

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 29 |
| 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 |
| 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 63 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 67 |
| 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 Y RHABDOMYOSARCOMA: 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. SOBREENPRESIÓN 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 |
| 4. RESULTADOS | 99 |
| 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 |
| 5. DISCUSIÓN | 153 |
| 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 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 165 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 169 |
| 8. ANEXOS..... | 189 |