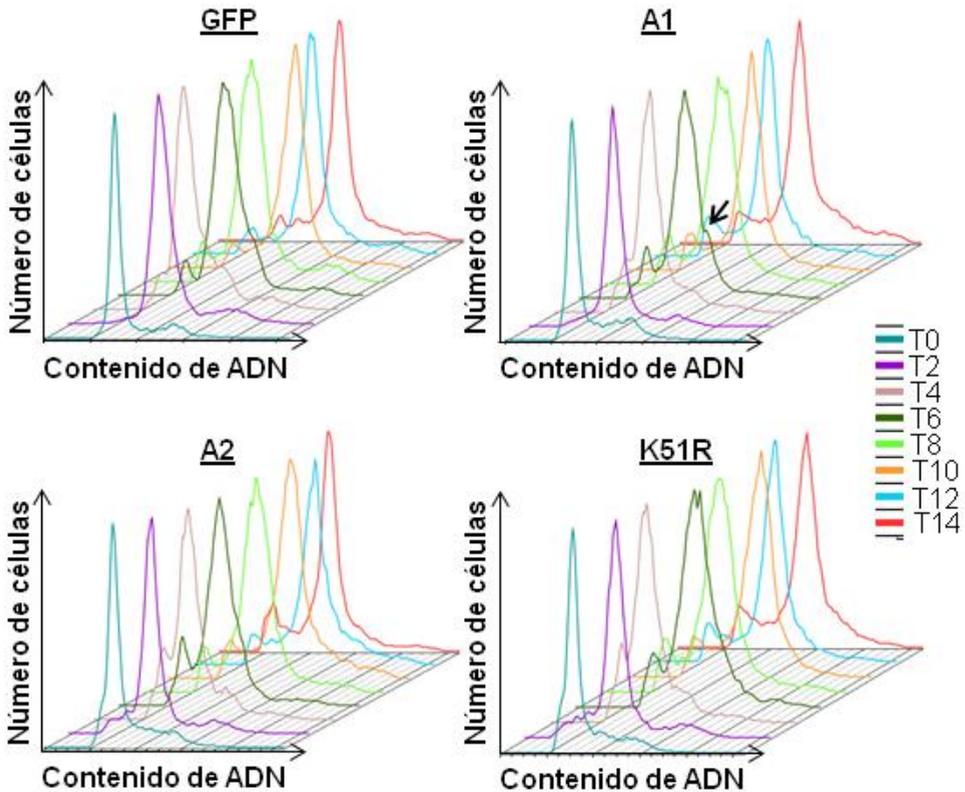
Después de 4 horas, las células se trataron con Nocodazol, un agente que retiene a las células en la fase G2/M. Se recogió una muestra de células cada 2 horas durante un periodo de 14 horas, tiempo en el que se estima que las células habrán alcanzado mitosis. Se tuvo en cuenta que la eficiencia de transfección no es del 100%, de modo que se analizaron por citometría de flujo y por separado las poblaciones de células de un mismo cultivo que habían incorporado el plásmido correspondiente frente a las células del mismo cultivo que no se transfectaron.

El estudio de la fracción de células HeLa sincronizadas y no transfectadas mostró que, para cada tiempo y condición analizados, no había diferencias significativas en el porcentaje de células en cada fase del ciclo (Tabla 14), mostrando, por tanto, el mismo patrón en el ciclo celular.

valor <i>p</i>	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14
G0/G1	0.4613	0.4535	0.0748	0.9995	0.7325	0.5240	0.0764	0.5607
S	0.9636	0.4603	0.0580	0.0509	0.6488	0.1309	0.8560	0.4381
G2/M	0.2975	0.1826	0.6127	0.0712	0.6646	0.1134	0.6196	0.6196

**Tabla 14. Valores *p* resultantes del análisis estadístico mediante el test unidireccional ANOVA a partir de la cuantificación de la proporción de células del cultivo que no se transfectaron en presencia de los diferentes plásmidos (GFP – A1 – A2 – K51R) a los diferentes tiempos post-sincronización en G0/G1 (T0 – T2 – T4 – T6 – T8 – T10 – T12 – T14). T: tiempo.**

En cuanto a las células transfectadas (Fig. 45; Tabla 15) no se observaron diferencias en la proporción de células sincronizadas para los diferentes constructos de ANKK1 en la fase G0/G1 (T0) (Fig. 46) ni en la progresión a la fase S del ciclo, que se produce al cabo de 2 horas de sincronización (T2). El análisis por *Western Blot* de proteínas totales de los diferentes constructos y el control mostró niveles mayores de los marcadores de G1/S, Ciclina A y Ciclina B en las células que sobreexpresan ANKK1 (Fig. 47). En este punto, la sobreexpresión no afectó en ningún caso a la expresión normal de la ANKK1-k y ANKK1-fl endógenas (Fig. 47), cuyos niveles en el control transfectado con GFP seguían una tendencia idéntica a la descrita anteriormente en células sincronizadas [81]: disminución de ANKK1-fl e incremento de ANKK1-k a medida que se avanza hacia mitosis (Fig. 47).



**Figura 45. La sobreexpresión de las diferentes variantes de ANKK1 afecta a la progresión del ciclo celular.** Se analizó la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo de las células HeLa transfectadas con las diferentes isoformas de ANKK1 (A1, A2, K51R) y sincronizadas en G0/G1. Se obtuvieron histogramas en los que se representó la proporción de células frente al contenido en ADN a los diferentes tiempos post-sincronización (T0 – T2 – T4 – T6 – T8 – T10 – T12 – T14). Mediante el programa FlowJo v.7.6.5 se analizaron los histogramas y se determinó la proporción de células en cada fase del ciclo. A T6, ya se observó un incremento de la proporción de células en mitosis en la población transfectada con A1 (flecha negra). T: tiempo.

	T0		T2		T4		T6	
	valor <i>p</i>	Sign.						
<b>G0/G1</b>	0.3428	ns	0.5489	ns	<0.0001	***	<0.0001	***
<b>S</b>	0.6521	ns	0.8019	ns	<0.0001	***	0.0022	**
<b>G2/M</b>	-	-	0.0922	ns	0.0505	ns	<0.0001	***

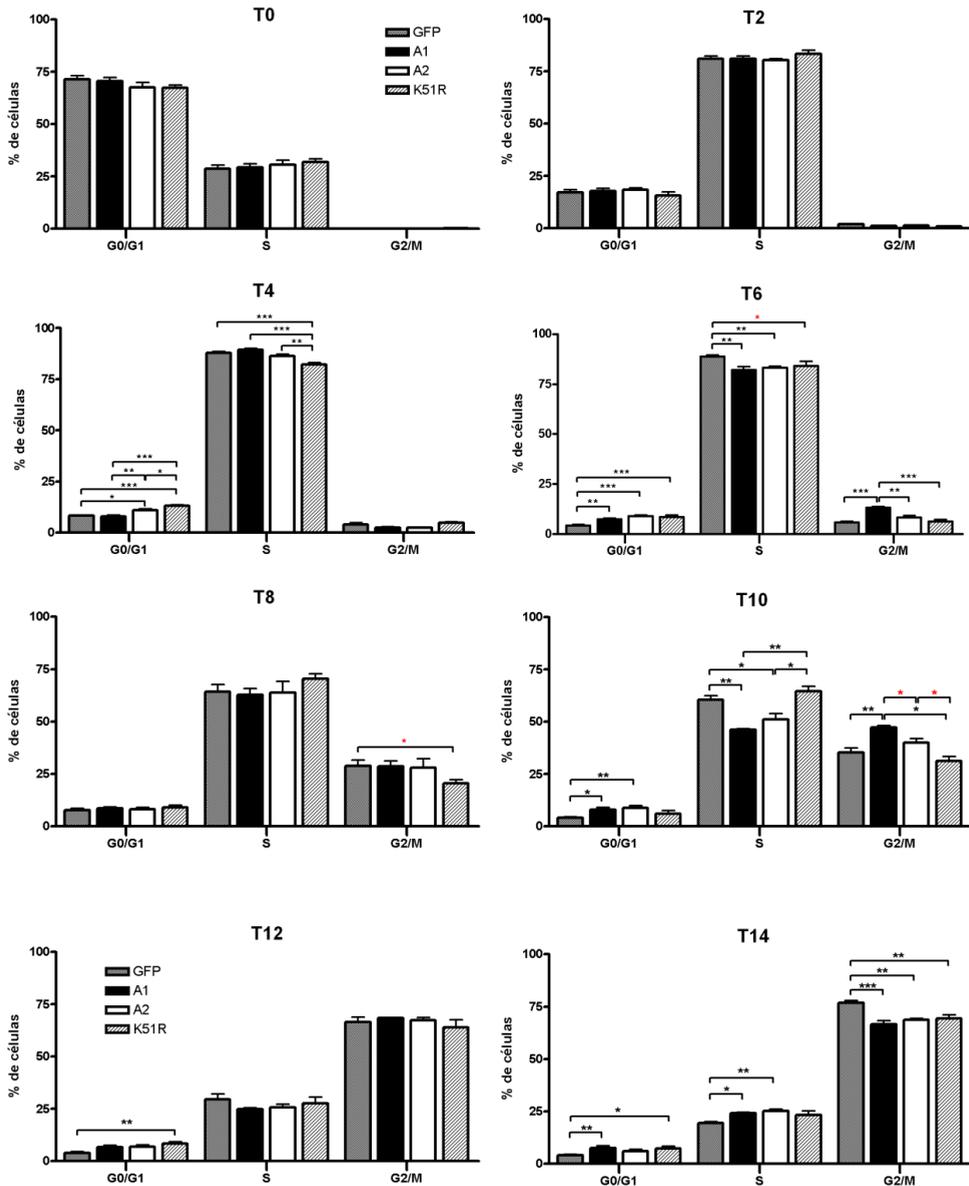
## Resultados

	T8		T10		T12		T14	
	valor p	Sign.	valor p	Sign.	valor p	Sign.	valor p	Sign.
<b>G0/G1</b>	0.7858	ns	<b>0.0049</b>	<b>**</b>	<b>0.0028</b>	<b>**</b>	<b>0.0066</b>	<b>**</b>
<b>S</b>	0.5130	ns	<b>0.0006</b>	<b>***</b>	0.5926	ns	<b>0.0020</b>	<b>**</b>
<b>G2/M</b>	0.2033	ns	<b>0.0010</b>	<b>**</b>	0.7086	ns	<b>P&lt;0.0001</b>	<b>***</b>

**Tabla 15. Valores p resultantes del análisis estadístico mediante el test unidireccional ANOVA a partir de la cuantificación de la proporción de células transfectadas del cultivo en presencia de los diferentes plásmidos (GFP – A1 – A2 – K51R) a los diferentes tiempos post-sincronización en G0/G1 (T0 – T2 – T4 – T6 – T8 – T10 – T12 – T14). T: tiempo.**

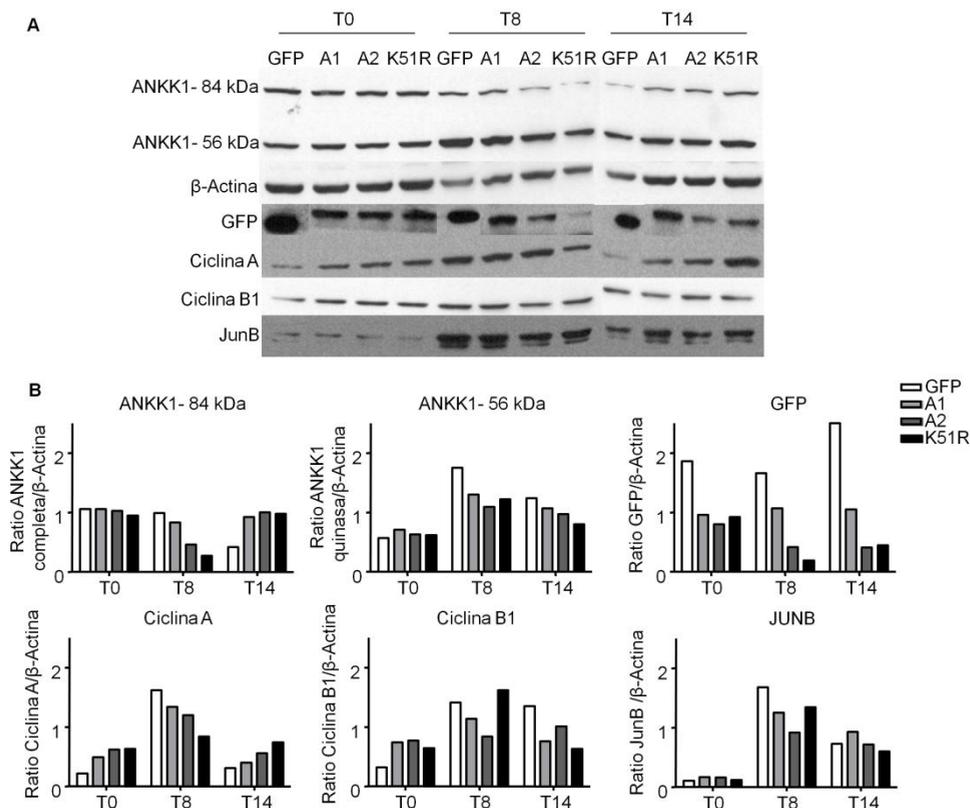
A medida que la fase S progresa (T4), se observa un retraso significativo de las células transfectadas con K51R respecto al control y las variantes A1 y A2. Sin embargo, cuando las células empiezan a alcanzar la fase G2 (T6), se observa que todas las variantes de ANKK1 muestran una menor proporción en fase S con respecto al control (Fig. 46), aunque en T8 se iguala para todos los constructos excepto las células K51R que muestran un retardo en la progresión del ciclo. Estos resultados correlacionan con la expresión de marcadores de ciclo a T8, observando una mayor expresión de ciclina A en todos los constructos con respecto a K51R y unos niveles levemente más elevados de JUNB, marcador que incrementa su expresión en la fase S, en las poblaciones control y K51R (Fig. 47). Mientras las células avanzan en el ciclo (T10), se vuelve a observar la mayor velocidad de progresión de la población transfectada con A1, por su mayor proporción en G2/M y menor proporción en S. La población transfectada con A2 avanza hacia mitosis más lentamente que A1, y a su vez más rápidamente que K51R, lo que también se refleja en su menor proporción en fase S. Cuando las células empiezan a alcanzar mitosis (T12), las poblaciones transfectadas con las distintas variantes genéticas de ANKK1 se igualan (Fig. 46). A T14, todas las células transfectadas con variantes de ANKK1 muestran un retraso en la progresión del ciclo que además presentan mayores niveles de Ciclina A y menores niveles de Ciclina B (Fig. 47), así como también niveles ligeramente mayores de JUNB (Fig. 47).

En resumen, estos resultados muestran que la sobreexpresión de las diferentes variantes de ANKK1 afecta a la progresión del ciclo. La sobreexpresión parece afectar a las fases G1/S ya que habría una mayor expresión de Ciclina A y Ciclina B en esa fase y también a la transición a las fases G2 y M del ciclo celular. Por otra parte, nuestros resultados también muestran diferencias significativas entre las variantes A1 y A2 de ANKK1 en la fase G2/M. En particular, la sobreexpresión de A1 incrementa la transición a G2, A2 se mantiene como el control mientras que K51R provoca un retraso en la progresión. Finalmente, al alcanzar la fase M, la sobreexpresión de las isoformas supone un retraso en la progresión hacia el avance del ciclo.



**Figura 46. La sobreexpresión de las diferentes variantes genéticas de ANKK1 en células HeLa sincronizadas provoca cambios en la progresión del ciclo celular.** Se analizó la proporción de células transfectadas con las diferentes isoformas de ANKK1 (A1, A2, K51R) y sincronizadas en G0/G1 a diferentes tiempos post-sincronización (T0-T2-T4-T6-T8-T10-T12-T14). Se cuantificó un mínimo de 10.000 células para cada condición (N=3). Cuando se consideró necesario por el menor tamaño muestral, se realizó la comparación de parejas de datos mediante la prueba *t* de Student (asterisco rojo). T6 S GFP-K51R:  $p=0.0337$ ; T8 G2/M GFP-K51R:  $p=0.0445$ ; T10 G2/M A1-A2:  $p=0.0118$ ; T10 G2/M A2-K51R:  $p=0.0274$ .

## Resultados



**Figura 47. La sobreexpresión de las diferentes variantes de ANKK1 afecta a la expresión de algunos marcadores del ciclo celular. (A)** Se escogieron 3 tiempos (T0 - T8 - T14) del proceso de sincronización y transfección de células HeLa con los diferentes plásmidos (GFP – A1 – A2 – K51R), se obtuvieron los extractos proteicos y se analizó la expresión de las proteínas ANKK1 ( $\alpha$ -STk2),  $\beta$ -Actina, GFP (como control de transfección), Ciclina A, Ciclina B1 y JunB (marcadores bien establecidos del ciclo celular [221]) mediante *Western Blot* (N=1). **(B)** Se realizó la densitometría de las bandas con el programa ImageJ v1.37 y se normalizaron los datos con respecto al valor de de  $\beta$ -Actina en cada caso, representándose gráficamente el ratio. El revelado con anti-GFP muestra niveles adecuados de las proteínas sobreexpresadas a T0, disminuyendo con el tiempo en el caso de A2 y K51R y manteniéndose constantes en el caso de A1. En condiciones normales, Ciclina A empieza a ser detectable en fase S e incrementa a lo largo de S y G2 con un pico en mitosis [222,223] siendo entonces rápidamente degradada [224]; Ciclina B1 se caracteriza por su aumento en G2 y posterior decaimiento en mitosis [222,224]; JunB está descrito que promueve la expresión de ciclina A y es degradada tras fosforilación al entrar en mitosis [221]. T: tiempo.

## 4.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE ANKK1

### 4.4.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD QUINASA DE ANKK1

Se ha descrito que las proteínas de la familia RIP tienen actividad quinasa *in vitro* [49,59,63,225,226,227], a excepción de RIP5/ANKK1 en la que todavía se desconoce. Todas las RIP quinastas comparten un dominio quinasa similar. La comparación de los dominios quinasa de los miembros de la familia RIP reveló que ANKK1 presenta 11 módulos conservados en el motivo RIP quinasa [25], con al menos un 70% de identidad y similitud de secuencia. Estos subdominios estructurales participan en diferentes funciones celulares, y muchos de ellos median la respuesta de células eucariotas a estímulos externos mediante la fosforilación de otras moléculas en rutas de transducción de señal [1]. En particular, en todas las RIP, incluida ANKK1, se encuentran conservados los aminoácidos cruciales para la actividad quinasa: la Lisina de unión a ATP y el Aspártico aceptor de protones durante la transferencia del grupo fosfato. Además, el dominio quinasa de RIP4 es el más similar a ANKK1, y se ha descrito que activa la señalización NF- $\kappa$ B tan eficientemente como la isoforma completa [65]. Estos antecedentes, junto con los hallazgos en este trabajo de la expresión de ANKK1 en el núcleo de mioblastos, su exportación durante el proceso de diferenciación y su posible participación en la señalización muscular, sugieren que ANKK1 también podría fosforilar proteínas en estos procesos. Para comenzar este estudio, se realizó el ensayo quinasa de ANKK1 en bacterias.

#### 4.4.2.1. ANKK1 no presenta actividad quinasa al sobreexpresarla en bacterias *E. coli*

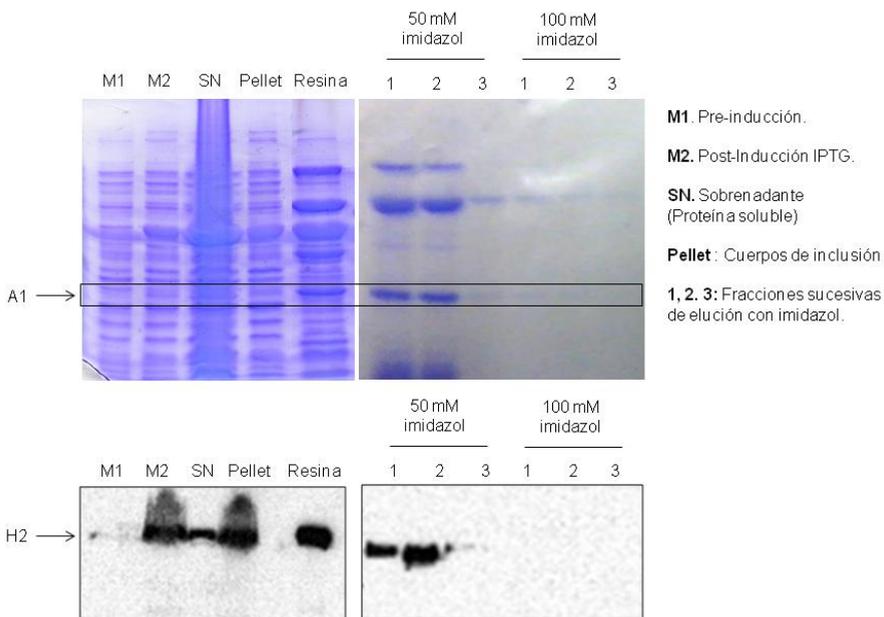
Para este estudio se generaron 4 constructos en el vector pET-21-a, que añade en pauta en el extremo Ct de las proteínas clonadas una cola de histidinas. Se incluyeron las variantes polimórficas de la isoforma ANKK1-k (pET-21-a-ANKK1-A1 y pET-21-a-ANKK1-A2), la isoforma catalíticamente inactiva (pET-21-a-ANKK1-K51R) y la isoforma ANKK1-fl (pET-21-a-ANKK1-H2), respectivamente. Los constructos se sobreexpresaron en bacterias BLB21 co-transfectadas con un plásmido productor de las chaperonas GroES/GroEL, para facilitar el correcto plegamiento de ANKK1. Se utilizó el constructo pET-21-a-ANKK1-A1 para la puesta a punto de las condiciones de inducción. Los niveles de proteína se analizaron mediante tinción con azul de Coomassie y *Western Blot* con anti-His (Fig. 48).

Los resultados revelaron que la inducción con IPTG 3 horas a 37°C producía elevados niveles de proteína A1, sin embargo la mayor parte quedaba retenida en forma insoluble (*pellet*) (Fig. 48). La inducción con IPTG 24 horas a 12°C producía unos niveles de proteína comparables a la condición anterior sin apenas quedar retenida en los cuerpos de inclusión, por lo que se estableció como condición óptima para la sobreexpresión.



**Figura 49. La condición óptima de inducción de ANKK1-A1 era también adecuada para el resto de isoformas.** Las bacterias se transformaron con los constructos pET-21-a-ANKK1-A2, pET-21-a-ANKK1-K51R y pET-21-a-ANKK1-H2 y se obtuvieron los extractos proteicos antes (M1) y tras la inducción con IPTG a 12 °C durante 24 horas (M2), la fracción soluble [228] y los cuerpos de inclusión (*pellet*). Los extractos se separaron en un gel de acrilamida que se tiñó con azul de Coomassie para la visualización y posterior escaneo de las bandas de proteínas.

Para purificar la proteína sobreexpresada, los sobrenadantes con las fracciones de proteína soluble se transfirieron a la resina *Talon Metal Affinity*. Una vez retenidas en la resina, se estableció la concentración óptima de imidazol (50 mM) para la elución de las proteínas ANKK1-A1 y ANKK1-H2, respectivamente (Fig. 50). Se observó que, además de ANKK1, quedaban otras proteínas retenidas en la resina de manera inespecífica (correspondientes al peso molecular de las chaperonas GroES/GroEL con las que se co-transformaron las bacterias).

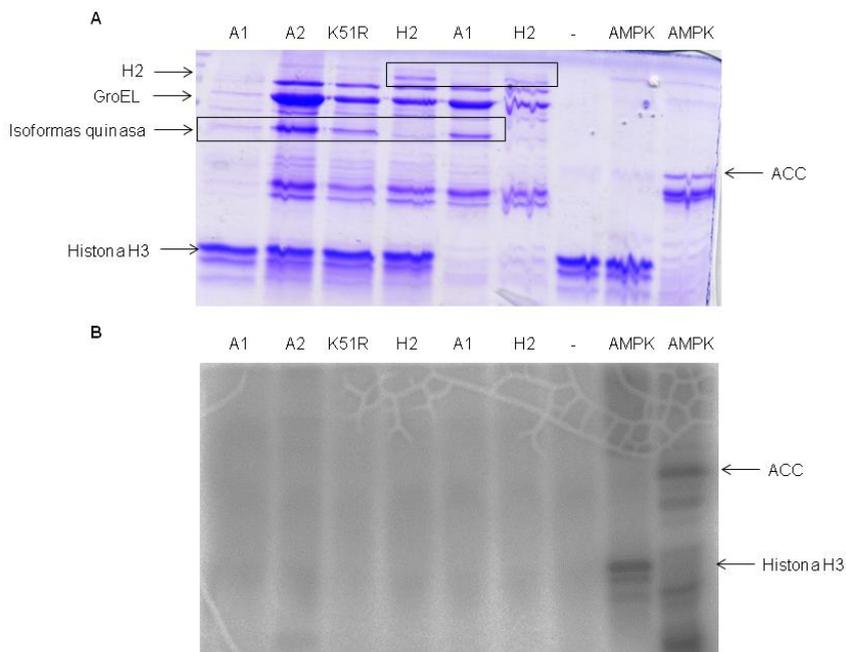


**Figura 50. La adición de 50 mM de imidazol era suficiente para lograr la elución de las isoformas de ANKK1 retenidas en la resina.** Las proteínas ANKK1-A1 y ANKK1-H2 se purificaron con la resina *Talon Metal Affinity*, se eluyeron utilizando concentraciones crecientes de imidazol y se visualizaron mediante un gel Coomassie (A1) o mediante *Western Blot* (H1). Se asume que las condiciones de elución de ANKK1-A1 son extrapolables a ANKK1-A2 y ANKK1-K51R.

Una vez optimizadas las condiciones de sobreexpresión, purificación y elución de todas las isoformas, se realizó el ensayo de actividad quinasa y se analizó mediante tinción Coomassie (Fig. 51A) y autorradiografía (Fig. 51B). Se realizó el ensayo para las proteínas A1, A2, K51R y H2 en presencia del sustrato Histona H3; A1 y H2 sin sustrato; y los correspondientes controles negativos (-) y positivos (AMPK) de autofosforilación y fosforilación de sustrato.

## Resultados

En este ensayo no se detectó actividad quinasa de ANKK1 para ninguno de los constructos (Fig. 51).

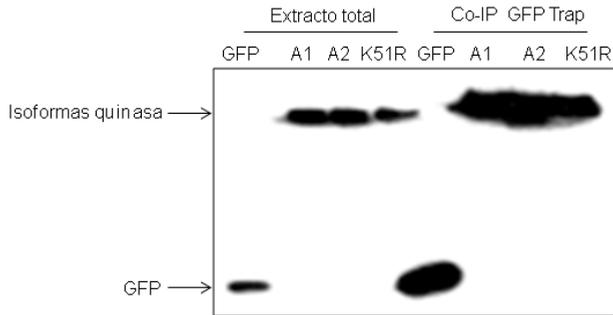


**Figura 51. Las isoformas de ANKK1 no mostraron actividad quinasa en ninguna de las condiciones analizadas en bacteria. (A)** Las proteínas A1, A2, K51R y H2 eluidas se mezclaron con el cóctel de reacción quinasa, se hirvieron con tampón de carga y se separaron en un gel de acrilamida. Tras la tinción con azul de Coomassie, el gel se escaneó y **(B)** se deshidrató para la posterior autorradiografía. ACC: acetil Coenzima A carboxilasa.

Dado que el sistema bacteriano no dispone de la maquinaria de modificaciones post-traduccionales del mamífero, se trasladó este estudio a células HEK293T, para descartar la posibilidad de que las modificaciones post-traduccionales sean cruciales para la actividad quinasa de ANKK1.

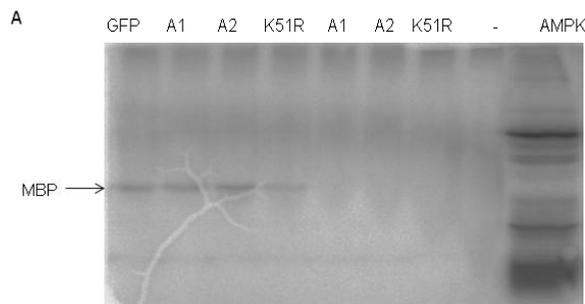
### 4.4.2.2. ANKK1 no presenta actividad quinasa al sobreexpresarla en células HEK293T

Para el estudio de la actividad quinasa de ANKK1 en células HEK293T se utilizaron los plásmidos previamente generados pEGFP-N1-ANKK1-A1, pEGFP-N1-ANKK1-A2 y pEGFP-N1-ANKK1-K51R. Se optimizaron las condiciones de sobreexpresión en las células HEK293T y posterior purificación de las diferentes isoformas utilizando la resina *GFP-Trap beads* (Chromotek) y se comprobó que se obtenían niveles adecuados de proteína mediante *Western Blot* (Fig. 52).



**Figura 52. Las diferentes variantes de ANKK1 se sobreexpresaron adecuadamente en las células HEK293T.** Se realizó un *Western Blot* de los extractos proteicos y de la co-inmunoprecipitación con *GFP-Trap beads* a partir de células HEK293T tras la sobreexpresión con los plásmidos pEGFP-N1, pEGFP-N1-ANKK1-A1, pEGFP-N1-ANKK1-A2 y pEGFP-N1-ANKK1-K51R y se reveló con el anticuerpo anti-GFP.

A continuación se realizó el ensayo quinasa de las proteínas GFP, A1, A2 y K51R en presencia y en ausencia de sustrato, en el primer caso utilizando como sustrato la proteína básica de mielina (MBP) y los respectivos controles negativos (-) y positivos (AMPK) (Fig. 53). Los resultados mostraban la fosforilación del sustrato MBP en todas las condiciones, incluida la fracción de células transfectadas con el control negativo GFP, lo que apuntaba al posible arrastre de otras proteínas en la resina que estaría fosforilando de manera inespecífica al sustrato. Tampoco se observó autofosforilación de proteínas en las fracciones sin sustrato.



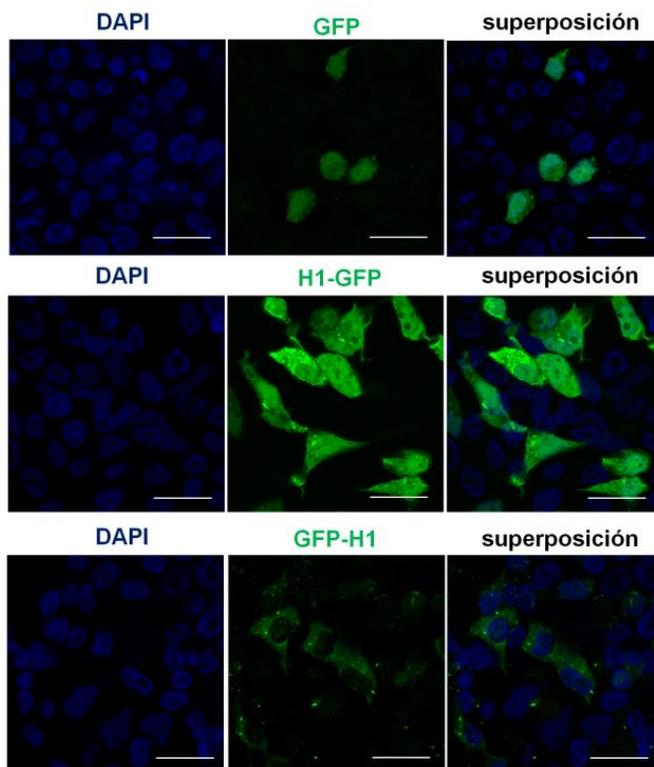
**Figura 53. La sobreexpresión de las variantes de ANKK1 en células HEK293T no producía una fosforilación específica del sustrato MBP.** Las proteínas A1, A2 y K51R purificadas se mezclaron con el cóctel de reacción quinasa, se hirvieron con tampón de carga y se separaron en un gel de acrilamida. El gel se deshidrató para la posterior autorradiografía.

En el momento de realización de estos ensayos, la casa comercial Abcam comercializó la isoforma completa ANKK1 recombinante producida en células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus, donde afirmaban demostrar la actividad quinasa de ANKK1 determinada mediante un contador de centelleo. Esta proteína recombinante estaba fusionada a la Glutathion S-transferasa en su extremo Nt, por lo que se planteó la posibilidad de que el extremo en el que se fusionaba el epítipo a ANKK1 podía afectar a la estabilidad y funcionalidad de ANKK1. Por este motivo, se realizó el clonaje de la isoforma completa de ANKK1-H1 en fusión

## Resultados

con GFP tanto en su extremo Ct (pEGFP-N1-ANKK1-H1) como en Nt (pEGFP-C1-ANKK1-H1), en adelante GFP-H1 y H1-GFP, respectivamente. Los constructos se sobreexpresaron en células HEK293T y se estudió la localización subcelular de estas proteínas de fusión por fluorescencia (Fig. 54).

Los resultados mostraron que tanto el patrón como los niveles de expresión de la isoforma H1 varían notablemente en función del extremo de la proteína en el que se localiza el epítipo (Fig. 54). Cuando el epítipo se localiza en Ct (H1-GFP), el nivel de expresión de la proteína es muy elevado, y la localización de la proteína es tanto nuclear como citoplasmática. Si el epítipo se localiza en Nt (GFP-H1), la expresión es muy leve y su localización es citoplasmática, encontrándose acúmulos o agregados celulares donde la proteína queda retenida.



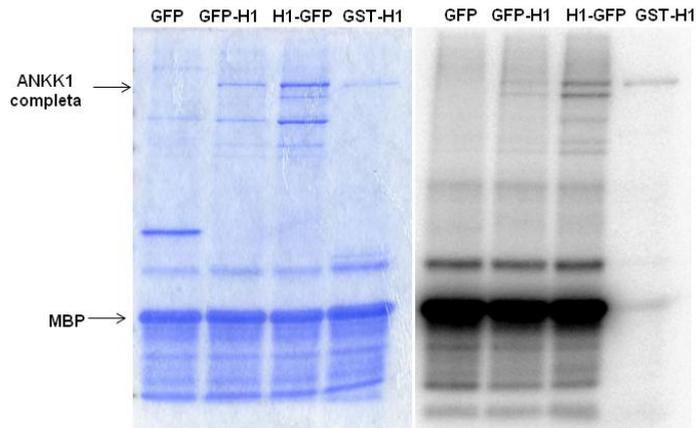
**Figura 54. El extremo de la proteína ANKK1 al que se añade el epítipo afecta a su patrón y nivel de expresión celular.** Se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia de células HEK293T transfectadas con los plásmidos que codifican GFP, H1-GFP y GFP-H1, respectivamente. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 5 capas de 1  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se muestra el marcaje de GFP en verde y la superposición. Escala: 25  $\mu\text{m}$ .

Continuamos, entonces, con el estudio de la actividad quinasa incluyendo estas dos isoformas, así como con la proteína ANKK1 recombinante comercial (Fig. 55).

La tinción Coomassie reveló que la isoforma H1-GFP quedaba más retenida en la resina que GFP-H1, lo que se correlacionaba con su mayor nivel de expresión

observado en células. No obstante, en el ensayo quinasa *in vitro* no se encontraron diferencias en la fosforilación del sustrato MBP, encontrando incluso fosforilación del mismo en el control negativo transfectado con la proteína GFP (Fig. 55). Estos resultados sugieren que se puede estar produciendo un arrastre inespecífico de proteínas en la resina, que están fosforilando de manera inespecífica al sustrato. Por tanto, en las condiciones estudiadas, esta técnica no es apropiada para determinar la putativa actividad quinasa de ANKK1.

Por otra parte, la proteína ANKK1 recombinante comercial (GST-H1) mostró unos niveles de fosforilación de sustrato y de autofosforilación muy leves como para poder considerar que se trata de una verdadera quinasa (Fig. 55).



**Figura 55. ANKK1 con epítomos tanto en Nt como en Ct no mostró actividad quinasa tras su sobreexpresión en células HEK293T.** Las proteínas purificadas se mezclaron con el cóctel de reacción quinasa, se hirvieron con tampón de carga y se separaron en un gel de acrilamida. Tras la tinción con azul de Coomassie, el gel se escaneó y se deshidrató para la posterior autorradiografía. GST: Glutathion S-transferasa.



*No somos raros... Somos ediciones limitadas*



# **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

Este estudio ha mostrado por primera vez que la expresión de *ANKK1* no se limita a precursores y células neurales postmitóticas, sino que también se extiende al linaje miogénico. Hasta ahora se ha evidenciado el interés neuropsiquiátrico de *ANKK1* y su relación con el neurodesarrollo; en este trabajo se ha caracterizado la expresión de la proteína *ANKK1* en el músculo esquelético, apuntando a su implicación en la miogénesis.

### 5.1. ANKK1 SE LOCALIZA EN PRECURSORES MIOGÉNICOS

En estudios anteriores en embrión murino se mostró que *ANKK1* se localiza en el citoplasma de las células de la glía radial [19], que son las encargadas de guiar a las neuronas en migración durante el desarrollo del sistema nervioso central [78]. En este trabajo hemos encontrado que *ANKK1* también se expresa en el embrión murino en desarrollo en una subpoblación de mioblastos y miotúbulos. La expresión de *ANKK1* en la glía radial y precursores miogénicos al final de la miogénesis primaria y secundaria sugiere que esta proteína participa en mecanismos moleculares comunes durante el proceso de migración en ambos linajes celulares. Otras proteínas RIP también se han asociado con procesos de migración, como *LRRK1*, que ejerce un papel clave en la migración de células epiteliales [229]. En este contexto, cabe destacar la relevancia del proceso de migración durante el desarrollo del músculo esquelético: en primer lugar, la correcta localización de las células en los somitas es fundamental para que puedan alcanzar su potencial miogénico [230]; durante la maduración somítica, las células progenitoras musculares deben migrar desde el dermomiótomo de la región dorsal de los somitas tanto al miotomo como a masas musculares más distales [93]; además, los mioblastos migran y se fusionan a lo largo de la miogénesis primaria y secundaria para producir músculos específicos [99]. Dado que la migración celular es un proceso crítico para el adecuado desarrollo embrionario y funcionamiento de un organismo adulto, la localización de *ANKK1* en la glía radial y en las fibras musculares embrionarias derivadas de precursores migratorios, apunta su posible participación en procesos morfogénicos en estos linajes. Se requieren estudios en estadios más tempranos del desarrollo embrionario para confirmar la participación de *ANKK1* en la migración celular.

*ANKK1* ha mostrado una distribución citoplasmática en miotúbulos derivados de cultivos celulares y también en los embrionarios, aunque se observaron diferencias en cuanto al patrón de expresión. Mientras que *ANKK1* se distribuye por todo el citoplasma de los miotúbulos en cultivo, en los miotúbulos embrionarios muestra una polarización apical (Fig. 18A). De hecho, *ANKK1* no se expresa en todos los miotúbulos embrionarios, sino que se expresa en aquellos que muestran morfologías más alargadas y con protrusiones características de la migración. Además, las edades embrionarias estudiadas en este trabajo coinciden

## Discusión

temporalmente con el inicio de la miogénesis secundaria en ratón [100,231], en la que los mioblastos fetales secundarios crecen sobre las fibras primarias ya formadas [232,233,234]. La presencia de ANKK1 en células con morfología migratoria en estos estadios embrionarios sugiere su localización en mioblastos embrionarios primarios y fetales secundarios.

La morfología polarizada y la formación de protrusiones en los grupos de miotúbulos son características de las células que se localizan en el frente de avance durante la migración [235,236]. La polarización es el primer paso del proceso de migración [96], está evolutivamente conservada y consiste en un eje activo que extiende protrusiones dinámicas hacia el frente celular y un eje de arrastre que se retrae a medida que la célula avanza [235,236,237]. Existen diferentes moléculas que son reguladoras clave de la polarización, tales como Cdc42 y Rac, cuya activación es necesaria para iniciar la formación y desarrollo de estas protrusiones celulares respectivamente, y el complejo mPar6/PKC que es esencial para la correcta orientación de la protrusión y del centro organizador de microtúbulos [236,238,239]. En neuronas, se ha descrito que proteínas como APC, mPar3 y mPar6 se expresan de manera polarizada para permitir la correcta formación del axón [240,241]. Si bien es cierto que se desconoce cuál es la contribución de ANKK1 al proceso de polarización, es llamativa su localización tanto en el frente de avance de grupos de miotúbulos que han migrado colectivamente (Fig. 18A-D) como en células que migran de manera individual (Fig. 18E). Estos hallazgos sugieren que ANKK1 podría participar en la polarización de las células migratorias durante el desarrollo.

Además, se observaron ciertas particularidades morfológicas al comparar mioblastos ANKK1+ de los primordios musculares localizados en la región caudal que darán lugar a músculos del tronco y extremidades, frente a aquellos procedentes de los primordios musculares en la región occipital que formarán la musculatura de la lengua, cuyo origen mesodérmico es también somítico [242,243]. Los mioblastos de la lengua muestran un patrón multidireccional, mientras que los del tronco se alinean en paralelo unos con otro tal y como se ha descrito previamente [243], sin bien es cierto que en ambos casos los mioblastos ANKK1+ muestran un patrón polarizado de la proteína en mioblastos alineados. Los mioblastos ANKK1+ de la lengua muestran una morfología más elongada que aquellos ANKK1+ del tronco, lo que probablemente se explica porque la maduración de las estructuras celulares de la cabeza tiene lugar antes que el tronco [244]. En resumen, nuestros resultados sugieren que ANKK1 podría tener un papel en el desarrollo muscular embrionario de diferentes músculos originados a partir de somitas distribuidos a lo largo del neuraxis desde las regiones más caudales hasta las regiones más occipitales.

Por otra parte, estudios previos de nuestro grupo de las isoformas de ANKK1 durante el desarrollo de cerebro murino han revelado que la isoforma ANKK1-k se expresa mayoritariamente en los estadios proliferativos durante la neurogénesis, mientras que se observa un patrón reverso con una mayor prevalencia de la isoforma ANKK1-fl en estadios posteriores de maduración neuronal [245]. Similar a esto, en estudios previos se ha mostrado que la expresión de *ANKK1* está

disminuida durante la diferenciación neuronal en un modelo de neuroblastoma [19], lo que sugiere una regulación temporal coordinada de ANKK1 durante el desarrollo. Nuestros resultados han desvelado un patrón de expresión equivalente en las líneas celulares miogénicas murina y humana (C2C12 y RD). En proliferación, la isoforma ANKK1-k se encuentra en el núcleo de los mioblastos, mientras que disminuye a lo largo de la diferenciación hacia miotúbulos, en los que se encuentra una mayor prevalencia de la isoforma completa en el citoplasma. De acuerdo con esto, en el embrión se detectaron algunos núcleos ANKK1+ (Fig. 18B) que se podrían corresponder con las futuras SCs, precursores miogénicos cuya aparición ocurre al final del desarrollo embrionario [101]; del mismo modo, se observó la ausencia de ANKK1 en el núcleo de fibras musculares adultas tanto *in vivo* (Fig. 35) como en los cultivos de fibras FDB *in vitro* (Fig. 33). En resumen, ANKK1 muestra una dinámica de expresión de isoformas específica de fase durante el desarrollo del músculo esquelético que es muy similar a la observada en tejido nervioso, en el que la disminución de la isoforma quinasa ocurre en la transición de estadios más proliferativos hacia más diferenciados.

Asimismo, cabe mencionar que la dinámica de expresión de isoformas de ANKK1 durante diferenciación es equivalente en mioblastos murinos y humanos, lo que no es sorprendente puesto que el dominio quinasa tiene 83.4% de homología de secuencia y la isoforma completa 82.5% [19]. El hecho de que la línea C2C12 diferencia más eficientemente *in vitro* que RD explica el efecto más dramático en la disminución de ANKK1 observado en la primera. De hecho, los rhabdomyosarcomas están asociados con traslocaciones y deleciones cromosómicas que modulan procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis, lo que explica su menor potencial de diferenciación y se correlaciona con la disminución menos pronunciada de ANKK1 nuclear en las células RD.

Por otra parte, entre las funciones de las proteínas RIP, familia a la que ANKK1 pertenece, se encuentra la regulación de la proliferación y la diferenciación en un amplio rango de tipos celulares, siendo de particular interés que los cuatro miembros RIP (*RIP1*, *RIP2*, *RIP3*, *RIP4*) se expresan en músculo y su expresión está regulada durante la diferenciación miogénica [56,57]. Se ha descrito el papel de *RIP2* en miogénesis, cuya regulación a la baja es un prerrequisito para la correcta diferenciación de mioblastos [57]. De hecho, la expresión de *RIP2* se correlaciona con el potencial de diferenciación de mioblastos normales y células RD, y su inhibición incrementa su potencial regenerativo [57]. Otras proteínas RIP también se han asociado con procesos de proliferación y diferenciación en otros tejidos. En concreto, *RIP4* que es la más homóloga a ANKK1, es un componente esencial en la ruta de diferenciación de queratinocitos y afecta a la morfogénesis de la piel [67,246] y *RIP7* es fundamental para la diferenciación y supervivencia de neuronas dopaminérgicas, muy probablemente preservando o reactivando el ciclo celular [247]. Todos estos antecedentes en distintas proteínas RIP apoyan la implicación de ANKK1 en la diferenciación de músculo esquelético propuesta en este trabajo.

Nuestro grupo previamente demostró que, durante el ciclo celular, ANKK1 participa en las fases G1 y M en diferentes líneas celulares así como en la fase M

tanto en la neurogénesis como en progenitores neurales con capacidad de autorrenovación en cerebro anterior murino [245]. Por lo tanto, es posible que la expresión de ANKK1 en el núcleo de mioblastos en proliferación tenga un impacto en el ciclo celular y su salida durante la diferenciación muscular. Se conocen muchos otros factores de transcripción que regulan el proceso miogénico y tienen un patrón de disminución nuclear equivalente al observado en ANKK1 nuclear. Tal es el caso de Six1/4 y Pax3/7 que regulan la especificación temprana del linaje miogénico, y Myf5/MyoD que están involucrados en el compromiso al programa miogénico [248,249,250]. Es más, en células C2C12 en estadios iniciales de diferenciación se observó una relación reversa entre ANKK1 y MYOD, observándose una coordinación secuencial temporal entre la salida del ciclo celular y la diferenciación. Esta relación reversa era también evidente tras 24 horas de tratamiento con LMB, que retenía significativamente ANKK1 en el núcleo mientras que no mostraba un efecto sobre MYOD hasta pasadas 48 horas. En este trabajo proponemos que el transporte núcleo-citoplasmático de ANKK1 se lleva a cabo por exportinas y se produce antes del incremento de MYOD en la progresión del linaje miogénico. MYOD tiene una elevada capacidad de traslocación núcleo-citoplasmática debido a la presencia de NLS y NES, secuencias que no sólo regulan el compartimento celular en el que se ubica, sino los mecanismos por los que se degrada [251]. Aunque todavía queda por elucidar el efecto de las NLS y NES sobre la dinámica núcleo-citoplasmática de ANKK1, nuestro estudio apunta a que ANKK1 utiliza su única NES para salir del núcleo, sugiriendo que su disminución durante diferenciación se debe a un incremento de su exportación. Todos estos hallazgos apuntan a la conexión entre la expresión de ANKK1 y el estado de activación de las células musculares.

Los estudios de diferenciación mostraron además una banda de entre 115-118 kDa reconocida por el anticuerpo STk2, que mediante ensayos *in vitro* observamos que se trataba de una glicosilación. En anteriores trabajos ya se detectaron isoformas alternativas de ANKK1 que apuntaban a la presencia de modificaciones post-traduccionales en la proteína [19,81]. Además, se ha descrito que las proteínas RIP sufren diferentes modificaciones post-traduccionales que regulan su función: RIP1 necesita de la ubiquitinación para la activación de IKK vía TNF- $\alpha$  [252]; RIP1 y RIP3 sufren auto- y trans-fosforilación recíproca necesaria para la activación de la necroptosis [31]; RIP2 requiere de la ubiquitinación, auto-fosforilación y fosforilación mediada para la activación efectiva de la señalización NOD [253,254,255]; RIP3 y RIP4 también sufren ubiquitinación que conduce a la activación de NF $\kappa$ B [256]. Si bien es cierto que hasta ahora no se ha descrito que se produzca la modificación post-traduccionales de glicosilación en la familia RIP, en este trabajo se determinó tanto *in silico* como *in vitro* que esta modificación se produce al menos en la isoforma canónica de la proteína. Se ha reportado que NCAM1, perteneciente al clúster génico donde localiza ANKK1, sufre también este tipo de modificación post-traduccionales [216], además de la unión de una cadena de ácido polisialílico que regula la actividad de la propia proteína sin modificar [83]. Existe además una multitud de proteínas cuya glicosilación regula su función en el músculo diferenciado, como es el caso de la proteína distroglicano, en la que las moléculas de carbohidratos se concentran en un dominio rico en Ser/Thr [257],

cuya presencia es fundamental para la unión de ligandos de la matriz extracelular [219]; glicoproteína 1, cuyas cadenas N-glicosiladas juegan un papel importante en la proliferación y diferenciación de SCs [258] o sindecano-3, glicoproteína que, de manera similar a ANKK1, está regulada a la baja durante la diferenciación de músculo esquelético [259] y su defecto en SCs desencadena un ciclo celular aberrante [260]. En este sentido, ANKK1 podría ser glicosilada a nivel post-traduccional y, del mismo modo que ocurre con otras proteínas, la adición de este nuevo grupo podría afectar a su función y/o localización celular.

## 5.2. ANKK1 EN EL MÚSCULO ADULTO Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO

El estudio de ANKK1 en el músculo adulto reveló que esta proteína localiza en el subtipo de fibras de contracción rápida y en diversos compartimentos subcelulares. Las fibras rápidas obtienen energía del glucógeno almacenado y la fosfocreatina, en muchas ocasiones basándose en el metabolismo glicolítico [261,262], aunque también se encuentran subtipos con metabolismo oxidativo y mixto. En las fibras musculares murinas, existe una elevada proporción de genes diferencialmente expresados que se relacionan fundamentalmente con la maquinaria contráctil y la glicólisis [263] y ANKK1 podría estar entre ellos. Además, en C2C12 hemos demostrado que la inducción del metabolismo glicolítico por niveles altos de glucosa en el medio o bien, el crecimiento en condiciones hipóxicas, causa un aumento de expresión de *ANKK1* que podría explicar su localización en las fibras rápidas. En el caso del tratamiento con Berberina, la disminución observada en ANKK1 nuclear podría explicarse porque este compuesto activa la diferenciación de mioblastos a través de MyoD y p38 MAPK [264], mientras que en este trabajo hemos observado una relación reversa entre la expresión de MYOD y ANKK1, durante la diferenciación y tras la activación de la vía glicolítica en hipoxia. Por tanto, el incremento de la expresión de *ANKK1* tras la inducción de la vía glicolítica mediada por diferentes mecanismos junto con su localización en fibras de contracción rápida sugiere una relación entre *ANKK1* y el metabolismo celular.

En cuanto a la localización subcelular de ANKK1, las fibras musculares FDB adultas *in vitro* mostraron un patrón de expresión característico tanto longitudinal como transversal a la fibra muscular (Fig. 33). Este patrón de expresión bandeado también se observó en los miotúbulos embrionarios más diferenciados (Fig. 18C), y es típico de los costámeros, que son agrupaciones de proteínas de la matriz extracelular que tienen papeles clave en el mantenimiento de la estructura muscular y la contracción [265]. También encontramos que ANKK1 subyace a  $\alpha$ -sarcoglicano en la fibra muscular, es decir, se localiza a nivel subsarcolémico (Fig. 34), hecho que no es sorprendente teniendo en cuenta que se han descrito en tejido nervioso isoformas de ANKK1 asociadas a membrana [19], al igual que ocurre con otros miembros de la familia RIP [37].

En este trabajo también encontramos expresión de *ANKK1* en las SCs, que son los precursores miogénicos adultos [34,35]. La comparación del patrón de

expresión de isoformas ANKK1 (ANKK1-k nuclear frente a ANKK1-fl citoplasmática) entre SCs quiescentes / autorrenovables y ya comprometidas muestra sorprendentes similitudes con los precursores de células neurales [36] durante el desarrollo, ya que la isoforma quinasa desaparece del núcleo tras la activación de la SC mientras que la isoforma citoplasmática se mantiene. Además la expresión de ANKK1-k en SCs y mioblastos se ha vinculado con un estado más indiferenciado de las mismas. Entre las diferentes rutas de señal que regulan el mantenimiento del estado quiescente, cabe mencionar la vía NFκB. En las SCs, el promotor de *Notch1* es hipermetilado bajo el control de TNFα y NFκB, reduciendo así la autorrenovación y proliferación de las SCs [266]. En mioblastos, la inhibición de la activación de esta ruta es un prerrequisito para la diferenciación miogénica [267]. Como ya se ha mencionado anteriormente, se ha sugerido la participación de las proteínas RIP en la diferenciación muscular y además, las RIP activan la vía NFκB [25]. En el caso de ANKK1 este trabajo demuestra que también es una RIP implicada en diferenciación muscular y el análisis *in silico* de su promotor ha revelado la presencia de, al menos, tres elementos cis de unión a NFκB [226]. Por tanto, se podría especular que ANKK1-k, localizada en el núcleo de las SCs quiescentes podría activar esta vía favoreciendo así la autorrenovación de las SCs mientras que su ausencia en el núcleo favorecería la progresión miogénica.

En cuanto a los aspectos metabólicos, hemos observado que la isoforma ANKK1-fl está preferentemente presente en poblaciones celulares que dependen de la vía glicolítica para la obtención de energía: por una parte, ANKK1-fl se expresa en los mioblastos y miotúbulos fetales en el periodo embrionario, momento en el cual se dan unas condiciones hipóxicas que aseguran la correcta formación de los precursores musculares [268,269,270,271]. Por otra parte, a diferencia de ANKK1-k, la expresión de ANKK1-fl se mantiene a lo largo la transición de la SC quiescente a la SC activada, momento en el que se da un ambiente hipóxico [268] que desencadena una reprogramación metabólica desde la fosforilación oxidativa hacia la glicólisis [149]. Todo esto concuerda con la expresión de ANKK1-fl en fibras de contracción rápida con un metabolismo preferentemente glicolítico y su ausencia en fibras lentas puramente oxidativas.

Por lo tanto, es tentador considerar que el patrón de expresión de *ANKK1* en SCs podría estar relacionado con cambios metabólicos y/o entrada o salida de estas células en el ciclo celular.

### **5.3. LA EXPRESIÓN DE ANKK1 SE VE AFECTADA EN PROGENITORES MUSCULARES Y POBLACIONES REGENERATIVAS EN PACIENTES CON DISTROFIAS MUSCULARES**

Existen múltiples similitudes entre la miogénesis embrionaria y la regeneración mediada por SCs en músculo adulto, estableciendo una conexión entre los progenitores de origen somítico y las SCs adultas [101,272,273,274]. El hallazgo de que ANKK1 también se expresa en las SCs de músculo sano y, en mioblastos, SCs y fibras musculares regenerativas de pacientes con distrofias musculares sugiere que esta proteína participa en la reparación y regeneración muscular.

Por una parte, se encontró que hay una menor proporción de mioblastos de pacientes con distrofias musculares que expresan ANKK1 nuclear *in vitro*, coincidiendo con el aumento de las células PAX7+ que es un marcador de quiescencia, estando el incremento de las SCs en pacientes DMD previamente reportado [198]. Recientemente se ha descrito que en pacientes con distrofias musculares se produce un incremento en la subpoblación de las SCs no comprometidas a regeneración muscular [199], posiblemente desencadenando un defecto mitótico que produce un arresto del ciclo celular, tal y como sucede en modelo murino [275]. Futuros estudios en esta dirección permitirán definir si la reducción del número de mioblastos ANKK1+ provenientes de pacientes con distrofias musculares guarda relación con una posible afectación de su ciclo celular, teniendo en cuenta la relación ya descrita de ANKK1 con el ciclo celular [81].

Además, nuestros resultados *in vivo* han mostrado, tras la inmunotinción con  $\alpha$ -ANKK1, un incremento en el número de las SCs en músculos distróficos con patologías de distinta etiología, siendo conocido el aumento de las SCs en otras patologías además de DMD, tales como LGMD2A [276]. En estos pacientes también se encontró una elevada proporción de fibras regenerativas que expresaba ANKK1.

Desde un punto de vista genético, la localización de los genes *ANKK1* y *NCAM1* en el clúster genómico NTAD también apoya la función de este *locus* en la miogénesis. *NCAM1* no sólo se han asociado con neurogénesis, sino que también se ha identificado su localización en mioblastos embrionarios [90], SCs adultas [277] y fibras regenerativas en diferentes patologías neuromusculares [91,92]. Por lo tanto, nuestro estudio de *ANKK1* y los hallazgos previamente reportados de *NCAM1* en miogénesis embrionaria y adulta extienden el impacto del clúster NTAD más allá del desarrollo del cerebro, al del linaje miogénico. Este conocimiento junto con la expresión de *ANKK1* en las SCs y fibras regenerativas en músculo de pacientes con distrofias musculares sugiere la implicación de esta proteína en los mecanismos de mantenimiento y regeneración muscular, pudiendo ser ANKK1 una posible diana de acción farmacológica para estas patologías.

#### 5.4. ANKK1 Y SU PARTICIPACIÓN EN PROCESOS CELULARES

En este trabajo hemos demostrado que la diferenciación miogénica produce una disminución de ANKK1-k nuclear y, por otra parte, el metabolismo glicolítico incrementa la expresión de la proteína. Ambos fenómenos podrían estar estrechamente relacionados, ya que la transición del proceso de proliferación a diferenciación supone un cambio en el metabolismo celular hacia la fosforilación oxidativa, y al mismo tiempo conlleva la salida de las células del ciclo celular.

Ya se ha reportado la relación de ANKK1 con el ciclo en progenitores neurales [81]. Nuestro estudio por citometría de flujo del impacto de la sobreexpresión de variantes genéticas de ANKK1-k en células HeLa sincronizadas ha encontrado una serie de tendencias específicas de isoforma de ANKK1 sobreexpresada y la

## Discusión

progresión del ciclo celular. En general, a lo largo del ciclo celular se ha observado una mayor proporción de células en fase G0/G1 en las poblaciones transfectadas con cualquiera de las isoformas de ANKK1. La sobreexpresión de A1, y en menor medida de A2 promueve una mayor velocidad de progresión del ciclo celular en estadios iniciales, mientras que las células transfectadas con la isoforma K51R sufren un retraso en la progresión, determinado por la menor proporción de células en S y la mayor proporción en fase G2/M. Estos resultados apoyan resultados previos que sugieren diferencias funcionales entre las variantes polimórficas de ANKK1 y la mutante catalíticamente inactiva [81]. Nuestro grupo ya describió que la sobreexpresión de las variantes genéticas de ANKK1-k en células HEK293T presenta diferencias en cuanto a niveles de expresión y respuesta a la estimulación dopaminérgica [79]. Las diferencias en la velocidad de progresión del ciclo celular entre A1 y A2 observadas en este trabajo podrían por tanto relacionarse con diferencias asociadas a características específicas de cada variante, como por ejemplo que la isoforma A1 podría tener un sitio adicional de fosforilación como se predice de los estudios *in silico* [19]. En estadios más avanzados del ciclo, la proporción de células en fase G2/M no sólo se iguala sino que es menor en las poblaciones que sobreexpresan las variantes de ANKK1-k, lo que correlaciona con el hallazgo previo de que los niveles de ANKK1-k incrementan hacia G2/M en células sincronizadas [81].

El retraso en la progresión del ciclo celular en las células transfectadas con K51R sugería que la actividad quinasa de la proteína podría ser necesaria para que el ciclo celular avance con normalidad. Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado la actividad quinasa de la proteína ANKK1 ni sus isoformas y variantes genéticas en diferentes condiciones y tipos celulares estudiados. Además, el hecho de que la proteína recombinante mostrara unos niveles de autofosforilación y fosforilación de sustrato tan bajos sugiere que la actividad quinasa de esta proteína, o bien es leve, o bien tiene lugar en un contexto celular específico. Se conocen muchas proteínas quinasa que actúan en momentos concretos del ciclo celular [278]. Tal es el caso de CDK2, que forma complejos con ciclinas E en fase G1 tardía y con ciclina A2 en fase S, fosforilando proteínas diana y permitiendo la progresión del ciclo celular [279]; las quinasas aurora fosforilan a PLK1 en fase S [280], y esta a su vez activa CDK1 en G2 [281]; la actividad quinasa de CDK1 se requiere para eventos mitóticos [282], mientras que la reducción de su actividad permite completar la mitosis y citoquinesis. ANKK1-k incrementa a medida que avanza hacia fase M mientras que la isoforma canónica presenta una menor expresión basal en G1/S que disminuye hacia mitosis, lo que sugiere que las diferentes isoformas de ANKK1 podrían ejercer distintos papeles en el contexto de la progresión del ciclo celular. El rol concreto de ANKK1 en la regulación del ciclo celular y su posible actividad quinasa en un determinado momento del ciclo celular todavía está por determinar.

En resumen, en la presente Tesis Doctoral se presenta la primera evidencia de la expresión de ANKK1 en el linaje miogénico durante el desarrollo y en la edad adulta. El patrón de expresión característico de ANKK1 durante la diferenciación miogénica y la regeneración podrían convertir a esta proteína en un marcador de utilidad del estado de la fibra muscular, abriendo nuevas posibilidades que permitan comprender mejor los trastornos neuromusculares en los que la reparación muscular está afectada.



*Raras, pero no invisibles*



# **CONCLUSIONES**



## 6. CONCLUSIONES

1. ANKK1 es una proteína que participa en la biología muscular. Se localiza en precursores miogénicos durante el desarrollo embrionario murino y en las células satélite del músculo adulto.
2. ANKK1 muestra una dinámica de expresión de isoformas específica de fase durante la progresión miogénica: las isoformas ANKK1-k y ANKK1-fl se expresan en mioblastos y SCs quiescentes, mientras que sólo ANKK1-fl está presente en miotúbulos y SCs activadas.
3. En músculo murino adulto (gastrocnemio, sóleo, tríceps), ANKK1 se expresa mayoritariamente en fibras de contracción rápida tipo II. La activación de la vía glicolítica en mioblastos murinos incrementa la expresión de *Ankk1*. Todo ello muestra la relación entre la expresión de ANKK1 y el metabolismo glicolítico y explica la localización de la proteína en fibras musculares de contracción rápida.
4. Los mioblastos de pacientes con DMD presentan una expresión alterada de ANKK1. La disminución de ANKK1 nuclear en estos mioblastos se asocia con un estadio celular más indiferenciado, definido por el incremento de expresión de PAX7. Paralelamente, en biopsias procedentes de pacientes con diferentes distrofias musculares, la expresión de ANKK1 se asocia con poblaciones celulares regenerativas, es decir, SCs y fibras regenerativas.
5. La sobreexpresión de las variantes polimórficas de ANKK1 (A1-A2) en células HeLa incrementa la velocidad de progresión del ciclo celular, mientras que la sobreexpresión de la isoforma catalíticamente inactiva (K51R) la disminuye. En todos los casos, el porcentaje de células que alcanza mitosis está reducido. Todo esto indica que la expresión de ANKK1 afecta tanto a la progresión del ciclo celular como al número de células que completan el ciclo.
6. En las condiciones estudiadas, no se ha detectado actividad quinasa de ANKK1 *in vitro*. Sin embargo, dado que es una RIP quinasa y su dominio quinasa es homólogo al resto de los miembros de la familia RIP, no podemos afirmar que ANKK1 no presenta dicha actividad.



*Los libros curan la más peligrosa de las enfermedades humanas:  
la ignorancia*

*Radko Tichavsky*



# **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT (2004) Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat* 23: 540-545.
2. Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, et al. (1990) Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 263: 2055-2060.
3. Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, et al. (1993) Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 33: 271-285.
4. Perez de los Cobos J, Baiget M, Trujols J, Sinol N, Volpini V, et al. (2007) Allelic and genotypic associations of DRD2 TaqI A polymorphism with heroin dependence in Spanish subjects: a case control study. *Behav Brain Funct* 3: 25.
5. Radwan GN, El-Setouhy M, Mohamed MK, Hamid MA, Azem SA, et al. (2007) DRD2/ANKK1 TaqI polymorphism and smoking behavior of Egyptian male cigarette smokers. *Nicotine Tob Res* 9: 1325-1329.
6. Lawford BR, Young RM, Noble EP, Sargent J, Rowell J, et al. (2000) The D(2) dopamine receptor A(1) allele and opioid dependence: association with heroin use and response to methadone treatment. *Am J Med Genet* 96: 592-598.
7. Comings DE, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Rugle LJ, Muhleman D, et al. (1996) A study of the dopamine D2 receptor gene in pathological gambling. *Pharmacogenetics* 6: 223-234.
8. Fang YJ, Thomas GN, Xu ZL, Fang JQ, Critchley JA, et al. (2005) An affected pedigree member analysis of linkage between the dopamine D2 receptor gene TaqI polymorphism and obesity and hypertension. *Int J Cardiol* 102: 111-116.
9. Noble EP (1994) Polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene and alcoholism and other substance use disorders. *Alcohol Alcohol Suppl* 2: 35-43.
10. Oliveri RL, Annesi G, Zappia M, Civitelli D, De Marco EV, et al. (2000) The dopamine D2 receptor gene is a susceptibility locus for Parkinson's disease. *Mov Disord* 15: 127-131.

## Bibliografía

11. Hoenicka J, Garcia-Ruiz PJ, Ponce G, Herranz A, Martinez-Rubio D, et al. (2015) The addiction-related gene ANKK1 in Parkinsonian patients with impulse control disorder. *Neurotox Res* 27: 205-208.
12. Comings DE, Comings BG, Muhleman D, Dietz G, Shahbahrami B, et al. (1991) The dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders. *JAMA* 266: 1793-1800.
13. Sery O, Drtilkova I, Theiner P, Pitelova R, Staif R, et al. (2006) Polymorphism of DRD2 gene and ADHD. *Neuro Endocrinol Lett* 27: 236-240.
14. Golimbet VE, Aksenova MG, Abramova LI, Kaleda VG, Orlova VA, et al. (1998) [Association of allele polymorphism of dopamine d2 receptors with schizophrenic and affective disorders]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 98: 32-35.
15. Li T, Liu X, Sham PC, Aitchison KJ, Cai G, et al. (1999) Association analysis between dopamine receptor genes and bipolar affective disorder. *Psychiatry Res* 86: 193-201.
16. Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, Deybach JC, Ades J, et al. (2004) The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res* 67: 75-85.
17. Mihara K, Suzuki A, Kondo T, Yasui-Furukori N, Ono S, et al. (2001) Relationship between Taq1 A dopamine D2 receptor (DRD2) polymorphism and prolactin response to bromperidol. *Am J Med Genet* 105: 271-274.
18. Klein TA, Neumann J, Reuter M, Hennig J, von Cramon DY, et al. (2007) Genetically determined differences in learning from errors. *Science* 318: 1642-1645.
19. Hoenicka J, Quinones-Lombrana A, Espana-Serrano L, Alvira-Botero X, Kremer L, et al. (2010) The ANKK1 gene associated with addictions is expressed in astroglial cells and upregulated by apomorphine. *Biol Psychiatry* 67: 3-11.
20. Bork P (1993) Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* 17: 363-374.
21. Bennett V (1992) Ankyrins. Adaptors between diverse plasma membrane proteins and the cytoplasm. *J Biol Chem* 267: 8703-8706.
22. Caenepeel S, Charydczak G, Sudarsanam S, Hunter T, Manning G (2004) The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11707-11712.

23. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
24. Humphries F, Yang S, Wang B, Moynagh PN (2015) RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ* 22: 225-236.
25. Meylan E, Tschopp J (2005) The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends Biochem Sci* 30: 151-159.
26. Huxley AF, Niedergerke R (1954) Measurement of muscle striations in stretch and contraction. *J Physiol* 124: 46-47P.
27. Cirak S, Feng L, Anthony K, Arechavala-Gomez V, Torelli S, et al. (2012) Restoration of the dystrophin-associated glycoprotein complex after exon skipping therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 20: 462-467.
28. Janssens S, Beyaert R (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 11: 293-302.
29. Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, et al. (2009) RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 325: 332-336.
30. He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, et al. (2009) Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell* 137: 1100-1111.
31. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, et al. (2009) Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell* 137: 1112-1123.
32. Vitner EB, Salomon R, Farfel-Becker T, Meshcheriakova A, Ali M, et al. (2014) RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. *Nat Med* 20: 204-208.
33. Ito Y, Ofengeim D, Najafov A, Das S, Saberi S, et al. (2016) RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS. *Science* 353: 603-608.
34. Shaw PJ, Barr MJ, Lukens JR, McGargill MA, Chi H, et al. (2011) Signaling via the RIP2 adaptor protein in central nervous system-infiltrating dendritic cells promotes inflammation and autoimmunity. *Immunity* 34: 75-84.

35. Goh FY, Cook KL, Upton N, Tao L, Lah LC, et al. (2013) Receptor-interacting protein 2 gene silencing attenuates allergic airway inflammation. *J Immunol* 191: 2691-2699.
36. Zhao CH, Ma X, Guo HY, Li P, Liu HY (2017) RIP2 deficiency attenuates cardiac hypertrophy, inflammation and fibrosis in pressure overload induced mice. *Biochem Biophys Res Commun.*
37. Micheau O, Tschopp J (2003) Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114: 181-190.
38. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, Jr. (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 281: 1680-1683.
39. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J (2001) NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21: 5299-5305.
40. Martinon F, Holler N, Richard C, Tschopp J (2000) Activation of a proapoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett* 468: 134-136.
41. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, et al. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1: 489-495.
42. Rickard JA, O'Donnell JA, Evans JM, Lalaoui N, Poh AR, et al. (2014) RIPK1 regulates RIPK3-MLKL-driven systemic inflammation and emergency hematopoiesis. *Cell* 157: 1175-1188.
43. Polykratis A, Hermance N, Zelic M, Roderick J, Kim C, et al. (2014) Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo. *J Immunol* 193: 1539-1543.
44. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997) A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388: 548-554.
45. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, et al. (1997) IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278: 860-866.
46. Regnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, et al. (1997) Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90: 373-383.
47. Jacquet S, Nishino Y, Kumphune S, Sicard P, Clark JE, et al. (2008) The role of RIP2 in p38 MAPK activation in the stressed heart. *J Biol Chem* 283: 11964-11971.

48. Thome M, Hofmann K, Burns K, Martinon F, Bodmer JL, et al. (1998) Identification of CARDIAK, a RIP-like kinase that associates with caspase-1. *Curr Biol* 8: 885-888.
49. Navas TA, Baldwin DT, Stewart TA (1999) RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 274: 33684-33690.
50. Inohara N, Nunez G (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 3: 371-382.
51. Viala J, Sansonetti P, Philpott DJ (2004) Nods and 'intracellular' innate immunity. *C R Biol* 327: 551-555.
52. Balamayooran T, Batra S, Balamayooran G, Cai S, Kobayashi KS, et al. (2011) Receptor-interacting protein 2 controls pulmonary host defense to *Escherichia coli* infection via the regulation of interleukin-17A. *Infect Immun* 79: 4588-4599.
53. Shimada K, Chen S, Dempsey PW, Sorrentino R, Alsabeh R, et al. (2009) The NOD/RIP2 pathway is essential for host defenses against *Chlamydomydia pneumoniae* lung infection. *PLoS Pathog* 5: e1000379.
54. Kim YG, Park JH, Reimer T, Baker DP, Kawai T, et al. (2011) Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host Microbe* 9: 496-507.
55. Krieg A, Le Negrate G, Reed JC (2009) RIP2-beta: a novel alternative mRNA splice variant of the receptor interacting protein kinase RIP2. *Mol Immunol* 46: 1163-1170.
56. Munz B, Hildt E, Springer ML, Blau HM (2002) RIP2, a checkpoint in myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 22: 5879-5886.
57. Ehlers S, Mueck T, Adams S, Landuzzi L, Lollini PL, et al. (2008) RIP2 regulates growth and differentiation of normal myoblasts and of rhabdomyosarcoma cells. *Eur J Cell Biol* 87: 163-172.
58. Sun X, Lee J, Navas T, Baldwin DT, Stewart TA, et al. (1999) RIP3, a novel apoptosis-inducing kinase. *J Biol Chem* 274: 16871-16875.
59. Yu PW, Huang BC, Shen M, Quast J, Chan E, et al. (1999) Identification of RIP3, a RIP-like kinase that activates apoptosis and NFkappaB. *Curr Biol* 9: 539-542.
60. Pazdernik NJ, Donner DB, Goebel MG, Harrington MA (1999) Mouse receptor interacting protein 3 does not contain a caspase-recruiting or a death domain but induces apoptosis and activates NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 19: 6500-6508.
61. Feng S, Ma L, Yang Y, Wu M (2006) Truncated RIP3 (tRIP3) acts upstream of FADD to induce apoptosis in the human hepatocellular

- carcinoma cell line QGY-7703. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 558-565.
62. Newton K, Dugger DL, Wickliffe KE, Kapoor N, de Almagro MC, et al. (2014) Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* 343: 1357-1360.
63. Bhr C, Rohwer A, Stempka L, Rincke G, Marks F, et al. (2000) DIK, a novel protein kinase that interacts with protein kinase Cdelta. Cloning, characterization, and gene analysis. *J Biol Chem* 275: 36350-36357.
64. Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D, et al. (2001) Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase. *J Biol Chem* 276: 21737-21744.
65. Meylan E, Martinon F, Thome M, Gschwendt M, Tschopp J (2002) RIP4 (DIK/PKK), a novel member of the RIP kinase family, activates NF-kappa B and is processed during apoptosis. *EMBO Rep* 3: 1201-1208.
66. Muto A, Ruland J, McAllister-Lucas LM, Lucas PC, Yamaoka S, et al. (2002) Protein kinase C-associated kinase (PKK) mediates Bcl10-independent NF-kappa B activation induced by phorbol ester. *J Biol Chem* 277: 31871-31876.
67. Holland P, Willis C, Kanaly S, Glaccum M, Warren A, et al. (2002) RIP4 is an ankyrin repeat-containing kinase essential for keratinocyte differentiation. *Curr Biol* 12: 1424-1428.
68. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 17: 1244-1245.
69. Ponce G, Perez-Gonzalez R, Aragues M, Palomo T, Rodriguez-Jimenez R, et al. (2009) The ANKK1 kinase gene and psychiatric disorders. *Neurotox Res* 16: 50-59.
70. Paisan-Ruiz C, Jain S, Evans EW, Gilks WP, Simon J, et al. (2004) Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease. *Neuron* 44: 595-600.
71. Zimprich A, Biskup S, Leitner P, Lichtner P, Farrer M, et al. (2004) Mutations in LRRK2 cause autosomal-dominant parkinsonism with pleomorphic pathology. *Neuron* 44: 601-607.
72. Greggio E, Lewis PA, van der Brug MP, Ahmad R, Kaganovich A, et al. (2007) Mutations in LRRK2/dardarin associated with Parkinson disease are more toxic than equivalent mutations in the homologous kinase LRRK1. *J Neurochem* 102: 93-102.
73. Haugarvoll K, Toft M, Ross OA, White LR, Aasly JO, et al. (2007) Variants in the LRRK1 gene and susceptibility to Parkinson's disease in Norway. *Neurosci Lett* 416: 299-301.

74. Bahnassawy L, Nicklas S, Palm T, Menzl I, Birzele F, et al. (2013) The parkinson's disease-associated LRRK2 mutation R1441G inhibits neuronal differentiation of neural stem cells. *Stem Cells Dev* 22: 2487-2496.
75. Yan R, Liu Z (2017) LRRK2 enhances Nod1/2-mediated inflammatory cytokine production by promoting Rip2 phosphorylation. *Protein Cell* 8: 55-66.
76. States DJ, Omenn GS, Blackwell TW, Fermin D, Eng J, et al. (2006) Challenges in deriving high-confidence protein identifications from data gathered by a HUPO plasma proteome collaborative study. *Nat Biotechnol* 24: 333-338.
77. Imami K, Sugiyama N, Kyono Y, Tomita M, Ishihama Y (2008) Automated phosphoproteome analysis for cultured cancer cells by two-dimensional nanoLC-MS using a calcined titania/C18 biphasic column. *Anal Sci* 24: 161-166.
78. Misson JP, Austin CP, Takahashi T, Cepko CL, Caviness VS, Jr. (1991) The alignment of migrating neural cells in relation to the murine neopallial radial glial fiber system. *Cereb Cortex* 1: 221-229.
79. Garrido E, Palomo T, Ponce G, Garcia-Consuegra I, Jimenez-Arriero MA, et al. (2011) The ANKK1 protein associated with addictions has nuclear and cytoplasmic localization and shows a differential response of Ala239Thr to apomorphine. *Neurotox Res* 20: 32-39.
80. Ponce G, Quinones-Lombrana A, Martin-Palanco NG, Rubio-Solsona E, Jimenez-Arriero MA, et al. (2016) The Addiction-Related Gene Ankk1 is Oppositely Regulated by D1R- and D2R-Like Dopamine Receptors. *Neurotox Res* 29: 345-350.
81. Espana-Serrano L, Guerra Martin-Palanco N, Montero-Pedrazuela A, Perez-Santamarina E, Vidal R, et al. (2016) The Addiction-Related Protein ANKK1 is Differentially Expressed During the Cell Cycle in Neural Precursors. *Cereb Cortex*.
82. Mota NR, Araujo-Jnr EV, Paixao-Cortes VR, Bortolini MC, Bau CH (2012) Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2) gene cluster. *Genet Mol Biol* 35: 912-918.
83. Bonfanti L (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog Neurobiol* 80: 129-164.
84. Bonfanti L, Theodosis DT (2009) Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell Adh Migr* 3: 43-50.
85. Katoh M (2003) Identification and characterization of TPARM gene in silico. *Int J Oncol* 23: 1213-1217.

86. Castelo-Branco G, Arenas E (2006) Function of Wnts in dopaminergic neuron development. *Neurodegener Dis* 3: 5-11.
87. Fidzianska A, Kaminska A (1995) Neural cell adhesion molecule (N-CAM) as a marker of muscle tissue alternations. Review of the literature and own observations. *Folia Neuropathol* 33: 125-128.
88. Covault J, Merlie JP, Goridis C, Sanes JR (1986) Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol* 102: 731-739.
89. Moore SE, Thompson J, Kirkness V, Dickson JG, Walsh FS (1987) Skeletal muscle neural cell adhesion molecule (N-CAM): changes in protein and mRNA species during myogenesis of muscle cell lines. *J Cell Biol* 105: 1377-1386.
90. Capkovic KL, Stevenson S, Johnson MC, Thelen JJ, Cornelison DD (2008) Neural cell adhesion molecule (NCAM) marks adult myogenic cells committed to differentiation. *Exp Cell Res* 314: 1553-1565.
91. Higuchi I, Kawai H, Kawajiri M, Fukunaga H, Horikiri T, et al. (1999) Statistically significant differences in the number of CD24 positive muscle fibers and satellite cells between sarcoglycanopathy and age-matched Becker muscular dystrophy patients. *Intern Med* 38: 412-415.
92. Hauerslev S, Sveen ML, Vissing J, Krag TO (2013) Protein turnover and cellular stress in mildly and severely affected muscles from patients with limb girdle muscular dystrophy type 2I. *PLoS One* 8: e66929.
93. Christ B, Ordahl CP (1995) Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 191: 381-396.
94. Tajbakhsh S, Buckingham M (2000) The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. *Curr Top Dev Biol* 48: 225-268.
95. Sambasivan R, Tajbakhsh S (2007) Skeletal muscle stem cell birth and properties. *Semin Cell Dev Biol* 18: 870-882.
96. Kurosaka S, Kashina A (2008) Cell biology of embryonic migration. *Birth Defects Res C Embryo Today* 84: 102-122.
97. Scarpa E, Mayor R (2016) Collective cell migration in development. *J Cell Biol* 212: 143-155.
98. Rorth P (2012) Fellow travellers: emergent properties of collective cell migration. *EMBO Rep* 13: 984-991.
99. Kelly AM, Zacks SI (1969) The histogenesis of rat intercostal muscle. *J Cell Biol* 42: 135-153.

100. Duxson MJ, Usson Y, Harris AJ (1989) The origin of secondary myotubes in mammalian skeletal muscles: ultrastructural studies. *Development* 107: 743-750.
101. Lepper C, Fan CM (2010) Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* 48: 424-436.
102. Lepper C, Partridge TA, Fan CM (2011) An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* 138: 3639-3646.
103. Murphy MM, Lawson JA, Mathew SJ, Hutcheson DA, Kardon G (2011) Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* 138: 3625-3637.
104. Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Van Wittenberghe L, Paldi A, et al. (2011) Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* 138: 3647-3656.
105. Ethier CR, Simmons C.A (2007) *Introductory biomechanics : from cells to organisms*. England: Cambridge University Press. 511 p.
106. Knupp C, Luther PK, Squire JM (2002) Titin organisation and the 3D architecture of the vertebrate-striated muscle I-band. *J Mol Biol* 322: 731-739.
107. Torre I, Gonzalez-Tendero A, Garcia-Canadilla P, Crispi F, Garcia-Garcia F, et al. (2014) Permanent cardiac sarcomere changes in a rabbit model of intrauterine growth restriction. *PLoS One* 9: e113067.
108. Brooke MH, Kaiser KK (1970) Three human myosin ATPase systems and their importance in muscle pathology. *Neurology* 20: 404-405.
109. Weiss A, McDonough D, Wertman B, Acakpo-Satchivi L, Montgomery K, et al. (1999) Organization of human and mouse skeletal myosin heavy chain gene clusters is highly conserved. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2958-2963.
110. Schiaffino S, Gorza L, Sartore S, Saggin L, Ausoni S, et al. (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 10: 197-205.
111. Gorza L (1990) Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 38: 257-265.
112. Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S (1994) Type IIX myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIB fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* 267: C1723-1728.

113. Wu YZ, Crumley RL, Armstrong WB, Caiozzo VJ (2000) New perspectives about human laryngeal muscle: single-fiber analyses and interspecies comparisons. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 857-864.
114. Horton MJ, Brandon CA, Morris TJ, Braun TW, Yaw KM, et al. (2001) Abundant expression of myosin heavy-chain IIB RNA in a subset of human masseter muscle fibres. *Arch Oral Biol* 46: 1039-1050.
115. Harrison BC, Allen DL, Leinwand LA (2011) Iib or not Iib? Regulation of myosin heavy chain gene expression in mice and men. *Skelet Muscle* 1: 5.
116. Sartore S, Mascarello F, Rowleron A, Gorza L, Ausoni S, et al. (1987) Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 8: 161-172.
117. Weiss A, Schiaffino S, Leinwand LA (1999) Comparative sequence analysis of the complete human sarcomeric myosin heavy chain family: implications for functional diversity. *J Mol Biol* 290: 61-75.
118. Wieczorek DF, Periasamy M, Butler-Browne GS, Whalen RG, Nadal-Ginard B (1985) Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue-specific one, in extraocular musculature. *J Cell Biol* 101: 618-629.
119. Rossi AC, Mammucari C, Argentini C, Reggiani C, Schiaffino S (2010) Two novel/ancient myosins in mammalian skeletal muscles: MYH14/7b and MYH15 are expressed in extraocular muscles and muscle spindles. *J Physiol* 588: 353-364.
120. Berg JS, Powell BC, Cheney RE (2001) A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12: 780-794.
121. Desjardins PR, Burkman JM, Shrager JB, Allmond LA, Stedman HH (2002) Evolutionary implications of three novel members of the human sarcomeric myosin heavy chain gene family. *Mol Biol Evol* 19: 375-393.
122. Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91: 1447-1531.
123. DeNardi C, Ausoni S, Moretti P, Gorza L, Velleca M, et al. (1993) Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J Cell Biol* 123: 823-835.
124. Williamson DL, Godard MP, Porter DA, Costill DL, Trappe SW (2000) Progressive resistance training reduces myosin heavy chain coexpression in single muscle fibers from older men. *J Appl Physiol* (1985) 88: 627-633.

125. Williamson DL, Gallagher PM, Carroll CC, Raue U, Trappe SW (2001) Reduction in hybrid single muscle fiber proportions with resistance training in humans. *J Appl Physiol* (1985) 91: 1955-1961.
126. Samaha FJ, Guth L, Albers RW (1970) Phenotypic differences between the actomyosin ATPase of the three fiber types of mammalian skeletal muscle. *Exp Neurol* 26: 120-125.
127. Hargreaves M (2000) Skeletal muscle metabolism during exercise in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27: 225-228.
128. Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495.
129. Schultz E (1974) A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lumbrical muscle. *Anat Rec* 180: 589-595.
130. Hawke TJ, Garry DJ (2001) Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* (1985) 91: 534-551.
131. Charge SB, Rudnicki MA (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84: 209-238.
132. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, et al. (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122: 289-301.
133. Yin H, Price F, Rudnicki MA (2013) Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93: 23-67.
134. Tajbakhsh S, Rocancourt D, Cossu G, Buckingham M (1997) Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89: 127-138.
135. Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, et al. (2003) The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J Anat* 202: 59-68.
136. Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, Rocancourt D, Cumano A, et al. (2009) Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13383-13387.
137. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, et al. (2000) Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102: 777-786.
138. Olguin HC, Olwin BB (2004) Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* 275: 375-388.

139. Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, et al. (1991) The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science* 251: 761-766.
140. Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R (1992) Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71: 383-390.
141. Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, et al. (1993) MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359.
142. Venuti JM, Morris JH, Vivian JL, Olson EN, Klein WH (1995) Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J Cell Biol* 128: 563-576.
143. Barjot C, Cotten ML, Goblet C, Whalen RG, Bacou F (1995) Expression of myosin heavy chain and of myogenic regulatory factor genes in fast or slow rabbit muscle satellite cell cultures. *J Muscle Res Cell Motil* 16: 619-628.
144. Feldman JL, Stockdale FE (1991) Skeletal muscle satellite cell diversity: satellite cells form fibers of different types in cell culture. *Dev Biol* 143: 320-334.
145. Lagord C, Soulet L, Bonavaud S, Bassaglia Y, Rey C, et al. (1998) Differential myogenicity of satellite cells isolated from extensor digitorum longus (EDL) and soleus rat muscles revealed in vitro. *Cell Tissue Res* 291: 455-468.
146. Hashimoto N, Murase T, Kondo S, Okuda A, Inagawa-Ogashiwa M (2004) Muscle reconstitution by muscle satellite cell descendants with stem cell-like properties. *Development* 131: 5481-5490.
147. Ono Y, Masuda S, Nam HS, Benezra R, Miyagoe-Suzuki Y, et al. (2012) Slow-dividing satellite cells retain long-term self-renewal ability in adult muscle. *J Cell Sci* 125: 1309-1317.
148. Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H (1995) Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest* 72: 341-347.
149. Ryall JG, Dell'Orso S, Derfoul A, Juan A, Zare H, et al. (2015) The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* 16: 171-183.

150. Rocheteau P, Gayraud-Morel B, Siegl-Cachedenier I, Blasco MA, Tajbakhsh S (2012) A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* 148: 112-125.
151. Mourikis P, Sambasivan R, Castel D, Rocheteau P, Bizzarro V, et al. (2012) A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* 30: 243-252.
152. Gopinath SD, Webb AE, Brunet A, Rando TA (2014) FOXO3 promotes quiescence in adult muscle stem cells during the process of self-renewal. *Stem Cell Reports* 2: 414-426.
153. Hausburg MA, Doles JD, Clement SL, Cadwallader AB, Hall MN, et al. (2015) Post-transcriptional regulation of satellite cell quiescence by TTP-mediated mRNA decay. *Elife* 4: e03390.
154. Sanes JR (2003) The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* 278: 12601-12604.
155. Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE (2000) HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 23: 239-245.
156. Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM (1995) Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol* 165: 307-312.
157. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol* 194: 114-128.
158. Wozniak AC, Anderson JE (2007) Nitric oxide-dependence of satellite stem cell activation and quiescence on normal skeletal muscle fibers. *Dev Dyn* 236: 240-250.
159. Toumi H, F'Guyer S, Best TM (2006) The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat* 208: 459-470.
160. Orimo S, Hiyamuta E, Arahata K, Sugita H (1991) Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle Nerve* 14: 515-520.
161. Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, et al. (1993) Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol* 265: R166-172.
162. Kharraz Y, Guerra J, Mann CJ, Serrano AL, Munoz-Canoves P (2013) Macrophage plasticity and the role of inflammation in skeletal muscle repair. *Mediators Inflamm* 2013: 491497.
163. Saclier M, Yacoub-Youssef H, Mackey AL, Arnold L, Ardjoune H, et al. (2013) Differentially activated macrophages orchestrate myogenic

precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells* 31: 384-396.

164. Abou-Khalil R, Le Grand F, Pallafacchina G, Valable S, Authier FJ, et al. (2009) Autocrine and paracrine angiopoietin 1/Tie-2 signaling promotes muscle satellite cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 5: 298-309.

165. Jones NC, Tyner KJ, Nibarger L, Stanley HM, Cornelison DD, et al. (2005) The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol* 169: 105-116.

166. Murphy MM, Keefe AC, Lawson JA, Flygare SD, Yandell M, et al. (2014) Transiently active Wnt/beta-catenin signaling is not required but must be silenced for stem cell function during muscle regeneration. *Stem Cell Reports* 3: 475-488.

167. Yang Y, Xu Y, Li W, Wang G, Song Y, et al. (2009) STAT3 induces muscle stem cell differentiation by interaction with myoD. *Cytokine* 46: 137-141.

168. Shea KL, Xiang W, LaPorta VS, Licht JD, Keller C, et al. (2010) Sproutyl regulates reversible quiescence of a self-renewing adult muscle stem cell pool during regeneration. *Cell Stem Cell* 6: 117-129.

169. Fu X, Zhu MJ, Dodson MV, Du M (2015) AMP-activated protein kinase stimulates Warburg-like glycolysis and activation of satellite cells during muscle regeneration. *J Biol Chem* 290: 26445-26456.

170. Hoffman EP, Brown RH, Jr., Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-928.

171. Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, et al. (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8: 323-327.

172. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, et al. (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21: 285-288.

173. Mittelbronn M, Sullivan T, Stewart CL, Bornemann A (2008) Myonuclear degeneration in LMNA null mice. *Brain Pathol* 18: 338-343.

174. Bonnemann CG, Wang CH, Quijano-Roy S, Deconinck N, Bertini E, et al. (2014) Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 24: 289-311.

175. Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chretien N, et al. (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18: 164-167.

176. Kuhn U, Gundel M, Knoth A, Kerwitz Y, Rudel S, et al. (2009) Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *J Biol Chem* 284: 22803-22814.
177. Hoffman EP, Kunkel LM (1989) Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 2: 1019-1029.
178. Flanigan KM, Voit T, Rosales XQ, Servais L, Kraus JE, et al. (2014) Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular dystrophy: results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscul Disord* 24: 16-24.
179. Udd B (2014) Distal myopathies. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14: 434.
180. Udd B (2011) Distal muscular dystrophies. *Handb Clin Neurol* 101: 239-262.
181. Vieira NM, Naslavsky MS, Licinio L, Kok F, Schlesinger D, et al. (2014) A defect in the RNA-processing protein HNRPDL causes limb-girdle muscular dystrophy 1G (LGMD1G). *Hum Mol Genet* 23: 4103-4110.
182. Broglio L, Tentorio M, Cotelli MS, Mancuso M, Vielmi V, et al. (2010) Limb-girdle muscular dystrophy-associated protein diseases. *Neurologist* 16: 340-352.
183. Mitsuhashi S, Kang PB (2012) Update on the genetics of limb girdle muscular dystrophy. *Semin Pediatr Neurol* 19: 211-218.
184. Helbling-Leclerc A, Bonne G, Schwartz K (2002) Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet* 10: 157-161.
185. Tawil R, Van Der Maarel SM (2006) Facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 34: 1-15.
186. Batten FE, Gibb HP (1909) Two Cases of Myotonia Atrophica, showing a peculiar Distribution of Muscular Atrophy. *Proc R Soc Med* 2: 32-33.
187. Zifko UA, Hahn AF, Remtulla H, George CF, Wihlidal W, et al. (1996) Central and peripheral respiratory electrophysiological studies in myotonic dystrophy. *Brain* 119 ( Pt 6): 1911-1922.
188. Salisbury E, Schoser B, Schneider-Gold C, Wang GL, Huichalaf C, et al. (2009) Expression of RNA CCUG repeats dysregulates translation and degradation of proteins in myotonic dystrophy 2 patients. *Am J Pathol* 175: 748-762.
189. Abu-Baker A, Rouleau GA (2007) Oculopharyngeal muscular dystrophy: recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim Biophys Acta* 1772: 173-185.

190. Messaed C, Rouleau GA (2009) Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiol Dis* 34: 397-405.
191. Haq RU, Speer MC, Chu ML, Tandan R (1999) Respiratory muscle involvement in Bethlem myopathy. *Neurology* 52: 174-176.
192. Quijano-Roy S, Avila-Smirnow D, Carlier RY (2012) Whole body muscle MRI protocol: pattern recognition in early onset NM disorders. *Neuromuscul Disord* 22 Suppl 2: S68-84.
193. Camacho Vanegas O, Bertini E, Zhang RZ, Petrini S, Minosse C, et al. (2001) Ullrich scleroatonic muscular dystrophy is caused by recessive mutations in collagen type VI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7516-7521.
194. Chung J, Smith AL, Hughes SC, Niizawa G, Abdel-Hamid HZ, et al. (2016) Twenty-year follow-up of newborn screening for patients with muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 53: 570-578.
195. Pane M, Messina S, Bruno C, D'Amico A, Villanova M, et al. (2013) Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscul Disord* 23: 313-315.
196. Blau HM, Webster C, Pavlath GK (1983) Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4856-4860.
197. Sacco A, Mourkioti F, Tran R, Choi J, Llewellyn M, et al. (2010) Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* 143: 1059-1071.
198. Bankole LC, Feasson L, Ponsot E, Kadi F (2013) Fibre type-specific satellite cell content in two models of muscle disease. *Histopathology* 63: 826-832.
199. Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J, Pasut A, Bentzinger CF, et al. (2015) Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* 21: 1455-1463.
200. Chang NC, Chevalier FP, Rudnicki MA (2016) Satellite Cells in Muscular Dystrophy - Lost in Polarity. *Trends Mol Med* 22: 479-496.
201. Talbot J, Maves L (2016) Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5: 518-534.
202. Webster C, Silberstein L, Hays AP, Blau HM (1988) Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 52: 503-513.
203. Marini JF, Pons F, Leger J, Loffreda N, Anoul M, et al. (1991) Expression of myosin heavy chain isoforms in Duchenne muscular dystrophy patients and carriers. *Neuromuscul Disord* 1: 397-409.

204. Celegato B, Capitanio D, Pescatori M, Romualdi C, Pacchioni B, et al. (2006) Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics* 6: 5303-5321.
205. Vihola A, Bassez G, Meola G, Zhang S, Haapasalo H, et al. (2003) Histopathological differences of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and PROMM/DM2. *Neurology* 60: 1854-1857.
206. Pisani V, Panico MB, Terracciano C, Bonifazi E, Meola G, et al. (2008) Preferential central nucleation of type 2 myofibers is an invariable feature of myotonic dystrophy type 2. *Muscle Nerve* 38: 1405-1411.
207. Keire P, Shearer A, Shefer G, Yablonka-Reuveni Z (2013) Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells. *Methods Mol Biol* 946: 431-468.
208. Blau HM, Pavlath GK, Hardeman EC, Chiu CP, Silberstein L, et al. (1985) Plasticity of the differentiated state. *Science* 230: 758-766.
209. Yaffe D, Saxel O (1977) Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature* 270: 725-727.
210. McAllister RM, Melnyk J, Finkelstein JZ, Adams EC, Jr., Gardner MB (1969) Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer* 24: 520-526.
211. Hinson AR, Jones R, Crose LE, Belyea BC, Barr FG, et al. (2013) Human rhabdomyosarcoma cell lines for rhabdomyosarcoma research: utility and pitfalls. *Front Oncol* 3: 183.
212. Burattini S, Ferri P, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, et al. (2004) C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: morpho-functional characterization. *Eur J Histochem* 48: 223-233.
213. Barlow JW, Wiley JC, Mous M, Narendran A, Gee MF, et al. (2006) Differentiation of rhabdomyosarcoma cell lines using retinoic acid. *Pediatr Blood Cancer* 47: 773-784.
214. Mailloux RJ, Harper ME (2010) Glucose regulates enzymatic sources of mitochondrial NADPH in skeletal muscle cells; a novel role for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FASEB J* 24: 2495-2506.
215. Yin J, Gao Z, Liu D, Liu Z, Ye J (2008) Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E148-156.
216. Liu T, Qian WJ, Gritsenko MA, Camp DG, 2nd, Monroe ME, et al. (2005) Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity

- subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry. *J Proteome Res* 4: 2070-2080.
217. Wu YJ, Fang YH, Chi HC, Chang LC, Chung SY, et al. (2014) Insulin and LiCl synergistically rescue myogenic differentiation of FoxO1 over-expressed myoblasts. *PLoS One* 9: e88450.
218. Larionov A, Krause A, Miller W (2005) A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* 6: 62.
219. Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, et al. (2002) Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418: 417-422.
220. Collins CA, Gnocchi VF, White RB, Boldrin L, Perez-Ruiz A, et al. (2009) Integrated functions of Pax3 and Pax7 in the regulation of proliferation, cell size and myogenic differentiation. *PLoS One* 4: e4475.
221. Farras R, Baldin V, Gallach S, Acquaviva C, Bossis G, et al. (2008) JunB breakdown in mid-/late G2 is required for down-regulation of cyclin A2 levels and proper mitosis. *Mol Cell Biol* 28: 4173-4187.
222. Pines J, Hunter T (1991) Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* 115: 1-17.
223. Erlandsson F, Linnman C, Ekholm S, Bengtsson E, Zetterberg A (2000) A detailed analysis of cyclin A accumulation at the G(1)/S border in normal and transformed cells. *Exp Cell Res* 259: 86-95.
224. Minshull J, Golsteyn R, Hill CS, Hunt T (1990) The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J* 9: 2865-2875.
225. Hsu H, Huang J, Shu HB, Baichwal V, Goeddel DV (1996) TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4: 387-396.
226. Korr D, Toschi L, Donner P, Pohlenz HD, Kreft B, et al. (2006) LRRK1 protein kinase activity is stimulated upon binding of GTP to its Roc domain. *Cell Signal* 18: 910-920.
227. West AB, Moore DJ, Biskup S, Bugayenko A, Smith WW, et al. (2005) Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16842-16847.
228. Tabebordbar M, Zhu K, Cheng JKW, Chew WL, Widrick JJ, et al. (2016) In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 351: 407-411.

229. Peng H, Kaplan N, Yang W, Getsios S, Lavker RM (2014) FIH-1 disrupts an LRRK1/EGFR complex to positively regulate keratinocyte migration. *Am J Pathol* 184: 3262-3271.
230. Tajbakhsh S, Rocancourt D, Buckingham M (1996) Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature* 384: 266-270.
231. Ontell M, Kozeka K (1984) The organogenesis of murine striated muscle: a cytoarchitectural study. *Am J Anat* 171: 133-148.
232. Buckingham M, Alonso S, Bugaisky G, Barton P, Cohen A, et al. (1985) The actin and myosin multigene families. *Adv Exp Med Biol* 182: 333-344.
233. Swynghedauw B (1986) Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol Rev* 66: 710-771.
234. Ontell M, Ontell MP, Sopper MM, Mallonga R, Lyons G, et al. (1993) Contractile protein gene expression in primary myotubes of embryonic mouse hindlimb muscles. *Development* 117: 1435-1444.
235. Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359-369.
236. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704-1709.
237. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453-465.
238. Etienne-Manneville S, Hall A (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106: 489-498.
239. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, et al. (2002) Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* 22: 6582-6591.
240. Shi SH, Jan LY, Jan YN (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112: 63-75.
241. Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN (2004) APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14: 2025-2032.

242. Czajkowski MT, Rassek C, Lenhard DC, Brohl D, Birchmeier C (2014) Divergent and conserved roles of Dll1 signaling in development of craniofacial and trunk muscle. *Dev Biol* 395: 307-316.
243. Shuler CF, Dalrymple KR (2001) Molecular regulation of tongue and craniofacial muscle differentiation. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 3-17.
244. Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M (1991) Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development* 111: 1097-1107.
245. Espana-Serrano L, Guerra Martin-Palanco N, Montero-Pedrazuela A, Perez-Santamarina E, Vidal R, et al. (2017) The Addiction-Related Protein ANKK1 is Differentially Expressed During the Cell Cycle in Neural Precursors. *Cereb Cortex* 27: 2809-2819.
246. Rountree RB, Willis CR, Dinh H, Blumberg H, Bailey K, et al. (2010) RIP4 regulates epidermal differentiation and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 130: 102-112.
247. Milosevic J, Schwarz SC, Ogunlade V, Meyer AK, Storch A, et al. (2009) Emerging role of LRRK2 in human neural progenitor cell cycle progression, survival and differentiation. *Mol Neurodegener* 4: 25.
248. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, et al. (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol* 166: 347-357.
249. Ridgeway AG, Skerjanc IS (2001) Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2. *J Biol Chem* 276: 19033-19039.
250. Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y (1998) Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *J Cell Sci* 111 ( Pt 6): 769-779.
251. Lingbeck JM, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL (2003) Determinants of nuclear and cytoplasmic ubiquitin-mediated degradation of MyoD. *J Biol Chem* 278: 1817-1823.
252. Ea CK, Deng L, Xia ZP, Pineda G, Chen ZJ (2006) Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 22: 245-257.
253. Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, Nakano H, Fukase K, et al. (2008) A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J* 27: 373-383.
254. Dorsch M, Wang A, Cheng H, Lu C, Bielecki A, et al. (2006) Identification of a regulatory autophosphorylation site in the serine-threonine kinase RIP2. *Cell Signal* 18: 2223-2229.

255. Zhao Y, Alonso C, Ballester I, Song JH, Chang SY, et al. (2012) Control of NOD2 and Rip2-dependent innate immune activation by GEF-H1. *Inflamm Bowel Dis* 18: 603-612.
256. Bertrand MJ, Lippens S, Staes A, Gilbert B, Roelandt R, et al. (2011) cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4). *PLoS One* 6: e22356.
257. Sgambato A, Brancaccio A (2005) The dystroglycan complex: from biology to cancer. *J Cell Physiol* 205: 163-169.
258. Song Y, Nestor KE, McFarland DC, Velleman SG (2010) Effect of glypican-1 covalently attached chains on turkey myogenic satellite cell proliferation, differentiation, and fibroblast growth factor 2 responsiveness. *Poult Sci* 89: 123-134.
259. Fuentealba L, Carey DJ, Brandan E (1999) Antisense inhibition of syndecan-3 expression during skeletal muscle differentiation accelerates myogenesis through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J Biol Chem* 274: 37876-37884.
260. Pisconti A, Cornelison DD, Olguin HC, Antwine TL, Olwin BB (2010) Syndecan-3 and Notch cooperate in regulating adult myogenesis. *J Cell Biol* 190: 427-441.
261. Okamoto K, Wang W, Rounds J, Chambers EA, Jacobs DO (2001) ATP from glycolysis is required for normal sodium homeostasis in resting fast-twitch rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E479-488.
262. Grichko VP, Heywood-Cooksey A, Kidd KR, Fitts RH (2000) Substrate profile in rat soleus muscle fibers after hindlimb unloading and fatigue. *J Appl Physiol* (1985) 88: 473-478.
263. Chemello F, Bean C, Cancellara P, Laveder P, Reggiani C, et al. (2011) Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. *PLoS One* 6: e16807.
264. Lee SJ, Yoo M, Go GY, Hwang J, Lee HG, et al. (2014) Tetrahydropalmitine promotes myoblast differentiation through activation of p38MAPK and MyoD. *Biochem Biophys Res Commun* 455: 147-152.
265. Pardo JV, Siliciano JD, Craig SW (1983) A vinculin-containing cortical lattice in skeletal muscle: transverse lattice elements ("costameres") mark sites of attachment between myofibrils and sarcolemma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1008-1012.
266. Acharyya S, Sharma SM, Cheng AS, Ladner KJ, He W, et al. (2010) TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA

- methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* 5: e12479.
267. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS, Jr. (1999) NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 19: 5785-5799.
268. Ryall JG, Cliff T, Dalton S, Sartorelli V (2015) Metabolic Reprogramming of Stem Cell Epigenetics. *Cell Stem Cell* 17: 651-662.
269. Kondoh H, Leonart ME, Bernard D, Gil J (2007) Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histol Histopathol* 22: 85-90.
270. Tixier V, Bataille L, Etard C, Jagla T, Weger M, et al. (2013) Glycolysis supports embryonic muscle growth by promoting myoblast fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 18982-18987.
271. Guillet-Deniau I, Leturque A, Girard J (1994) Expression and cellular localization of glucose transporters (GLUT1, GLUT3, GLUT4) during differentiation of myogenic cells isolated from rat foetuses. *J Cell Sci* 107 ( Pt 3): 487-496.
272. Relaix F, Rocancourt D, Mansouri A, Buckingham M (2005) A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 435: 948-953.
273. Schienda J, Engleka KA, Jun S, Hansen MS, Epstein JA, et al. (2006) Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 945-950.
274. Gros J, Manceau M, Thome V, Marcelle C (2005) A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435: 954-958.
275. Kollu S, Abou-Khalil R, Shen C, Brack AS (2015) The Spindle Assembly Checkpoint Safeguards Genomic Integrity of Skeletal Muscle Satellite Cells. *Stem Cell Reports* 4: 1061-1074.
276. Rosales XQ, Malik V, Sneh A, Chen L, Lewis S, et al. (2013) Impaired regeneration in LGMD2A supported by increased PAX7-positive satellite cell content and muscle-specific microrna dysregulation. *Muscle Nerve* 47: 731-739.
277. Cashman NR, Covault J, Wollman RL, Sanes JR (1987) Neural cell adhesion molecule in normal, denervated, and myopathic human muscle. *Ann Neurol* 21: 481-489.
278. Otto T, Sicinski P (2017) Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 17: 93-115.

279. Ma T, Van Tine BA, Wei Y, Garrett MD, Nelson D, et al. (2000) Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev* 14: 2298-2313.
280. Seki A, Coppinger JA, Jang CY, Yates JR, Fang G (2008) Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science* 320: 1655-1658.
281. Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, et al. (2000) The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 12: 405-411.
282. Santamaria D, Barriere C, Cerqueira A, Hunt S, Tardy C, et al. (2007) Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature* 448: 811-815.
283. de Souza GT, Zanette Rde S, do Amaral DL, da Guia FC, Maranduba CP, et al. (2015) Satellite cells: regenerative mechanisms and applicability in muscular dystrophy. *Stem Cells Int* 2015: 487467.
284. van Westering TL, Betts CA, Wood MJ (2015) Current understanding of molecular pathology and treatment of cardiomyopathy in duchenne muscular dystrophy. *Molecules* 20: 8823-8855.
285. Robinson-Hamm JN, Gersbach CA (2016) Gene therapies that restore dystrophin expression for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 135: 1029-1040.
286. Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, et al. (2016) Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* 351: 400-403.
287. Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, et al. (2016) In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* 351: 403-407.



*A disease may be rare, but hope should not be.*

*(Eleanor Christianson)*



# **ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### ANEXO 1.

Tabla de biomarcadores expresados en la mayoría de SCs y resumen de sus funciones (revisado por de Souza *et al.*, 2015 [283]).

Biomarker	Functions
Pax7	Regulates self-renewal in SCs; maintains of myogenic potential; prevents precocious differentiation; regulates the expression of Myf5; promotes de specification of the SCs
Pax3	Regulates proliferation of the SCs in conjunction with Pax7; is involved in myogenic differentiation; regulates the expression of Myf5
Myogenic Regulatory factor 5 (Myf5)	Is involved in embryonary myogenesis; promotes differentiation of SCs
Barx2	Regulates postnatal muscle growth and regeneration; promotes activation and differentiation of SCs; is involved in myoblast fusion
M-cadherin	Cell adhesion protein; involved in cell-to-cell signalization that promotes proliferation of SCs; involved but not essential to myoblast fusion to form myofibers
c-Met	Required for adult skeletal muscle regeneration due to its role in myoblast migration and fusion
$\alpha 7$ -integrin	Laminin receptor in the SCs, involved in the formation of neuromuscular and myotendinous cell junctions
Cluster of differentiation (CD) 34	Promotes cellular motility of SCs due to its antiadhesive function; is involved in the maintenance of the quiescence of SCs
Syndecan-3	Implicated in muscle regeneration; involved in the control of proliferation of SCs; role in angiogenesis
Syndecan-4	Implicated in muscle regeneration; involved in activation and proliferation of SCs
Chemokine receptor type 4 (CXCR4)	Receptor for the ligand alpha-chemokine stromal-derived factor 1 (SDF-1); the activated receptor induces chemotaxis, calcium influx and activating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and AKT serine-threonine kinase by phosphorylation; involved in the control of SCs development
Caveolin-1	Modulates SCs activation during muscle repair
Calcitonin receptor	Related to the maintenance of the quiescence of SCs
Lamins A and C	Nuclear envelope proteins, involved in the regulation of SCs differentiation
Emerin	Involved in the signalization for SCs differentiation

**ANEXO 2.**

Tabla de terapias de DMD en desarrollo. Se han empleado diversas estrategias para desarrollar los diferentes tipos de terapias que están en distintas fases de investigación, tanto clínica como preclínica. Se muestra un breve resumen de los resultados de estas estrategias. IV: intravenoso; IM: intramuscular; IP: intraperitoneal (revisado por van Westering *et al.*, 2015 [284]).

Therapy	Specific Strategy	Research Stage and Selected Models	Results of Therapy
Viral gene therapy	Lentivirus	Preclinical—myotubes, primary myoblasts and mdx	Transfection with mini- or microdystrophin: 20%–25% dystrophin expression in TA muscles (for 2 year period). Less central nucleation, but no protection from muscle injury. Able to transfect TA myogenic progenitor cells.
		'Gutted' adenovirus	Preclinical—mdx
	rAAV2/AAV8	Preclinical—mdx	Chimeric vector containing codon-optimized micro-dystrophin. IV injection resulted in almost 100% transfection, effective dystrophin expression in skeletal muscle and heart and improved muscle function. No immunological response was observed.
	rAAV6	Preclinical—mdx/utrn <sup>-/-</sup> and mdx	Microdystrophin rAAV6 administered in 1 month old mdx/utrn <sup>-/-</sup> increased life span, improved pathology and dystrophin (1 year post-injection). Dystrophin restored in heart and heart mass normal, but function not recovered. 20 mo mdx (4 months after injection) showed dystrophin expression in skeletal muscle and heart and improved pathology.
	AAV9	Preclinical—GRMD and mdx	IV mini-dystrophin administration to GRMD revealed varied dystrophin expression, also in heart. Micro-dystrophin administration in young mdx induced dystrophin expression and slowed progression of cardiac phenotype. 10 mo mice expressed dystrophin and cardiac function improved.
Cell-based therapy	Myoblasts	Preclinical—mdx	Ability to differentiate into myotubes.
		Clinical trials	Preclinically: partial dystrophin expression in mdx mice. No heart data. Clinical trial: no beneficial effects
	Fibroblasts	Preclinical—mdx	Ability to differentiate into myotubes. Effective transfection with dystrophin expression in immunocompromised mice. No heart data.
	Bone marrow-derived stem cells	Preclinical—mdx and GRMD	Migrate to damaged muscle areas, differentiate into myogenic cells and aid regeneration. Substantial dystrophin restoration in skeletal muscle of mdx, but no restoration in GRMD dogs. No heart data.
	Cd133+ stem cells	Preclinical—scid/mdx; Clinical trial Phase I	Ability to differentiate into myocytes. Preclinically: effective dystrophin restoration in scid/mdx. No heart data. Clinical trial demonstrated safety.
	Mesangio-blasts	Preclinical—GRMD	Improved functional mobility and partial dystrophin restoration in skeletal muscle. No heart data.
	iPS cells	Preclinical—immuno-compromised mdx	Differentiating iPS cells into muscle precursor cells followed by injection into TA induced dystrophin expression. Cells integrated with muscle cells and settled in satellite cell population. Improved TA function. No heart data.
Antisense oligonucleotides	2'OMePS	Preclinical—mdx; Clinical trial Phase III	Preclinical: IM revealed low dystrophin restoration, even with multiple high doses. Clinical: 6 mg/kg was maximal tolerated dose in patients. Phase III trial did not meet 6MWD endpoint.
		PMO	Preclinical: repeat IV administrations of high dose restored dystrophin in multiple skeletal muscles of the mdx mouse, <2% in heart. Clinically: well tolerated and dystrophin present after 48 weeks. At 84 weeks stabilization in the 6MWD; 120 weeks stabilized pulmonary function.
	Tricyclo-DNA	Preclinical- mdx	Multiple IV administrations and very high doses (200 mg/kg per week) resulted in dystrophin in skeletal muscle and heart, with low levels in the brain and improvements in cardiac and pulmonary function.
	Octa-guanidium conjugated PMO	Preclinical- mdx and GRMD	Capable of restoring dystrophin in skeletal muscle and hearts of mdx mice. This has further been demonstrated in dystrophic dogs. High doses led to adverse events in GRMD.
	CPP-AOs- Arginine rich	Preclinical—mdx and mdx/utrn <sup>-/-</sup>	(RXR) <sub>1</sub> : multiple IP produced ~100% dystrophin in diaphragm and low levels in skeletal muscles. Single IV restored dystrophin in skeletal muscle and diaphragm, ~50% in the heart. Improved mortality rate and corrected kyphosis in mdx/utrn <sup>-/-</sup> . (RXRRBR) <sub>2</sub> : Less toxic, repeat and high dose IV illustrated impressive exon skipping notably in heart (72%). Improvements in cardiac function, with preserved diastolic function after 6 months
CPP-AOs- Pips	Preclinical—mdx	Pip2a and Pip2b: strong exon skipping following IM. Following IV, Pip5e induced high dystrophin restoration body wide including heart. Pip6-PMO series: Pip6a, Pip6b and Pip6f exhibited best dystrophin expression in heart. Long-term IV administration prevented deterioration in heart function in the event of exercise.	
		CPP-AOs- Phage Peptides	Preclinical—mdx

Además de las terapias indicadas en la tabla anterior, cabe mencionar la importancia de estrategias terapéuticas recientes basadas en la edición genómica, destacando el sistema CRISPR/Cas9 por su mayor facilidad del diseño metodológico y su mayor frecuencia de éxito con respecto a otros sistemas de edición [285]. Con este sistema se ha logrado la edición genómica del gen de la distrofina en mioblastos en cultivo, fibroblastos y células madre pluripotentes inducidas. Además, se ha descrito que el sistema CRISPR/Cas9 utilizando como vectores virus adenoasociados (AAV), estrategia que se encuentra actualmente en ensayo clínico para otras enfermedades neuromusculares, consigue restaurar la expresión de distrofina en músculo esquelético y cardíaco en el modelo murino mdx, suponiendo la primera evidencia de una mejora fenotípica vía edición genómica en un modelo de distrofia muscular [228,286,287]. Esta estrategia también ha demostrado ser aplicable para las SCs, lo que incrementaría la regeneración de los músculos dañados.

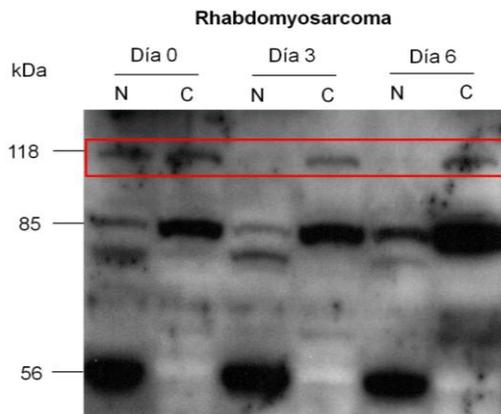
### ANEXO 3.

Tabla de oligonucleótidos empleados para la clonación. Se indica, de izquierda a derecha, el número asignado a cada oligonucleótido, la secuencia en 5'-3' (subrayado el sitio de restricción y la enzima de restricción utilizada).

Número	Secuencia (subrayado el sitio de restricción)	Enzima de restricción
1	GGAATTCATATGGCGGCCGATCCGACCG	NdeI
2	TGTGCTCGAGGTCCATCAGTTCCTGGCTAATG	XhoI
3	GGAATTCATATGGCCGCTGACCCC ACCG	NdeI
4	TGTGCTCGAGGATTTCCATCTCGGCC CCAGG	XhoI
5	TTAATTAAGCTTGCCACCATGG	HindIII
6	TGTGAGGATCCCAGATTTCATCT CGGCC	BamHI
7	GCCGGAATTCATGGCCGCTGACCCCACCG	EcoRI

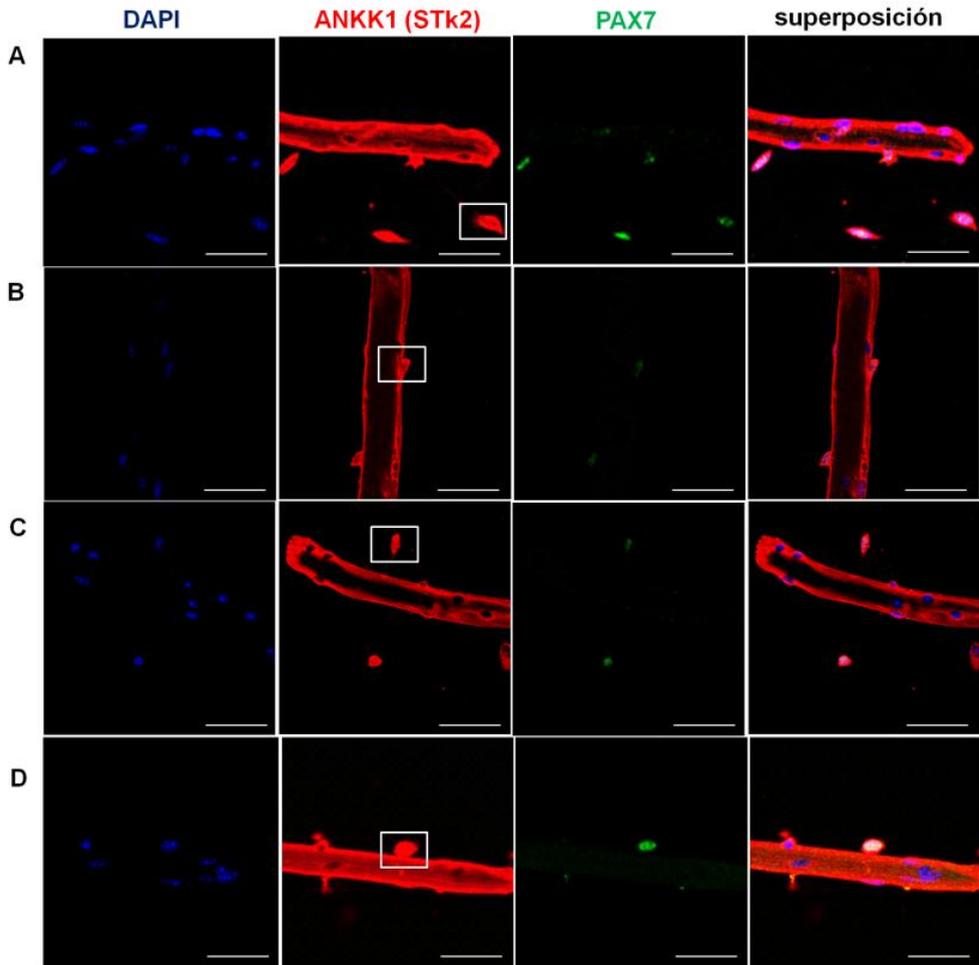
#### ANEXO 4.

Membrana del *Western Blot* de los extractos nucleares y citoplasmáticos de RD, revelada contra STk2 (para detectar la presencia de una banda citoplasmática de mayor peso molecular que el tamaño de la isoforma teórica predicha, señalada en un recuadro rojo en la imagen). El tamaño estimado de la isoforma de elevado peso molecular se ha calculado mediante el programa ImageJ v1.37, y es de aproximadamente 115 kDa.



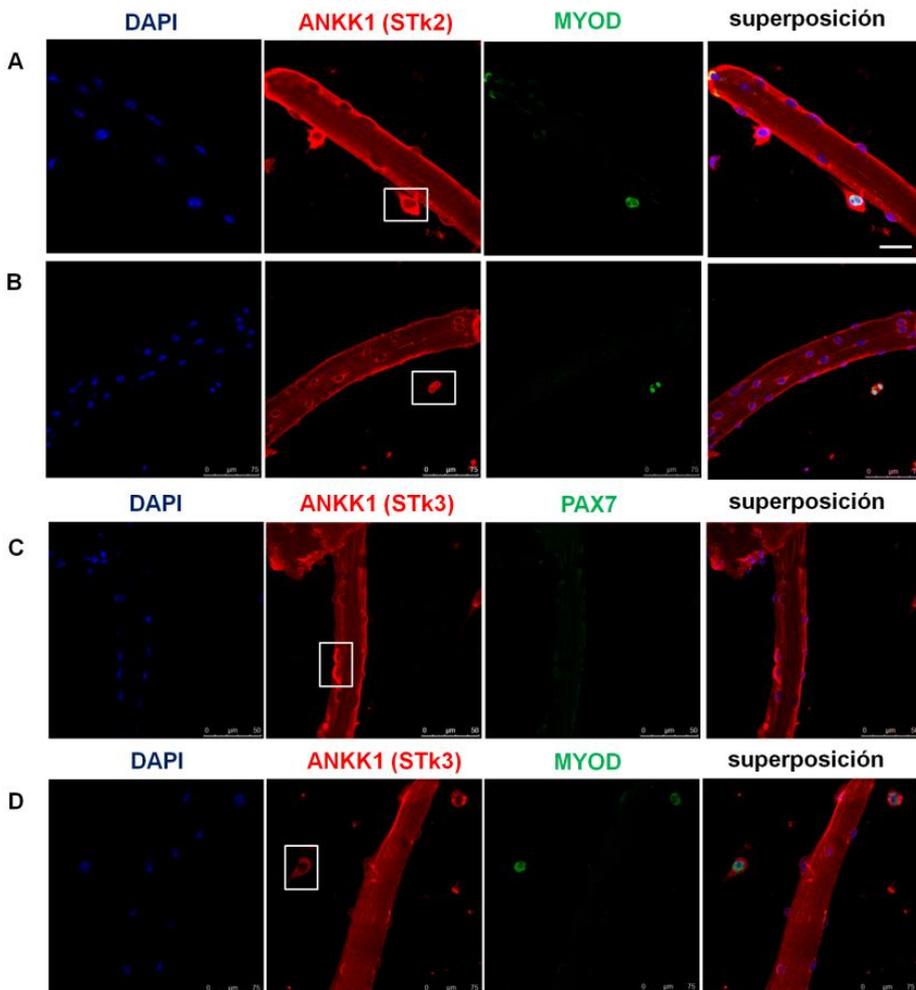
**ANEXO 5.**

Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia, representativas de 4 fibras musculares obtenidas del músculo FDB de ratón adulto en cultivo con sus SCs asociadas. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 8 capas de 1  $\mu\text{m}$  de grosor cada uno. Se observa el marcaje de DAPI, ANKK1 detectada con el anticuerpo STk2 (rojo), PAX7 (verde) y la superposición de las imágenes. Escala: 25  $\mu\text{m}$ .



**ANEXO 6.**

Imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia, representativas de 4 fibras musculares obtenidas del músculo FDB de ratón adulto en cultivo con sus SCs asociadas. Las imágenes corresponden a proyecciones Z de 10 capas de 1  $\mu$ m de grosor cada uno. Se observa el marcaje de DAPI, ANKK1 detectada con los anticuerpos STk2 (**A-B**) y STk3 (**C-D**) (rojo), los marcadores MYOD (**A-B, D**) y PAX7 (**C**) en verde y la superposición de las imágenes. Escala (**A,C**): 50  $\mu$ m; (**B, D**): 75  $\mu$ m.



**ANEXO 7.**

Imágenes obtenidas mediante inmunohistoquímica de secciones seriadas transversales de los músculos tríceps y sóleo de ratón adulto con los anticuerpos STk2 y MyHCII. La misma fibra está señalada en las diferentes secciones (asterisco negro). Escala: 50  $\mu$ m.

