



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Papel de la proteína quinasa de la Distrofia Miotónica (DMPK) en músculo esquelético y cardíaco. Implicación en la patofisiología de la Distrofia Miotónica de tipo 1

Esther Llagostera Martín

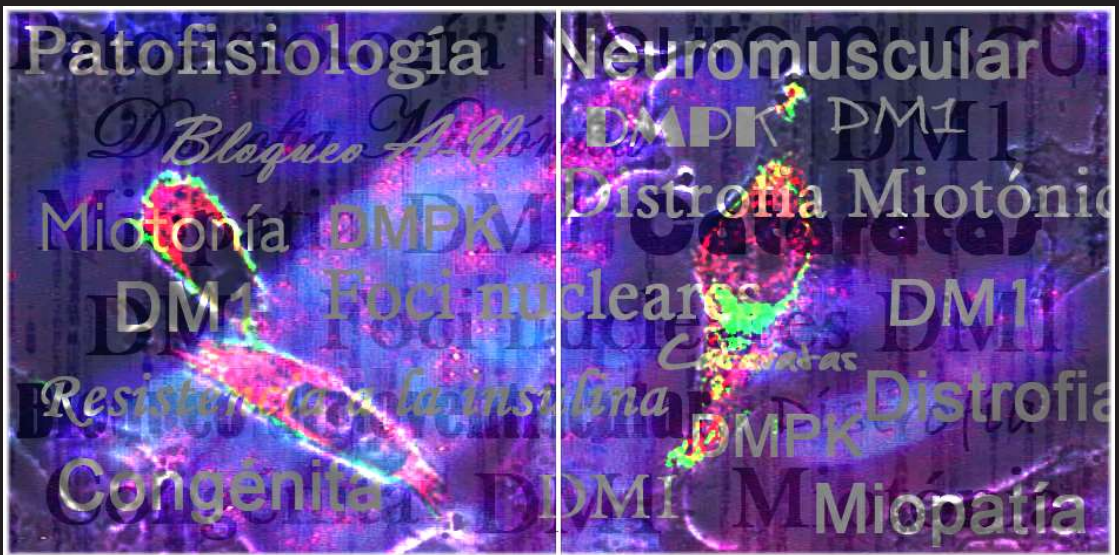
**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

---

# Papel de la proteína quinasa de la Distrofia Miotónica (DMPK) en músculo esquelético y cardíaco



Implicación en la patofisiología de la Distrofia miotónica de tipo 1



Universitat de Barcelona  
Facultat de Biologia  
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular  
Programa de doctorat en Biologia y Patologia Cel·lulars  
Bienio 2002-2004

**Papel de la proteína quinasa de la Distrofia Miotónica (DMPK)  
en músculo esquelético y cardíaco. Implicación en la  
patofisiología de la Distrofia Miotónica de tipo 1.**

Memoria presentada por **Esther Llagostera Martín**, licenciada en Biología,  
para optar al grado de doctora por la Universidad de Barcelona.

La directora,

El tutor,

Dra. Perla Kaliman

Dr. Antonio Zorzano

La doctoranda,

Esther Llagostera

Esther Llagostera Martín  
2009



*A mis padres*

*A mi hermana*



## Agradecimientos

Mi principal agradecimiento va dirigido a la Dra. Perla Kaliman, directora de esta tesis, por haber confiado en mí para la realización de este proyecto. Muchas gracias por darme la oportunidad de tener esta experiencia científica tan positiva y de guiarme con tanta dedicación durante todos estos años. He aprendido mucho durante esta tesis y no sólo a nivel científico sino también a nivel personal, muchísimas gracias por todo Perla.

Agradecer también al Dr. Antonio Zorzano, tutor de esta tesis, todo el tiempo que me ha dedicado y su interés en el trabajo realizado, así como la oportunidad de trabajar con su equipo en el Parc Científic de Barcelona.

Al Dr. Ramón Gomis y la Dra. Anna Novials por acogerme como una más en el laboratorio de Diabetes i Obesitat durante los dos últimos años y por las críticas constructivas durante las reuniones de grupo.

A la Dra. Pilar Ruiz-Lozano por acogerme en su laboratorio en The Burnham Institute en San Diego y por brindarme la oportunidad de conocer la investigación más allá de las fronteras de este país. Al Dr. Daniele Catalucci, a la Dra. Mónica Zamora, a la Dra. Cecilia Schimia y al Dr. Ramón Díaz por todos los conocimientos que compartieron conmigo y el tiempo que me concedieron durante la estancia realizada en San Diego.

Durante todo el periplo de laboratorios que he vivido desde que acabé la carrera de Biología he tenido el privilegio y el placer de cruzarme con incontables personas de excelente. Muchas de estas personas han influido en quien y como soy hoy a través de sus conocimientos ideas y trabajo. A todos ellos les agradezco su tiempo, dedicación y sus ganas de compartir conocimientos e ideas. Es difícil hacerlos constar a todos en un pequeño apartado de esta tesis e igualmente difícil expresar lo mucho que habéis significado en mi trayectoria no sólo científica sino también vital. Muchas gracias a todos por ayudarme a hacer esto posible!!!!

A los compañeros del laboratorio de Diabetes i Obesitat. En especial a la Dra. Mamen Carmona, por su tiempo y ayuda con los experimentos de la dieta rica en grasas. A la Dra. Rosa Gasa, por todos sus consejos científicos y ayuda en el laboratorio, a la Dra. Conxi Mora por su ayuda con el genotipado de los ratones y a la Dra. Marce Parrizas por todas las charlas interesantes. En especial me gustaría mencionar y agradecer la ayuda y el cariño que he recibido de las personas que desde el primer día que pisé el laboratorio me hicieron sentir como en casa: Ainhoa García, Lidia Sánchez y Yaiza Esteban. También quiero agradecer a la "quinta" antigua del laboratorio toda su ayuda, consejos y tiempo, a Jordi, Miriam, Núria, Gemma, Dra. Maria Lucas, Marta Amigó, Marta Julià, Sandra Piquer, Dra. Belén Nadal y Dra. Felicia Hanzu. Muchas gracias también y ánimos a los nuevos: Sandra, Rebeca, Nathalie, Paola, Maud, Fabián, Montse, Lisa y Joana. Y no me quiero olvidar de algunos que ya no están en el lab pero que han sido de gran apoyo como Txell, Berta y Laura. Gracias a todos!

Quería agradecer a toda la gente del laboratorio Zorzano-Palacín en el PCB la ayuda, consejos, protocolos y tiempo que me habéis concedido. En especial me gustaría dar las gracias a la Dra. Marta Camps, al Dr. Luc Matí y al Dr. Marc Liesa por las horas dedicadas y por todo lo que he aprendido con vosotros de microscopía y del trabajo con animales. También agradecer al Dr. Oscar Teijido y a la Dra. Silvia García-Vicente, su ayuda experimentos y protocolos así como su amistad durante todo este tiempo. No quiero olvidar a mis vecinos y compañeros de poyata: Déborah, Vicent, Eleonora, Paola, Jessica, Albert y Víctor, gracias por todos los buenos momentos.

A la Dra. Delia Zafra, a Laura Nocito y Susana Ros del laboratorio del Dr. Joan Guinovart en el PCB por su ayuda con algunas líneas celulares y anticuerpos.

A todo el personal del SEA-PCB por su ayuda y dedicación y en especial me gustaría agradecer al Dr. Xavi Cañas, al Dr. Albert Altafaj y a Joaquina Navarro el tiempo dedicado a enseñarme lo esencial en el trabajo con animales.

Los inicios siempre son duros pero son los que vivimos con más ilusión por eso a mis compañeras de Bellvitge siempre las llevaré en el corazón. A la Dra. Beatriz Montaner por ser una gran maestra y una excelente científica. A mis compañeros las ya doctoras: Dra. Vanesa Soto, Dra. Bet Costa-Cross, Dra. Marta Monge, Dra. Wilmar Castillo-Ávila y al Dr. Ricky Joshi, por todas las conversaciones científicas, pseudos-científicas y *mundanisimas*. Gracias por seguir ahí durante todos estos años!

Me gustaría mencionar y agradecer también a Esther Fuentes y al Dr. Marc Bataller del CSIC los desayunos en el PCB y su amistad. Asimismo quiero agradecer el apoyo incondicional que he recibido de mis amigas de toda la vida: Gloria García y Anna Sáez, muchas gracias por escuchar mis teorías, mis historias, mis planes y sobretodo muchas gracias por vuestra amistad. No quiero olvidar al Dr. Francesc García-Gonzalo y me gustaría agradecer su apoyo, ayuda y cariño durante todos estos años de tesis.

No querría olvidar a mis compañeras de piso: a Stella y de nuevo a Núria, y Déborah, y agradecerles el apoyo, la paciencia, las charlas y las risas que hemos compartido, porque han sido como una familia.

Finalmente, pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a mi familia. En primer lugar a mis padres, sin los que seguro que no hubiera llegado hasta aquí jamás, porque lo bueno que pueda haber en mí viene de ellos, de su cariño, respeto y amor incondicional. Ojalá pueda daros tanto como lo que me habéis dado a mí, sois los mejores maestros de vida que se puede tener: infinitas gracias, me siento absolutamente privilegiada. En segundo lugar a mi hermana, mi mejor amiga. Eres un ejemplo a seguir, una persona alegre, íntegra y luchadora, has sido siempre una inspiración para mí y por ello me gustaría también agradecer a Iván que la cuide tanto. Y finalmente, a mis abuelos por todo su cariño y en especial a la Yaya, que es una mujer fuerte y con un talento creativo innegable de la que nunca dejaré de aprender.

A todos,

! Muchas  
gracias!  
~







## Índice

<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>Capítulo 1. Distrofia Miotónica</b>	<b>1</b>
1.1 Aspectos generales	1
1.2 Historia del descubrimiento de las distrofias miotónicas	1
1.3 Las distrofias miotónicas de tipo 1 (DM1) y de tipo 2 (DM2)	2
1.4 Otras enfermedades con expansiones de tripletes	3
1.5 Principales manifestaciones clínicas de la DM1	4
1.5.1 Afección muscular	5
1.5.2 Afección cardíaca	7
1.5.3 Resistencia a la insulina	8
1.5.4 Otras alteraciones endocrinas	9
1.5.5 Otros órganos y sistemas afectados	10
<b>Capítulo 2. Aspectos genéticos y mecanismos patofisiológicos de la DM1</b>	<b>11</b>
2.1 Defecto genético	11
2.2 Características de la expansión de los tripletes en DM1	12
2.3 Formas clínicas de la DM1 en función del tamaño de la expansión de tripletes	13
2.3.1 Forma leve o benigna.	13
2.3.2 Forma clásica.	13
2.3.3 Forma congénita (DMC).	14
2.4 Mecanismos fisiopatológicos de la DM1	14
2.4.1 Ganancia de función del ARN	14
2.4.2 Alteración en la expresión de los genes vecinos	16
2.4.3 Haploinsuficiencia del gen DMPK	18
<b>Capítulo 3. La proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK)</b>	<b>20</b>
3.1 El gen <i>DMPK</i>	20
3.2 DMPK: la proteína	20
3.3 Proteínas homólogas a DMPK	20
3.4 Isoformas de DMPK	21
3.5 Dominios funcionales de DMPK	22
3.6 Expresión y localización de DMPK	23
3.7 Regulación de la actividad DMPK	23
3.8 Sustratos conocidos de DMPK	24
3.8.1 Fosfoleman (PLM).	25
3.8.2 Fosfolamban (PLN).	25
3.8.3 Proteína de unión a CUG.	25
3.8.4 Subunidad diana de la fosfatasa de miosina (MYPT1, Myosin Phosphatase Target subunit).	26
3.9 Función de DMPK	26
3.9.1 Integridad del músculo esquelético	26
3.9.2 Conducción cardíaca y canales iónicos	27
<b>Capítulo 4. La señalización de la insulina y el transporte de glucosa</b>	<b>29</b>
4.1 La cascada de señalización intracelular de la insulina	29
4.2 GLUT4 y su translocación a la membrana plasmática	31
<b>Capítulo 5. Mecanismos moleculares de la contracción y relajación cardíaca</b>	<b>33</b>

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>Capítulo 1. Papel de DMPK en la homeóstasis de la glucosa y en la acción de la insulina en músculo.</b>	<b>41</b>
1.1 <b>Justificación y objetivo</b>	41
1.2 <b>Resultados</b>	42
1.2.1 Alteraciones metabólicas en los ratones <i>dmpk</i> -KO	42
1.2.2 Los ratones <i>dmpk</i> -KO presentan defectos en la vía de señalización de la insulina en músculo esquelético y cardíaco	44
1.2.3 La sobre-expresión de DMPK en mioblastos de ratón aumenta la activación de la vía de señalización de la insulina	46
1.2.4 El transporte de glucosa se encuentra disminuido en músculo esquelético y cardiomiocitos aislados de ratones <i>dmpk</i> -KO	47
1.2.5 Disminución de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en músculo cardíaco de ratones <i>dmpk</i> -KO	48
1.2.6 Alteración de la localización de los receptores de insulina y de IGF-1 en células HeLa que sobre-expresan formas mutadas de DMPK	49
1.2.7 Disminución de la unión de la insulina a la membrana plasmática en cardiomiocitos aislados de ratones <i>dmpk</i> -KO	53
1.2.8 Alteración del citoesqueleto en células HeLa que sobre-expresan formas mutadas de DMPK	53
1.3 <b>Discusión</b>	54
<b>Capítulo 2. Inducción de adiposidad y resistencia a la insulina por dieta rica en grasas en animales que no expresan DMPK</b>	<b>59</b>
2.1 <b>Justificación y objetivo</b>	59
2.2 <b>Resultados</b>	59
2.2.1 Una dieta rica en grasas provoca un mayor aumento en el peso corporal en animales <i>dmpk</i> -KO que en animales <i>dmpk</i> -WT	59
2.2.2 La ingesta y la actividad de los ratones <i>dmpk</i> -WT y <i>dmpk</i> -KO es comparable	60
2.2.3 La dieta rica en grasas causa un mayor aumento de tejido adiposo blanco en ausencia de DMPK	61
2.2.4 El aumento en el tejido adiposo blanco es debido a un incremento del tamaño de los adipocitos	62
2.2.5 Efecto de la dieta rica en grasas en parámetros metabólicos de los animales <i>dmpk</i> -KO y <i>dmpk</i> -WT	63
2.2.6 Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones <i>dmpk</i> -KO tras la dieta rica en grasas	65
2.3 <b>Discusión</b>	67
<b>Capítulo 3. Papel de DMPK en la señalización <math>\beta</math>-adrenérgica y patofisiología cardíaca</b>	<b>69</b>
3.1 <b>Justificación y objetivo</b>	69
3.2 <b>Resultados</b>	70
3.2.1 La captación de calcio en retículo sarcoplásmico (SR) depende de PKA y de DMPK	70
3.2.2 Alteración de la localización del receptor $\beta$ -adrenérgico en células HeLa que sobre-expresan formas mutadas de DMPK	71
3.2.3 Disminución de la señalización $\beta$ -adrenérgica en músculo cardíaco de ratones <i>dmpk</i> -KO	72
3.2.4 Parámetros cardíacos en ratones <i>dmpk</i> -KO	74
3.3 <b>Discusión</b>	75
<b>Discusión general de los resultados</b>	<b>77</b>

1. Modelo integrado de los mecanismos moleculares implicados en la patología metabólica y cardíaca en DM1	77
2. Modelo integrado del papel de DMPK en la patofisiología de la DM1	78
3. Distrofia Miotónica de tipo 1. ¿Tres mecanismos y una conexión desconocida?	79
4. Conclusiones generales y perspectivas	81

## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Capítulo 1. Protocolos con animales</b>	<b>85</b>
1.1. <b>Cepa S129. Ratones <i>dmpk</i>-WT Y <i>dmpk</i>-KO</b>	85
1.2. <b>Genotipación de los ratones KO para <i>dmpk</i></b>	85
1.2.1. Protocolo 1: kit comercial SIGMA (SIGMA)	86
1.2.1.1. Obtención de ADN genómico a partir de cola de ratón	86
1.2.1.2. PCR	86
1.2.2. Protocolo 2	88
1.2.2.1. Obtención de DNA a partir de cola de ratón	88
1.2.2.2. PCR	88
1.3. <b>Prueba de tolerancia a la glucosa</b>	90
1.4. <b>Prueba de tolerancia a la insulina</b>	91
1.5. <b>Extracción de tejido de ratones</b>	91
1.5.1. Tratamientos	91
1.5.1.1. Insulina	91
1.5.1.2. Isoproterenol	92
1.5.2. Extracción de tejidos	92
1.5.2.1. Sóleo	92
1.5.2.2. Gastrocnemio	93
1.5.2.3. Corazón	93
1.5.2.4. Tejido adiposo marrón (TAM)	93
1.6. <b>Dieta rica en grasas</b>	94
1.7. <b>Aislamiento de cardiomiocitos de ratón adulto a partir de corazón y ensayos realizados con ellos</b>	94
1.7.1. Aislamiento de cardiomiocitos	94
1.7.2. Ensayos de unión a insulina- <sup>125</sup> I	94
1.8. <b>Transporte de glucosa</b>	94
1.8.1. Transporte de glucosa en músculo sóleo.	94
1.8.2. Transporte de glucosa en cardiomiocitos	95
1.9. <b>Obtención de vesículas de retículo sarcoplásmico y transporte de calcio</b>	95
1.10. <b>Fraccionamiento subcelular de membranas. Estudio de translocación de GLUT4 en músculo cardíaco</b>	96
1.11. <b>Extracción de proteína a partir de tejido de ratón</b>	98
1.12. <b>Estudios de actividad</b>	98
1.13. <b>Ecocardiogramas</b>	99
<b>Capítulo 2. Métodos de trabajo en cultivo celular</b>	<b>101</b>
2.1 <b>Generalidades</b>	101
2.1.1. Condiciones de esterilidad	101

2.1.2	Condiciones de cultivo celular	101
<b>2.2</b>	<b>Líneas celulares</b>	102
2.2.1	C2C12	102
2.2.2	HEK293	102
2.2.3	HeLa	102
<b>2.3</b>	<b>Técnicas de cultivo celular</b>	102
2.3.1	Subcultivo	102
2.3.2	Recuento de células	104
2.3.3	Congelación de células	104
2.3.4	Descongelación de células	104
<b>2.4</b>	<b>Protocolos de transfección</b>	104
2.4.1	Transfección mediante fosfato cálcico en células HeLa	105
2.4.1.1	Preparación de los tampones	105
2.4.1.2	Determinación del pH óptimo de transfección	105
2.4.2	Co-transfecciones	107
2.4.2.1	Transfección de células HeLa con METAFECTENE™ PRO	107
2.4.2.2	Transfección de células HeLa con Lipofectamine©	108
<b>2.5</b>	<b>Extracción de proteína a partir de cultivo celular</b>	108
<b>2.6</b>	<b>Inmunocitoquímica</b>	109
<b>Capítulo 3. Técnicas bioquímicas</b>		<b>111</b>
<b>3.1</b>	<b>Detección de proteínas</b>	111
3.1.1	Valoración de proteínas.	111
3.1.2	Western-Blot	112
3.1.2.1	Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.	112
a.	Preparación de las muestras	112
b.	Polimerización de los geles	113
c.	Carga de las muestras y migración	114
d.	Tinción del gel	114
3.1.2.2	Transferencia del gel e inmunodetección de proteínas	115
a.	Electrotransferencia de las proteínas	115
b.	Inmunodetección	116
c.	<i>Stripping</i>	117
<b>3.2</b>	<b>Determinación de insulina en plasma</b>	118
<b>3.3</b>	<b>Determinación de adiponectina en plasma</b>	119
<b>Capítulo 4. Técnicas de detección de ácidos nucleicos</b>		<b>121</b>
<b>4.1</b>	<b>ADN</b>	121
4.1.1	Técnicas generales de manipulación	121
4.1.2	Transformación bacteriana con ADN plasmídico	121
4.1.3	Recuperación del ADN: <i>Minipreps</i> y <i>Maxipreps</i> .	122
4.1.4	<i>Stock</i> de bacterias transformadas: gliceroles.	123
4.1.5	Cuantificación de ADN	124
4.1.6	Digestiones enzimáticas.	124
4.1.7	Electroforesis en gel de agarosa	124
<b>4.2</b>	<b>ARN</b>	125
4.2.1	Técnicas generales de manipulación	125
4.2.2	Extracción de ARN a partir de tejido adiposo blanco	126
4.2.3	Cuantificación del ARN	127
<b>4.3</b>	<b>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase Chain Reaction)</b>	127
4.3.1	Reacción de PCR para secuenciar	127
4.3.2	PCR a tiempo real (RT-PCR)	128

4.3.2.1 Retro-transcripción	129
4.3.2.2 RT-PCR	129
<b>Capítulo 5. Adenovirus</b>	<b>131</b>
5.1 <b>Generalidades</b>	131
5.1.1 Adenovirus y las ventajas de su uso	131
5.1.2 Seguridad en el trabajo con adenovirus	131
5.2 <b>Preparación de adenovirus a partir de stocks</b>	132
5.2.1 Prepurificación de adenovirus	132
5.3 <b>Titulación de virus.</b>	133
5.4 <b>Infección de células C2C12 con adenovirus</b>	133
<b>Capítulo 6. Técnicas histológicas</b>	<b>135</b>
6.1 <b>Protocolo de fijación e inclusión de tejidos</b>	135
6.1.1 Páncreas y tejidos adiposos	135
6.1.1.1 Fijación	135
6.1.1.2 Deshidratación	135
6.1.1.3 Aclarado	135
6.1.1.4 Inclusión	135
6.1.1.5 Corte y Montaje	136
6.2 <b>Tratamiento de portaobjetos con poly-lisina</b>	136
6.3 <b>Tinción hematoxilina-eosina</b>	136
6.4 <b>Immunodetección de insulina en páncreas.</b>	137
6.5 <b>Cálculo del área del islote.</b>	138
<b>Capítulo 7. Reactivos</b>	<b>141</b>
7.1 <b>Soluciones de uso rutinario</b>	141
7.1.2 PBS	141
7.1.3 TAEX50	141
7.1.4 TBSX20	141
7.1.5 Tampón de carga de ADN X6	141
7.1.6 Mowiol 4-88 (CALBIOCHEM)	141
7.1.7 Medio LB (Luria-Bertani)	141
7.1.8 Placas LB-Agar	142
7.1.9 Activación de ortovanadato de sodio	142
7.2 <b>Cebadores</b>	143
7.3 <b>Vectores de expresión</b>	143
7.4 <b>Cálculos estadísticos</b>	143
7.5 <b>Anticuerpos</b>	144

**BIBLIOGRAFÍA****145****ANEXO. Artículos publicados**

Artículo 1. Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action	<b>161</b>
Artículo 2. Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1.	<b>173</b>
Artículo 3. High-fat diet induced adiposity and insulin resistance in mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase.	<b>181</b>

## Índice de figuras y tablas

## Figuras

INTRODUCCIÓN		
<b>Figura 1</b>	Dr. Hans Steinert (1875-1911)	1
<b>Figura 2</b>	Miotonía en DM1	5
<b>Figura 3</b>	Patrón de afección muscular en DM1	6
<b>Figura 4</b>	Histología muscular en DM1	6
<b>Figura 5</b>	Organización del locus 19q 13.3	11
<b>Figura 6</b>	Expansión de la mutación en DM1	12
<b>Figura 7</b>	<i>Foci</i> de ARN	15
<b>Figura 8</b>	Árbol filogenético quinasas homologas a DMPK	21
<b>Figura 9</b>	Dominios de DMPK susceptibles de <i>splicing</i>	22
<b>Figura 10</b>	Sustratos de DMPK descritos <i>in vitro</i>	24
<b>Figura 11</b>	Esquema de las principales vías de señalización de la insulina	30
<b>Figura 12</b>	Esquema de las vías activadas por la insulina que participan en la translocación de GLUT4 en células musculares	32
<b>Figura 13</b>	Esquema de las vías implicadas en el control de la contracción cardíaca	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
<b>Figura 14</b>	Tolerancia a la glucosa	42
<b>Figura 15</b>	Parámetros metabólicos	43
<b>Figura 16</b>	Expresión y estado de fosforilación de proteínas clave en la vía de señalización de la insulina en tejidos que expresan DMPK	44
<b>Figura 17</b>	Vía de señalización de la insulina en tejidos que no expresan DMPK	45
<b>Figura 18</b>	Efecto de la sobre-expresión de DMPK en la vía de señalización de la insulina	46
<b>Figura 19</b>	Disminución del transporte de glucosa en ratones <i>dmpk</i> -KO	47
<b>Figura 20</b>	Translocación de GLUT4 en respuesta a la insulina en músculo cardíaco	48
<b>Figura 21</b>	Efecto de DMPK en la localización celular del receptor de insulina	50
<b>Figura 22</b>	Efecto de la sobre-expresión de las formas de DMPK WT y mutante en la distribución subcelular del receptor de insulina.	51
<b>Figura 23</b>	Efecto de la sobre-expresión de las formas de DMPK WT y mutante en la distribución subcelular del receptor de IGF-1	52
<b>Figura 24</b>	Unión de la insulina a cardiomiocitos aislados	43
<b>Figura 25</b>	La sobreexpresión de formas mutantes de DMPK provoca alteraciones en la formación de fibras de estrés.	54
<b>Figura 26</b>	Efecto de una dieta rica en grasas en el peso corporal de animales <i>dmpk</i> -KO.	60
<b>Figura 27</b>	Ingesta y capacidad motriz	61
<b>Figura 28</b>	Peso de diferentes tejidos tras la dieta rica en grasas.	62
<b>Figura 29</b>	Peso del tejido adiposo blanco epididimal en dieta estándar	62
<b>Figura 30</b>	Estudio morfológico del tejido adiposo blanco epididimal tras la dieta rica en grasas	63
<b>Figura 31</b>	Prueba de tolerancia a la glucosa tras la dieta rica en grasas.	65
<b>Figura 32</b>	Prueba de tolerancia a la insulina.	66
<b>Figura 33</b>	Estudio morfológico del páncreas	66
<b>Figura 34</b>	Fosforilación de PLN en vesículas de retículo sarcoendoplásmico	69
<b>Figura 35</b>	Captación de calcio por vesículas procedentes del retículo sarcoendoplásmico	70
<b>Figura 36</b>	Se requiere DMPK para la localización del receptor $\beta$ -AR en la membrana plasmática	71



<b>Figura 37</b>	Fosforilación de los sustratos de PKA	73
<b>Figura 38</b>	Hipótesis de la participación de DMPK en la regulación del mecanismo de contracción-relajación cardíaca	76
<b>Figura 39</b>	Modelo integrado para la resistencia a la insulina y la patología cardíaca observada en pacientes de DM1	77
<b>Figura 40</b>	Modelo hipotético del papel patofisiológico de DMPK en DM1	78

## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>Figura 41</b>	Alteración del gen <i>Dmpk</i> murino en los animales usados en esta tesis	85
<b>Figura 42</b>	Resultado de la genotipación con el kit de Sigma	87
<b>Figura 43</b>	Resultado de la genotipación siguiendo el protocolo 2	89
<b>Figura 44</b>	Cantidad de muestra en un Microvette	90

## Tablas

### INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1</b>	Resumen comparativo de las características de DM1 y DM2	3
<b>Tabla 2</b>	Resumen de desórdenes de repeticiones de tripletes no codificantes.	4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Tabla 3</b>	Parámetros metabólicos antes y después de la dieta	64
<b>Tabla 4</b>	Parámetros cardíacos	74
<b>Tabla 5</b>	Tabla resumen de las alteraciones patológicas observadas en modelos animales de DM1	80



## Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
AMPc	adenosina-3',5'-monofosfato
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BCA	ácido bicinconínico
BSA	albúmina sérica bovina
<sup>14</sup> C	carbono-14
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent kinase II
Cdc42	<i>cell division cycle-42</i>
cpm	cuentas por minuto
dNTP	desoxirribonucleótidos-trifosfato
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMPK	proteína quinasa de la distrofia miotónica
DMSO	dimetil sulfóxido
DMWD	proteína de la distrofia miotónica con repeticiones de triptófano y ácido aspártico (WD)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
F-actina	actina filamentosa
FBS	suero fetal bovino
g	gramos
g	gravidades, unidad de aceleración
GFP	proteína fluorescente verde
GLUT4	transportador de glucosa 4
GM130	proteína de 130 kDa de la matriz de Golgi
GTPasa	GTP hidrolasa
GTPγS	guanosina 5'-(γ-tio)-trifosfato
<sup>3</sup> H	tritio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanolsulfónico
IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina 1
IgG	inmunoglobulinas G
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
KO	<i>knock-out</i>
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LSB	tampón de muestras de Laemmli
M	molar
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
Myc	epítipo Myc (residuos 408-439 de la proteína p62 <sup>c-myc</sup> humana)

NEFA	ácido graso no esterificado
PBS	salino tamponado con fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehido
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonil
PSA	persulfato de amonio
Rac	GTPasas pequeñas pertenecientes a la familia de Rho
Ras	familia de GTPasas pequeñas (oncogenes)
RE	retículo endoplasmático
Rho	familia de GTPasas pequeñas de la superfamilia de Ras
R Ins	receptor de insulina
R IGF-1	receptor de IGF-1
ROCK	quinasas de las proteínas Rho
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SH	dominio de homología a Src
SR	retículo sarcoplásmico
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TG	triglicéridos
Tg	transgénico
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades internacionales de actividad enzimática
WT	tipo salvaje

**Criterio utilizado para nombrar genes y proteínas.**

En esta memoria de tesis se ha procurado mantener la nomenclatura de genes y proteínas siguiente:

Nomenclatura de genes y proteínas		
	Humano	Ratón
Gen	<i>DMPK</i>	<i>dmpk</i>
Proteína	DMPK	DMPK





# Capítulo 1. Distrofia Miotónica

## 1.1 Aspectos generales

La Distrofia Miotónica de tipo 1 (DM1), también conocida como enfermedad de Steinert [Steinert, 1909], es un desorden neuromuscular degenerativo de herencia autosómica dominante. Representa la forma más frecuente de distrofia muscular en adultos con una incidencia a nivel mundial de 1 cada 15000 individuos que aumenta en caucásicos hasta una frecuencia de 1 cada 8000 [Harper, 2001]. Su incidencia máxima se encuentra en algunas regiones aisladas de Canadá, siendo 1 cada 475 nacimientos, en tanto que es extremadamente rara en africanos subsaharianos, en los que solamente se ha descrito una familia nigeriana afectada [Brook, 1992].

La expresión fenotípica de la DM se define como multisistémica y variable ya que puede afectar a diferentes órganos y sistemas en mayor o menor medida. Presenta también penetrancia incompleta, es decir que no todos los portadores manifiestan la enfermedad. Asimismo, representa uno de los mejores ejemplos del fenómeno de anticipación genética [Harris y cols., 1996] ya que, dentro de un núcleo familiar afectado, con cada generación la severidad de los síntomas aumenta y la edad de aparición de la enfermedad disminuye.

## 1.2 Historia del descubrimiento de las distrofias miotónicas



**Figura 1.** Dr. Hans Steinert (1875-1911). Médico y profesor en la Universidad de Leipzig describió la enfermedad hace 100 años.

Hace ya un siglo (1909) que la DM era descrita por primera vez como entidad clínica por el médico alemán Hans Steinert (figura 1) y por los ingleses Batten y Gibb [Batten y Gibb, 1909]. Durante el último siglo y gracias al progreso de la medicina y la tecnología, muchos descubrimientos clínicos y fisiopatológicos han perfilado los síntomas de la DM, aunque no fue hasta 1992 que varios grupos descubrieron que la base genética causante de la enfermedad es la expansión de un triplete de nucleótidos en la región 3' no codificante del gen *DMPK* en el cromosoma

19 [Aslanidis y cols., 1992; Brook y cols., 1992; Buxton y cols., 1992; Fu y cols., 1992; Harley y cols., 1992; Mahadevan y cols., 1992].

Una vez identificada la alteración genética de la DM se observó que entre un 1 y un 2% de los pacientes con un diagnóstico clínico de DM no presentaban la mutación descrita, lo que sugirió la existencia de heterogeneidad genética. Desde 1994 hasta 1998 se describieron enfermedades similares que no presentaban la alteración genética descrita. Este hecho llevó al Consorcio Internacional de Distrofia Miotónica (IDMC) a acordar durante su Segunda Conferencia Internacional en 1998 una nueva nomenclatura para los *loci* de estas enfermedades publicado como: *New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1)*. (*The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC)*. *Neurology* 2000; 54: 1218-21). La nomenclatura del IDMC introdujo el concepto de DM para describir colectivamente el grupo de enfermedades miotónicas multisistémicas siendo la DM de tipo 1 (DM1) la que está causada por una alteración genética en el cromosoma 19. En el año 2001 se publicó la mutación que causa la DM2 en el cromosoma 3 [Liquori y cols., 2001] y recientemente, tras la sospecha de un tercer tipo de DM, análisis de ligación sugirieron la existencia de un tercer *locus* en el cromosoma 15, el DM3 [Le Ber, 2004 p1979].

### 1.3 Las distrofias miotónicas de tipo 1 (DM1) y de tipo 2 (DM2)

Hasta la fecha sólo dos tipos de DM han sido bien caracterizados, la DM de tipo 1 (DM1) y la de tipo 2 (DM2). La cuidadosa evaluación clínica de pacientes con DM1 o DM2 revela que las similitudes clínicas entre estos desórdenes miotónicos multisistémicos superan las discrepancias [Meola, 2000a]. No obstante, existen diferencias notables que hacen que sea poco probable confundirlas clínicamente.

En 1994, Thornton y colaboradores describieron una enfermedad autosómica dominante similar a la DM1 pero que no presentaba la alteración genética en el cromosoma 19 que inicialmente se llamó PROMM y posteriormente pasó a ser DM2 [Thornton y cols., 1994]. En el año 2001, se describió que la alteración genética causante de la DM2 consistía en repetición del tetranucleótido CCTG en una región no codificante del gen ZNF9 (del inglés *Zinc Finger protein 9*) localizado en la región 3q21.3 [Liquori y cols., 2001].



Una de las diferencias principales de la DM2 respecto a la DM1 es la ausencia de casos congénitos en la primera [Ashizawa y Harper, 2006]. El patrón de implicación de la musculatura es predominantemente proximal en tanto que en DM1 es distal y los músculos faciales y respiratorios a diferencia de la DM1 no suelen estar afectados [Huang y Kuo, 2005]. La implicación cardíaca en DM2 es más suave y puede, a diferencia de DM1, encontrarse con frecuencia miocardiopatía dilatada [Schara y Schoser, 2006].

Tabla 1. Resumen comparativo de las características de DM1 y DM2. Kurihara (2005), Cho y Tapscott (2006) y Machuca-Tzili y cols. (2006)

	DM1	DM2
Locus cromosómico	19q 13.3	3q 21.3
Locus genético	5'UTR gen DMPK	Intrón 1 gen ZNF9
Anormalidad genética	Repetición (CTG) <sub>n</sub>	Repetición (CCTG) <sub>n</sub>
Normal / patológico	5-37 / 50-4000	104-176 / 75-11000
Herencia	Autosómica dominante	Autosómica dominante
Debilidad muscular	Músculos distales	Músculos proximales
Forma congénita	Sí	No
Miotonía	++	+
Cataratas	+	+
Dolor muscular	+/-	+
Alteraciones cardíacas	++	+
Aumento de enzimas musculares	+	+
Alteraciones cognitivas	+	+
Hipersomnia	++	+
Resistencia a la insulina	+	+
Atrofia testicular	+	+
Calvicie frontal en hombres	+	+
Hipogammaglobulemia	+	+
Problemas gastrointestinales	+	-
Hipertrofia muscular pantorrilla	-	+
Anticipación	+	+

Las revisiones recientes de Schara y Schoser (2006) Ashizawa y Harper (2006), Cho y Tapscott (2007) y Mankodi (2008) analizan este tema en detalle.

#### 1.4 Otras enfermedades con expansiones de tripletes

La DM1 y la DM2 forman parte de las enfermedades resultantes de la expansión de un triplete de nucleótidos. Este grupo creciente de enfermedades puede separarse en dos grandes bloques, aquellas en las que los tripletes inestables se encuentran en secuencias codificantes o exones y las que se encuentran en zonas no codificantes, por lo tanto no traducidas como la DM1 [Cummings y Zoghbi, 2000].

Tabla 2. Resumen de desórdenes de repeticiones de tripletes no codificantes. Basado en Cummings y Zoghbi (2000) y Machuca-Tzili y cols. (2005)

Enfermedad	Gen	Locus	Proteína	Repetición	Tamaño		Localización
					Norm	Patológico	
DM1	<i>DMPK</i>	19q13.3	Dmpk	CTG	5-37	50 a miles	3'UTR
DM2	<i>ZNF9</i>	3q21.3	Zinc finger protein 9	CCTG	104-176	75-11000	Intrón 1
Sind. X frágil	<i>FRAXA</i>	Xq27.3	Fmrp	CGG	6-53	60-200 pre* >230 completo	5'UTR
Sind. XE frágil	<i>FRAXE</i>	Xq28	Fmr2p	GCC	6-35	61-200 pre >200 completo	5'UTR
Ataxia de Friedreich	<i>X25</i>	9q13-21.1	Frataxina	GAA	7-34	34-80 pre >200 completo	Intrón 1
Ataxia Espinocerebelar 8	<i>SCA8</i>	13q21	-	CTG	16-37	110 a <250?	Exón terminal 3'
Ataxia Espinocerebelar 12	<i>SCA12</i>	5q31-33	PP2A-PR55β		7-28	66-78	5'UTR

\*pre (premutación)

Los desórdenes de repeticiones en zonas codificantes presentan características similares resumidas en la tabla 2. En primer lugar todos son multisistémicos, implicando la disfunción o degeneración de varios tejidos. De hecho, como hemos visto en DM1, los fenotipos que se presentan dentro del mismo desorden suelen ser también variables probablemente debido a una mayor heterogeneidad en la variación somática que la que presentan las enfermedades con expansiones codificantes. Se ha observado que el tamaño y la variación de las expansiones de los tripletes es también mayor en las enfermedades no codificantes. Muchas de ellas presentan pre-mutaciones que son clínicamente silenciosas pero que, a través de la línea germinal, pueden expandirse hasta alcanzar un número de repeticiones que es capaz de causar los síntomas. Para más información remitirse a la revisión publicada por Cummings y Zoghbi en el año 2000.

### 1.5 Principales manifestaciones clínicas de la DM1

En este apartado, se describirán los síntomas de la DM1 dado que en el presente trabajo de tesis se ha estudiado la función del producto del gen mutado en la DM1.

Las primeras manifestaciones de la DM1 tienen lugar temprano en la edad adulta y la esperanza de vida de los individuos afectados es, por lo general, de seis décadas. La miotonía y la debilidad y degeneración muscular son los síntomas más relevantes

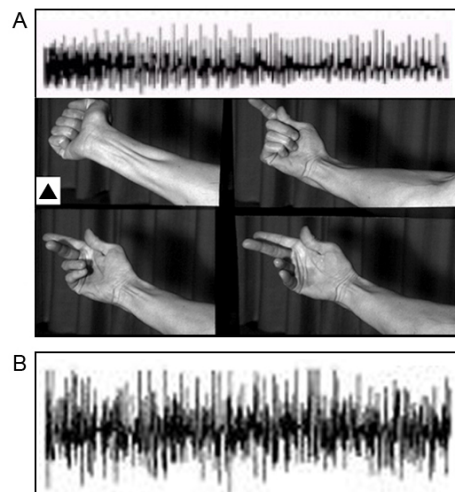
de la DM1 de aparición adulta. Estos pueden además ir acompañados de alteraciones en la morfología facial, cataratas preseniles, atrofia testicular, calvicie frontal, fallo renal, resistencia a la insulina y alteraciones en la conducción cardíaca. También puede aparecer una pérdida variable de la capacidad cognitiva que es mucho más frecuente y notable en la forma congénita de la enfermedad como se detallará más adelante.

Dado que en esta tesis el trabajo realizado se ha centrado en las alteraciones metabólicas y cardíacas de la DM1, estas serán las que se describan con más detalle.

### 1.5.1 Afección muscular

El síntoma muscular más característico de la DM1 es la miotonía, término acuñado en 1891. Éste hace referencia al trastorno del músculo esquelético que, debido a una actividad eléctrica anormal, resulta en una prolongación del tiempo de relajación después de una contracción [Morales-Montero, 2003]. Este síntoma puede ser monitorizado en los pacientes mediante una electromiografía o EMG (figura 2). La alteración del funcionamiento normal del músculo provoca una incapacidad transitoria para realizar el movimiento antagónico a la contracción dificultando gestos tan cotidianos como soltar objetos [Harper, 2001]. La miotonía caracteriza no sólo a la DM1 sino a un grupo de enfermedades conocidas como enfermedades miotónicas que se dividen en distróficas y no distróficas (canalopatías). Sólo las distrofias miotónicas como la DM1 y la DM2 se asocian a debilidad muscular temprana y progresiva [Machuca-Tzili, 2005].

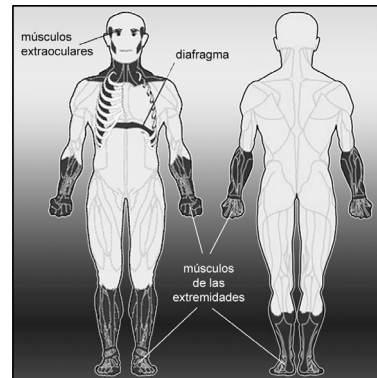
El patrón de implicación del músculo esquelético está bien caracterizado. En las extremidades la debilidad muscular es primero distal, afectando sobretodo a los flexores digitales y propagándose después hacia los músculos proximales (figura 3).



**Figura 2. Miotonía en DM1.** (A) La miotonía se detecta en el EMG como descargas repetitivas de las fibras musculares que crecen y decrecen en frecuencia y amplitud después de una contracción máxima (▲). Se observa reducción en la velocidad de obertura de la mano y debilidad de los flexores digitales [Schara, 2006]. (B) Este patrón no se detecta en músculo no afectado.

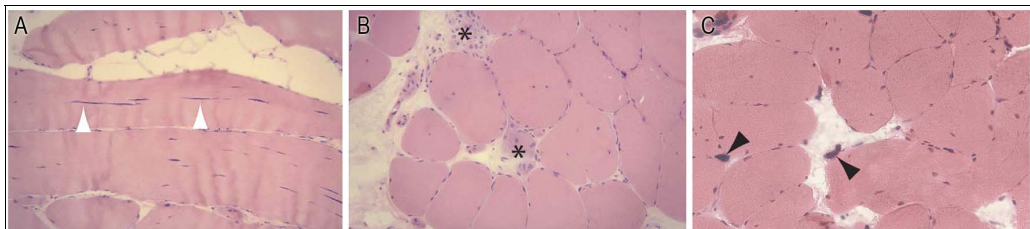
Es muy frecuente que se identifique a los pacientes tras una primera visita en la que éstos refieren debilidad en los pies y en las manos.

La debilidad de los músculos faciales es también una característica temprana que junto a una ptosis palpebral leve (caída del párpado) y un desgaste de los músculos del cuello confiere un aspecto característico a los pacientes de DM1. La debilidad muscular puede causar problemas al hablar (voz ligeramente nasal), masticar y tragar [Machuca-Tzili, 2005].



**Figura 3. Patrón de afectación muscular en DM1.** Los músculos distales son los primeros que resultan afectados en los pacientes con DM1.

La histología de los músculos afectados puede mostrar aumento del tamaño de las fibras musculares. Aparecen también fibras dispersas con características propias de atrofia severa: mionúcleos picnóticos (condensación de la cromatina) localizados en el centro en lugar de en la periferia de la fibra muscular (figura 4). Un estudio publicado en el año 2003 muestra que las fibras de tipo I podrían tener una mayor implicación en la DM1 que las de tipo II [Vihola, 2006].



**Figura 4. Histología muscular en DM1.** Se muestran las características histológicas típicas en DM1: proliferación de núcleos localizados en el centro de la fibra a veces formando cadenas alargadas (A, flechas blancas), fibras necróticas (B, asteriscos) y fibras atroficas (C, flechas negras). Reproducido de Day y Ranum, 2005.

La debilitación de los músculos implicados en la respiración es muy común en los pacientes de DM1 y puede llevar a un fallo respiratorio [Machuca-Tzili, 2005] que puede llegar a ser la causa del fallecimiento en un 40% de los pacientes [Mathieu, 1999].

### 1.5.2 Afección cardíaca

Aunque Steinert en su trabajo original identificó la bradicardia como un síntoma de la DM1 no fue hasta que se dispuso del electrocardiograma (ECG) como herramienta diagnóstica que se pudieron realizar estudios sistemáticos de los defectos en la conducción cardíaca [Ashizawa y Harper, 2006]. Simplificando, la manifestación de los síntomas cardiovasculares en pacientes con DM1 se puede dividir en [Sovari y cols, 2007]:

- defectos de la conducción cardíaca,
- taquiarritmias (aceleración del ritmo cardíaco)
- miocardiopatía (alteración del músculo cardíaco que causa pérdida de tonicidad muscular y reducción de la capacidad para bombear sangre) y
- otras afecciones cardíacas (menos comunes).

De estas complicaciones, es la anormalidad en la conducción cardíaca la que se da en mayor proporción y su presentación más habitual es el bloqueo atrio-ventricular de primer grado (40% de los pacientes) [Philips y Harper, 1997; Colleran y cols., 1997; Bhakta y cols., 2004; Pelargonio, 2002]. Este bloqueo, que puede ser asintomático en fases iniciales, puede progresar más o menos rápidamente a falta de aliento, síncope e incluso muerte súbita [Sovari y cols, 2007]. En un estudio longitudinal realizado durante 10 años en los que se siguió a 367 pacientes de DM1 se observó que la mortalidad estaba aumentada 7,3 veces respecto a la población no afectada de la misma edad. De éstos un 20% falleció por enfermedad cardiovascular en tanto que un 10% lo hizo por muerte súbita [Mathieu y cols., 1999]. Las revisiones de G. Pelargonio y colaboradores [Pelargonio y cols., 2002] y la más reciente de A.A. Sovari y colaboradores [Sovari y cols., 2007] analizan en detalle este tema.

A nivel histológico se han descrito a partir de muestras cardíacas procedentes de pacientes con DM1 (biopsias y estudios *postmortem*) varios grados de fibrosis intersticial, infiltración de grasa, hipertrofia de los cardiomiocitos y miocarditis focalizada [Philips y Harper, 1997].

En el corazón, el ciclo del calcio a través del retículo sarcoendoplásmico (SR) juega un papel crucial en la regulación del mecanismo de contracción y relajación cardíaca.

En general, la disminución en la captación de calcio es la característica principal del fallo cardíaco, tanto en humanos como en animales [Ter Keurs y Boyden, 2007].

### 1.5.3 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es la principal alteración metabólica asociada a la patología de DM1 [Harper, 2001]. Se ha visto que el metabolismo de la glucosa en músculo esquelético está alterado en estos pacientes [Moxley y cols., 1978; Annane y cols., 1994; Vlachopapadopoulou y cols., 1995]. Estudios realizados en pacientes con DM1 muestran una marcada hiperinsulinemia tras una prueba de tolerancia a la glucosa oral o OGTT (del inglés *Oral Glucose Tolerance Test*) [Goden y cols., 1969; Huff y cols., 1967; Walsh y cols., 1970; Barbosa y cols., 1974; Cudworth y Walker, 1975].

Se ha observado que tras una administración de insulina los pacientes de DM1 muestran una reducción del 15-25% en la capacidad de disminuir la glucosa sanguínea respecto a individuos control [Moxley y cols., 1984]. Asimismo, experimentos realizados en músculo del antebrazo de pacientes de DM1 indican una disminución del 70% en la sensibilidad a la insulina [Moxley y cols., 1978]. También se analizaron cultivos primarios de células musculares aisladas a partir de un feto con DM1 en los que se observó que la captación de glucosa tras el tratamiento con insulina disminuía un 50% respecto a la observada en células control [Furling y cols., 2001]. Se ha visto que enfermos de DM1 presentan concentraciones de insulina mayores que individuos sanos en situaciones de glucemia comparable [Fernandez-Real y cols., 1999]. Más recientemente, Matsumura y colaboradores realizaron un estudio cruzado con 95 pacientes de DM1 con el objetivo de evaluar la intolerancia a la glucosa. El HOMA-IR<sup>1</sup> resultó mayor en los pacientes de distrofia que en los controles y la sensibilidad a la insulina menor. El 13,3% de los enfermos y el 1,9% de los controles mostraron unos resultados propios de individuos afectados de diabetes mellitus. Dicho estudio sugiere que la DM1 predispone a la resistencia a la insulina con una hiperinsulinemia como mecanismo compensatorio, incluso en aquellos pacientes con una menor glucemia en ayunas [Matsumura y cols., 2009]. En controversia con este conjunto de evidencias, Perseghin y colaboradores estudiaron la acción y secreción de la insulina de varios jóvenes con DM1 no diabéticos durante un clamp euglicémico-hiperinsulinémico y tras un OGTT. En su estudio no observaron

---

<sup>1</sup> Índice de cálculo sencillo que se utiliza para medir la insulinoresistencia de los pacientes:  $\text{insulina basal} \times \text{glucemia} / 22,5$

una resistencia a la insulina mayor que en los individuos no afectados, pero sí un exceso de proinsulina en plasma y una elevada secreción insulina después de la carga oral de glucosa [Perseghin y cols., 2003]. Perseghin y colaboradores han sugerido que la resistencia a la insulina en estos pacientes está sobreestimada y que anomalías en la degradación proteica durante la fase postabsortiva regulada por la insulina serían la principal afectación metabólica [Perseghin y cols., 2004].

A nivel molecular, se ha descrito que el ARN mensajero del receptor de insulina presenta un procesamiento (*splicing*) alterado en músculo y otros órganos de pacientes con DM1 [Savkur y cols., 2001; Guiraud-Dogan y cols., 2007]. Se ha encontrado que la forma A del receptor, que tiene menos afinidad por el ligando y es predominante durante el desarrollo fetal, es la que se encuentra en mayor proporción en estos enfermos [Savkur y cols., 2001].

El conjunto de datos publicados parece indicar que la resistencia a la insulina es la causa principal de intolerancia a la glucosa en los pacientes con DM1. Sin embargo, la fisiopatología de esta intolerancia a la glucosa en DM1 no está clara ya que varios sistemas endocrinos y citoquinas parecen tomar parte [Barreca y cols., 1980; Okimura y cols., 1988; Fernandez-Real y cols., 1999; Johansson 2000, 2002a y b].

#### 1.5.4 Otras alteraciones endocrinas

Se ha descrito que además de patología neuromuscular de la DM1, los pacientes presentan alteraciones metabólicas que afectan a diferentes funciones:

- Hipotalámicas. El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (eje HPA) se encuentra afectado en pacientes de DM1, en concreto se ha encontrado una respuesta exagerada de la hormona adrenocorticotropa o ACTH (del inglés *Adrenocorticotropic Hormone*) a diferentes estímulos mediados por hormona liberadora de corticotropina o CRH (del inglés *Corticotropin Releasing Hormone*) [Jackson 1988 p70; Grice, 1991 p69; Grice, 1995 p179]. También se ha descrito una disminución de los andrógenos adrenales circulantes y una alteración en el ritmo diurno del cortisol [Carter y Steinbeck, 1985; Buyalos y cols., 1998]. Se cree que un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral o TNF $\alpha$  (del inglés *Tumor Necrosis Factor*) podría ser el nexo de unión entre estas alteraciones endocrinas [Johansson y cols., 1999; Johansson y cols., 2001].

- Gonadales. La atrofia testicular con reducción en la fertilidad en pacientes de DM1 varones es muy frecuente mientras que en las mujeres los abortos espontáneos y los trastornos menstruales aparecen con asiduidad [Ashizawa y Harper, 2006].

### 1.5.5 Otros órganos y sistemas afectados

Además de los síntomas descritos la DM1 refleja su carácter multisistémico afectando a otros órganos y sistemas como:

- Ojos. Las cataratas subcapsulares posteriores son muy frecuentes en la DM1, pueden aparecer en la segunda década de vida. Se presentan inicialmente como iridiscencias rojas y verdes que posteriormente evolucionan a cataratas opacas [Ashizawa y Harper, 2006]. A veces son la única evidencia de enfermedad o antecedente en una familia afectada.

- Sistema nervioso central. El retraso mental sólo se observa en la DM1 congénita y de aparición juvenil [Harper, 2001]. Se han observado también anomalías en la materia blanca de estos pacientes [Hund, 1997 p33]. De hecho, el exceso de somnolencia (hipersomnía), la apatía y la función frontal ejecutiva anormal observada en estos pacientes se atribuye a alteraciones en su sistema nervioso central [Ashizawa y Harper, 2006]

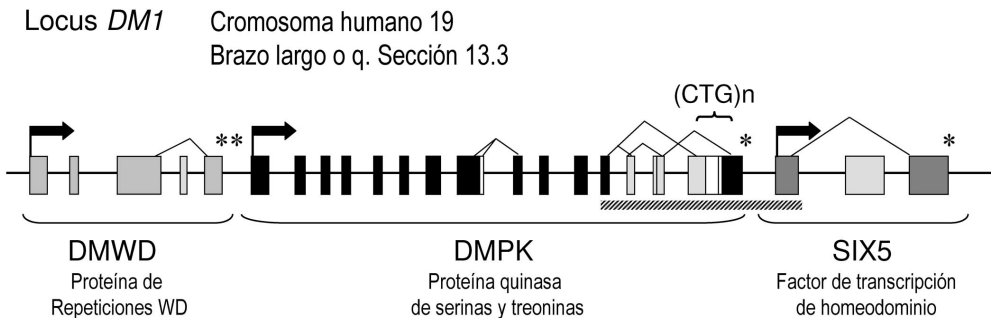
- Sistema digestivo. La afectación del músculo liso se cree responsable de los trastornos digestivos de estos pacientes, presentando un empeoramiento en la motilidad intestinal [Day y Ranum, 2005] así como en la coordinación para tragar los alimentos, aumentando así el riesgo de sufrir neumonía por aspiración (disfagia) [Machuca-Tzili y cols., 2004].



## Capítulo 2. Aspectos genéticos y mecanismos patofisiológicos de la DM1

### 2.1. Defecto genético

El defecto genético causante de la DM1 se identificó en 1992 y consiste en una expansión del trinucleótido CTG (citosina, timina, guanina) [Brook y cols., 1992; Fu y cols., 1992; Mahadevan y cols., 1992]. Esta expansión inestable se localiza en la región 3' no codificante o 3'UTR (del inglés *Untranslated Region*) del gen *DMPK* (del inglés *Dystrophia Myotonica Protein Kinase*). Este gen que codifica para una quinasa de serinas y treoninas, se localiza en la región 13.3 del brazo largo del cromosoma 19 humano. El gen *DMPK*, compuesto por 15 exones, se encuentra flanqueado por los genes *DMWD* y *SIX5* (figura 5).



**Figura 5. Organización del locus 19q 13.3.** El gen *DMPK* se encuentra en el cromosoma humano 19 flanqueado por los genes *DMWD* y *SIX5*. Las flechas indican inicio de transcripción, los asteriscos zonas de poliadenización, los exones son los cuadrados en tanto que la línea representa los intrones y las zonas intergénicas. Los splicings alternativos se han representado por líneas que unen a los distintos exones. En humanos se localiza una isla de CpG que solapa la zona 3' de *DMPK* y la 5' de *SIX5* aquí representado por una barra con trazos diagonales. En el exón 15 de *DMPK* localizamos la región donde se encuentra la repetición inestable (CTG)<sub>n</sub>. Adaptado de Wansink y Wieringa, 2003.

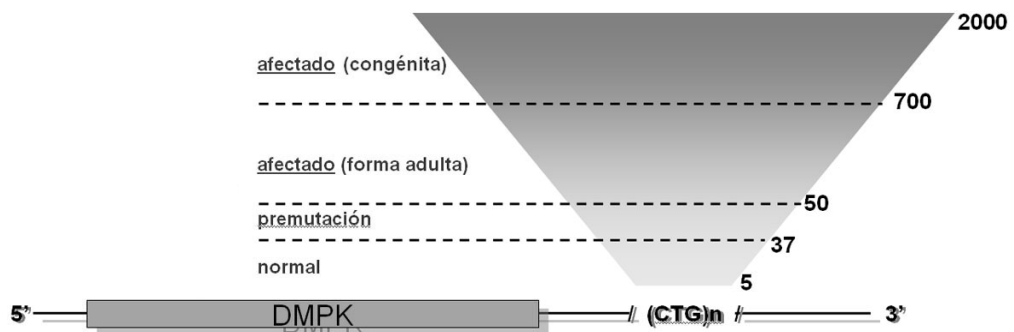
El gen *DMDW* se localiza en la zona 5' de *DMPK* y se expresa principalmente en el testículo y el cerebro. Mediante análisis informático se ha predicho que la proteína *DMDW* posee repeticiones de triptófano y ácido aspártico (WD). El estudio de proteínas homólogas a *DMDW* en otras especies sugiere que ésta pueda participar en vías de proteólisis mediante la regulación de otros genes [Wansink y Wieringa, 2003]. En el extrema 3' del gen *DMPK* se encuentra el gen *SIX5* que es el homólogo en vertebrados del gen de *Drosophila sine oculis*, esencial para el desarrollo del sistema visual en la mosca del vinagre. Este gen codifica para un factor de transcripción de un

homeodominio que se expresa durante el desarrollo así como en algunos tejidos del adulto como: músculo esquelético y cardíaco, ojo, riñón, hígado, pulmón e intestino delgado [Kawakami y cols., 2000].

## 2.2. Características de la expansión de los triplete en DM1

H.G. Harley y su equipo identificaron en 1992 un polimorfismo que en pacientes de DM1 era de longitud variable pero mucho mayor que la de individuos que no presentaban la patología [Harley y cols., 1992]. Después de aislar la secuencia se vio que la longitud del fragmento en los pacientes afectados era mayor que en los familiares asintomáticos [Buxton y cols., 1992]. Ese mismo año se clonó y se identificó un segmento genómico inestable [Aslanidis y cols., 1992] que daba lugar a la repetición de un triplete CTG [Brook y cols., 1992] y se describió una correlación entre la longitud de los tripletes repetidos y la incidencia de la forma congénita de la enfermedad [Tsilfidis y cols., 1992]

Se ha visto que esta secuencia es altamente variable en la población normal, de manera que los individuos no afectados pueden presentar entre 5 y 37 copias mientras que los pacientes de DM1 sintomáticos presentan por lo menos 50 repeticiones llegando a más de 1000 en los más afectados (figura 6) [Brook y cols., 1992].



**Figura 6. Expansión de la mutación en DM1.** Los individuos que presentan el triplete (CTG) repetido más de 50 veces muestran los síntomas más suaves de la enfermedad que encuentra su expresión máxima en la forma congénita.

El mecanismo molecular exacto por el que ocurre la expansión se desconoce. La inestabilidad mitótica, o lo que es lo mismo el aumento en el número de repeticiones durante las divisiones celulares, provoca heterogeneidad somática. El número de repeticiones aumenta con la transmisión de padres a hijos, lo cual es evidencia de

inestabilidad meiótica. Parece ser que el tamaño del alelo paterno es más importante en determinar el tamaño del alelo del hijo y, por consiguiente, su fenotipo. Sin embargo, la forma congénita se hereda casi exclusivamente por vía materna. La transmisión de grandes mutaciones por vía paterna parece estar bajo selección negativa durante la espermatogénesis ya que los hombres con debilidad muscular en la edad adulta temprana generalmente son infértiles. En muchas de las familias donde una madre afectada ha tenido un niño con la forma congénita, se ha logrado determinar que el abuelo materno era el portador de la mutación [Lavedan y cols., 1993]. Este hecho sugiere que el alelo DM1 en el abuelo necesita pasar a través de una hija para alcanzar el grado de inestabilidad responsable de las expansiones intergeneracionales subsecuentes y que se necesitan para llegar al intervalo de tamaño, que dará como resultado el nacimiento de niños con DM1 congénita (DMC) [López de Munain y cols., 1995].

### **2.3. Formas clínicas de la DM1 en función del tamaño de la expansión de tripletes**

En base a una correlación entre la edad de aparición y la severidad de los síntomas han establecido 3 grandes categorías:

#### **2.3.1. Forma leve o benigna.**

Presenta entre 50 y 150 repeticiones de los tripletes. Se manifiesta en pacientes de edad avanzada y se caracteriza por la presencia de un tipo de cataratas de aparición más temprana que las cataratas comunes, acompañada de una mínima o nula implicación muscular. Los pacientes con una forma leve no suelen tener problemas de miotonía o anomalías en el sistema nervioso central, pero pueden tener alteraciones gastrointestinales, metabólicas y de conducción cardíaca.

#### **2.3.2. Forma clásica.**

Presenta entre 100 y 1000 repeticiones de los tripletes. Los síntomas aparecen en una edad juvenil o adulta, y suelen incluir cataratas, miotonía y debilidad muscular generalizada y progresiva, acompañada de una mayor o menor implicación de los otros sistemas.

### 2.3.3. Forma congénita (DMC).

Presenta más de 1000 repeticiones de los tripletes y constituye la expresión más grave de la enfermedad con una sintomatología presente desde el nacimiento. Se caracteriza por una hipotonía generalizada, distrés respiratorio, malformaciones articulares, así como un retraso en la función motora, retraso mental, defectos de conducción cardíaca, debilidad facial y dificultades para la succión y deglución. Los problemas para la deglución se deben a una debilidad de los músculos de la mandíbula (faciales y palatal), pudiéndose provocar una aspiración del alimento que podría dar lugar a la muerte por asfixia. La miotonía no suele aparecer hasta los 5 años de vida y si estos niños viven lo suficiente, desarrollan unos síntomas similares a las formas clásicas, pero más severos. Esta forma congénita presenta una alta mortalidad perinatal (25%) que si es superada lleva a la total manifestación de síntomas descritos en adultos con tan sólo 10 años de edad.

Tras el descubrimiento de la mutación de la DM1 y la posterior aplicación de los estudios moleculares para el diagnóstico de la enfermedad, actualmente es posible añadir un nuevo grupo a los tres anteriores: los portadores asintomáticos. A esta categoría pertenecen los individuos que no manifiestan ningún síntoma, pero que pueden transmitir la enfermedad a su descendencia.

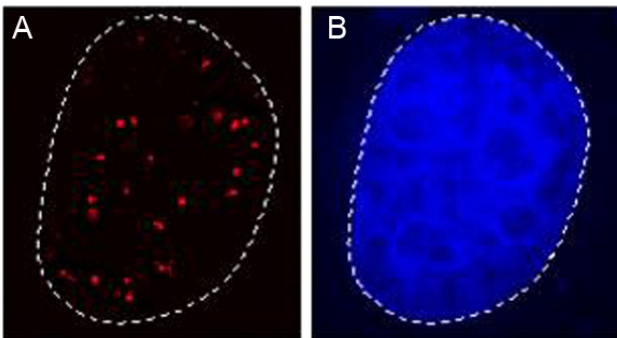
## 2.4. Mecanismos fisiopatológicos de la DM1

El mecanismo fisiopatológico por el que la expansión de los tripletes en el gen *DMPK* causa las alteraciones multisistémicas observadas en DM1 no es conocido en detalle. Sin embargo, muchos estudios aportan datos que perfilan los defectos celulares responsables de las manifestaciones pleiotrópicas de la enfermedad. Estudios en ratón sugieren que varios mecanismos operan en paralelo para generar el amplio espectro de síntomas en DM1.

### 2.4.1 Ganancia de función del ARN

El gen *DMPK* con expansiones de tripletes en la región 3' no-codificante se transcribe en el núcleo celular de los pacientes de DM1 de la misma manera que lo hace el gen sin expansiones. Sin embargo, los transcritos mutantes producidos son de

longitud elevada debido a la expansión. En células de pacientes con DM1 se ha mostrado que el ARN mutado se acumula en formaciones nucleares que se conocen como “*foci* ribonucleares” [Taneja y cols., 1995]. La observación de estas formaciones (Figura 7) sugirió que tal vez los *foci* podían significar una ganancia de función a nivel de ARN [Davis y cols., 1997; Wang y cols., 1995]. Este mecanismo se comprobó experimentalmente a partir de ratones transgénicos que expresaban entre 200 y 300 repeticiones CTG no codificantes en el contexto del gen humano de la actina esquelética (HSA<sup>LR</sup>, del inglés *Human Skeletal Actin long repeats*) o del gen *DMPK* humano. Dichos modelos animales desarrollan miotonía, miopatía, *foci* similares a los observados en pacientes de DM1 y defectos en el procesamiento del ARN (*splicing*) del Canal de Cloro-1 (CIC-1). Asimismo, otros estudios evidenciaron el papel relevante de la acumulación de ARNs con un número elevado de tripletes CUG en la patogénesis de la enfermedad [Mankodi y cols., 2000; Seznec y cols., 2001]. La identificación de proteínas capaces de unirse a estructuras de tipo (CUG)<sub>n</sub>-ARN proporcionó un modelo de ganancia de función del ARN que además podía explicar las similitudes entre la DM1 y la DM2, ya que proteínas similares podrían verse alteradas por las repeticiones mutantes de CUGs (DM1) y CCUGs (DM2).



**Figura 7. Foci de ARN.** Detección de los *foci* mediante hibridación *in situ* en el laboratorio del Dr. Tom Cooper en el Baylor College of Medicine (Texas). (A) En rojo se localizan los *foci* con ayuda de una sonda CAG de ANP (ácido nucleico polipeptídico) marcada con el fluoróforo Cy3. (B) Marcaje nuclear con DAPI. Reproducido de la página web del laboratorio del Dr. Cooper <http://www.bcm.edu/pathology/labs/cooper/projects.htm>

Entre las proteínas con capacidad de unión al triplete expandido se identificó una familia denominada MBNL (del inglés *Musclebind-like*) que se unen específicamente a ARN en forma de horquilla (*hairpins*) formada por tramos de repeticiones de CUGs de cadena doble [Millar y cols., 2000]. Se vio que todas las isoformas de MBLN -MBNL1, MBNL2 y MBNL3- se localizaban en los *foci* nucleares de músculos de pacientes de DM1 [Cardani y cols., 2006] y líneas celulares de DM1 [Fardaei y cols., 2002]. Se propuso que quizás este “secuestro” de MBNL en los *foci* las apartaba de sus funciones celulares normales. Consistente con esta teoría fue la descripción de ratones deficientes para MBNL que desarrollan miotonía, cataratas e irregularidades

en el *splicing* del Canal de Cloro-1 (CIC-1), Troponina cardíaca T (TNNT2) y Troponina T del músculo esquelético (TNNT3), todas ellas alteraciones fenotípicas y moleculares asociadas a la DM1 [Kanadia y cols., 2003]. La proteína homóloga de MBNL en *Drosophila* cumple funciones críticas en las fases finales de diferenciación de células musculares y fotorreceptoras del ojo, por ello se considera una proteína potencialmente implicada en los efectos tóxicos provocados por la acumulación de ARNs con repeticiones expandidas [Artero y cols., 1998; Begemann y cols., 1997]. En conjunto, todas estas evidencias apoyan la hipótesis de que la pérdida de actividad de MBNL es un evento patogénico clave en el desarrollo de la enfermedad [Llamusí y Artero, 2008].

Otra proteína que regula el *splicing* alternativo y la traducción, y se ha relacionado con la patogénesis asociada en DM1 es la CUG-BP1 (BP, *binding protein*) [Ranum y Cooper, 2006]. A diferencia de MBNL, la cantidad y actividad de la proteína CUG-BP1 se encuentra aumentada en mioblastos de DM1 y tejido muscular esquelético y cardíaco de afectados de DM1 [Dansithong y cols., 2005; Ho y cols., 2005; Mahadevan y cols., 2006; Savkur y cols., 2001; Timchenko y cols., 2001, 2004]. Hasta el momento, el mecanismo que lleva al aumento de los niveles de proteína es desconocido. CUG-BP1 no colocaliza con los *foci* de ARN [Jiang y cols., 2004; Mankodi y cols., 2005; Wang y cols., 2007] en cambio interacciona con repeticiones cortas de GUGs de cadena simple [Timchenko y cols., 1996b]. Dos modelos de ratones transgénicos que sobre-expresan CUG-BP1 muestran letalidad embrionaria y miopatía aportando consistencia a esta hipótesis [Ho y cols., 2005; Timchenko y cols., 2004].

Cabe destacar que las funciones que MBNL y CUG-BP1 realizan sobre el proceso de *splicing* son antagonistas, de manera que MBNL promueve el *splicing* que da origen a isoformas adultas, mientras que CUG-BP1 hace que las isoformas embrionarias se expresen en el adulto [Ho y cols., 2004].

#### 2.4.2 Alteración en la expresión de los genes vecinos

El locus DM1, donde se localiza el gen *DMPK*, es una zona densa en genes. Algunos estudios han postulado que la expansión de los tripletes causaría alteraciones en la estructura de la cromatina, provocando modificaciones en la transcripción de genes vecinos [Wang y cols., 1994; Wang y cols., 1995]. Se propuso

que la variabilidad clínica de la enfermedad podría explicarse por una relación entre el tamaño de la mutación y el número de genes vecinos afectados [Morrone y cols., 1997]. Se sabe que tramos de repeticiones (CTG).(CAG) son flexibles de manera que pueden envolver eficientemente el octámero de histonas “cerrando” una región de cromatina que se encontraría “abierta” en condiciones no patológicas [Otten y Tapscott, 1995; Wang y cols., 1994]. Se ha descrito que en la región del gen *DMPK* donde se localiza la expansión de tripletes existe un elemento aumentador (en inglés *enhancer*) de la transcripción de un gen adyacente a *DMPK*, *SIX5*. La pérdida de funcionalidad de este *enhancer* resulta en la disminución de la expresión de este gen localizado a 3' de *DMPK* [Klesert y cols., 1997; Thornton y cols., 1997]. El gen *sine oculis* es el homólogo más cercano de *SIX5* en *Drosophila* (mosca de la fruta) donde es determinante para la formación del ojo y se requiere para el desarrollo del músculo y los componentes gonadales mesodérmicos [Kirbi y cols., 2001]. Debido a que las cataratas y la degeneración de los músculos son comunes en DM1, se sugirió que la haploinsuficiencia de *SIX5* sería un mecanismo que posiblemente contribuye a la patogénesis de la DM1 [Boucher, 1995(1919); Jansen, 1995(843)]. El descubrimiento de que los ratones KO para *SIX5*, presentan cataratas [Klesert y cols., 2000; Sarkar y cols., 2000] dio apoyo experimental a esta hipótesis. Asimismo, se observó que la expresión de *SIX5* en células provenientes de pacientes con DM1 estaba disminuida entre 2 y 4 veces respecto a las muestras de individuos no afectados [Klesert y cols., 1997].

Además de *DMPK* y *SIX5*, se sugirió que otros genes vecinos podrían estar implicados en ciertos aspectos de la patogénesis de DM1. Se ha propuesto que alteraciones en el gen *DMWD* (*Dystrophia Myotonica containing WD-repeat motif*), que se localiza corriente arriba del gen *DMPK* y que se expresa en los testículos, serían las responsables de la infertilidad masculina en algunos pacientes de DM1. Las consecuencias clínicas de la deficiencia de *DMWD* quedan por descubrir, aunque cabe destacar que los niveles de ARN mensajero de *DMWD* en el citoplasma de líneas celulares de DM1 y en muestras de músculo esquelético de pacientes adultos están disminuidos [Alwazzan y cols., 1999].

Bajo este modelo, algunas características multisistémicas de la enfermedad se explicarían por la haploinsuficiencia de varios genes vecinos y la gravedad del cuadro clínico estaría relacionada con la longitud de la repetición CTG [Ranum y Day, 2002]. Sin embargo, los ratones deficientes en genes vecinos estudiados hasta el momento

no presentan ninguna anomalía histopatológica, contráctil o electrofisiológica en el músculo esquelético [Personius y cols., 2005; Mistry y cols., 2001].

### 2.4.3 Haploinsuficiencia del gen *DMPK*

En un primer momento y tras identificar la alteración genética responsable de la DM1 se sospechó que una disminución en los niveles de proteína DMPK podía ser el mecanismo patológico responsable de la enfermedad. Dado que la transcripción del gen mutado no parece alterada, la pérdida del ARNm se ha atribuido a la retención de los transcritos mutantes en inclusiones ribonucleares que impiden que lleguen correctamente al citoplasma donde deberían ser traducidos [Krahe y cols., 1995; Davis y cols., 1997; Furling y cols., 2001]. Puesto que la mayoría de los pacientes presentan la mutación en hemigocosis, la disminución de la traducción afecta sólo al alelo mutado y se habla de haploinsuficiencia. Algunas publicaciones muestran una reducción de los niveles de ARN y proteína DMPK en los músculos de los pacientes afectados y células derivadas de biopsias [Fu y cols., 1992; Carango y cols., 1993; Novelli y cols., 1993; Hofman-Radvanyi y cols., 1993]. Con el objetivo de determinar si existía una relación entre la disminución de la expresión de la proteína DMPK y las alteraciones observadas en los pacientes de DM1, se crearon dos líneas independientes de ratones *knock-out* (KO) [Reddy y cols., 1996; Jansen y cols., 1996]. Ambas líneas se generaron por recombinación homóloga y sustitución de los primeros siete exones del gen *dmpk* por un *cassette* de resistencia a neomicina o higromicina, resultando en la ausencia de proteína DMPK. Los ratones obtenidos fueron aparentemente sanos pero bajo un examen más detallado se pudo comprobar que los KO desarrollados en el laboratorio de Sita Reddy mostraban una miopatía progresiva leve de aparición tardía, con una disminución de la fuerza muscular y degeneración de las fibras musculares. El grupo de Jansen sólo pudo detectar una miopatía leve en los músculos de la cabeza y cuello en ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> de edad avanzada. Estudios realizados en mioblastos aislados de esos ratones y en miotubos diferenciados *in vitro* mostraron que la proteína DMPK tenía un papel en la homeóstasis del calcio [Benders y cols., 1997]. Asimismo se describió que la regulación de los canales de ión sodio se encontraba alterada en células musculares aisladas de ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> y *dmpk*<sup>+/-</sup> [Mounsey y cols., 2000a; Mistry y cols., 2001; Reddy y cols., 2002] de la misma manera que se había visto en biopsias musculares de pacientes de DM1 [Franke y cols., 1990]. Cabe destacar que en los ratones KO del grupo de Reddy se



describieron anomalías de conducción cardíaca que incluyen bloqueo atrioventricular de primer, segundo y tercer grado e incluso los heterocigotos muestran bloqueo de primer grado, condición muy similar a la observada en pacientes de DM1 [Berul y cols., 2000].

Así pues, el hecho de que no se den las características multisistémicas de la enfermedad en los ratones KO, de que no existan casos de DM1 provocados por mutaciones de punto en el gen y de que exista otra DM -la de tipo 2, cuya alteración genética se localiza en otro *locus*- sugieren que las alteraciones pleiotrópicas características de la DM1 no son consecuencia única de la disminución de proteína DMPK [Ranum y Day, 2002] sino que otros mecanismos contribuyen al complejo fenotipo de la enfermedad. Sin embargo, teniendo en cuenta las alteraciones que muestran los animales KO para *dmpk*, la disminución de los niveles de esta proteína en humanos probablemente contribuya a los síntomas observados en los pacientes de DM1. Por ello es de interés examinar en detalle el fenotipo de estos animales y seguir investigando para desvelar la función fisiológica de DMPK.

## Capítulo 3. La proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK)

### 3.1 El gen *DMPK*

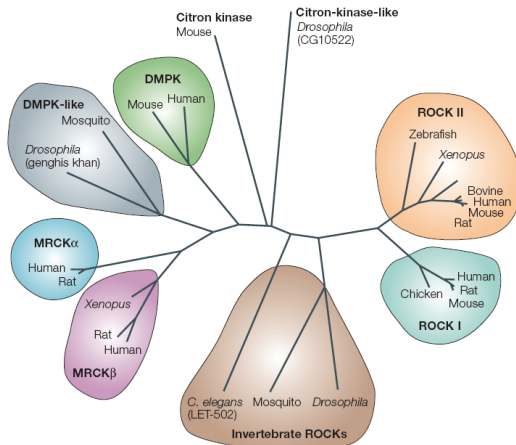
El gen de que codifica para la proteína DMPK tiene aproximadamente 14 Kb y codifica un ARN mensajero de 2,3 Kb con 15 exones que se traduce en una proteína de 624 aminoácidos [Mahadevan y cols., 1992]. Se localiza en el brazo largo del cromosoma humano 19, concretamente en el locus 19q13.3 [Brook y cols., 1992]. El gen *DMPK* está flanqueado por los genes *SIX5* y *DMWD* (figura 5).

### 3.2 DMPK: la proteína

DMPK es una serina/treonina quinasa que se consideró miembro de la gran familia AGC de quinasas [Hanks y Hunter, 1995] hasta que en 1997 el equipo de Andrew S. Kraft [Zhao y cols., 1997] la describió como la proteína tipo de que denominó “Familia de quinasas relacionadas con DMPK” (*DMPK-related family of kinases*). Estas complejas quinasas multidominio comparten un dominio catalítico altamente conservado así como una región “*coiled-coil*” (CC) que se ha relacionado con la regulación de su actividad.

### 3.3 Proteínas homólogas a DMPK

Además de DMPK, proteínas como las quinasas I y II asociadas a Rho (ROCKI/II) [Nakagawa, y cols., 1996; Ishizaki y cols., 1996], LET-502 de *C. elegans* [Wissman y cols., 1997], la quinasa Genghis Khan (Gek) en *Drosophila* [Luo y cols., 1997], la quinasa murina citron [Di Cunto y cols., 1998] y la proteína de rata MRCK (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase*) involucrada en el control de división celular [Leung y cols., 1998], son miembros de esta familia. Muchas de ellas actúan como efectores de las small Rho GTPases Rho, Rac y Cdc42 (figura 8). Varios miembros de esta familia están relacionados funcionalmente a eventos de reorganización del citoesqueleto: Gek se ha visto implicado en la polimerización de actina así como la quinasa citron, LET-502 y ROCKII en la contracción y formación del surco durante la citocinesis. Las quinasas ROCK fueron descritas inicialmente como mediadoras de los efectos de RhoA en la formación de fibras de estrés y adhesiones



focales. En dichos procesos, la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) por parte de ROCKs juega un papel importante [Riento y Ridley, 2003, Leung y cols., 1996].

**Figura 8.** Árbol filogenético quinasas homologas a DMPK. Entre los grupos que presentan homología con DMPK se encuentran ROCKs y las MRCK en tre otras. Reproducido de Riento y Ridley (2003).

### 3.4 Isoformas de DMPK

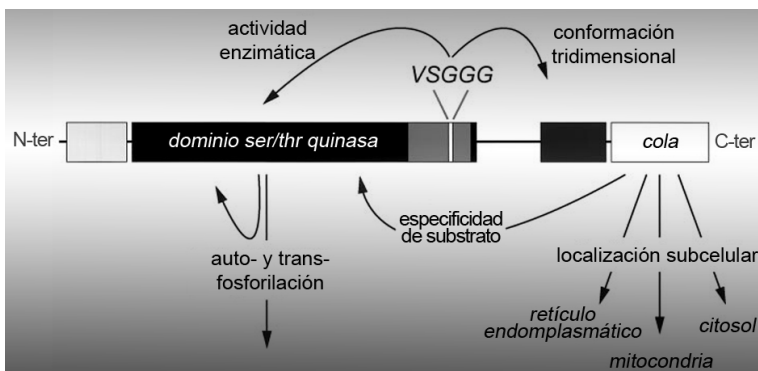
A partir de los datos inferidos de la estructura del gen y por estudios directos sobre la expresión de ARNm se mostró que en humanos y en ratón pueden aparecer varias isoformas de DMPK resultantes de procesos de *splicing* alternativo. Seis isoformas mayoritarias de ARNm (DMPK A, B, C, D, E y F) se forman por una combinación de tres eventos de *splicing* [Groenen y Wansink, 2000]. El dominio N-terminal (con una región rica en leucinas), el dominio catalítico (Ser/Thr quinasa) y el fragmento “*coiled-coil*” son comunes en las seis isoformas, en tanto que la variación conferida por los eventos de *splicing* determina la presencia/ausencia del motivo de 5 aminoácidos VSGGG y la naturaleza del extremo C-terminal. Aparentemente, el motivo VSGGG modularía la autofosforilación en tanto que la naturaleza del motivo C-terminal definiría la especificidad por el sustrato así como la localización dentro de la célula [Wansink y van Herpen, 2003]. Las isoformas recombinantes con extremos C-terminales hidrofóbicos se unen al retículo endoplasmático (RE) en tanto que las que poseen extremos hidrofílicos lo hacen con la membrana externa de la mitocondria. Asimismo, si el extremo C-terminal es muy corto, la isoforma de DMPK adopta una localización citoplasmática. En cuanto a la especificidad tisular, las isoformas con extremos C-terminales largos son predominantes en músculo esquelético y cardíaco, en tanto que las que tienen extremos cortos son más abundantes en el músculo esquelético liso [Jansen y cols., 1992; Groenen y Wansink, 2000].

Utilizando anticuerpos dirigidos contra el dominio C-terminal de la proteína, Maeda y colaboradores también detectaron dos isoformas inmunoreactivas de DMPK en

músculo esquelético y cardíaco con unos pesos moleculares aparentes de 71 y 80 kDa, localizando la proteína en las uniones neuromusculares en músculo esquelético y discos intercalares en corazón y fibras de Purkinje [Maeda y cols., 1995]. El análisis de biopsias de músculo esquelético utilizando un anticuerpo dirigido al dominio C-terminal reveló la existencia de dos formas de la quinasa: DMPK-1 y DMPK-2. Se propuso que la forma más grande, DMPK-1 es el producto directo de la traducción y que DMPK-2 es un producto de la proteólisis del extremo C-terminal de DMPK-1 [Bush y cols., 2000]. Sin embargo, cabe destacar que Lam y colaboradores, utilizando un panel de 16 anticuerpos contra distintos epítomos de DMPK, detectaron una sola proteína con un peso molecular de 80 kDa en músculo esquelético, cardíaco y en menor medida músculo liso [Lam y cols., 2000].

### 3.5 Dominios funcionales de DMPK

La funcionalidad de DMPK como quinasa de Ser/Thr se ha demostrado *in vitro* mediante un amplio espectro de péptidos sintéticos y sustratos putativos [Wansinky van Herpen, 2003; Bush y cols., 2000; Dunne y cols., 1994; Timchenko y cols., 1995]. El lugar propuesto de unión a ATP, la lisina 100 (Lys100), se pudo confirmar usando formas mutadas quinasa-deficientes (de lisina a alanina) [Jin y cols., 2000; Wansink y van Herpen, 2003]. El dominio C-terminal podría jugar un rol de autoinhibición dado que se ha visto que en formas carentes de éste la actividad de la quinasa frente a sustratos exógenos aumenta entre 3 y 5 veces (figura 9).



**Figura 9. Dominios de DMPK susceptibles de *splicing*.** El motivo VSGGG y la cola C-terminal. Basado en Wansink, 2003.

Se ha propuesto que la región C-terminal comprendida entre los residuos 550 y 629 actuaría como pseudosustrato y en la oligomerización de la proteína. En este punto es interesante destacar el hecho de que un dominio con la misma función existe en las

ROCK, reforzando más si cabe la relación entre estas dos proteínas [Amano y cols., 1999].

### 3.6 Expresión y localización de DMPK

Entre los esfuerzos iniciales dirigidos a aclarar la conexión entre la expansión de tripletes CTG en el gen *DMPK* y la patología de la DM1, uno de los análisis que se llevaron a cabo fue el de los niveles del ARNm de *DMPK* en tejidos de pacientes. La mayoría de estos estudios encontraron que la mutación DM1 conlleva una disminución en la cantidad total del ARNm de *DMPK* [Carango y cols., 1993; Hofman-Radvanyi y cols., 1993; Novelli y cols., 1993; Fu y cols., 1993; Koga y cols., 1994; Wang y cols., 1994]. Asimismo, otros estudios hallaron que los niveles de la proteína DMPK son más bajos de lo habitual en el corazón y músculo esquelético de los individuos con DM [Maeda y cols., 1995]. Más concretamente, la concentración de DMPK en el músculo esquelético de pacientes con DM1 se halló reducida en un 50%, sin que dicha reducción se correlacionase con el número de repeticiones del triplete CTG [Salvatori y cols., 2005]. En cuanto al patrón de expresión tisular de *DMPK*, hibridaciones *in situ* en el ratón demostraron que el ARNm de *DMPK* se encuentra presente en múltiples tejidos del adulto, incluyendo el músculo esquelético, corazón, músculo liso, hueso, testículos, pituitaria, cerebro, ojo, piel, timo, pulmón, epitelio intestinal, cartílago e hígado. En cambio, no se detectó expresión en ovario, páncreas y riñón [Sarkar y cols., 2004]. Por último, en embriones de ratón el ARNm de *dmpk* se detecta principalmente en la musculatura esquelética, músculo cardíaco, diafragma y músculo liso de pulmón y de intestino [Kaliman y cols., 2005].

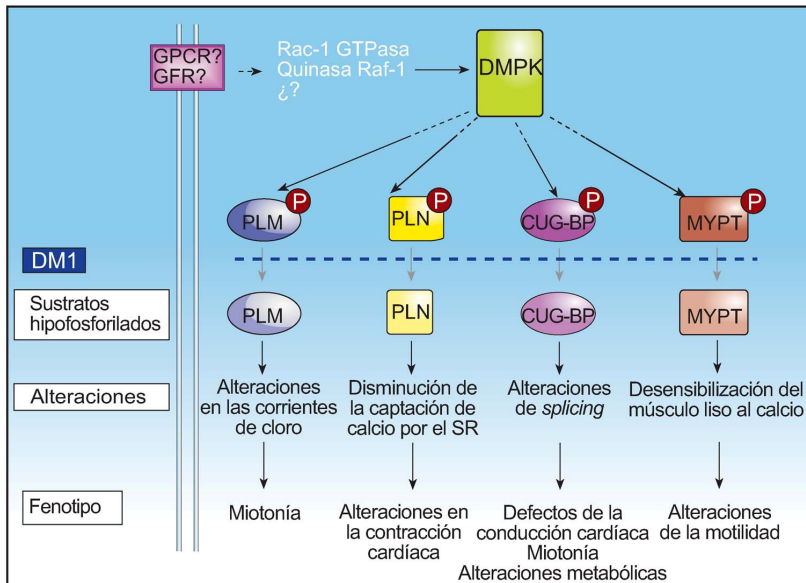
### 3.7 Regulación de la actividad DMPK

La similitud estructural de DMPK con los miembros de la familia de las Rho-quinetas ha llevado a especular sobre la posibilidad de que DMPK esté regulada *in vivo* por proteínas G pequeñas (*Small G-proteins*). Aunque DMPK no presenta lugares de unión evidentes para proteínas G, se ha visto que proteína DMPK aislada de células expuestas a GTP- $\gamma$ -S muestra aproximadamente el doble de actividad de la que presenta DMPK aislada de células sin tratar [Bush y cols., 2000]. Esta observación sería consistente con un mecanismo de regulación vía proteínas G. Sin embargo, queda por determinar si esta regulación tiene lugar mediante una unión directa a proteínas G, tal y como se da en las quinasas Rho, o si esto tiene lugar por

una vía indirecta. En el año 2000, Shimizu y colaboradores demostraron que la GTPasa asociada al citoesqueleto Rac-1 puede unirse a DMPK. De hecho, la co-expresión de Rac-1 y DMPK activa la actividad quinasa de esta última de manera sensible a GTP. El mismo equipo demostró que DMPK puede unirse a la quinasa Raf-1, activada por Ras, y que Raf-1 purificada fosforila y activa DMPK [Shimizu y cols., 2000].

### 3.8 Sustratos conocidos de DMPK

Los sustratos preferidos de DMPK son aquellos con un residuo de arginina en la posición -3 respecto del residuo aceptor de fosfato (serina o treonina), seguido por un residuo hidrofóbico (leucina o valina), seguida de nuevo por una arginina (R x x S/T L/V R) [Bush y cols., 2000]. Este motivo consenso es similar al de PKC, en cuanto a que tiene preferencia por residuos básicos cercanos, y también al de CaMK II, dado que prefiere la presencia de residuos hidrofóbicos en el extremo C-terminal del lugar aceptor. El *screening* de una librería de 35 péptidos sintéticos mostró que las secuencias óptimas de los sustratos de DMPK consistirían en 3 ó 4 argininas (o lisinas) en distintas posiciones N-terminales del residuo fosfoceptor [Wansink y van Herpen, 2003].



**Figura 10. Sustratos de DMPK descritos *in vitro*.** Esquema resumen de los sustratos de DMPK descritos en la literatura, ver texto para más información. PLM, Fosfoleman; PLN, fosfolamban; CUG-BP, proteína de unión a CUG, MYPT1, fosfatasa de la miosina 1.

### 3.8.1 Fosfoleman (PLM).

Es uno de los sustratos de membrana principal de las proteínas quinasas A y C (PKA y PKC). Induce corrientes de cloro (Cl) cuando se expresa en oocitos de la rana *Xenopus* [Mounsey y cols., 2000b]. PLM es un buen sustrato *in vitro* para la forma truncada C-terminal de Dmpk y la co-expresión de DMPK con PLM en oocitos reduce tanto las corrientes de Cl como la expresión de PLM en la membrana [Mounsey y cols., 2000b]. La confirmación de este mecanismo *in vivo* podría arrojar luz sobre una de las características fundamentales de la DM1, la miotonía. De hecho, estudios electrofisiológicos de la miotonía han demostrado una reducción en las corrientes de cloro y en la polarización de la membrana [Adrian y Bryant, 1974]. Conjuntamente, estudios genéticos han puesto de manifiesto en pacientes con miotonía congénita mutaciones en el gen codificante del canal de cloro en el músculo (CICN1) [O'Coilain y cols., 2004].

### 3.8.2 Fosfolamban (PLN).

Estudios electrofisiológicos llevados a cabo en músculo cardíaco de ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> mostraron que DMPK es crítica para la modulación de la contractilidad cardíaca así como para el mantenimiento de una actividad de conducción cardíaca apropiada [Jansen y cols., 1996; Berul y cols., 1999]. En condiciones fisiológicas, la fosforilación de PLN en la serina 16 por PKA lleva a un aumento proporcional del ritmo de captación de ión calcio (Ca<sup>2+</sup>) por el retículo sarcoplásmico (SR) y acelera la relajación ventricular [Arai, 2000]. Se ha reportado que en homogenados cardíacos obtenidos a partir de ratones *dmpk*<sup>-/-</sup>, PLN aparece hiperfosforilado [Pall y cols., 2003]. Sin embargo, en el año 2005, Kaliman y colaboradores demostraron que la serina 16 de PLN se encontraba hipofosforilada en vesículas de SR de homogenados ventriculares de ratón *dmpk*<sup>-/-</sup>, correlacionando esto con una reducción en la captación de Ca<sup>2+</sup> por el SR [Kaliman y cols., 2005].

### 3.8.3 Proteína de unión a CUG.

Se han descrito proteínas capaces de unirse a repeticiones de tripletes de ADN o de ARN [Timchenko, 1996a; Timchenko, 1996b]. La proteína CUG-BP/hNab50 es capaz de unirse a repeticiones del tipo (CUG)<sub>n</sub>, que es el tipo de triplete presente en el ARNm de DMPK. Cabe destacar que en pacientes de DM1 en homocigosis así como en los ratones *knock-out* para *dmpk*, tanto la distribución intracelular como el estado

de fosforilación de esta proteína se encuentra alterado. Se ha demostrado que CUG-BP es un sustrato de DMPK tanto *in vitro* como *in vivo* [Roberts, 1997]. En base a estas observaciones se ha propuesto un modelo constituido por un mecanismo que operaría en la DM1. En éste, las expansiones de repeticiones de CUG secuestran a la proteína CUG-BP y a la vez reducen la cantidad de DMPK. Los niveles disminuidos de DMPK tendrían como consecuencia un aumento de la forma hipofosforilada de CUG-BP, que se acumularía en los núcleos de las células y que alteraría los mecanismos generales de procesamiento de los ARNm (*splicing*). Se ha visto que la expresión de CUG-BP está aumentada en el músculo esquelético [Roberts y cols., 1997] y cardíaco [Timchenko y cols., 2001] de los pacientes de DM1 y que esto correlaciona con el *splicing* anormal de los pre-ARNm del receptor de insulina (R Ins) y de la troponina T cardíaca.

#### 3.8.4 Subunidad diana de la fosfatasa de miosina (MYPT1, *Myosin Phosphatase Target subunit*).

DMPK fosforila *in vitro* el dominio C-terminal de esta subunidad, inhibiendo así la actividad fosfatasa de este enzima, de la misma manera que lo hacen las Rho quinasas [Kimura y cols., 1996; Muranyi y cols., 2001]. La inhibición de esta fosfatasa implica un aumento en el nivel de fosforilación de la cadena ligera de la miosina, lo que se ha relacionado con la sensibilización al calcio en el músculo esquelético [Hartshorne y cols., 1998]. También se ha descrito que la MYPT1 está implicada en la regulación de la estructura del citoesqueleto en células no musculares (aumento de las fibras de estrés y las adhesiones focales) [Kaibuchi y cols., 1999].

### 3.9 Función de DMPK

#### 3.9.1 Integridad del músculo esquelético

*DMPK* se expresa principalmente en músculo esquelético y cardíaco [Lam y cols., 2000]. El promotor del gen confiere un nivel de expresión bajo pero que podría incrementarse mediante un elemento potenciador (*enhancer*) constituido por cajas conservadas de respuesta al factor de transcripción muscular MyoD en el primer intrón [Storbeck y cols., 1998]. En la línea celular miogénica de rata L6E9 y en la de mioblastos de ratón C2C12, la expresión de *DMPK* se induce a través de una vía miogénica canónica definida por la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), el factor nuclear



B (NF $\kappa$ B), la sintasa del óxido nítrico y la proteína p38 activada por mitógenos. Esta observación apoya la idea de que DMPK tiene un papel en la generación y/o mantenimiento del músculo esquelético [Canicio y cols., 2001; Carrasco y cols., 2002]. Estos datos son consistentes con los obtenidos a partir de ratones que carecen de *dmpk* y que desarrollan una miopatía progresiva en la edad adulta [Reddy y cols., 1996; Jansen y cols., 1996].

Por otro lado, los ratones transgénicos Tg26-hDMPK, que poseen 25 copias extra del gen intacto de *DMPK* humano con una extensión (CTG)<sub>11</sub>, son capaces de recapitular varias características musculares propias de la DM1 en animales de 11 a 15 meses de edad. La sobreproducción de proteína y/o ARN de *DMPK* humano (*wild type*) en estos animales se asoció a desajustes del citoesqueleto y a una distorsión de la homeostasis iónica en el corazón, músculo esquelético y en células de músculo liso. Estos animales mostraron dificultad al andar, atrofia de las fibras musculares de tipo I, una hipertrofia moderada de las fibras de tipo II, acumulación de mitocondrias en el espacio subsarcolemma y entre las miofibrillas y un aumento de las fibras con núcleos centrales. Se ha visto también que la sobre-expresión de *DMPK* en la línea C2C12 de ratón inhibe el proceso de diferenciación muscular terminal [Okoli y cols., 1998]. A la vista de este conjunto de datos parece lógico pensar que los niveles de proteína de DMPK son relevantes para obtener y mantener una estructura y una funcionalidad correcta del músculo esquelético.

### 3.9.2 Conducción cardíaca y canales iónicos

Los pacientes de DM1 presentan con frecuencia una disfunción progresiva del ventrículo izquierdo, enfermedad isquémica del corazón, embolismo pulmonar o muerte súbita [Pelargonio y cols., 2002].

Se ha demostrado que los ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> reproducen parte del fenotipo cardíaco observado en pacientes de DM1, por ejemplo un bloqueo atrioventricular (AV) de primer, segundo y tercer grado [Berul y cols., 1999; Berul y cols., 2000; Saba y cols., 1999]. Cabe destacar que en animales heterocigotos, *dmpk*<sup>+/-</sup>, también presentan un bloqueo AV de primer grado similar al observado en pacientes de DM1.

Por otra parte, estudios electrofisiológicos en músculo esquelético y cardíaco de pacientes de DM1 y de ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> mostraron defectos en el ciclo del calcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular [Jacobs y cols. 1993; Benders y cols., 1996 y 1997; Pall y cols., 2003]. La

disminución de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del SR en cardiomiocitos se detecta a las 14 semanas de edad en los ratones *dmpk*<sup>-/-</sup>, precediendo las primeras manifestaciones de debilidad muscular que aparecen entre los 7 y los 10 meses. Estas observaciones indican que los ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> presentan alteraciones cardíacas previas a las alteraciones del músculo esquelético [Reddy y cols., 2009; Kaliman y cols., 2005].

Benders y colaboradores, mostraron que la células de músculo esquelético de ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> diferenciadas *in vitro* (miotubos) muestran una mayor concentración basal de ión calcio intracelular que los miotubos que provienen de animales control, hecho que se ha correlacionado con una probabilidad de apertura alterada de los canales para los iones calcio y sodio dependientes de voltaje [Benders y cols., 1997]. Los miotubos mutantes presentan respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  menores y más lentas después del estímulo con acetilcolina o altas concentraciones extracelulares de ión potasio.

Otros estudios realizados en ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> mostraron que la apertura y cierre de los canales de ión sodio tenía lugar de manera anómala en los músculos esqueléticos y cardíacos indicando que DMPK podría estar asociada al silenciamiento de los canales de  $\text{Na}^+$  en músculo [Mounsey y cols., 2000a; Lee y cols., 2003]. En los ratones transgénicos Tg26-hDMPK se observó una expresión reducida del canal de cloro CIC-1 en el sarcolema del músculo esquelético junto con anomalías ultraestructurales de las miofibras [O'Coirlain y cols., 2004].

En conjunto, estos datos indican que DMPK modularía diversos aspectos de la homeostasis iónica aunque se requiere más investigación sobre este tema para comprender con más detalle los mecanismos implicados.

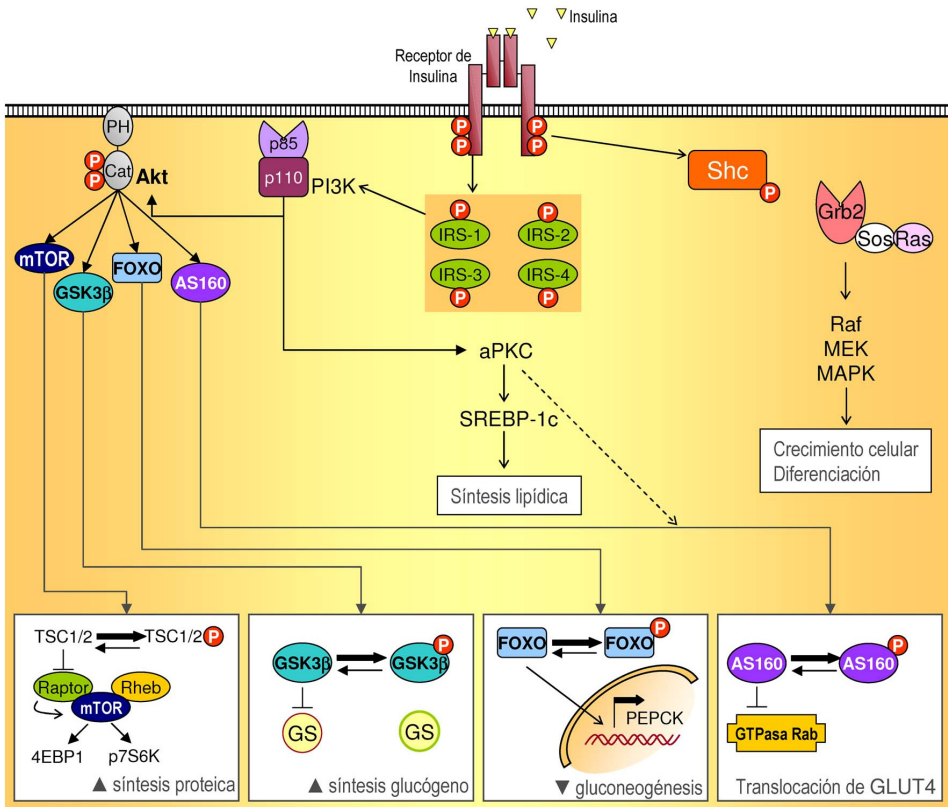
## Capítulo 4. La señalización de la insulina y el transporte de glucosa

El trabajo realizado durante esta tesis se ha dirigido principalmente a examinar el papel de DMPK, la proteína que codifica el gen alterado en la DM1, en la regulación de la homeóstasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina. Por ello, a continuación se describirán con más detalle las vías de señalización celular relevantes en el control de dichos procesos.

### 4.1 La cascada de señalización intracelular de la insulina

La captación de glucosa dependiente de insulina en tejido adiposo y en músculo esquelético es un evento crítico en la reducción de la concentración de glucosa plasmática postprandial. Las alteraciones en algún punto de este proceso pueden llevar al desarrollo de diabetes mellitus de tipo 2 [Khan y Pessin, 2002]. Se ha establecido claramente que la resistencia a la insulina precede al desarrollo de hiperglicemia [Stumvoll y cols., 2005].

La señalización de la insulina está mediada por una red altamente integrada y compleja que controla varios procesos (figura 11). En presencia de insulina, su receptor específico o IR (del inglés *Insulin Receptor*) se autofosforila y es capaz de fosforilar las tirosinas de una familia de proteínas denominadas IRS (del inglés *Insulin Receptor Substrate*) que están vinculadas a la activación de dos vías de señalización principales: la vía de PI3K/Akt, responsable de la mayoría de las acciones metabólicas de la insulina, y la vía de Ras/MAPK, que tiene un papel clave en la regulación de la expresión génica. A su vez, ambas participan en el control del crecimiento celular y la diferenciación [Taniguchi y cols., 2006].



**Figura 11. Esquema de las principales vías de señalización de la insulina.** La señalización activada por la unión de insulina a su receptor controla varios procesos que se encuentran integrados en una compleja red. Entre ellos el aumento de la síntesis del glucógeno en hígado y músculo esquelético, la disminución de la gluconeogénesis hepática, la translocación del transportador de glucosa a la membrana plasmática del músculo esquelético y el tejido adiposo y el aumento de la síntesis proteica. Para más información ver texto. Adaptado de Taniguchi, 2006.

La fosforilación de tirosinas en las proteínas IRS genera lugares de anclaje para aquellas proteínas que disponen de un sitio de tipo 2 homólogo a Src (SH2). Una de las proteínas que se une a este tipo de sitios es la p85, subunidad reguladora de la quinasa fosfatidilinositol 3' (PI3K). El reclutamiento de la subunidad reguladora acerca a la subunidad catalítica (p110) a la membrana plasmática donde fosforila las posiciones 3' de PI(4,5)-bisfosfato y de PI(4)-fosfato (PI, fosfatidilinositol). Esta fosforilación recluta y activa proteínas que contienen el dominio de homología a plekstrina incluyendo a PDK-1 y Akt. PDK-1 activa efectores de la vía como la proteínas quinasas C atípicas (aPKC, isoformas  $\lambda$  y  $\xi$ ) y también a la proteína Akt. La activación de Akt y de las PKC atípicas pone en marcha la translocación del transportador de glucosa dependiente de insulina GLUT4. Por lo tanto, en respuesta a la insulina, GLUT4 se transporta desde su reservorio intracelular hacia la membrana

plasmática donde activa el transporte de glucosa [Taniguchi y cols., 2006 y Thirone y cols., 2006].

Akt además fosforila varias proteínas con efecto sobre el metabolismo proteico y de la glucosa. La quinasa 3 de la glucógeno sintasa (GSK3) responsable de la inhibición de la glucógeno sintasa (GS) es uno de los sustratos principales. Cuando Akt fosforila GSK3, ésta deja de inhibir a la GS aumentando así la síntesis de glucógeno en las células. En hepatocitos, Akt inactiva por fosforilación a FOXO (*forkhead transcription factor*), responsable de la activación de genes gluconeogénicos [Puigserver y cols., 2003]. Otra acción de Akt es fosforilar e inhibir a la tuberina (TSC1, *Tuberous Sclerosis Complex*) que en complejo con la hamartina (TSC2) inhiben a mTOR. Una vez fosforilado mTOR queda libre y activa la transcripción de factores clave para la síntesis proteica [Harris y Lawrence, 2003].

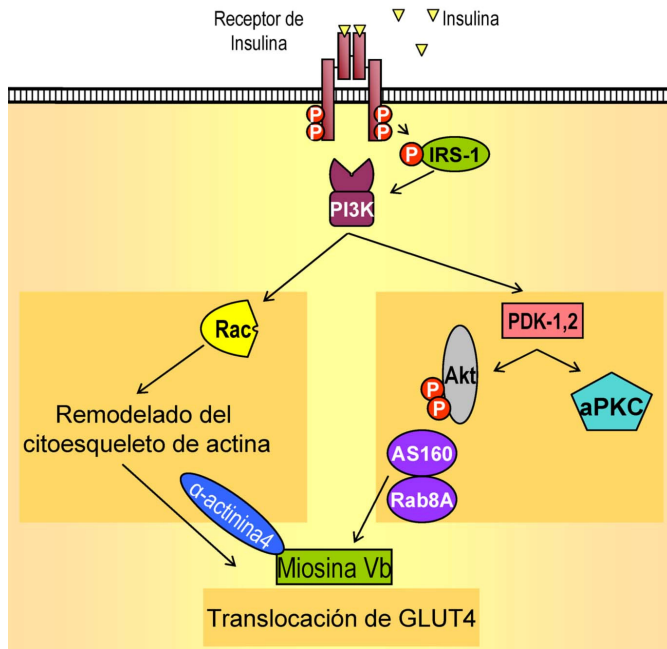
Así pues, en respuesta a la insulina, a través de GLUT4 la glucosa se transporta hacia el interior de las células musculares y adiposas donde es fosforilada por el enzima hexoquinasa. La glucosa-6-fosfato formada es entonces usada en la vía glucolítica o incorporada a las reservas de glucógeno muscular por la glucógeno sintasa [Savage y cols., 2007]. Datos obtenidos en varios estudios clínicos indican que en pacientes de diabetes de tipo 2 el transporte de glucosa es el paso limitante de la síntesis de glucógeno en músculo [Cline y cols., 1999; Rothman y cols., 1992; Rothman y cols., 1995; Petersen y cols., 1998]. Se ha sugerido que la resistencia a la insulina precede al desarrollo de la diabetes de tipo 2 en descendientes no obesos de diabéticos y en adultos obesos [Savage y cols., 2007].

## 4.2 GLUT4 y su translocación a la membrana plasmática

Uno de los mecanismos más caracterizados que da lugar a la aparición de resistencia a la insulina es el reclutamiento insuficiente de GLUT4 en membrana plasmática a pesar de la expresión normal de la proteína [Björnholm y Zierath, 2005].

En células adiposas y musculares en estado basal, GLUT4 se desplaza constitutivamente en un ciclo desde y hacia la membrana plasmática pero la organización dinámica de este ciclo se encuentra actualmente en debate [Dugani y Klip, 2005]. En general se acepta que la insulina promueve en buena parte la rama exocítica del ciclo de GLUT4 y en menor medida reduce la rama endocítica. El

aumento de la exocitosis de GLUT4 en repuesta a la insulina tiene lugar vía IRS-1 y PI3K. La activación de la vía en este punto se escinde en dos ramas (figura 12):



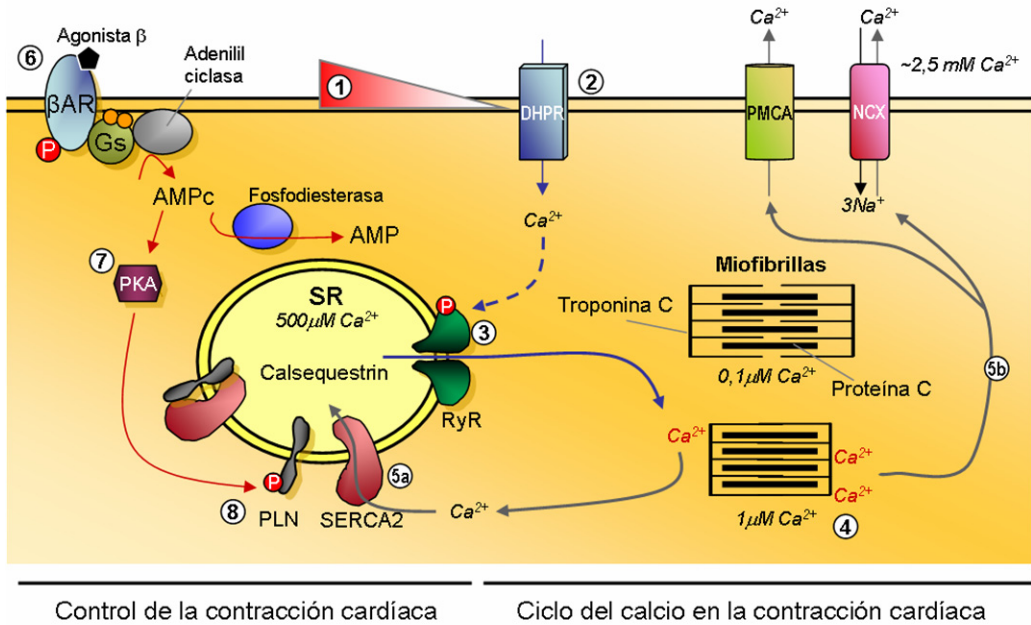
**Figura 12.** Esquema de las vías activadas por la insulina que participan en la translocación de GLUT4 en células musculares. Para más información ver texto. Adaptado de Klip, 2009.

Por un lado la activación de Akt por PI3K lleva a la fosforilación del sustrato de Akt de 160 kDa (AS160) quedando inhibida su capacidad para activar a proteínas RabGTPasa [Eguez y cols., 2005]. Ello implica que estas se estabilizan en su forma de unión a GTP [Ishikura y cols., 2008], evento que se ha relacionado con la promoción del tráfico de vesículas [Klip, 2009]. En células musculares se ha visto que Rab8A, con capacidad para unirse a los motores moleculares miosina Va y Vb [Roland y cols, 2007; 2009], está relacionada con el tráfico de GLUT4 [Ishikura y Klip, 2008]. Por otro lado, la activación de PI3K es esencial para la activación de Rac1, de la familia de las proteínas Rho, que se ha visto involucrada en la translocación de GLUT4 [JeBailey y cols, 2004; 2007]. La activación de Rac1 es importante en el remodelado de la actina, evento necesario en la translocación de GLUT4 inducida por insulina [Khayat y cols., 2000; Patel y cols., 2006]

## Capítulo 5. Mecanismos moleculares de la contracción y relajación cardíaca

Dado que parte del trabajo realizado durante esta tesis se ha dirigido a determinar la implicación de DMPK en la patología cardíaca y la señalización  $\beta$ -adrenérgica en DM1 a continuación se describen de manera general las vías que regulan estos procesos.

El control de la contracción y relajación cardíaca viene determinado por el reciclaje de calcio en los cardiomiocitos (figura 13). El sistema nervioso simpático es el encargado de enviar la señal de despolarización de las membranas en cada latido. Cuando esto ocurre los canales de calcio de la membrana plasmática, los receptores de dehidropiridina (DHPR), se abren dejando entrar una cantidad de calcio que es suficiente para abrir los canales de calcio del retículo sarcoendoplásmico (SR, del inglés *Sarcoplasmic Reticulum*), los receptores de rianodina (RyR). El aumento de la concentración de calcio en el citoplasma activa la contracción muscular de las miofibrillas mediante la unión del calcio a Troponina I y a proteína C. La contracción finaliza cuando el calcio es retirado del citoplasma hacia el SR por la bomba ATPasa de calcio del SR o SERCA. En humanos, el calcio citoplasmático que es capaz de captar y posteriormente liberar el SR es el 70% del total en tanto que en ratones representa el 90%. La captación de calcio por el SR limita la velocidad de relajación a la vez que la cantidad recuperada en el SR determina la fuerza de la siguiente contracción. El calcio que no se capta a través de SERCA hacia el SR, es retirado por las ATPasas de calcio de la membrana plasmática (PMCA, del inglés *Plasma Membrane Calcium ATPase*) y por los intercambiadores de sodio/calcio (NCX, del inglés *Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger*) [MacLennan y Kranias, 2003; Ter Keurs y Boyden, 2007].



**Figura 13. Esquema de las vías implicadas en el control de la contracción cardíaca.** (1) Tras la despolarización de la membrana se abren los canales de calcio DHPR (2) dejando pasar una cantidad de calcio suficiente para que los receptores RyR situados en el SR liberen una cantidad mayor de calcio (3). El aumento de calcio en el citoplasma provoca la contracción de las miofibrillas (4), éstas se relajan cuando la concentración de calcio en el citoplasma disminuye gracias a SERCA (5a) y a otras proteínas transportadoras de la membrana plasmática (5b). Cuando la demanda cardíaca aumenta, los receptores  $\beta$ -AR se activan (6) y a través de las proteínas G aumenta la concentración de AMPc que a su vez activa PKA (7). PKA fosforila PLN que libera a SERCA (8) aumentando así su actividad. Basado en MacLennan y Kranias, 2003 y Ter Keurs y Boyden, 2007.

Quando la demanda cardíaca aumenta el corazón puede responder al estrés mediante la activación de la vía  $\beta$ -adrenérgica. La activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ -AR) por adrenalina u otro agonista  $\beta$  provoca un aumento en la cantidad de AMP cíclico (AMPc) en la célula activando a la proteína quinasa dependiente de AMPc: PKA. Esta quinasa fosforila entre otras a una proteína transmembrana localizada en el SR: fosfolamban (PLN, Phospholamban), un inhibidor reversible de la bomba de calcio SERCA2. PLN es una proteína de 52 aminoácidos localizada en las membranas del SR. Posee dos residuos contiguos, Ser-16 y Thr-17, identificados como sitios de fosforilación de PKA y la quinasa dependiente de calmodulina, CaMKII, respectivamente [Jones y cols., 1985; Fujii y Ueno, 1987; Hagemann y Xiao, 2002]. En su estado fosforilado PLN se libera de su unión a SERCA2, permitiendo que se active el transporte de calcio hacia el SR. Por el contrario, cuando PLN no se encuentra fosforilada se une a SERCA2 e inhibe su actividad.



Con PLN fosforilada, SERCA2 aumenta su actividad captando más calcio, y aumentando la cantidad de calcio disponible para la siguiente contracción. Una vez finalizada la señal  $\beta$ -adrenérgica una fosfatasa defosforila a PLN que vuelve a inhibir parcialmente a SERCA2 [Hagemann y Xiao, 2002]. Una interacción crónica entre PLN y SERCA2 es el defecto crítico en la miocardiopatía dilatada [MacLennan y Kranias, 2003].

Nuestro grupo demostró que PLN se encuentra hipofosforilado en vesículas de SR procedentes de ratones *dmpk*<sup>-/-</sup> y sugirió que DMPK estaría implicada en el mecanismo de regulación de la contracción cardíaca [Kaliman y cols., 2005].



Objetivos

---



En este trabajo de tesis estudiamos la función de la proteína quinasa de la distrofia miotónica (DMPK) en las alteraciones cardiometabólicas asociadas a la distrofia miotónica de tipo 1 (DM1). Para ello, nos propusimos los siguientes subobjetivos:

1. Estudio del papel de DMPK en la homeóstasis de la glucosa y en la acción de la insulina.
2. Estudio del papel de DMPK en las alteraciones metabólicas inducidas por una dieta rica en grasas.
3. Estudio del papel de DMPK en la señalización  $\beta$ -adrenérgica y su impacto en la patofisiología cardíaca.



## Resultados y discusión

---





En este apartado se presentan y discuten los resultados obtenidos en este trabajo de tesis divididos en tres capítulos:

- (1) Papel de DMPK en la homeóstasis de la glucosa y en la acción de la insulina en músculo,
- (2) Inducción de adiposidad y resistencia a la insulina por dieta rica en grasas en animales que no expresan DMPK y
- (3) Papel de DMPK en la señalización  $\beta$ -adrenérgica y patofisiología cardíaca.

Al final del apartado se ha incluido una discusión general.

Los resultados presentados en los capítulos 1 y 2 han dado lugar a dos artículos publicados en el año 2007 y 2009, respectivamente, que se pueden consultar el apartado de Artículos publicados.



# Capítulo 1. Papel de DMPK en la homeóstasis de la glucosa y en la acción de la insulina en músculo.

## 1.1 Justificación y objetivo

Los pacientes de DM1 muestran con frecuencia niveles basales de insulina dentro de la normalidad pero liberan esta hormona en exceso tras una sobrecarga de glucosa [Cudworth y Walker, 1975], evento que indica una respuesta compensatoria de las células beta-pancreáticas. Este fenómeno es compatible con una situación de insensibilidad de los tejidos a la insulina [Krentz y cols., 1992; Vialettes y cols., 1986]. Se ha propuesto que un defecto en el procesamiento del ARN mensajero del receptor de la insulina sería el mecanismo responsable de la resistencia a la insulina observada en pacientes de DM1 (para más detalles ver el apartado 1.5.3: “*Resistencia a la insulina*” en la Introducción). A pesar de esto, hasta la realización del trabajo aquí presentado se desconocía si DMPK tenía algún papel en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Sabiendo que:

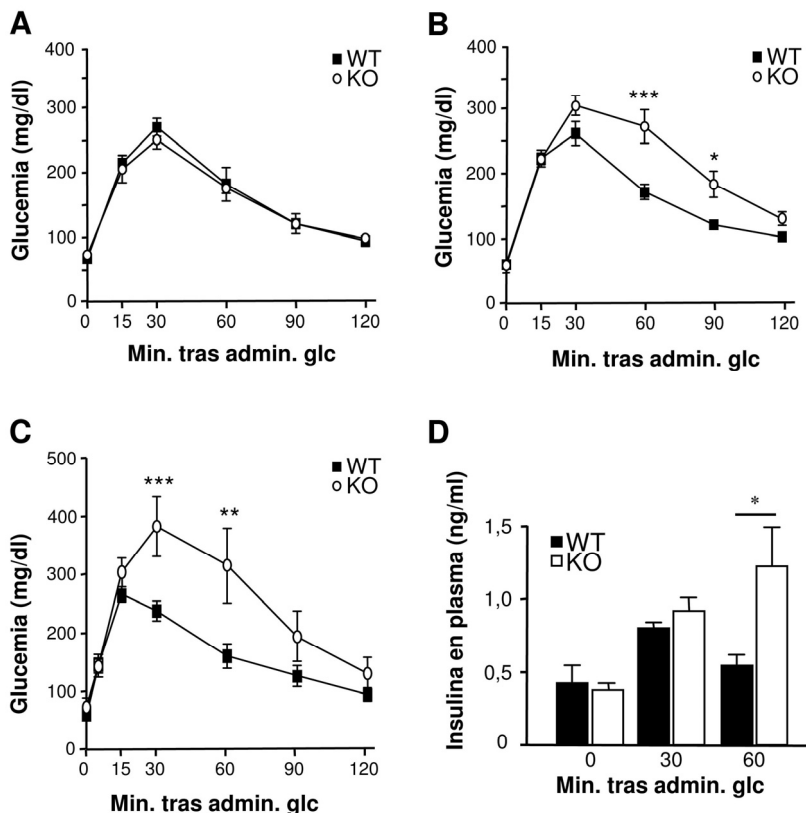
- 1) Los pacientes de DM1 muestran una disminución del 50% en la expresión de la proteína DMPK [Salvatori y cols., 2005],
- 2) Los estudios de modelos animales KO para DMPK sugieren que algunas de las características observadas en la patología de DM1 pueden ser debidas a la haploinsuficiencia de DMPK [Reddy y cols., 1996 y Jansen y cols., 1996],
- 3) El gen *dmpk* se localiza en una zona del cromosoma 19 (19q13) en la que 2 estudios independientes de ligación genómica han identificado *loci* cuantitativos o QTLs (del inglés *Quantitative Trait Loci*) para diabetes de tipo 2 [van Tilburg y cols., 2003 y An y cols., 2005 p909],

el objetivo de la primera parte de esta tesis fue analizar el posible papel de la proteína DMPK en la regulación de la acción de la insulina.

## 1.2 Resultados

### 1.2.1 Alteraciones metabólicas en los ratones *dmpk*-KO

En primer lugar se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa o GTT (del inglés *Glucose Tolerance Test*), con la finalidad de determinar si los animales que no expresan la proteína DMPK (*dmpk*-KO) presentaban alteraciones en la homeóstasis de la glucosa comparados con los controles o salvajes (*dmpk*-WT).



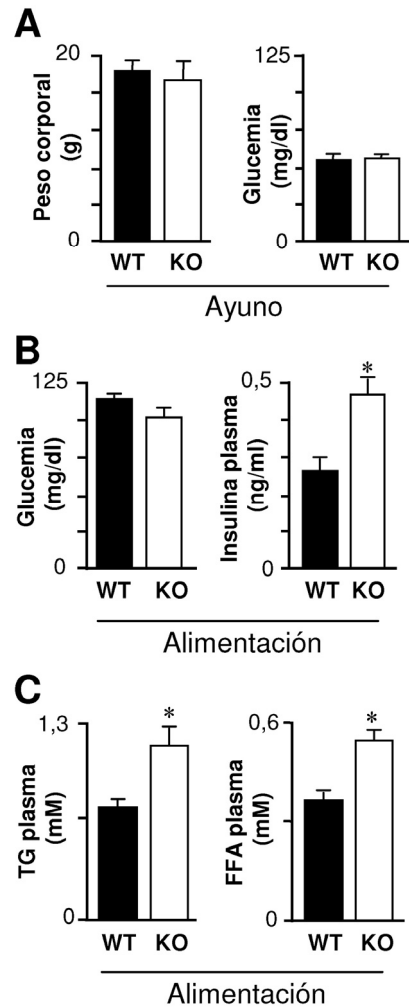
**Figura 14. Tolerancia a la glucosa.** Para el GTT se inyectó 2 mg/Kg de peso corporal de glucosa por vía intraperitoneal (i.p.) en animales ayunados 16 horas. Se realizaron extracciones de sangre para determinar la glucemia en los tiempos indicados. (A) GTT de animales *dmpk*-WT y *dmpk*-KO a las 4 semanas de edad y a las 8 semanas, machos (B) y hembras (C). (D) Niveles de insulina plasmática durante los GTT de las hembras de 8 semanas. (n= 5- 8 animales por grupo) \* p-valor <0,05, \*\* p-valor <0,001 y \*\*\* p-valor <0,0001.

Los estudios de GTT realizados en animales machos y hembras de cuatro semanas de edad no evidenciaron diferencias entre ratones *dmpk*-KO y *dmpk*-WT, (figura 14A). La glucemia alcanzó el máximo valor tras 30 minutos de la administración intraperitoneal de glucosa y descendió normalmente hasta recuperar los valores iniciales 2 horas después. En cambio, la tolerancia a la glucosa en

animales de 8 a 10 semanas de edad sí se encontró alterada en los animales *dmpk*-KO, tanto en machos (figura 14B) como en hembras (figura 14C). Los animales *dmpk*-KO presentaron un área bajo la curva significativamente mayor que los *dmpk*-WT (datos no mostrados) indicando que los ratones *dmpk*-KO presentan intolerancia a la glucosa con respecto a los controles. Los niveles de insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa fueron también mayores en los animales *dmpk*-KO respecto a los *dmpk*-WT (figura 14D).

Los animales *dmpk*-KO no mostraron diferencias en el peso corporal respecto a los *dmpk*-WT de la misma edad (figura 15A). Tampoco presentaron una glucemia en ayunas que se alejara de los niveles observados en los animales control (figura 15A). Los niveles de insulina (figura 14D) y triglicéridos (datos no mostrados) en ayunas fueron comparables entre animales *dmpk*-KO y *dmpk*-WT. En alimentación, la glucemia presentó niveles similares en ambos grupos. Sin embargo, los niveles de insulina fueron significativamente mayores en los animales *dmpk*-KO que en los *dmpk*-WT (figura 15B). También se observaron niveles más altos de lípidos en plasma, triglicéridos y ácidos grasos libres, en los ratones *dmpk*-KO (figura 15C).

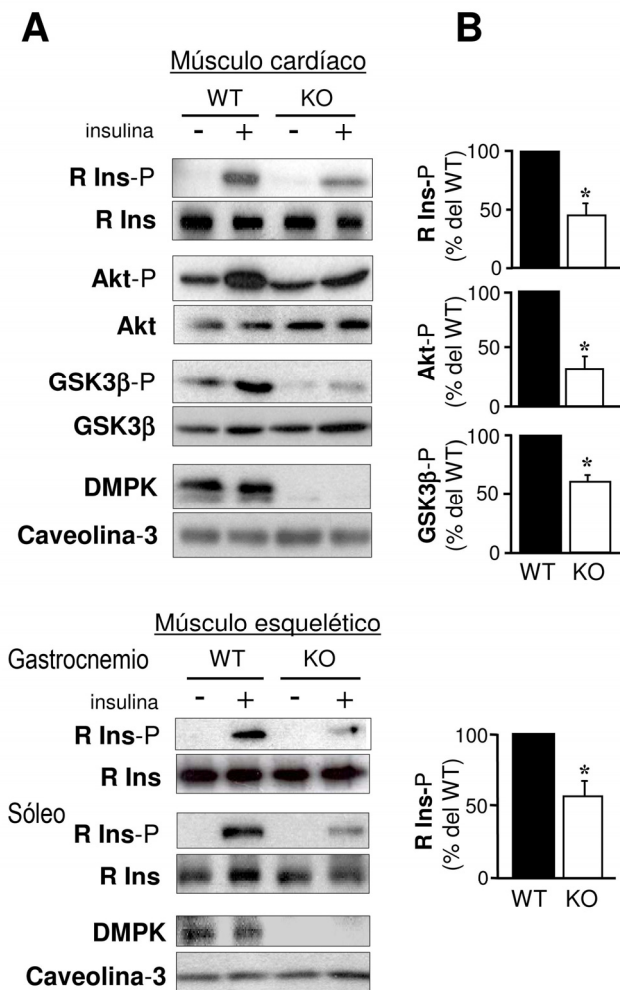
En conjunto estos datos sugieren que en los animales *dmpk*-KO existe una disminución en la sensibilidad tisular a la insulina.



**Figura 15. Parámetros metabólicos** (A) Peso corporal y glucemia de los animales *dmpk*-WT y *dmpk*-KO tras un ayuno de 16 horas. (B) Glucemia e insulina en plasma en ambos grupos en alimentación. (C) Triglicéridos (TG) y ácidos grasos libres o FFA (del inglés *Free Fatty Acids*) en alimentación. (n=8-14 por grupo) \* p-valor <0,05.

### 1.2.2 Los ratones *dmpk*-KO presentan defectos en la vía de señalización de la insulina en músculo esquelético y cardíaco

Para determinar si la vía de señalización de la insulina se encontraba alterada en los animales *dmpk*-KO se evaluó la expresión y los niveles de fosforilación de proteínas clave de esta vía. Se estudiaron el receptor de insulina (R Ins), la proteína quinasa B o Akt y la glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK3β) en los tejidos donde DMPK se expresa mayoritariamente, músculo esquelético y cardíaco. Se utilizó músculo sóleo por ser un tipo muscular constituido por fibras de tipo I o rojas y gastrocnemio, como representante de un tipo muscular mixto con fibras de tipo I y II.

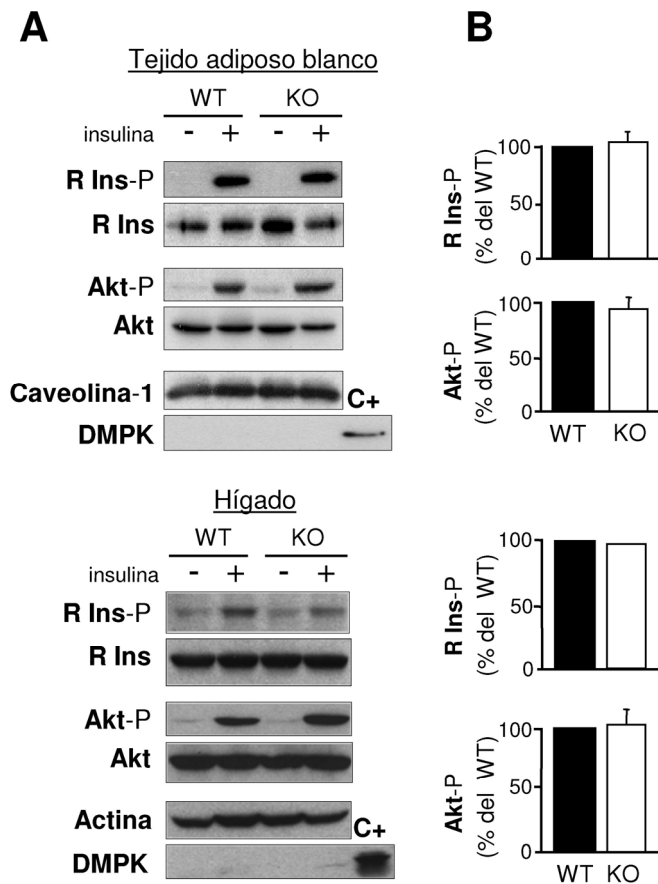


**Figura 16.** Expresión y estado de fosforilación de proteínas clave en la vía de señalización de la insulina en tejidos que expresan DMPK. (A). Tras ayunar a los ratones durante 16h se les inyectó 1 mg/Kg glucosa (i.p.). Tras 10 minutos se administró 10U/Kg de insulina i.p. Transcurridos 10 min más se extrajeron los músculos para la obtención de extractos proteicos. Los ensayos de Western-blot se realizaron con 50 µg de proteína. (B) Se cuantificaron como mínimo 3 experimentos independientes. \* p-valor <0,05.

Los ratones *dmpk*-KO mostraron niveles de expresión del receptor de insulina y de las quinasas Akt y GSK3β, similares a los de los animales *dmpk*-WT de la misma edad tanto en músculo esquelético como en músculo cardíaco (figura 16A). Sin embargo,

la fosforilación de dichas proteínas en respuesta a la insulina fue significativamente menor en los animales *dmpk*-KO comparados con animales *dmpk*-WT (figura 16A y B). Así, la fosforilación del receptor de insulina/receptor de IGF-I en los *dmpk*-KO (tirosinas 1150 y 1151 en el receptor de insulina y tirosinas 1135 y 1136 en el receptor de IGF-I) disminuyó un  $54\pm 10\%$  en músculo cardíaco respecto a los *dmpk*-WT y un  $44\pm 10\%$  en músculo esquelético. La cantidad de Akt fosforilada en animales *dmpk*-KO fue un  $39\pm 5\%$  de la que se observó en *dmpk*-WT y la de GSK3 $\beta$  un  $67\pm 9\%$ . En conjunto, los resultados indican una disminución en la activación de la vía de señalización de la insulina en músculo esquelético y cardíaco de los animales *dmpk*-KO respecto a los *dmpk*-WT.

Se comprobó la activación de la vía de la insulina en tejidos donde no se ha descrito expresión de DMPK tales como el tejido adiposo blanco y el hígado.



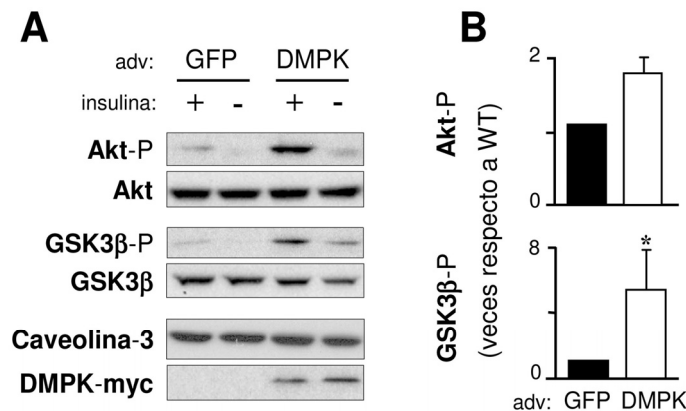
**Figura 17. Vía de señalización de la insulina en tejidos que no expresan DMPK.** (A). Las muestras de tejido se obtuvieron como se describe en la figura 3. Se utilizó un extracto cardíaco como control de expresión de DMPK. (B) Se cuantificaron como mínimo 3 experimentos independientes para obtener porcentajes de fosforilación respecto a los animales controles (*dmpk*-WT).

Los niveles de fosforilación del receptor de insulina y de la quinasa Akt en las muestras procedentes de animales *dmpk*-KO tras la estimulación con insulina fueron comparables a los que se observaron en las muestras de animales *dmpk*-WT (figura 17A). Las cuantificaciones de varios experimentos mostraron que no había diferencias significativas en los niveles de fosforilación (figura 17B).

Los datos obtenidos indican que la ausencia de DMPK en los tejidos donde habitualmente se expresa provoca una disminución en la activación de la vía de señalización de la insulina. Asimismo indican que las alteraciones observadas podrían encontrarse limitadas a aquellos tejidos en los que DMPK se expresa preferentemente.

### 1.2.3 La sobre-expresión de DMPK en mioblastos de ratón aumenta la activación de la vía de señalización de la insulina

Para confirmar el efecto de DMPK sobre la cascada de señalización de insulina se infectaron células de mioblastos de ratón, C2C12, con adenovirus recombinantes para DMPK fusionado a una etiqueta molecular "myc". Las células transducidas con el adenovirus recombinante para la forma salvaje o WT de DMPK mostraron niveles más altos de fosforilación de Akt y GSK3 $\beta$  tras la estimulación con insulina respecto a aquellas células transducidas con un adenovirus control que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) (figura 18A). Se observó un aumento de  $1,8\pm 0,2$  y  $5,5\pm 2,6$  veces en la fosforilación de Akt y GSK3 $\beta$  respectivamente en respuesta a la sobre-expresión de DMPK (figura 18B).



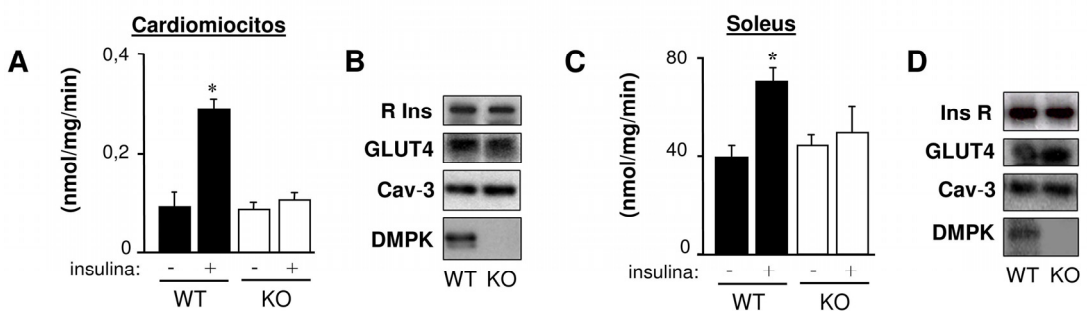
**Figura 18. Efecto de la sobre-expresión de DMPK en la vía de señalización de la insulina.** (A) Mioblastos C2C12 fueron tratados con 1 $\mu$ M de insulina durante 30 minutos. (B) Se cuantificaron como mínimo 3 experimentos independientes. \*p-valor<0,05



Los datos obtenidos indican que cuando se sobre-expresa DMPK en mioblastos aumenta la respuesta de fosforilación de proteínas clave de la vía de señalización de la insulina.

#### 1.2.4 El transporte de glucosa se encuentra disminuido en músculo esquelético y cardiomiocitos aislados de ratones *dmpk-KO*

Debido al defecto observado en la señalización de la insulina, nos propusimos estudiar el transporte de glucosa dependiente de insulina en músculo cardíaco y esquelético de ratones *dmpk-KO* y *dmpk-WT*. Se determinó la captación de glucosa tritiada (2-deoxi-D- $^3\text{H}$  glucosa) tras un tratamiento con insulina en músculo sóleo y cardiomiocitos aislados a partir de ventrículo izquierdo de corazón. El transporte de glucosa dependiente de insulina en ambos casos fue significativamente mayor para ratones *dmpk-WT* (figura 19A y C). Se determinó que esa disminución en el transporte de glucosa en muestras *dmpk-KO* no era debida a una menor cantidad del transportador de glucosa dependiente de insulina, GLUT4, ya que los niveles de expresión del mismo eran comparables en ambos grupos (figura 19B y D). También fueron similares los niveles de caveolina 3, la isoforma músculo-específica de caveolina, cuya expresión se ha encontrado alterada en otros tipos de distrofia muscular [Woodman y cols., 2004] y que participa en la captación de glucosa [Fecchi y cols., 2006].

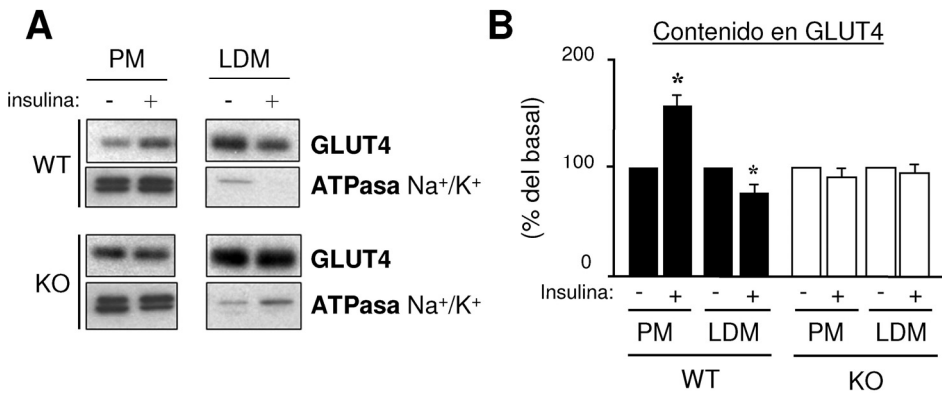


**Figura 19. Disminución del transporte de glucosa en ratones *dmpk-KO*.** Se cuantificó la captación de glucosa en cardiomiocitos aislados,  $n=6$ , (A) y en músculo soleus,  $n=3$ , (C) en respuesta a la insulina. La expresión del receptor de insulina (R Ins), GLUT4 y caveolina 3 se evaluó por Western-blot en cardiomiocitos (B) y en soleus (D). \* $p$ -valor $<0,05$ .

Este conjunto de datos indica que la disminución de la activación de la vía de la insulina afecta la capacidad de captación de glucosa en músculo cardíaco y esquelético de animales *dmpk-KO*.

### 1.2.5 Disminución de la translocación de GLUT4 a la membrana plasmática en músculo cardíaco de ratones *dmpk-KO*

Un evento crítico para captación de glucosa en respuesta a la insulina es la translocación de GLUT4 desde los compartimentos intracelulares hasta la membrana plasmática. Para estudiar si este mecanismo funcionaba correctamente en los ratones *dmpk-KO*, se realizaron fraccionamientos subcelulares a partir de músculo cardíaco de animales *dmpk-KO* y *dmpk-WT*. Los homogenados se fraccionaron por centrifugaciones sucesivas y de velocidades crecientes con el objetivo de obtener fracciones enriquecidas en microsomas de baja densidad (compartimentos intracelulares) y fracciones de membrana plasmática. Se controló la pureza de las fracciones de microsomas de baja densidad o LDM obtenidos (del inglés *Low Density Microsome*) observando la ausencia en las mismas de la sodio potasio ATPasa ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa), una proteína esencialmente localizada en la membrana plasmática. Por el contrario, dicha proteína se encontró enriquecida en la fracción correspondiente a membrana plasmática o PM (del inglés *Plasma Membrane*) (figura 20A).



**Figura 20. Translocación de GLUT4 en respuesta a la insulina en músculo cardíaco.** (A) Translocación del transportador de glucosa dependiente de insulina, GLUT4, desde compartimentos intracelulares (LDM, Low Density Microsomes) a la membrana plasmática (PM). (B) Cuantificación de la translocación de GLUT4 ( $n=3$ ). \* $p$ -valor $<0,05$ .

En muestras que provenían de animales *dmpk-WT*, el contenido de GLUT4 en la fracción PM aumentó un  $51 \pm 15\%$  tras la inyección de insulina en detrimento del contenido de la fracción LDM que disminuyó un  $23 \pm 4\%$ . La translocación de GLUT4 desde la fracción intracelular a la membrana plasmática (de LDM a PM) no se detectó en los animales *dmpk-KO* (figura 20B).

Estos datos sugieren que la alteración en la captación de glucosa en animales *dmpk-KO* resulta de una disminución de la capacidad de la insulina para inducir la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática.

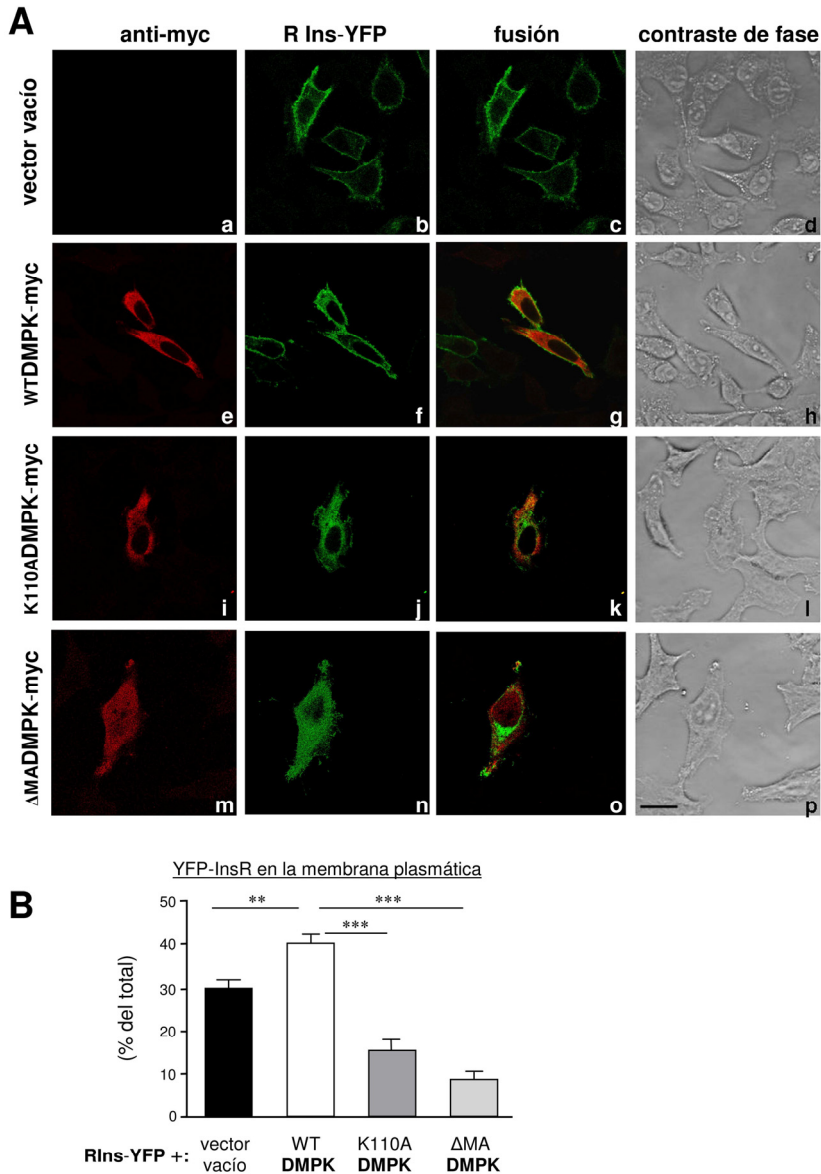
### 1.2.6 Alteración de la localización de los receptores de insulina y de IGF-1 en células HeLa que sobre-expresan formas mutadas de DMPK

Dado que en los animales *dmpk-KO* la activación de la vía de señalización de la insulina se encontró afectada desde uno de sus primeros eventos, esto es a nivel de fosforilación del receptor de insulina, se analizó si DMPK estaba implicada en la regulación de la disponibilidad de dicho receptor en la membrana plasmática. Para ello, se co-transfectaron transitoriamente células HeLa con un plásmido codificante para el receptor de la insulina fusionado a la proteína fluorescente amarilla o YFP (del inglés *Yellow Fluorescent Protein*) y uno de los siguientes plásmidos de expresión:

- a) control vacío (pCDNA4),
- b) pCIneo myc-DMPK salvaje o WT,
- c) pCIneo myc-DMPK sin actividad quinasa o K110A (contiene una mutación de una lisina por una alanina en el dominio de unión a ATP), o
- d) pCIneo myc-DMPK  $\Delta$ MA (presenta una delección del dominio C-terminal y se ha descrito como una quinasa más activa que la forma salvaje) [Bush y cols., 2000].

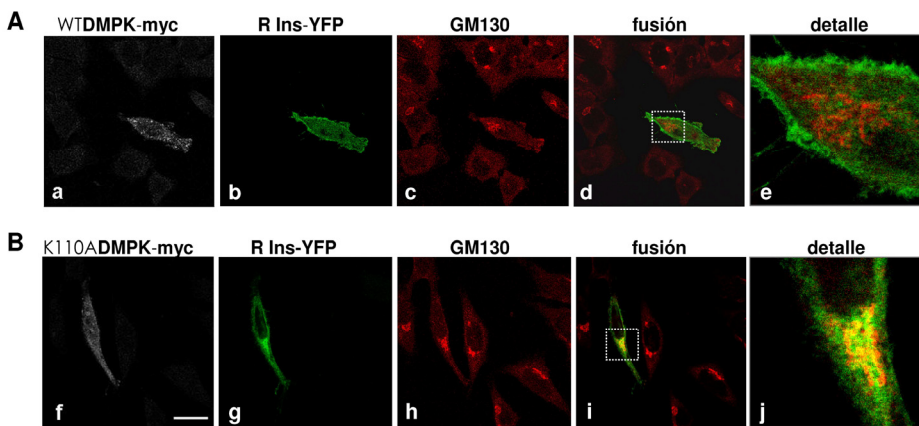
Se sabe que en estado basal (sin estimulación por ligando) el receptor de la insulina se localiza mayoritariamente en la membrana plasmática [Marshall, 1985]. Esto fue lo observado en las células que expresaban el vector vacío o la forma WT de DMPK y que habían sido mantenidas durante 2 horas en un medio sin suero: el receptor de insulina fusionado a YFP (R Ins-YFP) se localizaba en la membrana plasmática (figura 21A, a-d y e-h). Sin embargo, análisis cuantitativos mostraron que la sobre-expresión de la forma WT de DMPK inducía un aumento significativo en la cantidad de receptor de insulina en la membrana plasmática cuando se comparaba con las células control (figura 21B). Por el contrario, la presencia de cualquiera de las dos formas mutadas de DMPK, K110A ó  $\Delta$ MA, hacía que el receptor de insulina-YFP apareciera retenido en estructuras intracelulares (figura 21A, i-l y m-p) sin mostrar colocalización evidente con DMPK. Para ambas formas mutadas de DMPK, los

porcentajes de receptor de insulina en la membrana plasmática se encontraban significativamente disminuidos comparados con las células control (figura 21B).



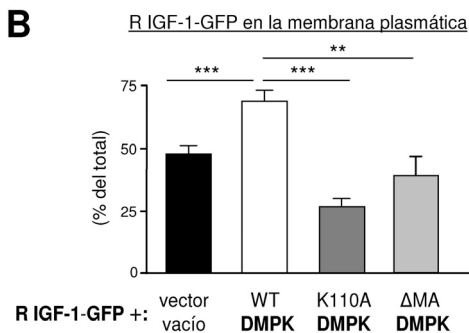
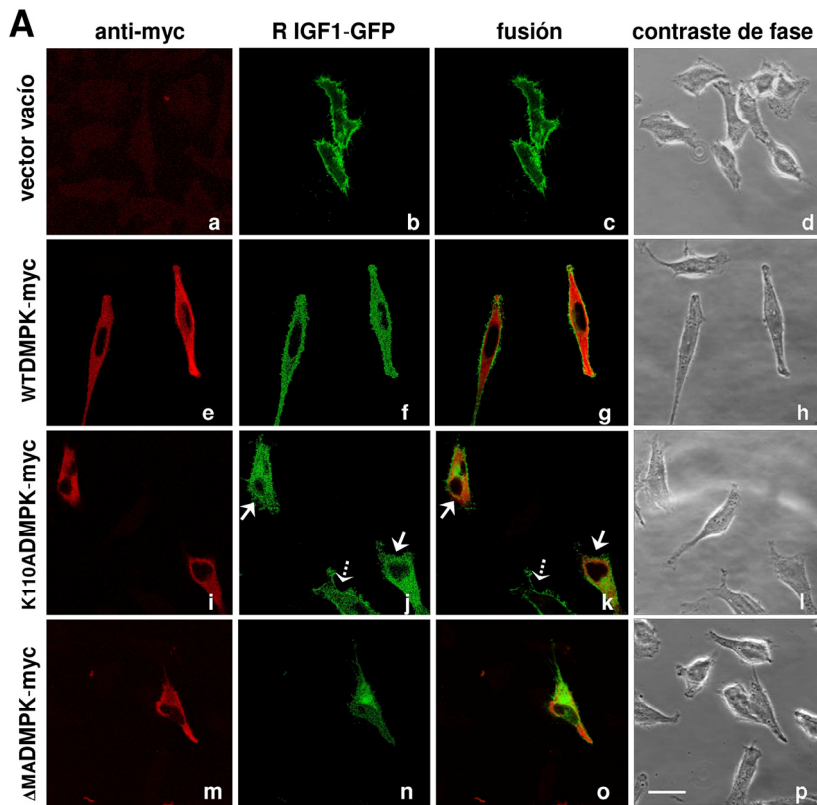
**Figura 21. Efecto de DMPK en la localización celular del receptor de insulina.** (A) Se transfectaron células HeLa con vectores que codificaban para el receptor de insulina fusionado a YFP (R Ins-YFP) junto con un vector control vacío (a-d), la forma WT de DMPK (e-h), la forma sin actividad quinasa, K110A (i-l), o la deletada en el dominio C-terminal,  $\Delta$ MA (m-p). Las imágenes que se muestran son ejemplos de 3 experimentos independientes. La escala de las imágenes equivale a 24  $\mu$ m representados por la barra (p). (B) La gráfica de barras muestra la cuantificación mediante el software Image J del porcentaje de receptor de insulina en localizado en la membrana plasmática. Se analizaron 20 células de cada condición de tres experimentos independientes. Los datos son medias  $\pm$  desviaciones estándar; \*\*p-valor<0,001; \*\*\*p-valor<0,0001.

Para identificar los compartimentos intracelulares en los que el receptor de insulina-YFP se encontraba retenido, las células HeLa se transfectaron transitoriamente con plásmidos codificantes para la forma salvaje (WT) o para la forma sin actividad quinasa (K110A) de DMPK y se comprobó la colocalización con distintos marcadores intracelulares. Estos estudios revelaron que en presencia de DMPK-K110A la señal del receptor de insulina-YFP colocalizaba en gran medida con el marcador de la matriz de Golgi GM130 (figura 22). No se encontraron en cambio evidencias de colocalización con marcadores propios de endosomas tempranos (EEA1) o de reciclaje (Receptor de Transferrina).



**Figura 22. Efecto de la sobre-expresión de las formas de DMPK WT y mutante en la distribución subcelular del receptor de insulina.** Células HeLa co-transfectadas transitoriamente con el receptor de insulina fusionado a YFP y la forma WT de DMPK (A) o bien la forma sin actividad quinasa, K110A (B). En verde se muestra el receptor de insulina y en rojo el marcador de Golgi GM130. La escala de las imágenes equivale a 24  $\mu\text{m}$  representados por la barra. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

También se analizó el efecto de DMPK en la localización intracelular del receptor de IGF-1 (del inglés *Insulin-like Growth Factor Receptor*), que presenta homología estructural y funcional con el receptor de la insulina. Para ello, se realizaron estudios idénticos a los descritos para el receptor de insulina pero utilizando un plásmido que codifica para IGF-1R fusionado a la proteína fluorescente verde o GFP (*Green Fluorescent Protein*) (R IGF-GFP). Los resultados fueron similares a los obtenidos con el receptor de insulina (figura 23).



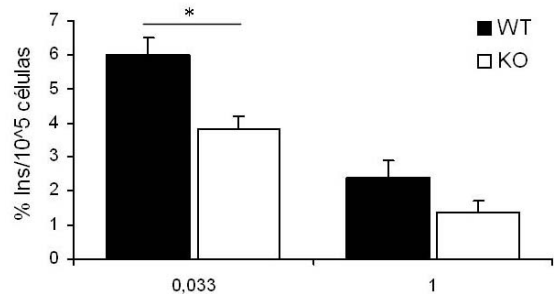
**Figura 23. Efecto de la sobre-expresión de las formas de DMPK WT y mutante en la distribución subcelular del receptor de IGF-1.** (A) Se transfectaron células HeLa con vectores que codificaban para el receptor de IGF-1 fusionado a GFP (R IGF-1-GFP) junto con un vector control vacío (a-d), la forma WT de DMPK (e-h), la forma quinasa deficiente, K110A (i-l), o la delecionada en el dominio C-terminal, ΔMA (m-p). Las imágenes que se muestran son ejemplos de 3 experimentos independientes. La escala de las imágenes equivale a 24 μm representados por la barra (p). (B) La gráfica de barras muestra la cuantificación mediante el software Image J del porcentaje de receptor de IGF-1 localizado en la membrana plasmática. Se analizaron 20 células de cada condición de tres experimentos independientes. Los datos son medias ± desviaciones estándar; \*\*p-valor<0,001; \*\*\*p-valor<0,0001.

Así, en las células co-transfectadas con el vector vacío o la forma WT de DMPK, el receptor de IGF-1R-GFP se localizó en la membrana plasmática (figura 23A, a-d y e-h). Por el contrario, la presencia de las formas mutadas de DMPK, K110A ó ΔMA, hizo

que el receptor de IGF-1R-GFP se encontrara retenido en compartimentos intracelulares (figura 23A, i-l y m-p).

### 1.2.7 Disminución de la unión de la insulina a la membrana plasmática en cardiomiocitos aislados de ratones *dmpk*-KO

Los resultados anteriores sugieren que DMPK estaría implicada en la regulación del tráfico intracelular del receptor de insulina. Para confirmar este mecanismo analizamos si las células provenientes de músculo cardíaco de los animales *dmpk*-KO tenían también una disminución en la cantidad de receptor de insulina presente en la membrana plasmática. Se aislaron cardiomiocitos a partir de ventrículo izquierdo de ratones *dmpk*-



**Figura 24. Unión de la insulina a cardiomiocitos aislados.** Cardiomiocitos aislados a partir de ventrículo de ratón se expusieron a 2 dosis de insulina (0,033 y 1 nM) a una temperatura de 16°C para evitar la internalización del receptor unido al ligando. Después de un lavado se comprobó la cantidad de insulina radioactiva unida a los cardiomiocitos. Los resultados se expresan como % de insulina-<sup>125</sup>I unida de manera específica. \*p-valor<0,05.

WT y *dmpk*-KO y se determinó la capacidad de unión de la insulina a la membrana plasmática. Los ensayos de unión a insulina marcada con yodo radioactivo (insulina-<sup>125</sup>I) mostraron una disminución del 36±8% en la capacidad de unión de insulina a los cardiomiocitos procedentes de animales *dmpk*-KO (figura 24). El porcentaje de insulina-<sup>125</sup>I desplazada en condiciones saturantes de insulina no marcada radiactivamente fue comparable en cardiomiocitos *dmpk*-WT y *dmpk*-KO siendo del 58±13% y 62±8% respectivamente.

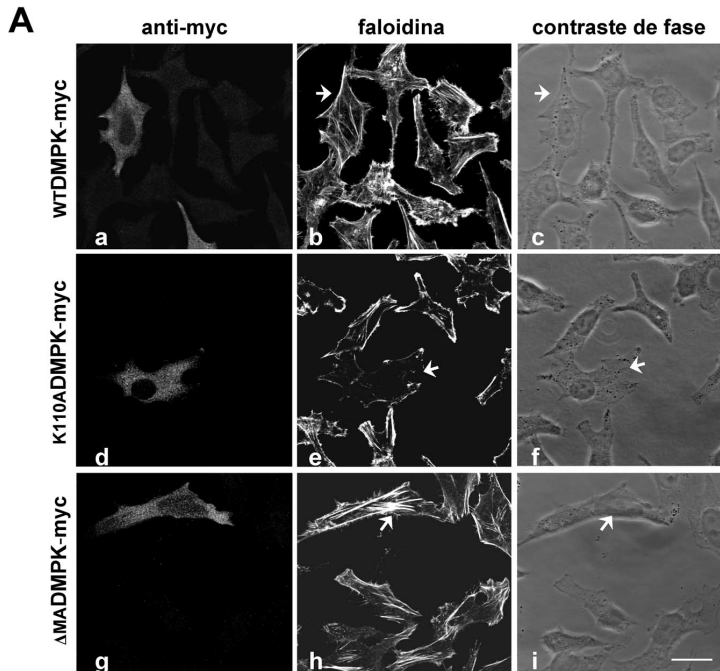
Estos resultados sugieren que existe un menor número de receptores disponibles en la membrana plasmática de los cardiomiocitos de ratones *dmpk*-KO, sin cambios en la afinidad del receptor por su ligando.

### 1.2.8 Alteración del citoesqueleto en células HeLa que sobre-expresan formas mutadas de DMPK

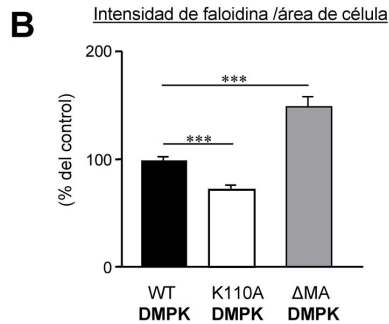
Los datos presentados indican que la ausencia de DMPK provocaba una alteración en la activación de la vía de señalización de la insulina afectando la fosforilación

intracelular de proteínas y la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática. Los resultados de los experimentos realizados sugieren que la disminución de la señal en la vía es debida a la menor disponibilidad de los receptores de insulina y de IGF-1 en la membrana plasmática. Quedaba por explicar cómo era posible que la ausencia de DMPK en los tejidos musculares esquelético y cardíaco provocara un defecto en el tráfico intracelular de los receptores.

Recientemente se ha demostrado que la desorganización del citoesqueleto de actina provoca alteraciones en la localización y señalización del receptor de insulina [Foti y cols., 2007]. También se ha descrito que la sobre-expresión de DMPK induce la reorganización del citoesqueleto de actina y la aparición de características propias de apoptosis en células epiteliales en cultivo de cristalino del ojo [Jin y cols., 2000]. Estas observaciones nos llevaron a analizar el posible papel de DMPK sobre el citoesqueleto, evaluando la formación de haces de filamentos de actina o fibras de estrés. Se utilizaron los plásmidos de expresión de DMPK descritos previamente (ver apartado 1.2.6) para transfectar transitoriamente células HeLa y se usó faloidina para marcar las fibras de estrés.







**Figura 25. La sobreexpresión de formas mutantes de DMPK provoca alteraciones en la formación de fibras de estrés.** Se transfecaron transitoriamente células HeLa con la forma WT, quinasa deficiente (K110A) o la delecionada ( $\Delta$ MA) de DMPK. Se evaluó la cantidad de fibras de estrés formadas mediante la unión de faloidina a las fibras de actina (A). Las imágenes presentadas son representativas de tres experimentos independientes. La barra representa  $24 \mu\text{m}$ . (B) Cuantificación de 20 células de cada uno de los 3 experimentos independientes se realizó mediante el software Image J. \*\*\* p-valor<0,0001

Como se observa en la figura 25, las células que expresaban la forma WT de la proteína no se distinguían de las células control no transfectadas (figura 25A, a-c). Las células transfectadas con el plásmido que codifica para la forma sin actividad quinasa de DMPK (K110A) se distinguían del resto por presentar menos fibras de estrés (figura 25A, d-f). Por el contrario aquellas que expresaban la forma delecionada de DMPK ( $\Delta$ MA) mostraban un claro aumento de este tipo de fibras (figura 25A, g-i). La cuantificación de los datos mostró que las diferencias en la formación de fibras de estrés en presencia de los diferentes constructos de DMPK era significativa (figura 25B).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la intolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina en tejidos musculares de animales *dmpk*-KO estarían causadas por una disminución de la disponibilidad de los receptores de insulina e IGF-1 en la membrana plasmática probablemente debido a la afectación del citoesqueleto de actina por la ausencia de DMPK.

### 1.3 Discusión

En el trabajo realizado en este bloque se analizó el posible papel metabólico de DMPK, una quinasa de serinas y treoninas poco caracterizada hasta la fecha. La DMPK se expresa en tejidos musculares. Nuestros resultados indican que tanto en músculo esquelético como cardíaco los ratones que no expresan DMPK (*dmpk*-KO) tienen defectos en la vía de señalización de la insulina. Los datos muestran que los ratones *dmpk*-KO comparados con los *dmpk*-WT desarrollan las siguientes alteraciones metabólicas:

- 1) Niveles elevados de glucemia en las pruebas de tolerancia a la glucosa,
- 2) aumento de los niveles plasmáticos de insulina y lípidos en condiciones de alimentación.

De la misma manera que se observa en los pacientes de DM1 [Krentz y cols., 1992], los ratones *dmpk*-KO muestran concentraciones de insulina mayores que las de los animales *dmpk*-WT en las pruebas de tolerancia a la glucosa. La captación de glucosa en estos animales aparece alterada así como la translocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática. Por otro lado observamos que en tejidos donde DMPK no se expresa, como el adiposo blanco y el hepático, la vía de señalización de la insulina no se encuentra alterada.

La unión de la insulina a su receptor provoca la autofosforilación y consecuente activación de dicho receptor. Este proceso encuentra influenciado por el número de receptores disponibles en la membrana plasmática. Un tráfico intracelular correcto de los receptores es crítico para la sensibilidad a la insulina. De hecho, se ha demostrado que mutaciones en el gen del receptor de insulina que empeoran la translocación del mismo a la membrana plasmática conducen a diabetes de tipo 2 en humanos [Accili y cols., 1989]. Tras la unión de la insulina al receptor, éste es rápidamente internalizado y, o bien es enviado a lisosomas para su degradación, o bien se recicla hacia la membrana plasmática para estar de nuevo disponible para una nueva oleada de señal insulínica [Knutson, 1991].

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que:

- 1) el nivel de expresión del receptor de insulina en los animales *dmpk*-KO es normal,

- 2) la unión de insulina a la membrana plasmática de los cardiomiocitos está disminuida,
- 3) la sobreexpresión de las formas de DMPK mutadas K110A (sin actividad quinasa) y  $\Delta$ MA (extremo C-terminal deletado), conducen a la retención del receptor de insulina en compartimentos intracelulares,
- 4) la sobreexpresión de la forma salvaje de DMPK aumenta el porcentaje de receptor de insulina en la superficie celular.

En conjunto estos datos parecen indicar que la proteína DMPK se encuentra implicada en el tráfico intracelular del receptor de insulina. Aún así, este mecanismo molecular no puede explicar totalmente el fenotipo metabólico observado en los animales *dmpk*-KO. De hecho, los ratones KO para el receptor de insulina en músculo o MIRKO (de las siglas en inglés *Muscle Insulin Receptor Knock Out*), no presentan intolerancia a la glucosa. Se ha propuesto que ello se debería a que el tejido adiposo compensa la insensibilidad a la insulina muscular y a que el receptor de IGF-1 también puede unir insulina y transducir su señal [Bruning y cols., 1998]. Sin embargo, sí se ha observado que la inactivación funcional conjunta de los receptores de insulina e IGF-1 (ratones MKR) lleva al desarrollo de diabetes de tipo 2 [Fernandez y cols., 2001]. Por este motivo, analizamos también el papel de la DMPK en la localización del receptor de IGF-1. Nuestros datos indican que la falta de actividad DMPK provoca una disminución de la localización de receptores de insulina y de IGF-1 en la membrana plasmática, situación funcionalmente similar aunque menos severa que la de los ratones MKR. Cabe destacar que las pruebas de tolerancia a la glucosa obtenidas en los ratones MKR de cuatro semanas son comparables a las de los ratones *dmpk*-KO a las 8-10 semanas de edad. Sin embargo, estos últimos no desarrollan diabetes de tipo 2. El fenotipo observado, más suave que el de los animales MKR, concuerda con un mecanismo que implicaría una reducción de la función de los receptores de insulina y de IGF-1 en lugar de una inactivación total de estos.

Los dominios quinasa y C-terminal en la proteína DMPK parecen desempeñar un papel de regulador positivo y negativo respectivamente en la reorganización del citoesqueleto de actina. Funciones similares han sido ya descritas para DMPK en células que forman el cristalino del ojo [Jin y cols., 2000] y para dominios homólogos en la quinasa Rho  $\alpha$  [Leung y cols., 1996]. Tanto la forma de la DMPK sin actividad quinasa (K110A) como la que tiene el extremo C-terminal deletado ( $\Delta$ MA) alteran a

la vez la localización de los receptores de insulina y de IGF-1 en la membrana plasmática y la formación de fibras de estrés. Se sabe que la alteración del citoesqueleto de actina por toxinas que despolimerizan o estabilizan los filamentos, implica cambios estructurales significativos en el complejo de Golgi [Egea y cols., 2006]. Cabe destacar que detectamos que la acumulación del receptor de insulina en presencia de las formas mutadas de la DMPK co-localiza parcialmente con el marcador de la matriz de Golgi GM130. En este contexto, un posible mecanismo para explicar nuestras observaciones sería que DMPK, a través de un efecto regulador de la dinámica del citoesqueleto de actina, participara en la formación o la transición de elementos responsables del transporte derivados de Golgi o PGC (del inglés *Post-Golgi Carriers*).

En resumen, este conjunto de datos proporcionan evidencias *in vivo* e *in vitro* del papel de DMPK en la regulación de la acción de la insulina y de la homeostasis de la glucosa. Estos resultados indican que una reducción de la expresión de DMPK podría influenciar la aparición de la resistencia a insulina en los pacientes de DM1 y sugieren que DMPK podría representar un gen de susceptibilidad para la diabetes de tipo 2.

## Capítulo 2. Inducción de adiposidad y resistencia a la insulina por dieta rica en grasas en animales que no expresan DMPK

### 2.1 Justificación y objetivo

Como se ha comentado en la introducción, la resistencia a insulina es la principal alteración metabólica en pacientes de DM1. También se ha visto que tienen tendencia a acumular grasa visceral [Gómez y cols., 1999] y que la inactividad resultante del deterioro muscular propio de este desorden puede agravar la situación.

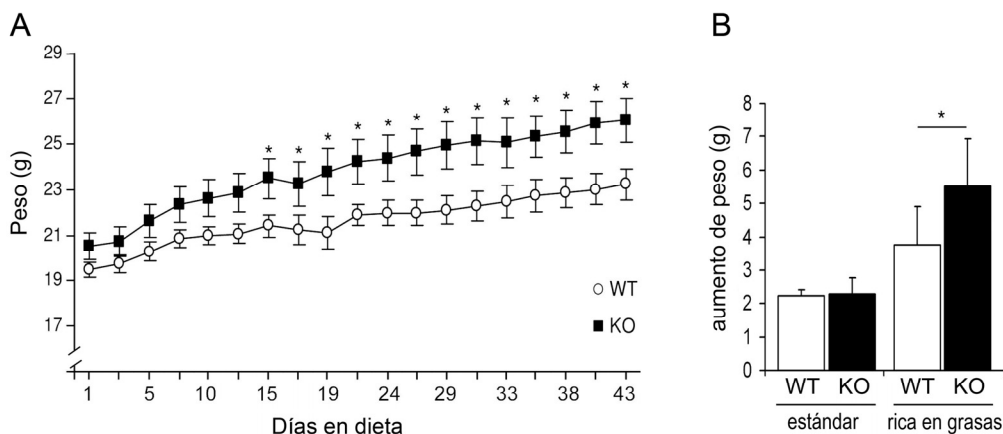
Por ello, quisimos averiguar si la ausencia de DMPK es un factor genético de riesgo frente a una situación de estrés metabólico como una dieta rica en grasas.

### 2.2 Resultados

#### 2.2.1 Una dieta rica en grasas provoca un mayor aumento en el peso corporal en animales *dmpk*-KO que en animales *dmpk*-WT

Animales machos *dmpk*-KO y *dmpk*-WT de 8 semanas de edad se sometieron durante 6 semanas a una dieta rica en grasas o HFD (del inglés *High Fat Diet*) en la que el 60% de las kilocalorías provenían de grasas. Como control se utilizó una dieta estándar con un 11% de kilocalorías provenientes de grasas. Tanto los animales *dmpk*-KO como los *dmpk*-WT sometidos a dieta rica en grasas aumentaron de peso durante las 6 semanas. Sin embargo, a partir de la segunda semana el peso de los ratones *dmpk*-KO fue significativamente mayor que el de los *dmpk*-WT manteniéndose esta diferencia hasta el final del ensayo (figura 26A).

Por el contrario, en animales alimentados con dieta estándar no se observaron diferencias significativas de peso entre ambos grupos (figura 26B).



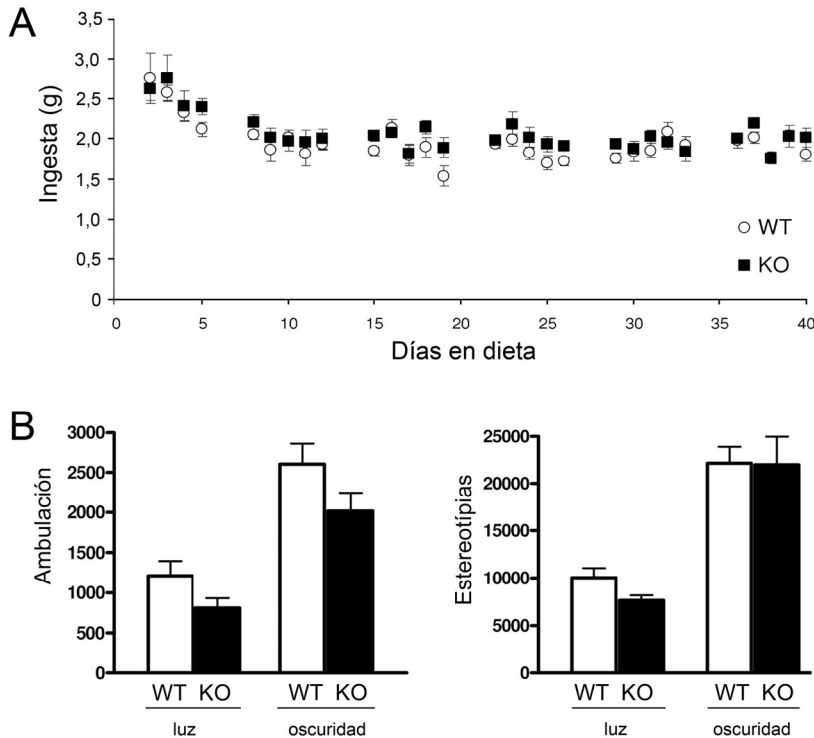
**Figura 26. Efecto de una dieta rica en grasas en el peso corporal de animales *dmpk*-KO.** (A) Pesos de los animales *dmpk*-KO y *dmpk*-WT de 8 semanas a 14 semanas de edad sometidos a una dieta rica en grasas *ad libitum*. Los datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar de los pesos de los animales en cada grupo ( $n=10$ ). (B) Diferencia de peso entre la semana 8 y 14 de vida en dieta grasa o estándar ( $n=5-10$ ). \*,  $p$ -valor $<0,05$ .

## 2.2.2 La ingesta y la actividad de los ratones *dmpk*-WT y *dmpk*-KO es comparable

Los datos obtenidos no permitían descartar la posibilidad de que las diferencias observadas en el peso entre los dos grupos fuera debida a una ingesta o actividad desigual.

Se pudo descartar la ingesta como responsable de las diferencias en el peso entre los dos grupos ya que el registro de consumo de pienso durante la dieta fue similar (figura 27A).

Los estudios de actividad (figura 27B) mostraron que tampoco se puede atribuir la diferencia de peso entre los dos grupos a alteraciones en la movilidad de los animales *dmpk*-KO.



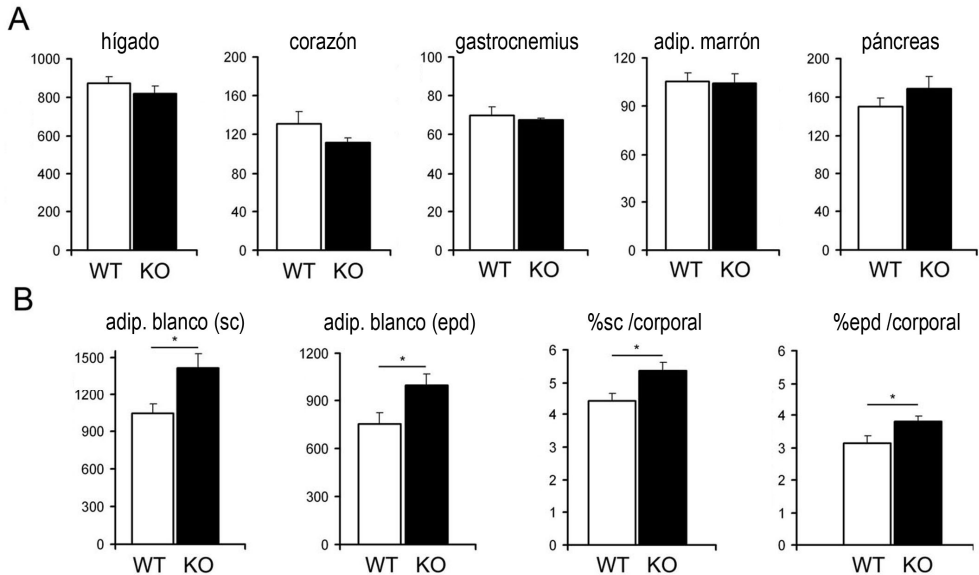
**Figura 27. Ingesta y capacidad motriz.** (A) La ingesta diaria se determinó en jaulas individuales sustrayendo el peso del pienso sobrante a la cantidad suministrada el día anterior. Los datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar de las diferencias en cada una de las jaulas de cada grupo ( $n=10$ ). (B) La actividad de los animales se registró mediante cámaras de video en jaulas individuales durante 24 horas divididas en 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz. El *software* acoplado distinguía entre movimientos ambulatorios (desplazamiento horizontal) y pequeños movimientos o estereotipias (acicalamiento, alzamiento sobre los cuartos traseros, etc). Ensayo realizado en la Universidad Autónoma de Barcelona en colaboración con la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Escorihuela. Los datos son medias  $\pm$  desviación estándar ( $n=6$ ).

Teniendo en cuenta que ambos grupos mostraron una ingesta y una actividad física similares, el mayor aumento de peso en los ratones *dmpk-KO* parece indicar que DMPK tendría un papel en la regulación del balance energético.

### 2.2.3 La dieta rica en grasas causa un mayor aumento de tejido adiposo blanco en ausencia de DMPK

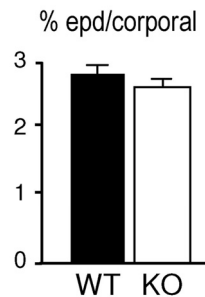
Al finalizar el periodo de 6 semanas de dieta, se comparó el peso de distintos tejidos provenientes de ratones *dmpk-KO* y *dmpk-WT*. No se observaron diferencias en los pesos del hígado, corazón, músculo gastrocnemio, tejido adiposo marrón o páncreas (figura 28A). Sin embargo, la masa de tejido adiposo blanco, tanto visceral como subcutánea, presentó un peso significativamente mayor en los animales *dmpk-KO* respecto a los *dmpk-WT* (figura 28B). Asimismo, la relación de la masa de tejido

adiposo relativa al peso corporal se encontró significativamente aumentada en los *dmpk*-KO.



**Figura 28. Peso de diferentes tejidos tras la dieta rica en grasas.** (A) Se determinó el peso en mg de diferentes tejidos de animales *dmpk*-WT y *dmpk*-KO tras 6 semanas de dieta rica en grasas. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los tejidos fueron pesados. (B) El peso del tejido adiposo blanco subcutáneo (sc) y epididimal (epd) se muestra en valores absolutos (mg) y como porcentaje respecto al peso corporal. Los datos son el promedio  $\pm$  desviación estándar de los pesos de cada grupo ( $n=10$ ). \*,  $p$ -valor $<0,05$ .

Esta diferencia en el peso de los depósitos de tejido adiposo blanco epididimal no se observó en los animales control de la misma edad que fueron criados con dieta estándar (figura 29).



**Figura 29. Peso del tejido adiposo blanco epididimal en dieta estándar.** El peso del tejido adiposo blanco epididimal se muestra como porcentaje respecto al peso corporal.

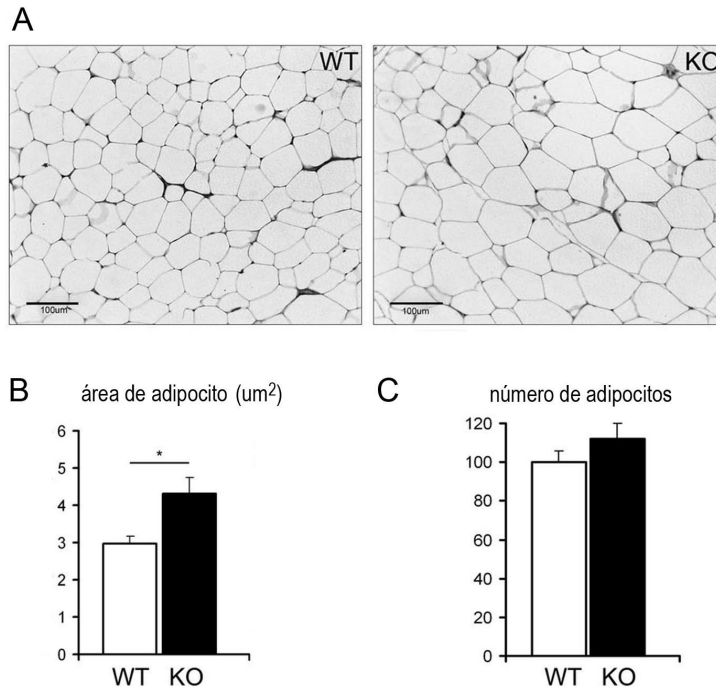
### 2.2.4 El aumento en el tejido adiposo blanco es debido a un incremento del tamaño de los adipocitos

Para profundizar en el tipo de cambios morfológicos que tenían lugar en el tejido adiposo epididimal se estudiaron cortes histológicos teñidos con hematoxilina/eosina (figura 30A).

Se pudo determinar que había un aumento significativo del 45% ( $p$ -valor=0,014) en el área de los adipocitos del tejido adiposo blanco epididimal de los animales *dmpk*-



KO comparado con los *dmpk*-WT (figura 30B). Sin embargo, no se observó un aumento en el número de células (figura 30C).



**Figura 30. Estudio morfológico del tejido adiposo blanco epididimal tras la dieta rica en grasas.** Se contaron las células de 15 campos de área conocida por cada animal,  $n=5$  de cada genotipo, y se hicieron medias. (A) Hematoxilina eosina representativa de tejido adiposo blanco de animales *dmpk*-WT y *dmpk*-KO respectivamente a un aumento de 20X. Las imágenes fueron procesadas mediante el Software MacBiophotonics Imaje J (free software disponible: <http://www.macbiophotonics.ca/downloads.htm>). (B) Las áreas se calcularon dividiendo el área del campo por el número de células de cada uno. (C) El cálculo del número de adipocitos se estimó multiplicando el número de células/mm<sup>2</sup> por el peso del tejido de cada animal en gramos (\*,  $p$ -valor<0,05).

En conjunto estos datos indican que los animales *dmpk*-KO tras una dieta grasa de 6 semanas presentan hipertrofia de los adipocitos. Los cambios morfológicos observados no se vieron acompañados por diferencias en la expresión de PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$  o adiponectina (datos no mostrados).

### 2.2.5 Efecto de la dieta rica en grasas en parámetros metabólicos de los animales *dmpk*-KO y *dmpk*-WT

Para ahondar en los efectos de la dieta rica en grasas sobre el perfil metabólico de los animales *dmpk*-KO y *dmpk*-WT se evaluaron varios parámetros (Tabla 3). Tras la dieta rica en grasas aumentaron los niveles de triglicéridos (TG) y colesterol hepáticos, así como la adiponectina en plasma y la actividad lipoproteína lipasa (LPL)

en gastrocnemio en ambos grupos sin evidencias de diferencias significativas entre ellos. No se detectaron cambios en la glucemia en alimentación, ni tampoco en los niveles plasmáticos de triglicéridos y ácidos grasos no-esterificados (NEFA, del inglés *Not esterified Fatty Acid*). El único parámetro que fue leve pero significativamente distinto entre ambos grupos fue la glicemia en ayunas que aumentó significativamente más en los animales *dmpk-KO* tras la dieta rica en grasas.

Tabla 3. Parámetros metabólicos antes y después de la dieta

	Dieta estándar		Dieta rica en grasas	
	WT	KO	WT	KO
Glicemia en alimentación (mg/dL)	114,20±4,26	109,20±3,86	122,50±3,78	119,40±3,91
Glicemia en ayuno (mg/dL)	64,00±2,58	65,07±2,16	74,43±5,06	96,29±4,88(*)
Insulinemia en alimentación (µg/mL)	n.d.	n.d.	1,36±0,14	1,06±0,10
Insulinemia en ayuno (µg/mL)	n.d.	n.d.	0,20±0,05	0,12±0,02
TG Hepáticos (mg/g)	21,30±1,16	23,96±3,04	86,94±22,91	68,33±12,00
Colesterol Hepático (mg/g)	1,36±0,08	1,34±0,08	5,05±0,59	3,89±0,22
TG en plasma (g/L)	0,67±0,04	0,65±0,04	0,53±0,04	0,59±0,05
NEFA plasma (mM)	1,79±0,13	1,59±0,05	1,11±0,12	1,21±0,13
Adiponectina (ng/mL)	11,55±0,81	11,47±1,04	13,19±0,79	13,29±0,72
Actividad LPL gastrocnemio (mU/g)	33,94±4,04	36,28±1,6	45,92±5,82	47,58±6,94

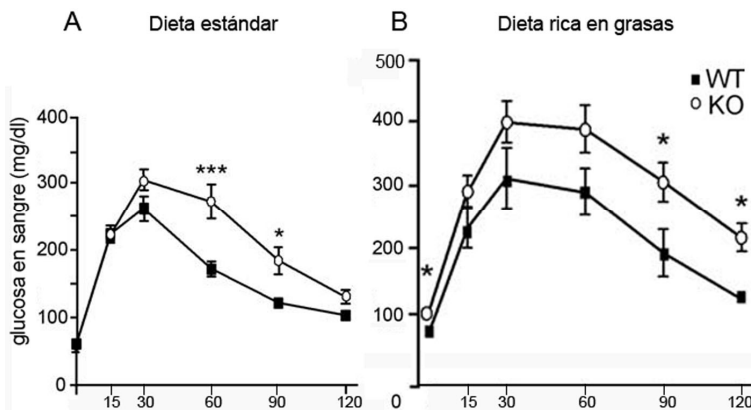
Los datos son medias ± desviación estándar, n=5. (\*) p-valor<0,05; n.d.: no determinado

Los niveles de adiponectina en plasma, un péptido secretado por los adipocitos con propiedades anti-inflamatorias y sensibilizadoras a la insulina, aumentaron en respuesta a la dieta rica en grasa pero de forma similar en ambos grupos. El colesterol y los triglicéridos hepáticos mostraron también niveles similares en los dos grupos de animales sugiriendo que DMPK no influiría en el almacenamiento de lípidos en el hígado por lo menos en las condiciones experimentales evaluadas. La actividad Lipoproteína Lipasa (LPL) en músculo gastrocnemio de los animales *dmpk-KO* no se diferencia de la de los *dmpk-WT*.

El conjunto de estos datos sugiere que las alteraciones metabólicas de los animales *dmpk-KO* sometidos a 6 semanas de dieta rica en grasas no dista en gran medida de la observada en los animales control. No obstante, la diferencia observada en la glucemia en ayunas tras la dieta rica en grasas indicaría un empeoramiento en la homeostasis de la glucosa más acusado en los animales *dmpk-KO*.

### 2.2.6 Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ratones *dmpk*-KO tras la dieta rica en grasas

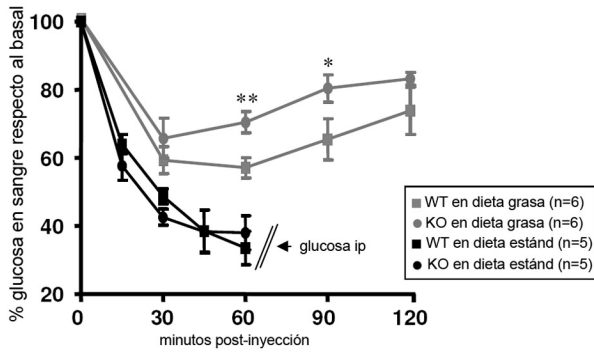
Dado que se ha demostrado que cambios en el peso corporal son capaces de influenciar la sensibilidad a la insulina en varios modelos animales, examinamos la homeostasis de la glucosa tras 6 semanas de dieta rica en grasas para evaluar el posible efecto de la ausencia de DMPK. Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa o GTT y a la insulina o ITT.



**Figura 31. Prueba de tolerancia a la glucosa tras la dieta rica en grasas.** Para el GTT se inyectaron 2 mg/Kg de glucosa intraperitoneal (i.p.) en animales ayunados 16 horas. Se realizaron extracciones de sangre para determinar la glucemia en los tiempos indicados. (A) GTT de animales *dmpk*-WT y *dmpk*-KO machos mantenidos en dieta estándar. (B) GTT de animales *dmpk*-WT y *dmpk*-KO machos mantenidos en dieta rica en grasas (n= 5- 8 animales por grupo) \* p-valor <0,05.

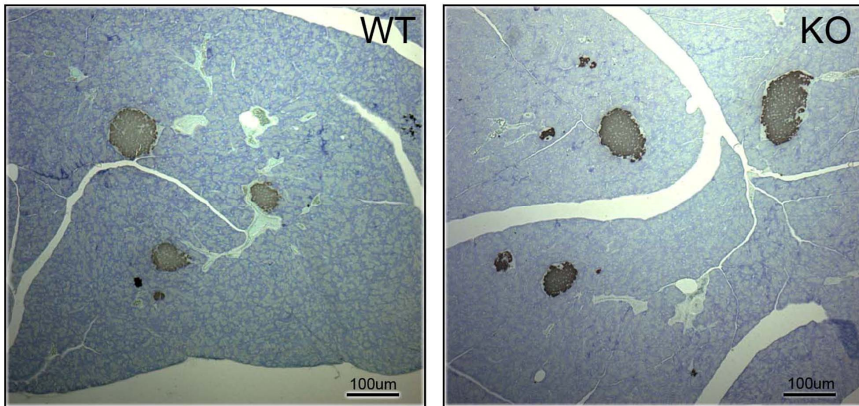
Los animales *dmpk*-KO criados con pienso estándar mostraron un patrón de tolerancia a la glucosa alterado comparado con los *dmpk*-WT (figura 31A). Tras la dieta rica en grasas la tolerancia a la glucosa empeoró en ambos grupos pero continuó siendo menor en los *dmpk*-KO (figura 31B).

La prueba de tolerancia a la insulina (ITT) no mostró diferencias en la respuesta de los niveles de glucosa en sangre entre los animales *dmpk*-WT y los *dmpk*-KO criados con pienso estándar (figura 32). Ambos grupos mostraron una reducción en la respuesta a la insulina exógena tras la dieta rica en grasas, indicando el desarrollo de resistencia a la insulina sistémica tras la dieta. Sin embargo, los animales *dmpk*-KO mostraron una resistencia a la insulina significativamente más severa que los *dmpk*-WT.



**Figura 32. Prueba de tolerancia a la insulina.** Se administró intraperitonealmente 0,75 UI de insulina por kg de peso a animales tras un ayuno de 16 horas. Se realizaron extracciones de sangre para determinar la glucemia en los tiempos indicados. (n= 5- 8 animales por grupo) \* p-valor <0,05, \*\* p-valor <0,01.

Con el objetivo de determinar si la dieta rica en grasas provocaba una alteración de las células productoras de insulina en los ratones *dmpk-KO*, se realizaron estudios de inmunohistoquímica para detectar insulina en cortes de páncreas de animales *dmpk-WT* y *dmpk-KO* (figura 33). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos. Las áreas de tejido productoras de insulina respecto al área total fueron comparables entre los animales *dmpk-WT* y *dmpk-KO*.



**Figura 33. Estudio morfológico del páncreas.** Inmunodetección de insulina en cortes histológicos de páncreas de animales *dmpk-KO* y *dmpk-WT* tras la dieta rica en grasas. Las células positivas para insulina aparecen teñidas de marrón en tanto que el resto de tejido se contrastó usando azul de toluidina. Las imágenes están tomadas a 10X.

## 2.3 Discusión

La caracterización metabólica descrita en el primer apartado de Resultados indica una implicación de DMPK en la homeostasis de la glucosa y la acción de la insulina en el músculo. Estos datos indican que la reducción en la expresión de DMPK podría representar un factor de susceptibilidad para la diabetes de tipo 2. Con la información obtenida tras la dieta podemos además concluir que la deficiencia de DMPK facilita la aparición de un estado metabólico prediabético (resistencia a la insulina y el aumento de grasa visceral) cuando se produce un estrés metabólico como es el consumo de un exceso grasas en la dieta.

Este estudio muestra que la dieta rica en grasas agrava el ya alterado fenotipo metabólico de los ratones *dmpk*-KO. Además de un mayor aumento de peso y de depósitos en el tejido adiposo que los animales control, los ratones *dmpk*-KO desarrollaron una mayor resistencia sistémica a la insulina. Es interesante destacar que dicha alteración no se observó en animales que consumieron una dieta estándar y que sólo se puso de manifiesto en una condición de riesgo metabólico.

El aumento de peso parece ser consecuencia del incremento en los depósitos de tejido adiposo, que es mayor en los animales *dmpk*-KO que en los *dmpk*-WT. No detectamos alteraciones en los patrones de expresión de factores de transcripción de receptores nucleares como PPAR $\gamma$  o PGC-1 $\alpha$ , que se han visto alterados en otros modelos murinos de dieta rica en grasas [Rong y cols., 2007]. PPAR $\gamma$  regula el almacenamiento lipídico promoviendo la captación de glucosa y la síntesis o el almacenamiento de triglicéridos [Schoonjans y cols., 1996; Martin y cols., 1997]. También inhibe la lipólisis, incrementando la masa adiposa y reduciendo la glucemia y los AG libres. PGC-1 $\alpha$ , identificado en un principio como un coactivador de PPAR $\gamma$ , se ha relacionado con la termogénesis adaptativa del tejido adiposo marrón, su naturaleza inducible refleja la importancia de su papel en los procesos metabólicos energéticos, incluidas la biogénesis y oxidación mitocondriales [Huss y Kelly, 2004].

El hecho de que los niveles en plasma de lípidos no fueran mayores en los ratones *dmpk*-KO que en los *dmpk*-WT, junto a la observación de niveles comparables de triglicéridos hepáticos sugieren que el aumento en el almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo puede haber protegido a los animales de alteraciones metabólicas adicionales y de un empeoramiento en homeostasis de glucosa.

Datos obtenidos en numerosos estudios epidemiológicos moleculares y genéticos indican que las interacciones gen-ambiente pueden aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas tales como la susceptibilidad al síndrome metabólico.

Los datos aquí expuestos sugieren que una dieta rica en grasas puede constituir un agravante de los riesgos metabólicos y cardíacos de los pacientes con DM1. De hecho, el sobrepeso y la obesidad con frecuencia llevan a un estado prediabético que multiplica por 6 el riesgo de aparición de diabetes [LeRoith, 2007]. Por ello, una dieta rica en grasas facilita la aparición de anomalías metabólicas, resistencia a insulina, diabetes de tipo 2, desórdenes lipídicos y enfermedad cardiovascular, todas ellas características fenotípicas encontradas con frecuencia en pacientes de DM1. Es de hecho la enfermedad cardiovascular una de las causas predominantes de muerte en los pacientes de DM1, llegando a alcanzar un 30% de los fallecimientos. En general la mortalidad tiene lugar tras una disfunción progresiva del ventrículo izquierdo, enfermedad isquémica del corazón, embolismo pulmonar o muerte súbita [Pelargonio, 2002]. Además cabe destacar que la afectación muscular de la enfermedad lleva a los pacientes a un estilo de vida más sedentario que a su vez facilita la aparición de sobrepeso. En este contexto los datos sugieren la necesidad de una terapia nutricional planificada para la prevención y gestión de los riesgos cardiometabólicos en los pacientes de DM1.

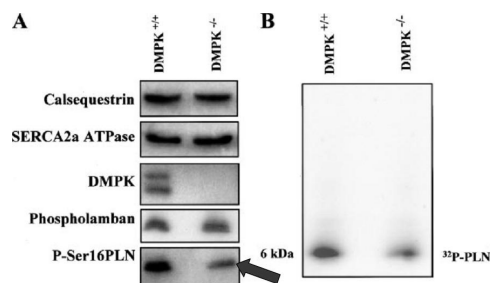
## Capítulo 3. Papel de DMPK en la señalización $\beta$ -adrenérgica y patofisiología cardíaca

### 3.1 Justificación y objetivo

La enfermedad cardiovascular es una de las causas prevalentes de muerte en los pacientes de DM1 [Pelargonio, 2002]. Los ratones *dmpk*-KO muestran un fenotipo cardíaco que reproduce el que pueden presentar los enfermos de DM1 incluyendo bloqueo atrioventricular de primer, segundo y tercer grado [Reddy y cols., 1996; Saba y cols., 1999; Berul y cols., 2000]. También se ha descrito un fenotipo cardíaco en los animales heterocigotos para DMPK (*dmpk*<sup>+/-</sup>), que desarrollan bloqueo atrioventricular de primer grado, semejante al que aparece con más frecuencia en los pacientes de DM1 [Berul y cols., 1999].

Hasta la fecha, se ha demostrado que DMPK está involucrada en la modulación de la homeostasis del calcio en el músculo esquelético [Edstrom y Wroblewski, 1989; Jacobs y cols., 1990; Benders y cols., 1996; Benders y cols., 1997], y en cardiomiocitos aislados a partir de ratones KO para DMPK [Pall y cols., 2003]. Aunque el mecanismo por el que esto tiene lugar no se ha descrito en detalle, resultados previos obtenidos en nuestro grupo demostraron que la captación de calcio se encontraba disminuida en vesículas del retículo sarcoendoplásmico (SR) procedentes de homogenados ventriculares de ratones que carecen de DMPK [Kaliman y cols., 2005]. Se demostró que DMPK podía fosforilar *in vitro* a PLN y se sugirió que la ausencia de DMPK provocaría la hipofosforilación de PLN y en consecuencia, la inhibición de la bomba de calcio del SR, SERCA2A (figura 34).

Quedaba resolver la incógnita de cómo era posible que la fosforilación de PLN disminuyera en ausencia de DMPK ya que está ampliamente descrito que la quinasa



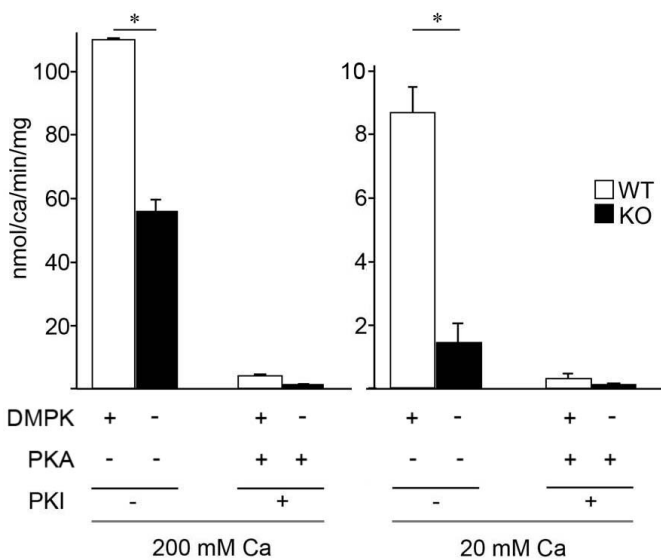
**Figura 34. Fosforilación de PLN en vesículas de retículo sarcoendoplásmico.** (A) Se observó mediante Western-blot la disminución de la fosforilación de PLN en muestras que provenían de animales KO. (B) Demostraron que DMPK podía fosforilar a PLN *in vitro*. Reproducido del artículo Kaliman y cols. (2005)

encargada de la fosforilación de PLN es la proteína quinasa A dependiente de cAMP (PKA). Dicha quinasa se activa en respuesta a estímulos adrenérgicos, por ello nos propusimos averiguar si DMPK estaba implicada en la señalización del receptor  $\beta$ -AR de manera similar a lo observado para el receptor de insulina.

### 3.2 Resultados

#### 3.2.1 La captación de calcio en retículo sarcoplásmico (SR) depende de PKA y de DMPK

Se determinó la captación de calcio en SR de cardiomiocitos procedentes de ratones *dmpk*-WT y *dmpk*-KO. Las determinaciones se hicieron en presencia o ausencia del inhibidor de PKA (PKI) para analizar el impacto de la falta de actividad PKA y de DMPK en conjunto y por separado. Cuando se verificó la captación de calcio en SR en presencia de PKI se observó que ésta se reducía a niveles mínimos tanto en muestras *dmpk*-WT como en *dmpk*-KO (figura 35).



**Figura 35. Captación de calcio por vesículas procedentes del retículo sarcoendoplásmico.** Se vio que las vesículas aisladas a partir de homogenados de ventrículo izquierdo de ratón KO captaban menos calcio que las procedentes de ratones WT. Cuando se evaluó esta captación en presencia del inhibidor de PKA (PKI) esta captación era prácticamente cero. Parcialmente reproducido del artículo Kaliman y cols. (2005)

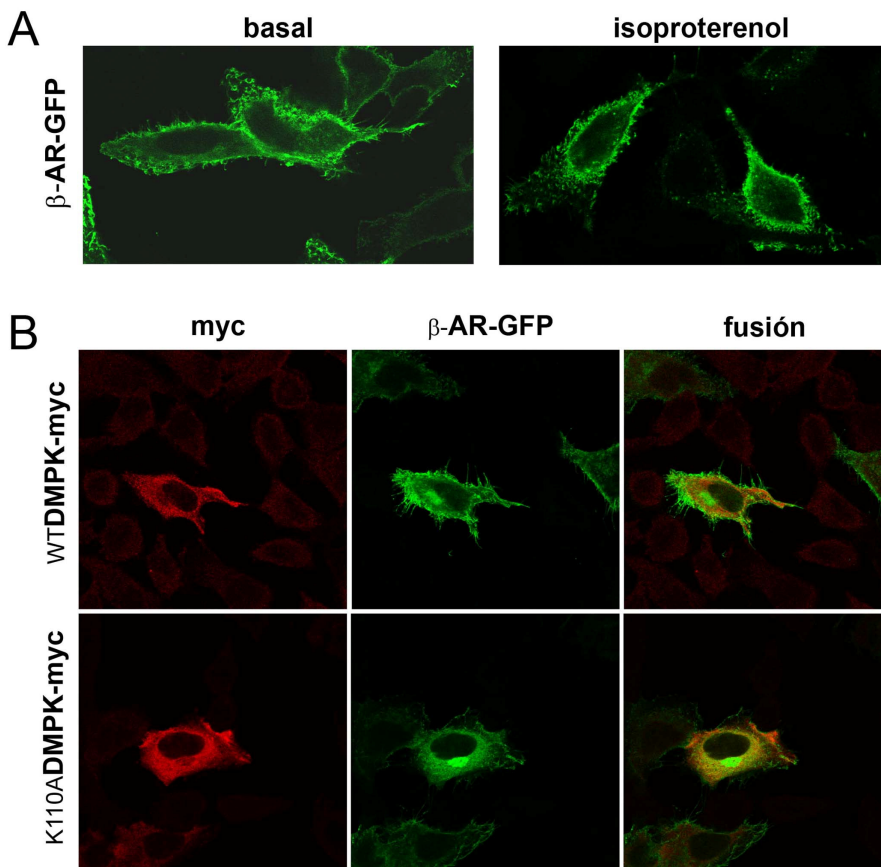
Esta disminución tan marcada concuerda con el hecho de que PKA es esencial para la fosforilación de PLN. Aún así, en ausencia de PKI, la disminución de la captación de calcio debido sólo a la ausencia de DMPK seguía siendo importante. Estos resultados indican que ambas quinastas tienen un papel en la captación de calcio en SR.

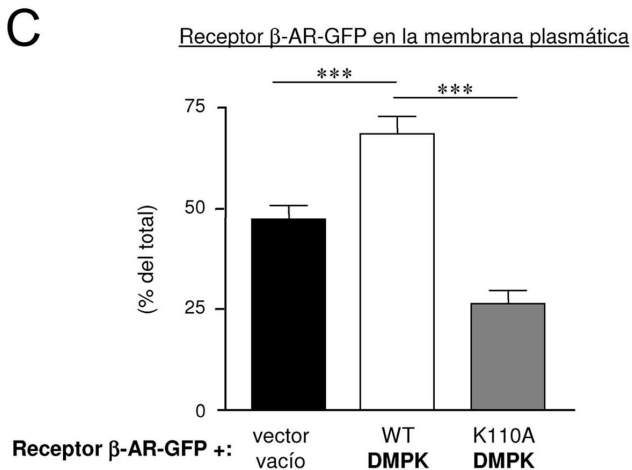


### 3.2.2 Alteración de la localización del receptor $\beta$ -adrenérgico en células HeLa que sobre-expresan formas mutadas de DMPK

La PKA se activa en respuesta a estímulos adrenérgicos, por ello nos propusimos averiguar si la DMPK estaba implicada en la regulación del receptor  $\beta$ -AR de manera similar a lo observado previamente para los receptores de insulina e IGF-1.

Para ello, se realizaron transfecciones transitorias de células HeLa con un plásmido de expresión que codifica para el receptor  $\beta$ -adrenérgico fusionado a GFP ( $\beta$ -AR-GFP). Junto a éste co-transfectamos otro plásmido de expresión de la construcción myc-DMPK salvaje (WT) o la myc-DMPK quinasa deficiente (K110A). El receptor  $\beta$ -AR-GFP, en condiciones basales, se encuentra localizado en la membrana plasmática. Sin embargo, en presencia de un agonista como el isoproterenol se interioriza en la célula (figura 36A).





**Figura 36. Se requiere DMPK para la localización del receptor  $\beta$ -AR en la membrana plasmática.** Se transfectoron transitoriamente células HeLa con vectores que codificaban para el receptor  $\beta$ -AR fusionado a GFP ( $\beta$ -AR-GFP). (A) El receptor se localiza en la membrana plasmática en condiciones basales pero se interioriza en presencia de isoproterenol. (B) Cuando las células de cotransfectaron junto con un vector de expresión de DMPK-WT, el receptor se localizó correctamente en la membrana plasmática a. Por el contrario, en presencia de la forma quinasa deficiente, K110A, el receptor  $\beta$ -AR se encontró retenido dentro de la célula. Las imágenes que se muestran son ejemplos de 3 experimentos independientes. La escala de las imágenes equivale a 24  $\mu$ m representados por la barra. (C) La gráfica de barras muestra la cuantificación mediante el software Image J del porcentaje de receptor  $\beta$ -AR localizado en la membrana plasmática. Se analizaron 20 células de cada condición de tres experimentos independientes. Los datos son medias  $\pm$  desviaciones estándar; \*\*\* $p$ <0,0001.

Se observó que en presencia de DMPK WT el receptor se localizaba preferentemente en la membrana plasmática, pero cuando se expresaba DMPK K110A, el receptor  $\beta$ -AR-GFP quedaba retenido en estructuras intracelulares y no accedía correctamente a la membrana plasmática (figura 36B).

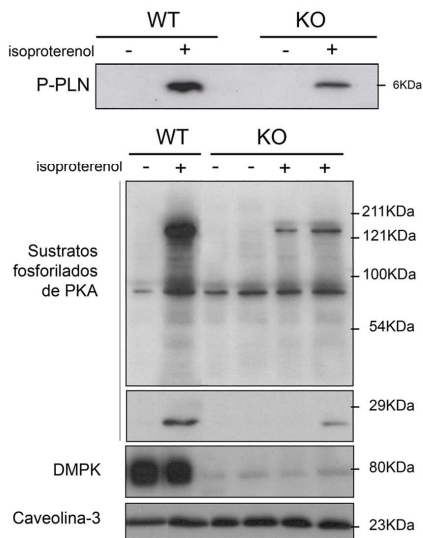
La gráfica de barras representa las diferencias en el porcentaje de localización del receptor en función de la forma de DMPK transfectada (figura 36C). La cuantificación de varios experimentos (entre 12-16 células de cada uno) mostró diferencias significativas. Se observó un aumento en la cantidad de receptor  $\beta$ -AR en la membrana plasmática respecto a las células que expresan el receptor vacío y una clara disminución en las células que expresaban la forma quinasa defectiva de DMPK.

### 3.2.3 Disminución de la señalización $\beta$ -adrenérgica en músculo cardíaco de ratones *dmpk*-KO

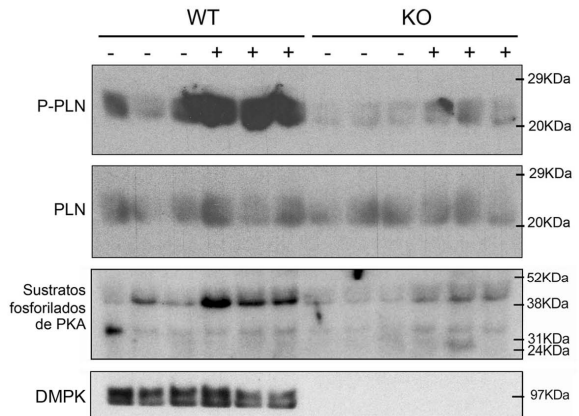
Así pues si la falta de actividad DMPK provoca una menor densidad de receptores  $\beta$ -AR en la membrana plasmática, cabría esperar alteraciones en la activación de las proteínas encargadas de transmitir la señal  $\beta$ -AR intracelularmente en respuesta a un

agonista. Para estudiar esta hipótesis, se analizó mediante Western-blot la fosforilación de sustratos de PKA en cardiomiocitos aislados y en homogenados totales de ventrículo izquierdo estimulados o no con isoproterenol (figura 37A y B, respectivamente). En primer lugar comprobamos que PLN, un sustrato clave de PKA en músculo cardíaco, resultaba hipofosforilado en las muestras procedentes de ratones *dmpk*-KO tras la estimulación con isoproterenol. Asimismo observamos que no sólo la fosforilación de PLN se ve afectada sino que también otros sustratos de PKA presentan una menor fosforilación en músculo cardíaco de los animales KO.

### A Cardiomiocitos



### B Extractos de ventrículo izquierdo



**Figura 37. Fosforilación de los sustratos de PKA.** (A) Cardiomiocitos aislados tratados o no con 1 µM de isoproterenol durante 15 minutos. (B) Los animales fueron tratados con 2 µg de isoproterenol por g de peso corporal

3.2.4 Parámetros cardíacos en ratones *dmpk*-KO

Para estudiar el posible impacto de una señalización  $\beta$ -adrenérgica defectuosa en los animales *dmpk*-KO, se analizaron varios parámetros cardíacos mediante ecocardiograma transtorácico en condiciones basales o tras el tratamiento con isoproterenol (tabla 2).

Tabla 4. Parámetros cardíacos

	Basal		Isoproterenol (tras la dosis más alta)	
	WT	KO	WT	KO
HR(bpm)	474,67±26,28	480,33±72,08	564,00±27,09	534,00±16,84
Ao-ET(ms)	48,00±5,66	54,33±5,31	47,33±1,63	49,33±1,63
%FS	38,71±1,66	35,86±6,00	67,15±3,51	58,06±2,42(§)
VCF (circ/s)	8,24±1,12	6,81±1,63	14,22±1,03	11,79±0,70(¥)
LVMd (mg)	74,31±19,77	60,77±9,24	100,54±24,12	63,14±11,44
LVM/BW(%)	0,38±0,11	0,32±0,06	0,50±0,12	0,33±0,06
LVIDs(mm)	2,09±0,12	2,10±0,21	0,90±0,10	1,10±0,18
LVIDd(mm)	3,41±0,11	3,28±0,03	2,74±0,09	2,61±0,34
LVPWs(mm)	0,93±0,16	1,00±0,24	1,36±0,17	1,05±0,07
LVPWd(mm)	0,71±0,11	0,57±0,03	1,19±0,28	0,86±0,10
IVSs(mm)	1,07±0,19	1,25±0,37	1,60±0,14	1,44±0,05
IVSd(mm)	0,66±0,11	0,68±0,12	0,92±0,09	0,78±0,05
LVDd/BW	0,17±0,01	0,17±0,01	0,14±0,00	0,14±0,02
EDD/PWD	4,95±0,61	5,82±0,41	2,46±0,54	3,11±0,70

Los datos son medias  $\pm$  desviación estándar típica, n=3.

d: diástole; s: sístole; HR (bpm): ritmo cardíaco (batidos por minuto); Ao-ET: raíz de la aorta; FS(%): índice de acortamiento; VCF: velocidad media de acortamiento de la circunferencia de la fibra; LVM: masa ventricular izquierda; LVIDs (mm): diámetro interno del ventrículo izquierdo; LVPWd (mm): grosor de la pared ventricular posterior; IVSd (mm): grosor *septum* interventricular; LVDd/BW: diámetro ventricular izquierdo en diástole respecto al peso corporal; EDD: diámetro al final de la diástole del ventrículo izquierdo.

(§) p= 0,0592; (¥) p=0,0746

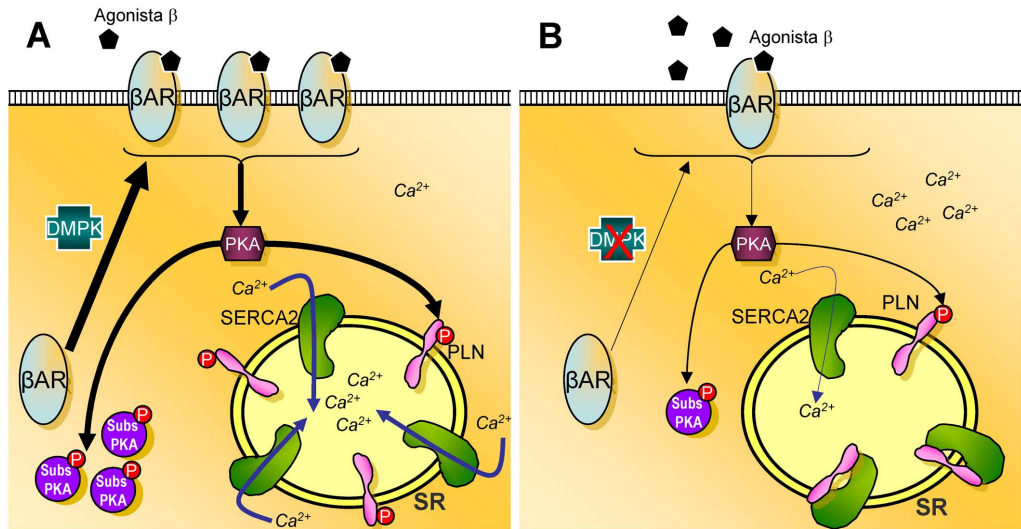
No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de ellos aunque sí se encontró una tendencia de los parámetros indicativos del acortamiento de fibras (FS y VCF) a ser más bajos para los *dmpk*-KO que para los *dmpk*-WT, posiblemente indicando un inicio del empeoramiento de la capacidad de contracción de las fibras.

### 3.3 Discusión

La regulación de las concentraciones de calcio en los cardiomiocitos es un evento crítico en el mecanismo de contracción-relajación cardíaca [Mackenzie y cols, 2004]. Se ha descrito que en el músculo esquelético de pacientes con DM1 existen alteraciones en la concentración de calcio citoplasmático intracelular [Jacobs y cols., 1990; Benders y cols., 1996]. La generación de modelos de ratones transgénicos de DMPK permitió evidenciar que esta quinasa tiene un papel relevante en la patofisiología cardíaca. Nuestros estudios han permitido proponer un modelo que explica al menos en parte el mecanismo a través del cual la DMPK participaría en la regulación de la contractilidad cardíaca.

Varios estudios han descrito que la ausencia de DMPK altera la homeostasis del calcio en músculo esquelético [Benders y cols., 1997] y cardiomiocitos [Pall y cols., 2003; Kaliman y cols., 2005]. Uno de los mecanismos principales de captación de calcio en el retículo sarcoplásmico del músculo cardíaco es a través de la bomba de calcio con actividad ATPasa, SERCA2. Fosfolamban (PLN) es una proteína reguladora de dicha actividad [Simmerman y Jones, 1998]. El estado de fosforilación de PLN está altamente regulado dado que determina su capacidad de unión a SERCA2 y por lo tanto es crucial en la regulación de la contracción-relajación cardíaca [Luo y cols., 1994; Kadambi y cols., 1996; Lindemann y cols., 1983]. Se sabe que la fosforilación de PLN en respuesta a un estímulo  $\beta$ -adrenérgico está mediada principalmente por la actividad de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) [MacLennan y Kranias, 2003].

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que DMPK está implicada en la fosforilación de PLN [Kaliman y cols. 2005]. En este bloque de la tesis, analizamos a través de qué mecanismos la DMPK podría estar regulando el estado de fosforilación de PLN la concentración intracelular de calcio en cardiomiocitos y la contractilidad cardíaca.



**Figura 38. Hipótesis de la participación de DMPK en la regulación del mecanismo de contracción-relajación cardíaca.** (A) La disponibilidad de receptores beta-adrenérgicos en la membrana plasmática (beta-AR) estaría regulada por DMPK. Una vez en la membrana, dicho receptor se activaría por agonistas beta-adrenérgicos activando a su vez a la quinasa PKA que fosforila a PLN entre otros sustratos. PLN fosforilado se libera de su unión a SERCA2, que aumenta así su capacidad de captación de calcio hacia el retículo sarcoplásmico (SR). (B) En ausencia de DMPK, la cantidad de receptor beta-AR disponible en la membrana plasmática disminuiría y así también lo haría la señal beta-adrenérgica, la activación de PKA, la fosforilación de PLN y la captación de calcio hacia el SR, dando como consecuencia alteraciones en la regulación de la contracción-relajación cardíaca.

Nuestros datos se ajustan a un modelo en el cual la ausencia de DMPK provocaría una menor concentración de receptores beta-adrenérgicos en la membrana plasmática (figura 38), dando lugar a una menor activación de PKA en respuesta a la estimulación por sus agonistas (figura 37). Como consecuencia de ello, la PKA no fosforilaría de manera óptima a PLN. En su estado hipofosforilado, PLN permanecería unido a SERCA2 que no podría activarse y captar calcio eficientemente hacia el retículo sarcoplásmico (figura 35). Finalmente, este mecanismo daría lugar a los defectos de contractilidad cardíaca que detectamos en ratones *dmpk-KO* frente a un estímulo beta-adrenérgico (tabla 4).

Algunas de las manifestaciones clínicas de DM1 se han correlacionado con la expansión de los tripletes [Marchini y cols., 2000]. Esta observación apoya el concepto de que la toxicidad del ARN sería el mecanismo principal responsable de dichas alteraciones. El hecho de que parece no existir una correlación entre la expansión de los tripletes y la gravedad de la afección cardíaca [Rinaldi y cols., 2008], apoyaría la hipótesis aquí sugerida de la disminución de expresión de la proteína DMPK sería un mecanismo relevante para el desarrollo de la afección cardíaca.

## Discusión general de los resultados

### 1. Modelo integrado de los mecanismos moleculares implicados en la patología metabólica y cardíaca en DM1

Los resultados presentados en esta tesis junto con estudios realizados por otros grupos pueden ser integrados en un modelo hipotético que explica las bases moleculares de la patología metabólica y cardíaca en DM1 (figura 39).

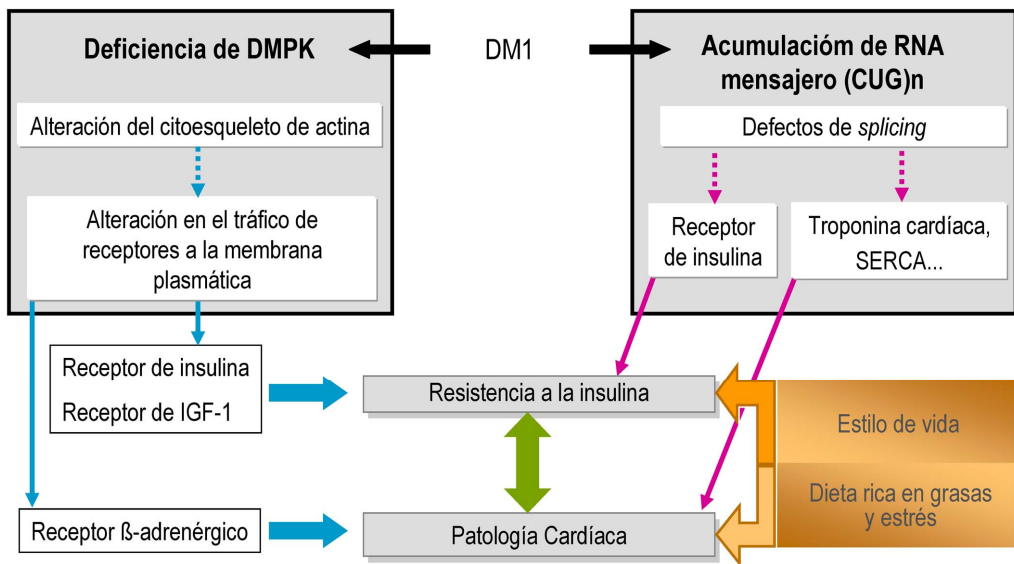
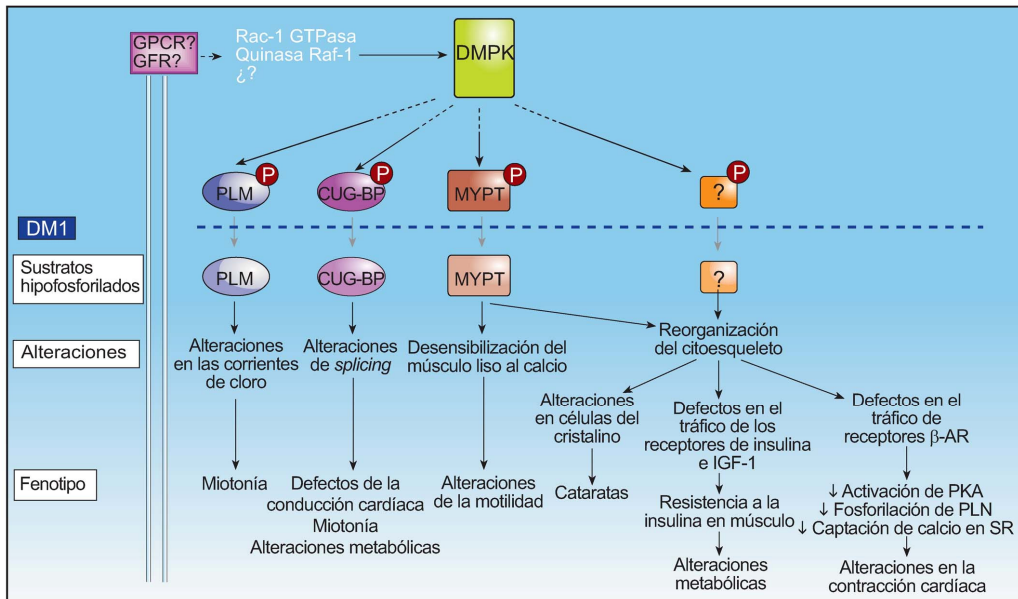


Figura 39. Modelo integrado para la resistencia a la insulina y la patología cardíaca observada en pacientes de DM1.

En este modelo, tanto la deficiencia de la proteína DMPK como la alteración a nivel del ARN estarían contribuyendo por mecanismos no excluyentes a la manifestación de la resistencia a la insulina y la cardiomiopatía. Trabajos previos han descrito la alteración del procesamiento del ARN mensajero del receptor de la insulina [Savkur y cols., 2001]. Ello no es incompatible con una alteración en el tráfico intracelular de receptores hacia la membrana plasmática. Lo mismo sería válido para la afección cardíaca. La patología observada en los pacientes de DM1 puede ser el resultado de alteraciones en el patrón de *splicing* de proteínas relevantes en la contracción como la troponina C [Philips y cols., 1998] y deficiencias en la señalización β-adrenérgica debidas a una menor disponibilidad del receptor en la membrana.

## 2. Modelo integrado del papel de DMPK en la patofisiología de la DM1

El modelo presentado en el apartado anterior puede integrarse dentro de un modelo fisiopatológico más general de la función de DMPK, construido a partir de los datos disponibles hasta ahora, tanto los aportados por este trabajo de tesis como los descritos previamente (figura 40).



**Figura 40. Modelo hipotético del papel patofisiológico de DMPK en DM1.** Se ha visto que la actividad quinaso de DMPK se induce por unión a la GTPasa Rac-1 y a la quinasa Raf-1. Los receptores de membrana implicados en estas vías están por determinar. Las dianas de fosforilación descritas para DMPK se correlacionan con diferentes alteraciones fisiológicas encontradas en los ratones transgénicos de DMPK, sistemas de sobre-expresión de DMPK y/o pacientes de DM1. PLM, Fosfoleman; CUG-BP, Proteína de unión a CUGs; MYPT1, Fosfatasa de la miosina-1; GPCR, Receptor acoplado a proteína G; IR, Receptor de insulina; IGF-1R, receptor de factor similar a la insulina 1; PLN, fosfolamban; SR, Retículo Sarcoplásmico.

Los resultados presentados en esta tesis muestran que los dominios quinaso y C-terminal de DMPK son reguladores, positivos y negativos respectivamente, de la reorganización del citoesqueleto en células HeLa. Estos datos concuerdan con los descritos anteriormente para DMPK en células del cristalino del ojo [Jin y cols., 2000] y para dominios homólogos a DMPK en la quinasa Rho  $\alpha$  [Leung y cols., 1996]. La vía de las Rho/Rho quinasas está implicada en la regulación de las interacciones actina-miosina, la formación de fibras de estrés y el grado de polimerización de la tubulina, todos ellos procesos relacionados con el tráfico de proteínas entre la membrana plasmática y el retículo endoplasmático/Golgi [Hall, 1998; Rogers y Gelfand, 2000; Ridley, 2006]. Nuestros datos demuestran que las dos formas mutadas de DMPK, una sin actividad quinaso y la otra con el dominio C-terminal deletado, alteran la



disponibilidad de los receptores de insulina, IGF-1 y  $\beta$ -adrenérgico en la membrana plasmática. Hemos detectado también que la sobre-expresión de la forma sin actividad quinasa causa la acumulación intracelular del receptor de la insulina en la matriz de Golgi.

A partir de los datos obtenidos, podemos especular sobre un posible rol de DMPK en la formación y función de los transportadores post-Golgi (PGC, del inglés *post-Golgi carriers*) mediante la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina. La comprensión de las interacciones funcionales de DMPK con el citoesqueleto y con las proteínas G pequeñas, mecanismos a través de los que DMPK regularía los procesos de tráfico intracelular, podrían aclarar el papel patofisiológico de DMPK en DM1. De hecho, en una situación hipotética en la que DMPK regulara el tráfico intracelular de diferentes proteínas transmembrana se podría explicar las alteraciones pleiotrópicas observadas en DM1: diferenciación del músculo esquelético, contractilidad del músculo cardíaco, regulación de la apertura de los canales de iones y metabolismo celular.

### **3. Distrofia Miotónica de tipo 1. ¿Tres mecanismos y una conexión desconocida?**

Como se describió más detalladamente en el apartado 2.4 de la Introducción (Mecanismos fisiopatológicos de la DM1), se han propuesto tres mecanismos para entender cómo la expansión del triplete (CTG)<sub>n</sub> en el gen DMPK se traduce en las diversas manifestaciones clínicas de la DM1:

1. la haploinsuficiencia de DMPK,
2. la alteración de la expresión de genes vecinos y
3. la toxicidad del ARN.

Sin embargo, un análisis cuidadoso de los datos procedentes de los estudios en diferentes modelos de DM1 revela una situación compleja en el que estos tres mecanismos podrían estar contribuyendo simultáneamente en la aparición de cada una de las características clínicas de la DM1.

**Tabla 5. Tabla resumen de las alteraciones patológicas observadas en modelos animales de DM1.**

Adaptado de Kaliman y Llagostera, 2008

Fenotipo	Alteración	Modelo	Observaciones	Referencias
<b>Miopatía</b>	<b>Expresión de DMPK</b>	Ratones <i>Dmpk</i> <sup>-/-</sup>	Aparición tardía, miopatía del músculo esquelético progresiva (degeneración de las fibras y fibrosis)	[Reddy y cols., 1996]
			Cambios en el tamaño de los músculos de la cabeza y el cuello a edades avanzadas	[Jansen y cols., 1996]
		Ratones transgénicos que sobre-expresan el gen humano de DMPK (Tg26-hDMPK)	Resistencia al ejercicio deficiente, descargas miotónicas, degeneración de las fibras	[O’Cochlain y cols., 2004]
	<b>Toxicidad del ARN</b>	Ratones transgénicos con tripletes expandidos en la región 3’-UTR del gen hDMPK	Inhibición de la miogénesis	[Storbeck y cols. 2004]
		Expresión inducible en músculo esquelético de (CTG) <sub>n</sub> expandidos	Deterioro severo del músculo	[Orengo y cols., 2008]
	Ratones <i>Mbn1</i> <sup>-/-</sup>	Miotonía a las 6 semanas de edad	[Kanadia y cols., 2003]	
	<b>Deficiencia de SIX5</b>	Análisis del mutante homólogo de SIX5 en <i>Drosophila</i> .	Desarrollo anormal del músculo	[Kirby y cols., 2001]
<b>Defectos cardíacos</b>	<b>Expresión de DMPK</b>	Ratones <i>Dmpk</i> <sup>-/-</sup>	Cardiomiopatía hipertrófica y aumento de la mortalidad neonatal	[Jansen y cols., 1996]
			Primer, segundo y tercer grado de bloqueo atrioventricular	[Berul y cols., 1999; 2000]
			Aumento de los intervalos PR y HV en la contracción cardíaca	[Saba y cols., 1999]
			Contractilidad basal aumentada	[Pall y cols., 2003]
		Reducción en la captación de Ca <sup>2+</sup> en el SR. Hipofosforilación de PLN	[Kaliman y cols., 2005]	
		Ratones transgénicos que sobre-expresan el gen humano de DMPK (Tg26-hDMPK)	Remodelado cardiomiopático	[O’Cochlain y cols., 2004]
	<b>Toxicidad del ARN</b>	Ratones transgénicos que expresan la región 3’ UTR del gen <i>DMPK</i>	Anormalidades en la conducción cardíaca	[Mahadevan y cols., 2006]
	<b>Deficiencia de SIX5</b>	Ratones <i>Six5</i> <sup>-/-</sup>	Alteraciones en la conducción cardíaca	[Personius y cols., 2005; Wakimoto y cols., 2002]
<b>Resistencia a la insulina</b>	<b>Expresión de DMPK</b>	Ratones <i>Dmpk</i> <sup>-/-</sup>	Resistencia a la insulina en el músculo, tolerancia a la glucosa alterada	[Llagostera y cols., 2007]
	<b>Toxicidad del ARN</b>	ARN de interferencia de MBNL1 y 2	<i>Splicing</i> del receptor de la insulina alterado	[Dansithong y cols., 2005]
		Sobre-expresión de CUG-BP		
		Ratones que expresan la región genómica humana de DM1 con tripletes expandidos (>350CTG)	<i>Splicing</i> del receptor de la insulina alterado en todos los tejidos estudiados	[Guiraud-Dogan y cols., 2007]
	<b>Deficiencia de SIX5</b>	Ratones <i>Six5</i> <sup>-/-</sup>	Sin determinar	

**Tabla 5. Tabla resumen de las alteraciones patológicas observadas en modelos animales de DM1.**

Adaptado de Kaliman y Llagostera, 2008

Fenotipo	Alteración	Modelo	Observaciones	Referencias
<b>Alteraciones oculares</b>	<b>Expresión de DMPK</b>	Sobre-expresión de <i>DMPK</i> en células epiteliales de cristalino en cultivo	Formación en la membrana plasmática de estructuras semejantes a las apoptóticas y reorganización del citoesqueleto de actina	[Jin y cols., 2000]
	<b>Toxicidad del ARN</b>	Ratones <i>Mbnl1<sup>-/-</sup></i>	Aparición de cataratas	[Kanadia y cols., 2003]
	<b>Deficiencia de SIX5</b>	Ratones <i>Six5<sup>-/-</sup></i>	Desarrollo de opacidades en el cristalino	
Ratones <i>Six5<sup>+/-</sup></i>		Cataratas de frecuencia y severidad relacionadas inversamente al nivel de expresión de <i>Six5</i>		[Sarkar y cols., 2000]
<b>Regulación de los canales iónicos</b>	<b>Expresión de DMPK</b>	Ratones <i>Dmpk<sup>+/-</sup></i>	Concentración de calcio intracelular alterada	[Benders y cols., 1997]
			Aperturay cierre de los canales de ión sodio alterados	[Mounsey y cols., 2000]
			Aperturay cierre de los canales de ión sodio sodio alterados	[Lee y cols., 2003]
		Ratones transgénicos que sobre-expresan el gen humano de DMPK (Tg26-hDMPK)	Sobrecarga de calcio intracelular en el miocardio. Reducción del número de canales de cloro en el sarcolema del músculo esquelético	[O'Coilain y cols., 2004]
	<b>Toxicidad del ARN</b>	Ratones transgénicos que expresan la región 3' UTR del gen <i>DMPK</i>	Expresión de la proteína CIC-1 reducida	
Ratón transgénico HSA <sup>LR</sup> ( <i>human skeletal actin</i> ) ARNm con 250 CUG en la región 3'UTR		Pérdida de la proteína CIC-1 en la membrana del músculo esquelético		[Mankodi y cols., 2002]
<b>Deficiencia de SIX5</b>	Ratón <i>Six5<sup>+/-</sup></i>	Apertura y cierre de los canales de ión sodio normales		[Mistry y cols., 2001]

Teniendo en cuenta nuestras investigaciones y la de otros grupos sobre este tema, hemos propuesto una hipótesis que considera que estos mecanismos patológicos aparentemente independientes podrían converger en uniones funcionales aún no establecidas entre la actividad de DMPK, la toxicidad del ARN y el producto del gen *Six5*.

#### 4. Conclusiones generales y perspectivas

En conjunto, el trabajo presentado aporta datos que respaldan la hipótesis de que la deficiencia de DMPK afecta a la homeostasis de glucosa y la señalización  $\beta$ -adrenérgica en músculo cardíaco a través una alteración en el tráfico intracelular de los receptores de insulina, IGF-1 y  $\beta$ -adrenérgico.

A partir de estas observaciones sería interesante determinar en qué punto/s del mecanismo regulador del tráfico de receptores podría estar interviniendo la quinasa DMPK.

Finalmente, los datos presentados sugieren que DMPK podría ser un gen de susceptibilidad a la diabetes de tipo 2 y a obesidad, por ello sería también de interés investigar alteraciones en el gen de DMPK no sólo a nivel de los pacientes de DM1 sino de la población general.

Conclusiones

---



Las conclusiones que pueden extraerse de los resultados presentados en esta memoria y que responden a los 3 objetivos iniciales de este trabajo de tesis son las siguientes:

## **1. Papel de DMPK en la homeostasis de la glucosa y en la acción de la insulina.**

- 1.1. DMPK está implicada en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina en músculo esquelético y cardíaco.
- 1.2. DMPK está implicada en la regulación de la capacidad de captación de glucosa dependiente de insulina en músculo cardíaco y esquelético y es necesaria para una correcta translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática.
- 1.3. DMPK es necesaria para preservar la estructura del citoesqueleto de actina y para la regulación del tráfico intracelular de los receptores de insulina y de IGF-1 *in vitro*.
- 1.4. Un mecanismo posible a través del cual los resultados aquí presentados podrían explicar las alteraciones metabólicas asociadas a la DM1 sería el siguiente: la disminución de expresión de DMPK en tejidos musculares provocaría alteraciones en la estructura del citoesqueleto de actina que darían lugar a defectos en el tráfico intracelular de receptores de insulina e IGF-1 y en la translocación de GLUT4 hacia la membrana plasmática. Estas alteraciones contribuirían a la resistencia a la insulina en tejidos musculares y a la intolerancia a la glucosa que se observa en los ratones deficientes en DMPK y en pacientes de DM1.
- 1.5. Debido a su implicación en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en la acción de la insulina en músculo, alteraciones en el gen DMPK podrían representar un factor de susceptibilidad a la resistencia a la insulina y diabetes de tipo 2.

## **2. Papel de DMPK en las alteraciones metabólicas inducidas por una dieta rica en grasas.**

- 2.1. Una dieta rica en grasas provoca mayores alteraciones metabólicas (aumento en el peso corporal, intolerancia a la glucosa, adiposidad y resistencia a la insulina) en animales que no expresan DMPK que en animales controles.
- 2.2. Una dieta rica en grasas podría constituir un agravante de los riesgos metabólicos y cardíacos de los pacientes con DM1. En este contexto, una

terapia nutricional planificada podría ayudar a prevenir y gestionar los riesgos cardiometabólicos en los pacientes de DM1.

### **3. Papel de DMPK en la señalización $\beta$ -adrenérgica y su impacto en la patofisiología cardíacas.**

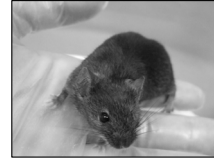
- 3.1. DMPK es necesaria en músculo cardíaco para una correcta fosforilación de sustratos de PKA en respuesta a un agonista  $\beta$ -adrenérgico. La fosforilación de PLN y la captación de calcio en el retículo sarcoplásmico (SR) de cardiomiocitos depende de PKA y de DMPK.
- 3.2. DMPK es necesaria para la regulación de la contractilidad cardíaca en respuesta a agonistas adrenérgicos.
- 3.3. DMPK está implicada en la regulación del tráfico intracelular del receptor  $\beta$ -adrenérgico *in vitro*.
- 3.4. A partir de los resultados presentados en esta tesis, podemos proponer el siguiente mecanismo: la ausencia de DMPK provocaría una menor concentración de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la membrana plasmática, disminuyendo así la activación de PKA en respuesta a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Como resultado PLN se encontraría hipofosforilado, la captación de calcio en SR disminuiría y la contractilidad cardíaca se vería alterada. Este mecanismo explicaría al menos en parte la patología cardíaca que se observa en los ratones deficientes en DMPK y en pacientes de DM1.



Material y métodos



## Capítulo 1. PROTOCOLOS CON ANIMALES



### 1.1. Cepa S129. Ratones *dmpk*-WT Y *dmpk*-KO

Los ratones KO para DMPK que se han utilizado en esta tesis se generaron a partir de la cepa 129 en el laboratorio de Sita Reddy [Reddy, 1996]. Estos animales tienen una sustitución de los exones 1 a 7 por un *cassette* que codifica para resistencia a neomicina (Neo) en homocigosis tal y como muestra la figura 41.

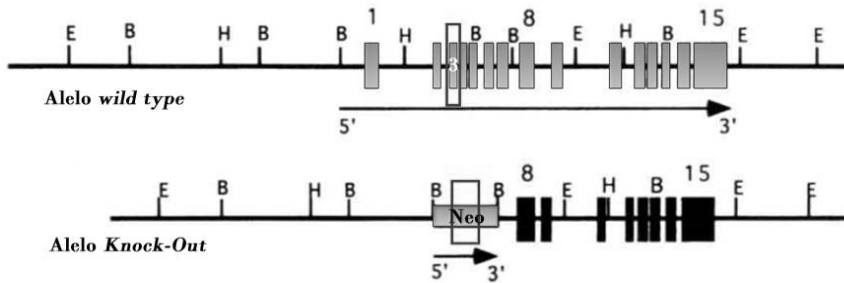


Figura 41. Alteración del gen *Dmpk* murino en los animales usados en esta tesis. Reproducido de Reddy y colaboradores (1996).

Todo el trabajo realizado con animales durante esta tesis fue aprobado por el Comité para el trabajo con animales de experimentación de la Universidad de Barcelona y de la Universidad de California San Diego y ha seguido los criterios éticos recomendados por estos mismos.

### 1.2. Genotipación de los ratones KO para *dmpk*

Para la genotipación usamos cebadores (*primers*) para amplificar una región del exón 3, sólo presente en los animales WT, o para una región del *cassette* de neomicina, sólo presente en los KO. Los animales heterocigotos presentan una reacción de PCR positiva para los dos pares de cebadores. Cada par de cebadores se procesó en tubos separados así que fueron necesarias 2 reacciones por muestra: exón 3 y neomicina. Las secuencias de los cebadores utilizados se detallan en el capítulo 7 del apartado Material y métodos.

Se han utilizado alternativamente 2 protocolos diferentes para la genotipación de esta cepa. Ambos constan de dos partes, la primera tiene el objetivo de aislar el ADN genómico y la segunda es la reacción de PCR que generará un producto si la muestra es positiva.

### 1.2.1. Protocolo 1: kit comercial SIGMA (SIGMA)

#### 1.2.1.1. Obtención de ADN genómico a partir de cola de ratón

Este kit comercial de SIGMA permite una obtención de DNA genómico muy rápido pero condiciona a que la PCR se realice con los reactivos del kit.

#### *Material*

---

- ✓ Biopsia de cola del ratón a genotipar, (2 a 3 mm)
- ✓ Solución de extracción (*Extraction Solution*) (SIGMA)
- ✓ Solución de preparación del tejido (*Tissue Preparation Solution*) (SIGMA)
- ✓ Solución de neutralización B (*Neutralization Solution B*) (SIGMA)

#### *Procedimiento:*

---

- Se prepara una mezcla de *Solución de extracción* con *Solución de preparación* del tejido en una proporción 4:1. Esta mezcla se puede preparar como máximo dos horas antes de usar.
- Se ponen 50 µl de la mezcla en un tubo Eppendorf y se le añade la biopsia de cola cortada longitudinalmente para facilitar la digestión.
- Se mezcla bien con ayuda del vórtex.
- Se realiza una centrifugación suave para que baje el líquido, es importante que la cola quede sumergida en la solución de digestión.
- Se incuba 1 hora a temperatura ambiente.
- Se pasa a la placa calefactora donde se incuba a 95°C durante 3 minutos.
- Se añaden 40 µl de la *Solución de neutralización B* a la mezcla y se mezcla bien con ayuda del vórtex.
- De nuevo se centrifuga suavemente para que baje toda la digestión.
- En este punto se puede congelar la digestión a -20°C.

#### 1.2.1.2. PCR

#### *Material*

---

- ✓ Extracto de ADN genómico
- ✓ Solución para la PCR (*PCR Reaction Mix*) (SIGMA)
- ✓ *Primer Mix* que consiste en una mezcla de los 2 cebadores necesarios para cada reacción a una concentración final de cada uno de ellos de 100 µM.
  - *Mix exón 3*: cebador *forward* (Exo3\_fwd) y *reverse* (Exo3\_rev)
  - *Mix Neo*: cebador *forward* (Neo\_fwd) y *reverse* (Neo\_rev)
- ✓ Agarosa de uso rutinario
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Tampón de carga X6 de las muestras de ADN
- ✓ TAE X1

### Procedimiento

- Preparamos dos reacciones de PCR por cada muestra, más un control positivo y uno negativo. Cada reacción de PCR llevará:

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	2,5 $\mu$ l
Solución para la PCR	5 $\mu$ l
Mix de cebadores	0,5 $\mu$ l
Tejido (digestión)	2 $\mu$ l
Vf	10 $\mu$ l

- El programa de PCR es el siguiente:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	95°C	1 minuto
Amplificación 30 ciclos	Desnaturalización	95°C
	<i>Annealing</i>	62°C
	Elongación	72°C
	Elongación II	72°C
Almacenamiento	4°C	$\infty$

- Una vez finalizada la reacción se añade tampón de carga de ADN X6 a las muestras.
- Se prepara un gel al 1% de agarosa con bromuro de etidio en una proporción de 2,5  $\mu$ l por cada 50 ml de solución. La muestra positiva para Neo presenta una banda de 300 pares de bases (bp : *base pairs*) y la positiva para el exón 3, de 250 bp como se ve en la figura 42:

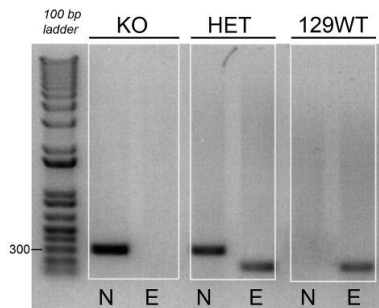


Figura 42. Resultado de la genotipación con el kit de Sigma

## 1.2.2. Protocolo 2

### 1.2.2.1. Obtención de DNA a partir de cola de ratón

Este protocolo nos ha sido facilitado por Ainhoa García Alamán y el laboratorio de la Dra. Conxi Mora.

#### *Material*

---

- ✓ Biopsia de cola del ratón a genotipar, (2 a 3 mm)
- ✓ Solución de lisis de cola:
  - 50 mM Tris pH 8.0
  - 50 mM KCl
  - 2.5 mM EDTA
  - 0.45% NP-40
  - 0.45% Tween-20
- ✓ Proteasa K (20mg/ml)

#### *Procedimiento*

---

- Se prepara una solución con el tampón de lisis de colas al que le añadimos Proteasa K a una concentración final de 0,4 mg/ml.
- Se incuba en agitación de 16 a 18 horas en un baño a 55°C.
- Se agita brevemente para comprobar que la digestión ha tenido lugar. Observaremos que la solución se enturbia.
- Finalmente, se centrifuga la digestión en una centrífuga de sobremesa a máxima velocidad durante unos 20 segundos

### 1.2.2.2. PCR

#### *Material*

---

- ✓ Agarosa de uso rutinario
- ✓ Bromuro de etidio
- ✓ Tampón de carga de las muestras de ADN concentrado 6 veces (X6)
- ✓ TAE X1
- ✓ Tampón X10 de la Polimerasa de ADN Taq
- ✓ Solución de 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- ✓ Solución de 10 mM dNTPs
- ✓ Cebadores (100 μM):
  - Neo4
  - Neo3
  - Exo3\_fwd
  - Exo3\_rev
- ✓ Polimerasa de ADN Taq

### Procedimiento

- Preparamos dos reacciones de PCR por cada muestra, más un control positivo y uno negativo. Cada reacción de PCR llevará:

Reactivo	Volumen
Agua MilliQ	18,75 $\mu$ l
Tampón X10 de la polimerasa Taq	2,5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,25 $\mu$ l
dNTPs 10 mM	0,5 $\mu$ l
Cebador <i> fwd</i> 100 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l
Cebador <i> rev</i> 100 $\mu$ M	0,25 $\mu$ l
Polimerasa Taq	0,5 $\mu$ l
Tejido (digestión)	1 $\mu$ l
Volumen final 25 $\mu$ l	

- El programa de la PCR usado fue el siguiente:

Ciclos		Temperatura	Tiempo
30 ciclos	Amplificación Desnaturalización	94°C	1 minuto
	<i>Annealing</i>	55°C	1 minuto
	Elongación	72°C	2 minutos
	Almacenamiento	4°C	$\infty$

- Una vez finalizada la reacción se añade tampón de carga de ADN X6 a las muestras.
- Se prepara un gel al 1% de agarosa con bromuro de etidio (BrEt) en una proporción de 2,5  $\mu$ l por cada 50 ml de solución. La muestra positiva para Neo presentará una banda de aproximadamente 1kb y la positiva para el exón 3 de 250 bp como se ve en la figura 43 :

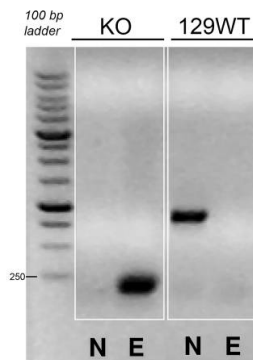


Figura 43. Resultado de la genotipación siguiendo el protocolo 2

### 1.3. Prueba de tolerancia a la glucosa

La prueba de tolerancia a la glucosa o GTT, del inglés *Glucose Tolerance Test*, tiene como objetivo determinar la capacidad metabólica del animal de responder a una sobrecarga de glucosa administrada intraperitonealmente. Se administró la glucosa en animales ayunados y se determinó la glucemia tomando muestras a diferentes tiempos hasta un máximo de dos horas.

#### Material

---

- ✓ Animales ayunados de 8 a 10 semanas de edad (aproximadamente 20 gramos)
- ✓ Glucómetro y tiras reactivas (ACCU-CHEK® Sensor Comfort)
- ✓ *Microvettes* (para recoger muestra de sangre)
- ✓ Suero glucosado hipertónico 40% (Fresenius Kabi)
- ✓ Jeringas de insulina ( 500  $\mu$ l, Tyco Healthcare)
- ✓ Cajas para los ratones
- ✓ Hoja de bisturí
- ✓ Alcohol 96°
- ✓ Cauterizador de colas
- ✓ Balanza
- ✓ Cronómetro
- ✓ Eppendorfs

#### Procedimiento

---

- El día anterior al ensayo se ponen los animales a ayunar durante 16 horas con agua *ad libitum* en jaulas con una rejilla para evitar que consuman las heces.
- Antes de comenzar en ensayo, se pesan los animales y se calcula el volumen a inyectar en función del peso. Se inyectan 2 mg de glucosa por gramo de peso del animal.
- Se rotulan los *microvettes*: tiempo 0, 5, 15, 30, 60 y 120 minutos.
- Se utiliza un cronómetro para cada animal (alternativamente, 1 cronómetro cada 6 animales inyectando cada 2 minutos).
- Se corta un trocito de cola (de 2 a 4 mm), que se guarda para volver a controlar el genotipo.
- Se saca sangre masajeando la cola (recomendable usar guantes de vinilo para minimizar daños por fricción). Se extrae una gota de sangre (5-10  $\mu$ l) para determinar glucosa con el glucómetro y 20  $\mu$ l de plasma para determinar insulina. El volumen de sangre necesario para obtener como mínimo 20  $\mu$ l de plasma se muestra en la figura 44. Las muestras se colocan en hielo a medida que se obtienen y hasta el paso 9.
- Una vez finalizado se cauterizan las colas de los animales y se devuelven a sus jaulas de origen.
- Se centrifugan las muestras durante 15 minutos a máxima velocidad para separar el plasma con sumo cuidado para no remover el *pellet*.
- Se congelan los plasmas a -80 °C.

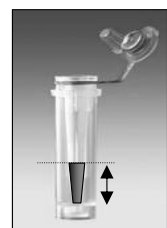


Figura 44. Cantidad de muestra en un *Microvette*.



## 1.4. Prueba de tolerancia a la insulina

La prueba de tolerancia a la insulina o ITT, del inglés *Insulin Tolerance Test*, nos permitió evaluar la respuesta de los animales a la insulina.

### Material

- ✓ Animales de 8 a 10 semanas de edad (aproximadamente 20 gramos)
- ✓ Glucómetro y tiras reactivas (ACCU-CHEK® Sensor Comfort)
- ✓ Insulina inyectable (Humulina: 100UI/ml, Eli Lilly)
- ✓ Jeringas de insulina ( 500 µl, Tyco Healthcare)
- ✓ Cajas para los ratones
- ✓ Hoja de bisturí
- ✓ Alcohol 96°
- ✓ Cauterizador de colas
- ✓ Balanza
- ✓ Cronómetro
- ✓ Eppendorfs

### Procedimiento

- Se pesan los animales y se distribuyen en cajas bien identificadas.
- Se inyectan 0,75U de insulina por Kg de animal. Se parte de un stock de Humulina de 100UI/ml y se utiliza una solución de trabajo de 0,133UI/ml de manera que se inyectan 5,7 µl de solución por cada gramo de peso del animal.
- Se corta un par de milímetros de la cola para genotipar de nuevo.
- Se determina la glucemia a tiempo “0” de todos los animales.
- Se inyectan los animales con un intervalo de 2 minutos entre uno y otro.
- Se determinan las glucemias a los 30, 60, 90 y 120 minutos de la inyección de insulina.

## 1.5. Extracción de tejido de ratones

En varios de los experimentos que se han realizado en esta tesis ha sido necesaria la extracción de diferentes tejidos para su posterior examen. En algunos casos, la extracción se realizó tras un tratamiento de insulina, isoproterenol, o tras una dieta.

### 1.5.1. Tratamientos

#### 1.5.1.1. Insulina

Para la estimulación con insulina los animales se sometieron a un ayuno de 16 horas y luego, se les inyectó intraperitonealmente (i.p.) 1 mg de glucosa por gramo de animal. Transcurridos 10 minutos, se les inyectó i.p. 10 U de insulina por Kg de peso del animal. Los animales se eutanizaron 10 minutos después de la administración de insulina.

### 1.5.1.2. Isoproterenol

Para la estimulación con isoproterenol no utilizaron animales no ayunados y se les inyectó 2 µg de isoproterenol i.p. por gramo de animal. Los animales se eutanzaron 10 minutos después de la administración de isoproterenol.

### 1.5.2. Extracción de tejidos

Las extracciones que se describen a continuación se realizaron a partir de animales sacrificados por dislocación cervical.

#### *Material*

---

- ✓ Material de cirugía:
  - Pinzas pequeñas de punta recta y otras de punta curva
  - Tijeras pequeñas y medianas
  - Pinzas con abrazaderas (*clamp*) pequeñas
- ✓ Apósitos absorbentes estériles (tallas)
- ✓ Suero fisiológico a 4°C
- ✓ PFA 3% en hielo
- ✓ Nitrógeno líquido
- ✓ Alcohol de 96°
- ✓ Balanza
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Eppendorf perforados

#### *Procedimiento*

---

- Se preparar todo el material de cirugía, se coloca la talla estéril y se pone suero fisiológico frío en una placa de Petri que servirá para limpiar los tejidos.
- Se pesan los animales.

#### 1.5.2.1. Sóleo

- Inmediatamente después de sacrificar al animal, se vierte etanol 70° sobre una de las patas traseras y se corta la piel.
- Se retira la piel estirando en dirección al pie y dejando expuestos los tendones que se proyectan hacia arriba desde el talón.
- Se Perfora bajo el tendón del gastrocnemio y se fijamos el *clamp*, lo más cerca posible del talón.
- Se corta el tendón, entre el *clamp* y el tobillo.
- Se estira con el *clamp* para separar el gastrocnemio.
- Sujetando el gastrocnemio en una dirección y la pata en la otra se distingue un tendón que conduce a un músculo más pequeño de color rojo más intenso, es el sóleo.
- Con ayuda de las pinzas se separa el sóleo del gastrocnemio. Se corta el tendón que lo fija a la rodilla.
- Se estira con la pinza y finalmente se corta por el tendón del otro extremo.

- Si el sóleo se va a usar para hacer extracción de ARN o bien de proteína se pone en un tubo eppendorf y se congela rápidamente en nitrógeno líquido. Si se utiliza para determinaciones de transporte de glucosa, ver “Transporte de glucosa en músculo sóleo”, en este capítulo.

#### 1.5.2.2. Gastrocnemio

- Siguiendo los pasos para obtener el sóleo, una vez retirado éste se estira bien el gastrocnemio y se corta bajando mucho las pinzas, es decir lo más cerca posible de la rodilla.
- Han de poder distinguirse los tres lóbulos (rojizos) que lo componen.

#### 1.5.2.3. Corazón

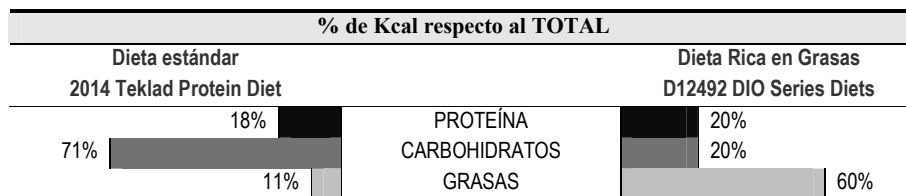
- Con el ratón boca arriba se rocía el pecho con etanol 70° y se realiza una incisión bajo las costillas.
- Se retira la piel de las costillas y se corta la caja torácica por los laterales de manera que se puede levantar toda la parte anterior de la caja torácica quedando expuestos de esta manera el corazón y los pulmones.
- Suavemente y con ayuda de unas pinzas se levanta el corazón, se localizan las venas pulmonares que se cortan liberando el corazón.
- Se limpia en suero fisiológico frío.
- Se seca sobre un pañuelo de papel y según cuál sea naturaleza del estudio a realizar, se congela rápidamente en nitrógeno líquido o bien se pone en un recipiente con PFA 4% frío para fijar el tejido.

#### 1.5.2.4. Tejido adiposo marrón (TAM)

- Se coloca el ratón boca abajo y se le estira la piel de la nuca para realizar un corte y retirar la piel de la zona.
- Se sujeta el TAM con pinzas y se corta lo más cerca posible del músculo.
- Se distingue el TAM porque tiene forma de alas de mariposa. Se separa el TAM del TA blanco con ayuda de las tijeras.
- Una vez limpio se procesa, o bien para histología o bien para extracción de ARN o proteína.

## 1.6. Dieta rica en grasas

Animales de 8 semanas de edad de ambos sexos y genotipos se sometieron a 6 semanas de dieta rica en grasas (Research Diets).



Los animales se separan en jaulas individuales donde la disponibilidad de agua fue *ad libitum*. Se pesan los animales 3 veces por semana durante las 6 semanas de duración del estudio. Se registra el peso de la comida a diario, para poder determinar la cantidad consumida por cada animal.

## 1.7. Aislamiento de cardiomiocitos de ratón adulto a partir de corazón y ensayos realizados con ellos

### 1.7.1. Aislamiento de cardiomiocitos

El protocolo para aislar y cultivar de miocitos cardíacos procedentes de ratón adulto fue realizado por el Dr. Daniele Catalucci en la Universidad de California San Diego (UCSD) según el protocolo descrito por Kondo y colaboradores [Kondo y cols., 2006].

### 1.7.2. Ensayos de unión a insulina-<sup>125</sup>I

Estos ensayos fueron realizados íntegramente en el laboratorio del Dr. Theodore P. Ciaraldi en la Universidad de California San Diego según el protocolo descrito por Ciaraldi y colaboradores [Ciaraldi y cols., 2001].

## 1.8. Transporte de glucosa

### 1.8.1. Transporte de glucosa en músculo sóleo.

#### Material

- ✓ Medio de incubación: DMEM sin glucosa (Gibco), 0,22 mg/ml piruvato de sodio y 0,22% de albúmina sérica bovina
- ✓ 2-deoxi-D-glucosa(<sup>3</sup>H)
- ✓ Manitol(<sup>14</sup>C)
- ✓ NaOH 0,5 N

*Procedimiento*

- Se deja que los músculos sóleos se recuperen en flascos con 2 ml de medio de incubación durante 15 minutos en un baño a 35°C con agitación y oxigenados con una mezcla 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>.
- Se les añade 1 mM de 2-deoxi-glucosa(<sup>3</sup>H) a 1 µCi/ml y 19 mM manitol(<sup>14</sup>C) a 0,3 µCi/ml y se incuban durante 20 minutos.
- Seguidamente, los músculos sóleos se congelan, pesan y finalmente digieren en 1 ml de NaOH 0,5N.
- La radioactividad intracelular y extracelular se determina por centelleo siguiendo el protocolo descrito por Morin y colaboradores [Morin y cols., 2002].

## 1.8.2. Transporte de glucosa en cardiomiocitos

*Material*

- ✓ 2-deoxi-D-glucosa(<sup>3</sup>H)
- ✓ Solución 50 mM D-glucosa
- ✓ Solución de 0,1% de SDS en NaOH 0,1 N

*Procedimiento*

- Se añade 1 mM de 2-deoxi-D-glucosa de los que 0,5 µCi son de 2-deoxi-D-glucosa(<sup>3</sup>H) (Amersham Pharmacia Biotech)
- Tras 20 minutos de incubación se transfiere la suspensión celular a tubos de centrifuga donde se centrifuga durante 30 segundos a 100g.
- Los *pellets* se lavan 3 veces en una solución de D-glucosa 50mM en PBS fría.
- La actividad basal se determina calculando el transporte en cardiomiocitos incubados con una solución 50 mM de D-glucosa.
- Las células se lisan con 1 ml de una solución de 0,1% de SDS en NaOH 0,1 N.
- Se toman muestras de los lisados para determinar la radioactividad y valorar la cantidad de proteína por muestra.

## 1.9. Obtención de vesículas de retículo sarcoplásmico y transporte de calcio

Los ensayos de captación de calcio en vesículas de retículo sarcoplásmico se realizaron en homogenados de ventrículos tal y como lo describen Pagani y Solano [Pagani y Solano, 1985 pH909] con algunas modificaciones como se detalla a continuación.

*Material*

- ✓ Solución 1 (homogenización): 25 mM imidazol, pH 7,4
- ✓ Solución 2 (captación): 100 mM KCl, 10 mM oxalato de potasio, 40 mM imidazol, 10 mM ácido sódico, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y 1 µM rojo de rutenio (para inhibir la captación de calcio por los receptores de rianodina)

- ✓ EDTA
- ✓  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (PerkinElmer Life Sciences)
- ✓ ATP

### Procedimiento

---

- Corazones de animales de 3 a 4 meses de edad se homogenizan con 1,5 ml de la solución 1 con un homogenizador manual de teflón.
- 175  $\mu\text{l}$  de homogenado se traspasan a un tubo con 1,4 ml de solución 2 y tampón EDTA- $^{45}\text{Ca}^{2+}$  que contiene 0,185  $\mu\text{Ci/ml}$  de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  a una concentración final de 20 nM o 200 nM.
- Tras una preincubación de 5 minutos del homogenado se inicia la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  añadiendo 2,5 mM de ATP.
- La captación se detiene pasando los homogenados por membranas de nitrocelulosa (Millipore) de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro a diferentes tiempos: 1, 3 y 5 minutos para la concentración de 200 nM  $\text{Ca}^{2+}$  y a los 1, 10 y 20 minutos para la de 20 nM.
- Se realizan 2 lavados con 5 ml de solución 2 sin  $\text{Ca}^{2+}$  no ATP.
- La radioactividad de las membranas se determina por centelleo líquido. Tras cuantificar la cantidad de proteína la captación de calcio es la pendiente de la recta de regresión lineal de la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  por mg de proteína y por minuto.

## 1.10. Fraccionamiento subcelular de membranas. Estudio de translocación de GLUT4 en músculo cardiaco

Para los estudios de translocación inducida por insulina del transportador de glucosa GLUT4, se realizó una homogenización a partir de corazón de ratones *dmpk*-KO y *dmpk*-WT. Los homogenados de tejido se sometieron a varias centrifugaciones diferenciales para obtener fracciones enriquecidas en membrana plasmática o membrana intracelulares. El protocolo que se ha usado durante la tesis está basado en el publicado el año 2001 por William Fuller y colaboradores [Fuller y cols. 2001]. Partimos de corazones congelados en nitrógeno líquido y mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Material

---

- ✓ Tampón A:

Reactivos:
20 mM HEPES pH 7,4
2 mM EDTA pH 8,0
1 mM $\text{MgCl}_2$
250 mM Sucrosa
1 comprimido de cóctel inhibidor de proteasas (Complete de Roche)
Agua MilliQ hasta 10 ml

- ✓ Solución de 2 M de NaCl
- ✓ Tampón de Homogenización de proteínas (TH). Ver el apartado siguiente, 1.11, de Material y métodos.

---

*Procedimiento*

---

- Todo el protocolo se realiza en hielo para evitar que se degraden las proteínas.
- Se pesan los corazones y se dejan 10 minutos en hielo.
- Se pasan a placas de Petri de 40 mm de diámetro donde se cortan en fragmentos pequeños.
- Se lavan las muestras 30 minutos en la solución 2 M de NaCl.
- Se pasan a un tubo de 15 ml y se centrifuga 5 minutos a 1000g.
- Se retira el sobrenadante.
- Se añade 1 ml de tampón A por cada 0,1 gramos de tejido.
- Se homogeniza el tejido en un homogenizador manual de vidrio, cada muestra se pasa: 4 minutos haciendo subir y bajar un émbolo holgado (*loose*), 1 minuto más usando un émbolo ceñido (*tight*).
- El homogenado se pasa a un tubo eppendorf de 1,5 ml. Se guardan 50  $\mu$ l del homogenado o Fracción Total (FT) en un eppendorf bien rotulado que se congela a -80°C.
- Se centrifuga 10 minutos a 380g. El sobrenadante se pasa a un nuevo eppendorf. El *pellet* o Fracción 1 (F1) se resuspende en 200  $\mu$ l de tampón TH y se congela a -80°C.
- Se centrifuga 10 minutos a 5000g. El sobrenadante se pasa a un nuevo eppendorf. El *pellet* o Fracción 2 (F2) se resuspende en 50  $\mu$ l de tampón TH y se congela a -80°C.
- Se centrifuga 30 minutos a 20000g. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo, esta vez de ultra-centrífuga. El *pellet* o Fracción 3 (F3) se resuspende en 50  $\mu$ l de tampón TH y se congela a -80°C.
- Se equilibra el peso de los tubos con ayuda de una balanza de precisión.
- Se centrifuga en una ultra-centrífuga 30 minutos a 50000g. El sobrenadante se pasa a un nuevo tubo de ultra-centrífuga. El *pellet* o Fracción 4 (F4) se resuspende en 10  $\mu$ l de tampón TH y se congela a -80°C.
- Se centrifuga en la ultra-centrífuga 1 hora a 50000g. El sobrenadante se pasa a un eppendorf que se rotulará como Citoplasma o Fracción 6 (F6). El *pellet* o Fracción 5 (F5) se resuspende en 10  $\mu$ l de tampón TH y se congela a -80°C.
- Se valora la concentración de proteína de 1,5  $\mu$ l de distintas diluciones de los extractos proteicos de cada fracción:
  - a. dilución 1/10 para las F 1 a 3 y la FT,
  - b. dilución 1/4 para la F4 y la F5 y
  - c. dilución 1/3 para la F6 o Citoplasma.

Las F1 a F3 son las más ricas en membrana plasmática en tanto que las F4 y F5 están enriquecidas en membranas intracelulares de baja densidad.

### 1.11. Extracción de proteína a partir de tejido de ratón

Las proteínas se extraen a partir de tejidos congelados en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y almacenados a -80 C hasta su uso.

#### Material

✓ Tampón de homogenización (TH)

Producto	Cat.	PM	Pesar	Conc
TrisHCl	SERVA	121,14	3,03 g	50 mM
NaCl	MERCK	58,44	3,51 g	120 mM
EDTA	SIGMA	372,2	730,6 mg	5 mM
EGTA (Tritiplex VI)	SIGMA	380,35	380,4 mg	2 mM
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O (Pirofosfato)	SIGMA	446,1	3,34 g	15 mM
NaF	SIGMA	41,99	419,91 mg	20 mM
Na <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	SIGMA	183,9	91,95 mg	1 mM
β-glycerophosphate penthydrate	SIGMA	306,1	6,12 mg	10 mM
Agua MilliQ hasta			500 ml	
<b>Ajustar el pH a 7,5</b>				

- ✓ Comprimidos *Complete* Mini EDTA-free (Roche)
- ✓ PMSF, solución 100 mM (SIGMA)
- ✓ PBS1X frío
- ✓ Solución de NP-40 al 10% en TH

#### Procedimiento

- Las muestras de tejido se suspenden en solución de homogenización a razón de 1 ml por cada 100 mg de peso de tejido.
- Los tejidos se homogenizan con un homogenizador manual de teflón cuando la extracción se realiza a partir de músculo sóleo. Para muestras de mayor tamaño se usa un homogenizador mecánico con cuchillas. La extracción proteica aumenta su rendimiento si antes de homogenizala ésta se pulveriza con un mortero de porcelana previamente enfriado con nieve carbónica.
- Se homogeneiza durante 2 minutos a máxima velocidad.
- Se añade NP40 a una concentración final de 1% y se deja la muestra en agitación orbital a 4°C durante 30 minutos.
- Al finalizar, las muestras se centrifugan a 4°C durante 10 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de sobremesa. El sobrenadante, del que se reservan 10 µl para hacer la valoración de proteína, se transfiriere a un tubo eppendorf nuevo. Las muestras se conservan a -80 C.

### 1.12. Estudios de actividad

Los estudios de actividad de los ratones fueron realizados íntegramente en el Departamento de Psiquiatría y Medicina Forense de la Universidad Autónoma de Barcelona por la Dra. Rosa M<sup>a</sup> Escorihuela.



Los animales se ubicaron en jaulas individuales diseñadas para poder registrar imágenes de los ratones (Med Associates Inc). La captación de imágenes fue realizada por cámaras equipadas con sensores infrarrojos acopladas a un *software* de grabación programado para detectar dos tipos de movimiento: ambulación, que implica desplazamiento horizontal, y pequeños movimientos como los que realizan durante el acicalamiento o al ponerse sobre los cuartos traseros. Cada sesión fue de 24 horas con un intervalo de 12 horas de luz (8 a.m. a 8 p.m) y otro de 12 horas de oscuridad (8 p.m. a 8 a.m).

### 1.13. Ecocardiogramas

Este protocolo se realizó íntegramente en The Burnham Institute (La Jolla, San Diego) en colaboración con el grupo de la Dra. Pilar Ruíz-Lozano y con la ayuda de la Dra. Cecilia Schimia. El objetivo en este caso fue determinar la función *in vivo* del corazón de los animales que no expresan DMPK frente a animales control tras un tratamiento con isoproterenol. Se utilizaron ratones hembras de 20 semanas de edad.

#### *Material*

---

- ✓ Ecógrafo Visual Sonic Vevo 770 acoplado a un transductor lineal de 8-15 MHz
- ✓ Isoproterenol. Usamos 3 dosis distintas:
  - Alta: 0,2 µg/µl
  - Media: 0,02 µg/µl
  - Baja: 0,2 ng/µl
- ✓ Aquagel® (gel conductor)
- ✓ Pomada conductora
- ✓ Aparato de anestesia
- ✓ Isoflorano
- ✓ Balanza
- ✓ Jeringas

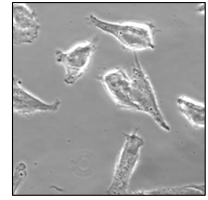
#### *Procedimiento*

---

- Se preparan las soluciones antes de la prueba. Las 3 dosis de se filtran antes de inyectar.
- Se pesan los animales y se calculan los volúmenes a inyectar. Se utilizan 10 veces en µl los gramos que pesa el animal.
- Se anestesia el animal en la cámara con isoflurano durante 1 minuto al nivel 5. Transcurrido ese tiempo se coloca sobre la superficie en la que se realizarán las mediciones con el hocico en el respirador ahora a nivel 1.
- Se aplica la pomada conductora a las extremidades del animal que se fijan a los sensores con ayuda de cinta adhesiva.
- Se depila la zona del tórax izquierdo.
- Se aplica Aquagel® para captar la señal con el ecógrafo.
- Se toman las medidas en modo B (bidimensional), M (monodimensional) y Doppler en condiciones basales.
- Se inyecta intraperitonealmente la dosis más baja de isoproterenol (2 ng por gramo de animal), se esperan 5 minutos y se toman las mismas medidas.

- Transcurridos 10 minutos de la primera inyección, se administra la siguiente dosis. Así hasta tomar todas las medidas con las tres dosis. La dosis media fueron 200 ng/g de ratón y la alta de 2µg/g de ratón.
- Finalizado el experimento, se retira al animal del respirador, se limpia y se devuelve a la jaula controlando que se recupere correctamente.

## Capítulo 2. MÉTODOS DE TRABAJO EN CULTIVO CELULAR



### 2.1 Generalidades

Cultivo celular es el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

#### 2.1.1 Condiciones de esterilidad

La manipulación de las células en cultivo se ha realizado siempre bajo una campana de flujo laminar vertical tipo NUAIRE de clase II, con bata y guantes rociados con etanol 70°. Antes de ponerse a trabajar en la campana se ha limpiado la superficie de trabajo con etanol 70° tras exponerla a unos 10 minutos de luz ultravioleta (UV). Todo el material que entró en la campana fue previamente esterilizado por temperatura (autoclave) o rayos gamma (material de plástico). Los medios de cultivo y soluciones que entraron en contacto con las células se calentaron a 37°C en un baño en agitación. Las soluciones que tuvieron que prepararse se pasaron por filtros de 0,25 µm de diámetro de poro. Las botellas sólo se abrieron dentro de la campana y no se dejaron abiertas más tiempo del requerido para retirar o añadir líquido. Asimismo, se tomó la precaución de no pasar la mano o cualquier otro material por encima cuando se encontraban abiertas. Todos los residuos biológicos se trataron con lejía antes de descartarlos en contenedores especiales.

#### 2.1.2 Condiciones de cultivo celular

El cultivo de células requiere el suministro de todos los nutrientes necesarios para el mantenimiento y crecimiento de las mismas. Las condiciones de cultivo que se han utilizado son 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> a humedad constante en incubadores NUAIRE™ DHD Autoflow CO<sub>2</sub> Air-Jacketed, con filtros HEPA. Los medios de cultivo se guardaron a 4°C y se atemperaron a 37°C cada vez que se utilizaron. No se usaron medios con más de 2 meses desde su preparación.

A lo largo de esta tesis se ha utilizado principalmente medio DMEM (Dubecco's Modified Eagle's Medium) con 25 mM de L-glucosa (SIGMA).

Según los requerimientos de cada condición experimental, los medios se suplementaron con:

- **Suero.** En esta tesis se ha empleado FBS (del inglés, *fetal bovine serum*) (de GIBCO o Biosera). Los sueros en cultivo aportan una mezcla de factores de crecimiento indispensable para la proliferación de las células *in vitro*.
- **Antibióticos.** Se ha utilizado estreptomycin a una concentración final de 100 µg/ml, que inhibe la síntesis de del ribosoma 70S bacteriano y 100UI/ml de penicilina que inhibe la síntesis de peptidoglicanos en la pared bacteriana. (CAMBREX Biowhittaker).

- **L-Glutamina.** Es un aminoácido inestable, por ello es necesario añadir 2 mM al medio antes de su uso y cada 15 días desde que se prepara el medio (CAMBREX BioWhittaker).
- **HEPES.** 25 mM de HEPES (CAMBREX BioWhittaker) servirá para mantener el pH del medio alrededor de 7,4.

## 2.2 Líneas celulares

En esta tesis se han utilizado las siguientes líneas celulares:

### 2.2.1 C2C12

Esta línea fue creada por Blau [Blau, 1985] a partir de la línea previamente establecida por Yaffe y colaboradores [Yaffe, 1977]. Las células C2C12 son de ratón y se diferencian formando fibras musculares que incluso llegan a contraerse en cultivo. Es muy importante evitar que estas líneas lleguen a confluencia ya que esto puede alterar las características de crecimiento y diferenciación.

Resulta un sistema aceptado para el estudio de la diferenciación muscular. El medio de proliferación que se ha usado es de DMEM suplementado con un 10% de FBS, penicilina, estreptomycin, L-glutamina y HEPES. El medio de diferenciación es DMEM suplementado con un 5% de suero de caballo (HS, horse serum), penicilina, estreptomycin, L-glutamina y HEPES.

### 2.2.2 HEK293

Ésta es una línea de células embrionarias de riñón humano transformadas con el objetivo de que expresen la región E1 de los adenovirus Ad5. Se utilizan para la producción de partículas víricas recombinantes a partir de adenovirus defectivos en la secuencia E1. El medio de proliferación es medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, penicilina, estreptomycin y L-glutamina.

### 2.2.3 HeLa

Esta línea celular fue de las primeras en aislarse y con las que se trabaja en muchos laboratorios de biología celular. Proviene de células tumorales de origen humano. El medio de proliferación es medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, penicilina, estreptomycin, L-glutamina, y piruvato de sodio (CAMBREX BioWhittaker).

## 2.3 Técnicas de cultivo celular

### 2.3.1 Subcultivo

Este protocolo se ha usado para separar las células de la superficie de crecimiento con el objetivo de amplificarlas o de preparar las placas para realizar los experimentos. En todas las líneas celulares, para proceder al subcultivo se partió de células subconfluentes.

### Material

- ✓ Medio de cultivo suplementado
- ✓ PBS (SIGMA)
- ✓ Tripsina (GIBCO)

### Procedimiento

- Se aspira y se descarta el medio viejo.
- Se lavan las células con PBS dos veces
- Se añade 1 ml de tripsina por cada 55 cm<sup>2</sup> de superficie.
- Se ponen las células con la tripsina en el incubador, no más de 1 minuto.
- Cuando se retiran del incubador, se golpea la placa o el flascón con cuidado para facilitar el desprendimiento de las células.
- Para bloquear la acción de la tripsina, se añade el medio de cultivo completo. Como mínimo el mismo volumen que se ha puesto de tripsina.
- Se recogen las células en dos lavados sucesivos de la placa o flascón y se pasan a un tubo de 15 ml.
- Se centrifugan los tubos a 400g durante 3 minutos para que bajen las células.
- Se aspira y descarta el sobrenadante y se resuspenden las células en medio nuevo pipeteando suavemente arriba y abajo 20 veces.
- Se diluyen las células en medio de cultivo en función de los requerimientos experimentales (tipo celular, tipo de placa, etc). Se coloca medio de cultivo en la placa o flascón antes de sembrar las células para facilitar que las mismas se distribuyan por toda la superficie.

Recipiente de cultivo	Área de crecimiento (cm <sup>2</sup> )	Número aprox. de células HeLa (confl.90%)
Placas Multipocillo		
96-well	0,32-0,6	4-5 x 10 <sup>4</sup>
48-well	1,0	1.3 x 10 <sup>5</sup>
24-well	2,0	2.5 x 10 <sup>5</sup>
12-well	4,0	5 x 10 <sup>5</sup>
6-well	9,5	1.2 x 10 <sup>6</sup>
Placas		
35 mm	8	1 x 10 <sup>6</sup>
60 mm	21	2.5 x 10 <sup>6</sup>
100 mm	56	7 x 10 <sup>7</sup>
145-150 mm	145	2 x 10 <sup>7</sup>
Flascones		
40-50 ml	25	3 x 10 <sup>6</sup>
250-300 ml	75	1 x 10 <sup>7</sup>
650-750 ml	162-175	2 x 10 <sup>7</sup>
900 ml	225	3 x 10 <sup>7</sup>

### 2.3.2 Recuento de células

Se utilizó una cámara de Neubauer que consta de dos partes, cada una dividida en 9 cuadrados de 1 mm<sup>2</sup>. Dado que 1 cm<sup>3</sup> es equivalente a 1ml, la concentración por ml será la media del recuento de células por 10<sup>4</sup>.

#### *Material*

---

- ✓ Cámara de recuento (HYCOR Biomedical Inc.)
- ✓ Trypan Blue (GIBCO). Es un colorante que sólo teñirá a las células muertas

#### *Procedimiento*

---

- Se parte de células tripsinizadas.
- Se ponen 50 µl de Trypan Blue en un pocillo de una placa multipocillo de 96.
- Se añaden 50 µl de la suspensión de células que ha de estar muy bien resuspendida.
- Se toman 10 µl de la mezcla y lo ponemos en la cámara de Neubauer, esto se hace por duplicado.
- Se cuentan las células no teñidas de los recuadros diagonales.
- Se hace la media y multiplicamos por 2 porque se ha hecho una dilución de la resuspensión de las células 1:1, y por 10<sup>4</sup>.

### 2.3.3 Congelación de células

Para congelar las células tripsinizadas, después de centrifugarlas se resuspenden en FBS con un 10% de DMSO estéril (SIGMA) que actúa como agente crioprotector. Se distribuye 1 ml de esta suspensión de células en criotubos de 2 ml y se congelan a -80°C en un recipiente con isopropanol que debido a sus propiedades físicoquímicas permite que el enfriamiento sea continuo a razón de 1°C por minuto evitando así la formación de cristales que podrían dañar las células. Después de 16-24h a -80°C el criotubo puede guardarse en nitrógeno líquido que preserva la viabilidad celular.

### 2.3.4 Descongelación de células

La descongelación se realizó siempre con rapidez, pues el DMSO es tóxico para las células a temperatura ambiente. Por ello, inmediatamente tras retirar las células del tanque de nitrógeno líquido, se pasan a un baño a 37°C. Seguidamente se resuspenden en medio de cultivo también a 37°C y se pasan a un tubo de 15 ml donde se centrifugan para poder retirar el sobrenadante con el DMSO. Finalmente se resuspende el *pellet* de células en medio nuevo para sembrar las placas de cultivo.

## 2.4 Protocolos de transfección

Durante el trabajo realizado en esta tesis se han usado varias técnicas de transfección en función del tipo celular que se ha usado y la eficiencia de transfección en cada uno de ellos.

### 2.4.1 Transfección mediante fosfato cálcico en células HeLa

El método del fosfato cálcico se basa en la introducción de un coprecipitado de ADN exógeno y fosfato cálcico en la célula. No se conocen en detalle los mecanismos que intervienen en esta incorporación pero se sabe que se forma un precipitado al mezclar dos soluciones, una salina que contiene cloruro de calcio y otra tamponada que contiene el fosfato; el ADN se incorpora a este precipitado. Inicialmente, éste se adhiere a la superficie de la célula y posteriormente se incorpora hacia el interior. Aparentemente, el agregado con calcio protege al DNA de la degradación por las nucleasas celulares. El tamaño y la calidad del precipitado es crítico para el éxito del proceso, que se ve afectado por factores tales como pequeños cambios en el pH de la solución. Por ello es necesario poner a punto la técnica determinando el pH óptimo de transfección para cada ADN recombinante.

#### 2.4.1.1 Preparación de los tampones

##### Material

	Cat.	MW	Pesar	Conc. final
<b>Solución de NaOH</b>				
NaOH	MERCK, #106498	40 g/mol	1 g	0,5M
H <sub>2</sub> O MilliQ hasta:			50 ml	
<b>Solución de Cloruro de Calcio</b>				
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	SIGMA, #C3881	147,02 g/mol	3,67 g	500 mM
BES	FLUKA, #14853	213,26 g/mol	1,066 g	100 mM
H <sub>2</sub> O MilliQ hasta:			50 ml	
<b>pH 6,95</b>				
<b>Tampón Fosfato</b>				
NaCl	SERVA, #30183	58,44 g/mol	8,18 g	280 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	SIGMA, #S7907	142 g/mol	53,25 mg	0,75 mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	MERCK, #106346	138 g/mol	51,75 mg	0,75 mM
BES	FLUKA, #14853	213,26 g/mol	5,33 g	50 mM
H <sub>2</sub> O MilliQ hasta:			50 ml	
<b>Se prepara al pH más ácido de los que queremos evaluar</b>				

##### Procedimiento

- Una vez preparado el tampón fosfato con el pH más ácido colocamos 40 ml de esa solución en un falcon de 50 ml.
- Añadimos NaOH 0,5 M hasta cambiar el pH de la solución de 0,03 en 0,03 unidades para preparar una batería de tampones con pHs diferentes.
- Una vez preparadas las soluciones se filtran en la campana con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

#### 2.4.1.2 Determinación del pH óptimo de transfección

A continuación se describe cómo se elige el pH óptimo del tampón fosfato para un determinado plásmido. En este ejemplo en concreto, el plásmido es el pcDNA4, que se mezcla con una cantidad trazadora de pGFP (green fluorescent protein) para poder analizar por fluorimetría la eficiencia de transfección. El procedimiento a seguir es el mismo para transfectar cualquier plásmido por este método.

Tener en cuenta para transfectar:

Material	Cantidad óptima de células	Área	DNA		Medio
			µg	vol	
Placa 10 cm de diámetro	800000	56 cm <sup>2</sup>	20 µg	250 µl	10 ml
Placas multipocillo de 6	160000	9,5 cm <sup>2</sup>	4 µg	50 µl	2 ml
Placas multipocillo de 24	35000	2,0 cm <sup>2</sup>	1 µg	12,5 µl	0,5 ml

---

### Material

- ✓ Relación básica de las soluciones,
  - DNA: Solución de Calcio (1:1),
  - (DNA+Solución de de Calcio): Tampón fosfato (1:1)

---

### Procedimiento

- Se prepara la solución de DNA para transfectar.
- Para transfectar placas multipocillo de 6 pozos con se mezclan 4 µg de DNA (3 µg de pCDNA4 y 1 µg de plásmido con GFP) con agua destilada estéril (agua milliQ filtrada o *aqua ad iniectabilia*) hasta un volumen de 50 µl en un eppendorf.
- Se añaden 50 µl de la solución de calcio y se agita (proporción 1:1).
- Se hace un *spin* para asegurarse de que todo el volumen está en el fondo del tubo.
- Se añaden 100 µl de tampón fosfato suavemente y con ayuda de una pipeta (pipeta de 2 ml más una punta amarilla en el extremo) hacemos burbujear suavemente la solución.
- Mientras se incuba la preparación como mínimo 15 minutos se siembran las células en las placas multipocillo.
- Se tripsinizan y centrifugan células HeLa de una placa de 10 cm de diámetro confluyente (aprox.90%). El *pellet* se resuspende en 6 ml de DMEM+10%FBS (sin antibióticos).
- Se reservan 0,25 ml de la suspensión que se lleva a un volumen final de 10 ml con medio completo para sembrar en una nueva placa de mantenimiento.
- Para las transfecciones, se siembran 0,25 ml de la suspensión de células por pocillo más 1,75 ml de medio sin antibióticos.
- Como 0,25 ml es un volumen pequeño preparamos la solución de células para todos pHs. El número de pocillos que se siembran es igual al número de pHs que se evaluarán más un pocillo que no se transfecta y servirá para determinar los parámetros de las células sin transfectar en el citómetro.
- Se añade despacio y agitando el preparado de ADN a la placa donde están las células para que se mezcle bien.
- Al día siguiente por la mañana se cambia el medio por uno nuevo con antibióticos.
- 24 horas después (30 horas tras la transfección) se lavan las células con PBSX1.
- Se añade tripsina (100 µl para 10 cm<sup>2</sup>) y se deja que las células se despeguen de la placa en el incubador.
- Se añaden 400 µl de medio completo.



- Se pasan las células a un eppendorf estéril y se centrifugan 5 minutos a 400g.
- Se aspira el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en paraformaldehído (PFA) al 0,5 %. (500 ml PFA4% + 3,5 ml PBS 1X).
- Se guarda la suspensión de células a 4 °C hasta que se puedan pasar por el citómetro.

## 2.4.2 Co-transfecciones

### 2.4.2.1 Transfección de células HeLa con METAFECTENE™ PRO

La transfección usando reactivos catiónicos liposomales es de los métodos más utilizados, en gran parte debido a su facilidad de uso y su eficiencia. Se basa en empaquetar el ADN en liposomas que se fusionan con la membrana plasmática y liberan el ADN dentro de la célula. Varias casas comerciales suministran sus liposomas con composiciones lipídicas variadas, algunas son mejores que otras para tipos celulares determinados variando en su toxicidad y eficiencia de transfección.

#### *Material*

---

- ✓ Kit de transfección METAFECTENE™ PRO

#### *Procedimiento*

---

Día 1. Se siembran las células. Para una placa de 12 pocillos se sembraron 100000 células/pozo y para una de 6 pocillos 250000 células/pozo. Las células han de estar a una confluencia del 90-100% en el momento de la transfección. Generalmente se siembran las células por la mañana, y al día siguiente por la tarde se transfectan.

Día 2. Las transfecciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente:

- Se pone la solución con el ADN plasmídico que queremos transfectar y el reactivo Metafectene a temperatura ambiente durante unos minutos.
- Se agita suavemente y se preparan en tubos eppendorf de 1,5 ml, las soluciones siguientes para una placa de 6 pocillos:
  - A: 4 µg de ADN plasmídico en 100 µl de PBSX1 estéril
  - B: 16 µl de Metafectene en 200 µl de PBSX1 estéril
- Se añade la solución con del ADN (A) a la solución con el Metafectene (B), se mezcla suavemente.
- Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.
- Durante los 15 minutos de incubación, se cambia el medio de las células que se transfectarán.
- Se añade la mezcla de A y B gota a gota sobre las células.
- Al día siguiente se cambia el medio.
- Dos días después de la transfección ya se puede analizar la expresión del transgen.

#### 2.4.2.2 Transfección de células HeLa con Lipofectamine©

Este protocolo está ajustado para transfección en un formato de placas de 24 pocillos.

##### *Material*

---

- ✓ Kit de transfección Lipofectamine® de Invitrogen (Cat.#11668-027)

##### *Procedimiento*

---

Día 1. Se siembran  $0,5 \times 10^5$  células en 500  $\mu$ l de medio de crecimiento sin antibióticos. Las células deben encontrarse en una confluencia del 70-90% en el momento de la transfección.

Día 2. Las transfecciones se realizan siguiendo las instrucciones del fabricante, brevemente:

- Se diluyen 1,6  $\mu$ g de ADN por pocillo de células a transfectar en 50  $\mu$ l de Medio Opti-MEM I sin suero y se mezcla suavemente. Si se trata de una co-transfección se utilizan 0,8  $\mu$ g de cada plásmido.
- Se mezclan 2  $\mu$ l de Lipofectamina con 48  $\mu$ l de Opti-MEM. Se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. En menos de 25 minutos se debe proseguir con el paso siguiente.
- Después de 5 minutos de incubación, se combina el ADN diluido con la Lipofectamina diluida. El volumen total será de 100  $\mu$ l. Se mezcla suavemente y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución puede tomar un aspecto turbio. Los complejos que se forman son estables 6 horas como máximo.
- Se añaden los 100  $\mu$ l de los complejos a cada pocillo. Se mezcla moviendo suavemente la placa hacia delante y hacia atrás.
- Se cambia el medio tras 4-6 horas. Se dejan las células en el incubador durante 18-48 horas antes de testar la expresión del transgen.

## 2.5 Extracción de proteína a partir de cultivo celular

##### *Material*

---

- ✓ El Tampón de homogenización (TH) es el mismo que se usa para extracción proteica a partir de tejido, ver apartado 1.11 de Material y métodos
- ✓ Comprimidos cóctel inhibidor de proteasas *Complete* (Roche)
- ✓ PMSF, solución 100 mM (SIGMA)
- ✓ Solución de NP-40 al 10% en TH

##### *Procedimiento*

---

- Se prepara el tampón homogenización completo (THC). Para 10 ml:
  - Se tritura un comprimido de *Complete*.
  - Se añaden 10 ml de TH y se disuelve bien.
  - Se añaden 10  $\mu$ l del stock 100 mM de PMSF.

-De la solución THC preparada se reservan 1,8 ml para preparar el tampón de lisis (TL).

- Se ponen las placas con las células sobre hielo y se lavan las células con 1 ml de PBS1X frío por cada 10 cm<sup>2</sup> de cultivo (1 pocillo de una Multipocillo de 6 pozos)
- Se añaden THC (400 µl/multipocillo de 6; 5 ml para placas de 10 cm de diámetro) y se rascan las células con ayuda de un *scraper* pasándolas después a un tubo en hielo.
- Se lava la placa con THC (200 µl/multipocillo de 6; 2 ml para placas de 10 cm de diámetro) para acabar de recoger las células. Se centrifuga el tubo durante 5 minutos a 400g a 4°C.
- Se prepara el tampón de lisis (TL) añadiendo 200 µl de NP-40 10% al THC que se había reservado.
- Se aspira el sobrenadante y se resuspende en TL (50 µl/multipocillo de 6; 250 µl para placas de 10 cm de diámetro). El volumen usado para la lisis se puede variar en función de la concentración de proteína final que se necesite y de la cantidad de células de las que se disponga.
- Se incuba de 30 a 45 minutos en agitación a 4°C.
- Se centrifugan las muestras 15 minutos a 16000g a 4°C
- Se recupera el sobrenadante y se pasa a un eppendorf nuevo. Se reservan unos 6 µl para valorar proteína.
- Se congelan las muestras a -80°C.

## 2.6 Inmunocitoquímica

### Material

- ✓ Preparar las siguientes soluciones:

	Cat.	MW	Pesar	Conc. final
<b>Solución de NH<sub>4</sub>Cl</b>				
NH <sub>4</sub> Cl	SIGMA, #A4514	53,49 g/mol	0,267 g	50 mM
PBS hasta			100 ml	
<b>Solución de Glicina</b>				
Glicina	CARLO ERBA, #453751	75,07 g/mol	0,15 g	20 mM
PBS hasta			100 ml	
<b>Solución de Tritón 0,1%</b>				
Tritón X-100	SIGMA, #X100		100 µl	0,1%
PBS hasta			100 ml	
<b>Solución de 10%FBS</b>				
FBS(*)			10 ml	10%
PBS hasta			100 ml	

(\*) El FBS se descongela y la dilución se prepara al momento

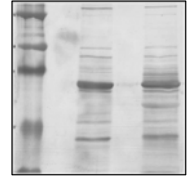
- ✓ Mowiol (ver capítulo 7 de Material y métodos)
- ✓ Cubreobjetos de 12 mm de diámetro esterilizados por UV

Procedimiento

---

- Las células se siembran en placas multipocillo en las que hay cubreobjetos estériles. Transcurrido el tiempo necesario en función del método usado de transfección o infección y el tratamiento que corresponda se procede a realizar la inmunocitoquímica.
- Se descarta el medio y se lavan las células con PBSX1.
- Se fijan 30 minutos con PFA 4%.
- Tras lavar 5 minutos más con PBSX1, se incuban los cubreobjetos durante 10 minutos con la solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para eliminar la autofluorescencia.
- Se realiza un primer bloqueo de los cubreobjetos con la solución de glicina durante 10 minutos.
- Se permeabilizan las membranas celulares durante 10 minutos en la solución de Tritón 0,1% o saponina 0,1% si se usa el anticuerpo primario contra GM130.
- Se bloquean posibles uniones inespecíficas de los anticuerpos con una solución al 10% de FBS durante 30 minutos.
- El anticuerpo primario diluido en la solución de FBS al 10%. Cada cubreobjeto se incuba con la superficie de las células boca abajo sobre una gota de 25  $\mu\text{l}$  de solución de anticuerpo primario. La incubación se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente ó 16 horas a 4 °C según el anticuerpo y las instrucciones del proveedor.
- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBSX1.
- Se incuba 30-45 minutos a temperatura ambiente con 25  $\mu\text{l}$  de solución de anticuerpo secundario por cubreobjeto.
- Se hacen 3 lavados de 5 minutos con PBSX1.
- Se retira el exceso de PBSX1 con ayuda de pañuelos de papel.
- Los cubres se montan sobre portaobjetos usando 7,5  $\mu\text{l}$  de solución de Mowiol por cubreobjeto.
- Se dejan secar 12 horas antes de examinarlos al microscopio. Los cubreobjetos se pueden guardar a 4°C.

## Capítulo 3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS



### 3.1 Detección de proteínas

#### 3.1.1 Valoración de proteínas.

La cuantificación de proteínas en las extracciones a partir de tejido o de células se ha realizado con el reactivo de ensayo de proteínas BCA (*Protein Assay Reagent*, PIERCE). Este reactivo es el que menos interferencias presenta con los detergentes presentes en los tampones de homogenización que se han utilizado durante esta tesis. El método se basa en que las proteínas reaccionan con el Cu(II) y forman Cu(I), que reacciona con el ácido bicinconínico (BCA) para formar un compuesto que tiene color púrpura.

#### *Material*

- ✓ Placa multipocillo de 96 pozos
- ✓ Reactivo BCA
- ✓ Albúmina 1mg/ml
- ✓ Tampón de homogenización en el que están preparadas las muestras (TH)

#### *Procedimiento*

- Se prepara la recta patrón como se indica en la tabla en una placa de 96 pocillos:

	BSA 1mg/ml	TH	H <sub>2</sub> O
A	-	2 µl	20 µl
B	1 µl	2 µl	19 µl
C	2 µl	2 µl	18 µl
D	5 µl	2 µl	15 µl
E	10 µl	2 µl	10 µl
F	15 µl	2 µl	5 µl
G	20 µl	2 µl	-

- Para valorar las muestras se ponen 2 µl de cada una por duplicado y se les añade 20 µl de H<sub>2</sub>O destilada para igualar el volumen con la recta patrón.
- Se añade en todos los pocillo 200 µl de reactivo BCA fresco que se prepara según las indicaciones del fabricante (49 partes de reactivo A más una parte de reactivo B).
- Se incuba la placa a 37°C durante 30 minutos.
- La placa se lee a 562 nm con el programa en un espectrofotómetro acoplado a un ordenador con el software KCJunior.

### 3.1.2 Western-Blot

#### 3.1.2.1 Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida.

Se trata de un método para separar proteínas en función de su tamaño [Laemmli, 1970]. Consiste en desnaturalizar y cargar negativamente las proteínas de la muestra mediante el detergente dodecilsulfato sódico (SDS). Esto permite que bajo un campo eléctrico y dentro de una matriz de acrilamida-bisacrilamida las proteínas se desplacen con una velocidad que va a depender de su tamaño. En este trabajo se ha utilizado siempre el sistema Mini-Protean de la casa comercial BIO-RAD. El protocolo se divide en las siguientes partes: (a) preparación de las muestras, (b) polimerización de los geles, (c) carga de las muestras y migración, y opcionalmente (d) tinción del gel.

#### a. Preparación de las muestras

##### *Material*

---

Tampón de carga Laemmli X4 (LSBX4)	
Tris HCl 2M pH6,8	4 ml
Glicerol	16 ml
SDS	1,6 gr
Azul de bromofenol	1 mg
H <sub>2</sub> O hasta	20 ml

Este tampón es muy denso y por lo que es necesario calentarlo unos minutos para poder usarlo.

- ✓ Ditiotreitól (DTT) 2 M o beta-mercaptoetanol ( $\beta$ -ME)
- ✓ Muestras proteicas valoradas
- ✓ Agua bidestilada

##### *Procedimiento*

---

- Se preparan las muestras en hielo, en general 50  $\mu$ g de proteína igualando en volumen final de todas las muestras con agua bidestilada.
- Se añade LSBX4 y DTT o  $\beta$ -ME (concentración final 0,1 M o 2%, respectivamente).
- Se calientan las muestras a 98°C durante 1 minuto.
- Se pasan a hielo durante 2 minutos.
- Se centrifugan a velocidad máxima durante 30 segundos y se cargan en el gel.

**Nota:** las muestras así preparadas se pueden guardar congeladas a -20°C.

### b. Polimerización de los geles

Se utilizan dos tipos de geles para realizar la electroforesis, uno de empaquetamiento (*stacking*) y otro separador (*resolving*). El gel de empaquetamiento tiene un porcentaje muy bajo de acrilamida (3,3%), esto hace que se forme un poro muy grande una vez polimerizado facilitando así el paso de todas las proteínas, independientemente de su tamaño, hasta llegar al principio del gel separador donde se acumulan. El gel separador contiene un porcentaje de acrilamida mayor, los más frecuentemente utilizados contienen entre un 7,5% y un 15%, cuanto menos acrilamida mayor será el poro que se forme y a la inversa. En función del rango de pesos moleculares de las proteínas que se necesita separar se usa un porcentaje u otro.

#### Material

Gel	Separador ( <i>resolving</i> )					Empaquetador ( <i>stacking</i> )	
	7,5%	8,5%	10%	12%	15%		
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	4,89 ml	4,5 ml	4 ml	3,4 ml	2,4 ml	3,1 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>
Tris 1,5M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	1,25 ml	Tris 1,5M pH 6,8
Acril 30%	2,5 ml	2,8 ml	3,3 ml	4 ml	5 ml	0,55 ml	Acril 30%
						50 µl	SDS 10%
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	5 µl	TEMED
PSA	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl	PSA
Volumen final	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	5 ml	

Cantidades necesarias para preparar geles de distinto porcentaje.

#### Procedimiento

- Se limpian con etanol los cristales que servirán de molde para el gel y se monta el sistema siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Se preparan 10 ml de solución para hacer el gel separador siguiendo las cantidades indicadas en la tabla. Es importante añadir persulfato de amonio (PSA) y TEMED al final ya que estos son los responsables de la catálisis de la polimerización.
- Se pone la solución entre los dos cristales y se añade 1-2 ml de agua bidestilada para evitar el contacto de la solución con el oxígeno del aire que podría inhibir la polimerización.
- Una vez polimerizado el gel separador, se retira el agua y se pone la solución empaquetadora.
- Rápidamente se pone el “peine” que servirá para formar los pocillos que permitirán cargar la muestra.

c. Carga de las muestras y migración

Para identificar los pesos moleculares de las proteínas de la muestra se carga un carril con marcadores de peso molecular conocido y preteñido (mezcla de proteínas de peso conocido con colorantes). Este carril servirá para controlar la electroforesis mientras esta tiene lugar.

*Material*

---

Tampón de Electroforesis 10X ( <i>Running</i> ) 1 L	
Tris base	30,3 gr
Glicina	144 gr
SDS	10 gr
H <sub>2</sub> O hasta	1 L

- ✓ Se diluye el tampón de *running* X10 en agua para obtener una solución X1.
- ✓ Fumarasa preteñida (SIGMA, 57kDa) al 0,02% en tampón LSBX1.
- ✓ Marcadores de peso molecular comerciales preteñidos: Broad Range (BioRad) y Rainbow (Amersham)

*Procedimiento*

---

- Una vez el gel polimeriza se retira el “peine” y se coloca el gel y los dos cristales en el soporte diseñado para ello.
- Se sumerge el gel junto al soporte en la solución de electroforesis X1 evitando que se formen burbujas de aire.
- Se cargan los marcadores, la fumarasa y las muestras usando una pipeta o una jeringa Hamilton.
- Se tapa la cubeta y se hace correr la electroforesis a 80-125 voltios durante un tiempo que puede oscilar entre 1 y 2 horas, siempre controlando el frente de avance para evitar perder las proteínas de menor peso molecular.
- Se desmonta el sistema y se separa el gel de los cristales. En este punto se puede optar por teñir el gel con colorante azul de Comassie o bien transferir las proteínas a una membrana para hacer una inmunodetección.

d. Tinción del gel

*Materiales*

---

	Solución de tinción	Solución desteñidora
Ácido acético	7,5%	7,5%
Isopropanol	25%	7,5%
Brilliant Blue	0,05%	



*Procedimiento*

- Se sumerge el gel en una cubeta con solución de tinción y se deja 1 hora a temperatura ambiente y rotación suave.
- Se hacen varios lavados con solución desteñidora hasta que sólo se observen las proteínas teñidas fijadas en el gel.
- Opcionalmente y si interesa conservar el gel, se puede secar en un secador de geles. Las condiciones de tiempo y temperatura se ajustarán a las características del gel.

## 3.1.2.2 Transferencia del gel e inmunodetección de proteínas

Esta técnica consiste en el paso de las proteínas ya separadas del gel a una membrana sintética (electrotransferencia), sobre la que se podrán detectar proteínas concretas mediante el uso de anticuerpos. De nuevo se saca partido de la capacidad de las proteínas cargadas negativamente de migrar en un campo eléctrico hasta la membrana sintética, después se realiza un bloqueo para prevenir uniones inespecíficas del anticuerpo y finalmente se usan anticuerpos específicos (primarios) contra las proteínas de interés. Los anticuerpos primarios se detectan mediante anticuerpos secundarios conjugados con el enzima de la peroxidasa de rábano HRP (*Horseradish Peroxidase*) que cataliza la reacción química de un sustrato comercial obteniendo un producto luminiscente (inmunodetección). Este protocolo se divide en tres partes: (a) electrotransferencia de las proteínas, (b) inmunodetección y (c) *stripping*.

a. Electrotransferencia de las proteínas*Materiales*

Tampón de Transferencia 10X (Transfer) 1L	
Tris base	30,3 gr
Glicina	144 gr
SDS	-
H <sub>2</sub> O hasta	1L

- ✓ Se diluye el tampón de transferencia X10 al que se le añade un 20% de metanol.
- ✓ Membrana de PVDF (Inmobilon-P, Millipore).
- ✓ Papel Whatman 3MM
- ✓ Metanol

### *Procedimiento*

---

- Una vez finalizada la electroforesis el gel se desmolda de los cristales y se descarta el gel de empaquetamiento. El gel de separación se sumerge en tampón de transferencia X1.
- Se corta una membrana del mismo tamaño que el gel. Para geles pequeños: 8,5 cm x 5,5 cm. La membrana de PVDF se activa con metanol durante 1-2 minutos y se pasa a un recipiente con tampón de transferencia.
- El montaje de la transferencia se hace como se indica a continuación. En primer lugar, se pone tampón de transferencia en un recipiente suficientemente grande como para que quepan las carpetas de transferencia. El lado de la carpeta que queda en el cátodo (-), de color negro, se sumerge mientras que el otro (+), transparente, queda levantado. Se pone una de las esponjas bien empapadas en tampón de transferencia. Se humedece también un trozo de papel Whatman de un tamaño algo mayor que el gel y se coloca inmediatamente encima de la espuma. Se coloca el gel sobre el papel con cuidado para evitar romperlo. Encima del gel se pone la membrana de PVDF procurando que no queden burbujas que interrumpan el paso de la corriente. Se añade otro papel Whatman húmedo y finalmente la otra esponja empapada. Se cierra la carpeta sujetándola con la pinza que lleva incluida y se coloca en el soporte para la transferencia. El lado negro de la carpeta queda en el lado del cátodo del soporte, también de color negro. Las proteínas migrarán desde el gel hacia el ánodo (+), de color rojo en el soporte, dirección en la que se encuentra la membrana donde quedarán retenidas.
- Se añade la placa de hielo al sistema para que no se caliente en exceso durante la transferencia. Se llena la cubeta con tampón de transferencia y se aplica una corriente constante de 250 mA durante, por lo menos, una hora.
- Finalmente se desmonta el sistema, siempre evitando que la membrana se seque. Es recomendable hacer un corte en una esquina de la membrana para conocer en todo momento la orientación de la misma y por lo tanto el orden de las muestras. La presencia de los marcadores preteñidos en la membrana nos indica que la transferencia ha tenido lugar con éxito.

### b. Immunodetección

#### *Materiales*

---

- ✓ Tampón de lavado: TBSX1 y Tween-20 (SIGMA) al 0,001% (500 µl en 500 ml de TBS)
- ✓ Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo al 5% en solución de lavado.
- ✓ Solución del anticuerpo primario: anticuerpo primario (la concentración final depende de las instrucciones del proveedor) en solución de bloqueo o bien sustituyendo la leche por un 5% de BSA (dependiendo de las recomendaciones del proveedor).

- ✓ Solución del anticuerpo secundario: anticuerpo secundario en la solución de bloqueo. El anticuerpo secundario está preparado en alícuotas a las que se le añade el mismo volumen de glicerol para evitar que se recongele cada vez que se guarda a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tipos de anticuerpo secundario utilizados:
  - Producido en burro contra IgG de ratón y acoplado a HRP: Anti-*mouse* IgG (Jackson Labs.) en una dilución 1:25000.
  - Producido en burro contra IgG de conejo y acoplado a HRP: Anti-*rabbit* IgG (Jackson Labs.) en una dilución 1:25000.
- ✓ Películas de radiografía (AGFA)
- ✓ Reactivo ECL (Amersham o PIERCE)

### *Procedimiento*

- Se bloquea la membrana en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.
- Tras el bloqueo, se prepara un sobre de plástico donde se coloca la membrana y la solución del anticuerpo primario y se sella. Se pone a rotar en un orbital a  $4^{\circ}\text{C}$  de 16 a 18 horas.
- Se recupera la solución del anticuerpo primario que podrá reutilizarse de 2 a 5 veces dependiendo del anticuerpo.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución de lavado.
- Se incuba la membrana a temperatura ambiente con 25 ml de solución de anticuerpo secundario.
- Se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución de lavado.
- Se incuba la membrana durante 1 minuto en reactivo ECL y se pone entre dos plásticos para evitar que se seque.
- En la cámara oscura se realizan varias exposiciones que pueden variar entre 5 segundos y 30 minutos, según el anticuerpo usado, en una película de radiografía a temperatura ambiente.

### *c.Stripping*

Este método permite reutilizar las membranas de Western ya que arranca los anticuerpos (especialmente el secundario) que se han quedado pegados en un primer proceso de inmunodetección.

### *Material*

Solución de <i>stripping</i>	
Tris-HCl 1M, pH6,7	6,25 ml
SDS 10%	20 ml
BME	0,7 ml
H <sub>2</sub> O hasta	100 ml

- ✓ Solución de lavado (igual que en inmunodetección)
- ✓ Solución de bloqueo (igual que en inmunodetección)

*Procedimiento*

---

- Se calienta un baño a 56°C.
- Se hidrata la membrana con metanol durante 1-2 minutos.
- Se hace un lavado de 5 minutos con solución de lavado.
- Se pone la membrana en un recipiente con la solución de *stripping*, lo cerramos bien y lo ponemos en el baño durante 30 minutos.
- Se recupera la solución de *stripping*, que se puede reutilizar varias veces.
- Se hacen 3 lavados de 10 minutos con solución de lavado.
- Se bloquea la membrana de nuevo con solución de bloqueo durante 1 hora para realizar una nueva inmunodetección.

### 3.2 Determinación de insulina en plasma

Para determinar la insulina en plasma se utilizó un kit basado en la técnica del ELISA, siguiendo las guías y recomendaciones del fabricante tal y como se describe a continuación.

*Materiales*

---

- ✓ ELISA ultrasensitivo de insulina de ratón (Mercodia)
- ✓ 5 µl de plasma

*Procedimiento*

---

- El ensayo se basa en la unión de la insulina presente en las muestras a dos anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epítomos de la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra (5 µl de plasma) reacciona con anticuerpos anti-insulina conjugados a la enzima peroxidasa que forman parte de la solución de incubación y con los anticuerpos anti-insulina unidos al pocillo de la placa (2 horas a temperatura ambiente). Tras un lavado que retira el anticuerpo conjugado al enzima que no se ha unido a la insulina y por lo tanto tampoco ha sido unido al pocillo de la placa, se detecta el enzima conjugado unido a la placa en presencia del sustrato 3,3',5,5'-tetrametibenzidina (30 minutos). La reacción se detiene en un medio ácido y se realiza una lectura colorimétrica a 450 nm. A partir de una recta patrón de concentraciones conocidas de insulina incluidas en la placa, se determina la concentración de insulina presente en las muestras.

### 3.3 Determinación de adiponectina en plasma

Se ha utilizado un kit para detección de la adiponectina en plasma basado en la técnica del ELISA. Se han seguido las guías y recomendaciones del fabricante tal y como se describe a continuación.

#### *Materiales*

---

- ✓ Kit ELISA para la detección de adiponectina de ratón (Linco Research)
- ✓ 2 µl de plasma

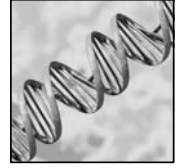
#### *Procedimiento*

---

- El ensayo se basa en la captura de las moléculas de adiponectina procedentes de la muestra (20 µl de una dilución 1/10000 de plasma de ratón) por anticuerpos monoclonales anti-adiponectina que se encuentran unidos a los pocillos de la placa. A éstos se le une un anticuerpo policlonal biotinilado anti-adiponectina (2 horas en agitación a temperatura ambiente), tras lavar los reactivos en exceso (no unidos) se conjuga enzima peroxidasa al anticuerpo biotinilado (30 minutos). La actividad del enzima retenido en el complejo se determina en presencia del sustrato 3,3',5,5'-tetrametibenzidina (de 5 a 20 minutos en agitación). La reacción se detiene en medio ácido y se lee la absorbancia de la placa a 450 nm. A partir de una recta patrón de concentraciones conocidas de adiponectina incluidas en la placa, de determina la concentración de adiponectina presente en las muestras.



## Capítulo 4. TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS



### 4.1 ADN

#### 4.1.1 Técnicas generales de manipulación

El trabajo con ácidos desoxiribonucleicos (ADN) y bacterias requiere la utilización de material estéril para prevenir contaminaciones con enzimas que pueden degradar el ADN. La manipulación de las bacterias se realiza siempre a menos de un palmo de distancia de la llama de un mechero Bunsen. El material se esteriliza en el autoclave o bien se adquiere de las casas comerciales ya esterilizado por radiación. Los reactivos que se utilizan en el procesamiento del ADN han de ser adecuados para dicho trabajo, así por ejemplo el agua ha de ser de calidad ultrapura, comercial (Fresenius Kabi) o bien obtenida por el sistema MilliQ de Millipore. Si las soluciones no se pueden pasar por el autoclave se hacen pasar a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

#### 4.1.2 Transformación bacteriana con ADN plasmídico

El proceso de transformación es aquel por el cuál las bacterias competentes incorporan ADN exógeno, en este caso un plásmido, permitiendo de esta manera amplificarlo, guardarlo e incluso modificarlo. Durante esta tesis las transformaciones se han hecho por choque térmico (*heat shock*). Las bacterias *Escherichia coli* TOP10 competentes con RbCl fueron preparadas de manera rutinaria por el equipo técnico del laboratorio (Lidia Sánchez, Ainhoa García y Yaiza Esteban).

#### *Material*

- ✓ Bacterias competentes (200  $\mu\text{l}$ ) con una eficiencia de transformación superior a  $10^7$  cfu/ml
- ✓ Medio de crecimiento bacteriano LB
- ✓ Plásmido a transformar en solución
- ✓ Antibiótico al que el plásmido confiere resistencia
- ✓ Mechero Bunsen

*Procedimiento*

---

- Bacterias competentes se descongelan en hielo.
- A 50-300ng de plásmido en un tubo de 1,5 ml se le añaden las bacterias competentes. Se agita suavemente para mezclar bien las bacterias con la solución del plásmido.
- Se incuba 30 minutos en hielo, sin agitación. Esto permite la adsorción del ADN a la superficie de las bacterias.
- Se ponen las placas de cultivo con LB-agar a utilizar en el incubador a 37°C pero nunca más de 30 minutos ya que se pueden secar. Transcurridos los 30 minutos, o cuando las placas no presentan condensación, se dejan a temperatura ambiente.
- Se ponen los tubos a 42°C como mínimo durante 45 segundos y como máximo, 2 minutos.
- Pasado ese tiempo se vuelven a dejar en hielo unos 2 minutos tras lo que se pueden dejar a temperatura ambiente.
- Se les añade 1ml de LB estéril sin antibióticos y los tubos se dejan en la placa calefactora o en un baño a 37°C con agitación (400 a 700 rpm) durante 1 hora.
- Se plaquean 200 µl de la transformación con ayuda de un asa de siembra en placas de LB-agar con el antibiótico al que el plásmido confiere resistencia. Si la eficiencia de transfección de un plásmido en concreto es baja se plaquean todas las bacterias, para ello se centrifugan los tubos a 3000 rpm durante 5 minutos. Se aspira y descarta el sobrenadante dejando 200 µl de medio en los que se resuspenden y plaquean las bacterias.
- Se deja la placa unos 15-20 minutos boca arriba en la estufa a 37°C para que se absorba bien la solución con las bacterias transformadas.
- Transcurrido ese tiempo se giran las placas.
- Al día siguiente se pican las colonias que han salido en tubos con 5ml de LB con antibiótico.

#### 4.1.3 Recuperación del ADN: *Minipreps* y *Maxipreps*.

Para purificar los plásmidos a partir de los cultivos bacterianos se utilizan reactivos comerciales en función de la cantidad de ADN del que necesitamos disponer. Las *minipreps* se usan con fines analíticos, en tanto que las *midí* y *maxipreps* facilitan la obtención de gran cantidad de ADN recombinante. Los protocolos de recuperación de ADN están diseñados para purificar desde 20 µg (*minis*) hasta 2,5 mg (*maxis*) de ADN plasmídico a partir de caldo de cultivo de bacterias transformadas y siguen los mismos pasos pero a escalas diferentes.



---

*Material*

---

- ✓ Durante la tesis se han utilizado kits para *Maxipreps*, Plásmid Maxi (QIAGEN), y *Minipreps* (ID Labs Inc., Amersham y QIAGEN).

---

*Procedimiento*

---

- Se parte de un cultivo bacteriano que ha crecido durante toda una noche en agitación a 37°C. Este caldo se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 1000g para obtener un *pellet* de bacterias.
- El *pellet* se resuspende en un tampón isotónico, al que se le añade una solución de lisis que liberará el ADN plasmídico. La mezcla se hace por inversión del tubo y con sumo cuidado pues es vital evitar la rotura del ADN genómico que posteriormente podría contaminar la preparación.
- Aparece un agregado mucoso que contiene las proteínas, restos celulares y al ADN genómico bacteriano.
- Se centrifuga a 12000g a temperatura ambiente.
- El sobrenadante se transfiere a una columna que contiene una resina que retiene el ADN plasmídico.
- Se centrifuga la columna y el tubo colector a máxima velocidad en una centrífuga de sobremesa.
- Se lava varias veces la columna y el ADN retenido con tampón de lavado.
- Finalmente se libera el ADN plasmídico de la columna a un nuevo tubo con agua MilliQ. Se cuantifica el ADN recuperado con el NanoDrop de ThermoScientific.

#### 4.1.4 *Stock* de bacterias transformadas: gliceroles.

Una vez se obtienen los vectores plasmídicos de expresión de la proteína de interés, se genera un *stock* de bacterias transformadas. A partir de esta reserva de bacterias en glicerol, se puede hacer crecer un nuevo caldo cada vez que se necesite más ADN plasmídico sin tener que transformar de nuevo.

Para preparar estos *stocks* se retiran en condiciones de esterilidad 850 µl de caldo para *Maxipreps*, se añaden 150 µl de glicerol estéril y se congelan rápidamente con ayuda de nieve carbónica. Los *stocks* así preparados se mantienen siempre congelados a -80°C, evitando que la temperatura aumente ya que la concentración del 15% de glicerol en la preparación es altamente tóxica para las bacterias a mayores temperaturas.

El caldo nuevo se prepara rascando el glicerol con una pipeta estéril cerca de la llama de un mechero Bunsen, después esta punta de pipeta se sumerge en 5 ml de LB. Tras 16 horas de incubación a 37°C en agitación este caldo se puede utilizar para hacer una *Miniprep* o bien como iniciador de un caldo mayor (500 ml) y posterior *Maxiprep*.

#### 4.1.5 Cuantificación de ADN

El ADN se puede cuantificar mediante un NanoDrop (ThermoScientific) o mediante un espectrofotómetro ( $\mu$ Quant, BIOTEK INSTRUMENTS). En el último caso se utilizan placas de 96 pocillos. Se prepara una dilución 1:50 del extracto de ARN en un volumen final de 100  $\mu$ l y también un blanco de 100  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O MilliQ. Mediante el software acoplado al espectrofotómetro (KC Junior) se cuantifica el ADN mediante una lectura a 260nm aplicando los factores de conversión obtenemos la concentración en  $\mu$ g/ $\mu$ l.

#### 4.1.6 Digestiones enzimáticas.

Las digestiones del ADN se han llevado a cabo siguiendo las instrucciones de los proveedores de los enzimas de restricción y utilizando los tampones suministrados con los mismos. Se recomienda utilizar 1 unidad enzimática durante 1 hora en condiciones óptimas por cada  $\mu$ g de ADN que se quiera digerir. En ningún caso se ha superado un volumen de enzima superior al 10% del volumen final dado que la solución del enzima contiene glicerol al 50% como crioprotector y concentraciones de glicerol superiores al 5% pueden inhibir la reacción enzimática de digestión. La cantidad de ADN que debe digerirse dependerá de si la finalidad de la digestión es realizar un gel analítico o bien un gel preparativo para realizar un tratamiento posterior.

#### 4.1.7 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un método estándar para separar los fragmentos de ADN y se basa en el hecho de que la movilidad de los fragmentos de ADN hacia el ánodo (+) es inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular.

El factor más importante en la separación de los fragmentos de ADN es el tamaño del poro del gel, en este caso determinado por la concentración de agarosa. De manera rutinaria se ha usado una concentración del 1% (peso/volumen) que da una resolución de separación correcta de los fragmentos entre 0,4 y 0,6 Kb.

Tanto si se realiza un gel analítico o un gel preparativo es necesario visualizar la muestra utilizando geles que contengan bromuro de etidio y observándolos bajo una luz ultravioleta. Para que una banda sea fácilmente visible debe contener sobre 20 ng de ADN. Mucho ADN cargado en el gel corre más rápido aparentando ser de menor tamaño de lo que realmente es. Poco ADN será problemático porque no permitirá que las bandas más pequeñas puedan verse claramente.

#### *Materiales*

---

- ✓ TAEX50 y TAEX1
- ✓ Solución *stock* de bromuro de etidio (SIGMA) 400  $\mu$ g/ ml en agua bidestilada
- ✓ Tampón de carga X6: 40% Sucrosa y 0,1% de Bromofenol blue en agua bidestilada

- ✓ Agarosa (SIGMA)
- ✓ Marcadores de peso molecular: 1Kb y 100 bp (PROMEGA)

### *Procedimiento*

---

- Para preparar el gel se pesan 0,5 g de agarosa y se ponen en un erlenmeyer de 150-200 ml, donde se añaden 50 ml de TAEX1.
- Se funde la agarosa en el microondas hasta que la solución hierva un par de veces, es importante ir controlando que la solución no se salga del recipiente. El erlenmeyer debe manipularse con guantes resistentes a la temperatura. Una vez que la agarosa está bien disuelta se deja enfriar a temperatura ambiente o se enfría con agua corriente.
- Cuando la solución esté aproximadamente a 40°C, se añade el bromuro de etidio (5 µl del stock por cada 50 ml de gel). Se mezcla bien y se vierte en el molde sellado y se pone un peine que servirá de molde para los pocillos.
- Una vez el gel ha solidificado, se retira con cuidado el peine y se coloca en la cubeta de electroforesis. Se llena la cubeta TAEX1 hasta cubrir el gel.
- Las muestras se preparan añadiendo tampón de carga de ADN X6 para que quede una concentración final de X1.
- Se carga el marcador de peso molecular en uno de los pocillos de los extremos y las muestras en el resto. Deben cambiarse las puntas al cambiar de muestra y es importante evitar que muestra de un pocillo contamine el pocillo contiguo.
- Se conectan los electrodos a la fuente de electroforesis y se hace correr a un voltaje constante de 60-80V.
- El resultado de la electroforesis se comprueba en un transiluminador de luz ultravioleta, el registro gráfico (fotografía) del resultado se realiza en un sistema de obtención de imágenes (*Gel-station*). En casos en los que se ha de recuperar una banda del gel es muy importante evitar una exposición larga a la luz ultravioleta ya que pueden alterar la estructura del ADN.

## 4.2 ARN

### 4.2.1 Técnicas generales de manipulación

La principal limitación cuando se trabaja con ARN es que éste se degrade por ARNasas, que pueden ser introducidas accidentalmente con mucha facilidad. Dado que su actividad es difícil de inhibir es esencial evitar esta posible contaminación siguiendo estas precauciones cuando se trabaje con ARN.

- Trabajar a 4°C
- Llevar siempre guantes dado que la piel contiene con frecuencia bacterias y levaduras que pueden contaminar la preparación de ARN y ser fuente de ARNasas.

- Utilizar plástico desechable y micropipetas destinadas al trabajo con ARN.
- El material que no sea desechable debe estar libre de ARNasas, para ello el cristal puede hornearse a 150°C durante 4 horas y los plásticos se pueden empapar durante 10 minutos en NaOH 0,5M, aclarado con agua y autoclavado.

#### 4.2.2 Extracción de ARN a partir de tejido adiposo blanco

##### *Material*

---

- ✓ Cloroformo
- ✓ Isopropil alcohol
- ✓ Etanol 75° en agua MilliQ
- ✓ TRIzol® (Invitrogen)

##### *Procedimiento*

---

- Se ponen los tejidos en tubos de fondo plano como criotubos de 4 ml con 1 ml de TRIzol por cada 100 mg de tejido y se homogeniza con la sonda grande de un politrón a velocidad máxima.
- Se centrifuga 3 minutos a 360g a 4°C para separar los restos de tejido que no se han podido homogenizar.
- El sobrenadante se pasa a uno o dos eppendorfs, dependiendo del volumen. Se centrifuga 10 minutos a 12000g. Aparece un *pellet* formado por membranas, polisacáridos y ADN de alto peso y una capa superior de grasa. Se recoge la fracción clara intermedia, sin remover ninguna de las otras y se pasa a un nuevo eppendorf. Si se sospecha de contaminación de con las otras fases se centrifuga de nuevo.
- Se añaden 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol usado. Se agita vigorosamente durante 15 segundos se centrifuga a 12000g durante 15 minutos a 4°C.
- Aparece una fase acuosa en la parte superior que debe transferirse a un nuevo eppendorf.
- Se añaden 500 µl de de isopropil alcohol para precipitar el ARN. Se deja 5 minutos a temperatura ambiente, pero si hace calor es mejor conveniente que esté cerca del hielo. Se centrifuga de nuevo a 12000g durante 15 minutos a 4°C.
- El precipitado de ARN es visible en la base del tubo. El sobrenadante se descarta y se añade 1 ml de etanol 75°. Se mezcla con ayuda del vortex y se centrifuga 5 minutos a 7000g.
- Se descarta el etanol 75° y el tubo se deja con la tapa abierta para que se evaporen los restos de alcohol, pero no se deja secar completamente. Con una pipeta se

aspiran los restos de etanol. Cuando los bordes del *pellet* de ARN empiezan a tornarse translúcidos, se añaden 20  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas. Para una mejor resuspensión del ARN, se puede dejar 16 horas a  $4^\circ\text{C}$  o 10 minutos en una estufa a  $55^\circ\text{C}$ .

- Los extractos de ARN se guardan a  $-80^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.3 Cuantificación del ARN

El ARN se puede cuantificar mediante un NanoDrop (ThermoScientific) o mediante un espectrofotómetro ( $\mu\text{Quant}$ , BIOTEK INSTRUMENTS). En el último caso se utilizan placas de 96 pocillos. Se prepara una dilución 1:50 del extracto de ARN en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  y también un blanco de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ. Mediante el software acoplado al espectrofotómetro (KC Junior) se cuantifica el ARN mediante lecturas a 280 y 260 nm. La cantidad de ARN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de la muestra es la absorbancia de ésta a 280 nm menos la absorbancia del blanco y dividida por 2 (que son los  $\mu\text{l}$  de muestra que se ponen en la placa). El cociente entre las absorbancias (280/260) es indicativo de la calidad de la muestra, valores entre 1,8 y 2 indican una solución de ARN suficientemente buena para realizar PCRs cuantitativas.

### 4.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*)

Esta técnica, desarrollada por Kary Mullis, Nobel de Química en 1993, revolucionó la biología molecular a mediados de los 80. Gracias a la PCR se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico a partir de cantidades muy pequeñas del mismo. La actividad enzimática de la ADN polimerasa aislada de la arqueobacteria *Thermus aquaticus* (Taq) permite la síntesis de hebras complementarias de ADN sin desnaturalizarse, permitiendo así que la amplificación sea un proceso rápido y eficiente.

#### 4.3.1 Reacción de PCR para secuenciar

La confirmación de una secuencia de ADN plasmídico es una comprobación a realizar antes de empezar el trabajo con plásmidos recombinantes nuevos. En este caso se ha recurrido al servicio de secuenciación de los servicios científico-técnicos (SCT) de la Universidad de Barcelona donde se utiliza el secuenciador por electroforesis capilar ABI Prism 3730 Applied Biosystems/Hitachi. El ADN se prepara con una reacción de PCR con el reactivo kit Big Dye 3.1 de Applied que aporta a la reacción la polimerasa y los nucleótidos marcados que hacen posible la secuenciación.

*Material*

- ✓ *Miniprep* del ADN a secuenciar
- ✓ Cebador o cebadores de la región a secuenciar
- ✓ Reactivo Big Dye Terminator 3.1 de Applied Biosystems (Cat.#4337454)

*Procedimiento*

- Se prepara la PCR con:
  - 1 µl de miniprep (aprox. 100 ng/µl)
  - 0,33 µl de cebador 10 µM
  - 2 µl de reactivo Big Dye 3.1
  - 6,66 µl de H<sub>2</sub>O
- La reacción de PCR es la siguiente

Ciclos		Temperatura	Tiempo
Amplificación 16 ciclos	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	Desnaturalización	95°C	30 segundos
	<i>Annealing</i>	55°C	1 minuto
	Elongación	68°C	2 minutos/Kb
	Elongación II	68°C	10 minutos
	Almacenamiento	25°C/4°C (o/n)	∞

- Las muestras se llevan al servicio para que las secuencien. En algunos casos es necesario precipitar las muestras, en tal caso:
  - Se pasan los 10 µl a un eppendorf nuevo.
  - Se añaden 10 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ.
  - Se añaden 60 µl de etanol 100% y se agita.
  - Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.
  - Se centrifuga durante 2 minutos a 4°C a velocidad máxima.
  - Se aspira y descarta el sobrenadante.
  - Se añaden 200 µl de etanol 70% a -20°C para lavar el ADN.
  - Se centrifuga de nuevo, se aspira y se descarta el sobrenadante.
  - Se repite el lavado y se deja secar a RT.

4.3.2 PCR a tiempo real (RT-PCR)

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero tiene el inconveniente de que no es cuantitativa. Esto resulta de interés para determinar el grado de expresión de genes específicos a través de la cuantificación de sus correspondientes ARNm. Para solventarlo se han generado unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. La clave de la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de la secuencia de interés mediante el uso de un reactivo fluorescente, el SYBR Green, que

al unirse al ADN de cadena que se forma durante la PCR se vuelve fluorescente. Para poder realizar una RT-PCR en primer lugar se debe retro-transcribir el ARN a ADN

#### 4.3.2.1 Retro-transcripción

##### *Material*

---

- ✓ DNAsa
- ✓ EDTA 25 mM
- ✓ Random primers
- ✓ dNTPs (10 mM)
- ✓ SuperScript II (Invitrogen)
- ✓ Agua MilliQ o agua tratada DEPC

##### *Protocolo*

---

- Se trata la extracción de ARN con DNAsa para evitar contaminación de ADN genómico. A cada muestra se le añaden 6 µl de una mezcla de DNAsa (1 µl), tampón de la DNAsa x10 (1 µl) y agua MilliQ (4 µl), se incuba 15 minutos a temperatura ambiente, tras lo que se le añade 1 µl de EDTA 25 mM.
- La muestra debe desnaturalizarse en presencia de 1 µl dNTP (10 mM), 0,1 µl de Random Primers y 2 µg de ARN (volumen máximo de 13 µl) durante 5 minutos a 60°C y 1 minuto más en hielo. Se hace un *spin* para bajar el volumen.
- A la muestra desnaturalizada se le añade 4 µl de Tampón “*First Strand*” (del Kit SuperScript) y 2 µl DTT 0,1 M bien mezclados.
- Se incuba la muestra durante 2 minutos a 25°C, tras lo que se añade 1 µl de SuperScript II sin sacar el tubo de la PCR.
- La elongación ADN complementario se hace con el siguiente programa de PCR
  - 10 minutos a 25°C
  - 50 minutos 42°C
  - 15 minutos 70°C
- De los 20 µl que se obtienen, se cuantifica la cantidad de ADN en 1 µl.

#### 4.3.2.2 RT-PCR

##### *Material*

---

- ✓ Primers o cebadores
- ✓ SYBR Green (Applied Biosystems)

##### *Procedimiento*

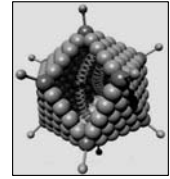
---

- Se diluye diez veces el producto de la retrotranscripción.
- Cada muestra se prepara por duplicado en placas de 96 pocillos especialmente diseñadas a tal efecto.

- A 4  $\mu$ l de producto de retrotranscripción diluido se le añade:
  - 3  $\mu$ l de cebador “*Forward*” y 3  $\mu$ l de cebador “*Reverse*” y
  - 10  $\mu$ l de Reactivo SYBR Green.
- La reacción se procesa en un ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems).
- Los datos se procesan mediante el software de Applied Biosystems SDS2.1. Las cantidades relativas de producto de PCR se calculan en respecto a una recta patrón que se prepara realizando diluciones crecientes de una muestra control y se utiliza en todas las placas. Todos los resultados se normalizan para TBP que se considera un gen de expresión constitutiva (*housekeeping*).



## Capítulo 5. ADENOVIRUS



### 5.1 Generalidades

#### 5.1.1 Adenovirus y las ventajas de su uso

Los adenovirus se caracterizan por disponer de una cápside con simetría icosaédrica y un genoma lineal de doble cadena de ADN. Estos virus se reproducen mediante un ciclo lítico en las células que infectan. El ciclo se inicia con la entrada del virus en la célula y su desencapsidación, posteriormente el ADN vírico migra hacia el núcleo y forma un complejo con el ADN y las histonas celulares. Los factores reguladores E1 son necesarios para la activación de la transcripción de los genes víricos tempranos. El proceso de síntesis de nuevos virus requiere factores de transcripción eucariotas y ADN polimerasa que serán aportados por la célula huésped. Las células infectadas quedan intactas aunque el citoesqueleto se destruye adoptando las células una forma esférica. Finalmente la lisis tiene lugar liberando nuevas partículas víricas.

Los adenovirus recombinantes de uso en el laboratorio se construyen a partir del vector recombinante adenovírico pJM17 que carece que la región E1 impidiendo así la infección lítica. Estos adenovirus sólo pueden replicar en células humanas que expresan E1, este es el caso de la línea celular de riñón 293. De esta manera los virus son capaces de entrar en las células y expresar las proteínas recombinantes que se les haya insertado pero no son capaces de replicarse. Como ventajas del trabajo con adenovirus recombinantes se puede destacar que: permiten transfectar uno o más genes, se puede disponer de titulaciones altas del orden de  $10^8$ - $10^9$  pfu/ml (pfu, *particle forming units*), son capaces de infectar diferentes tipos celulares, presentan baja patogenicidad, pueden infectar células que se encuentren o no en estado proliferativo y no suponen riesgo de mutagénesis para la célula ya que el ADN vírico no se integra en el genoma.

#### 5.1.2 Seguridad en el trabajo con adenovirus

Los adenovirus como agentes patógenos de los epitelios pueden producir constipados, gastroenteritis y conjuntivitis. Los adenovirus recombinantes aunque sean replicación-deficientes pueden producir daño en la conjuntiva y la córnea. Por ello los protocolos que han requerido trabajo con adenovirus se han realizado en laboratorios de cultivo especialmente diseñados para ello y se han seguido las normas de seguridad establecidas a tal efecto.

## 5.2 Preparación de adenovirus a partir de *stocks*

### 5.2.1 Prepurificación de adenovirus

Para la realización de esta tesis se ha dispuesto de adenovirus recombinantes para la proteína DMPK en su forma salvaje (o WT) y para GFP, que codifica para la proteína fluorescente verde y que utilizado como control.

Estos virus se generaron por recombinación homóloga tal y como se encuentra descrito en el artículo publicado por Kaliman y colaboradores en el año 2005.

#### Material

PBS +++	Sc A 100 ml	Sc B 50 ml	Sc C 50 ml
8,8 ml H <sub>2</sub> O mQ	8 g NaCl	0,5 g Cl <sub>2</sub> Ca.2H <sub>2</sub> O	0,23 g MgCl <sub>2</sub>
1 ml Sc A		1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	
0,1 ml Sc B		0,2 g KCl	
0,1 ml Sc C			
Pasar por filtro de 0,2 µm			

- ✓ Medio de cultivo para células 293

#### Procedimiento

- Se parte de 10 placas de 10 mm de diámetro de células 293 a un 80-90% de confluencia.
- Se prepara una dilución de adenovirus (0,5 ml) en medio DMEM sin suero y con antibióticos (44,5 ml) y se cambia el medio de las placas por 3 ml de la dilución.
- Tras 1 hora en el incubador se aspira el medio y se ponen 8 ml de medio de cultivo completo para las células 293.
- 36-48 horas después de la infección las células presentan un aspecto redondeado. Se despegan con suaves golpes en la placa y se recoge el medio resuspendiendo bien las células con una pipeta.
- El medio se pasa a tubos que se centrifugan a 400g durante 8 minutos.
- El *pellet* de las 10 placas se resuspende en 1 ml de PBS +++.
- Se realizan 5 ciclos de congelación / descongelación para lisar las células empleando hielo seco con etanol y un baño a 35°C, respectivamente. La temperatura del baño no debe superar los 38°C puesto que los virus pierden su viabilidad a mayor temperatura.
- Se centrifugan los tubos 3500 rpm durante 10 minutos y se recupera, alicuota y congela el sobrenadante.

### 5.3 Titulación de virus.

#### *Material*

---

- ✓ Medio de cultivo para células 293

#### *Procedimiento*

---

- Se parte de placas multipocillo de 6 sembradas con células 293 a una confluencia de 80-90%, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células por pocillo.
- Se hacen diluciones en PBS de  $10^2$  hasta  $10^6$  a partir del *stock* de adenovirus que se quiere titular.
- Se cambia el medio de los pocillos por 300  $\mu$ l de cada una de las diluciones.
- Se dejan las placas en el incubador y durante 1 hora en la que se agitan cada 15 minutos.
- Se aspira y descarta el medio, se hace un lavado con PBS y se añaden 2 ml de medio de cultivo completo.
- La dilución que a las 36-48 horas presente el 100% de las células con efecto citopático (pérdida de adherencia a la placa y redondeamiento de las células) será la que dé el título del *stock*.
- Se calcula el título del *stock* multiplicando la dilución que causa el 100% de efecto citopático por el número de células que había en cada pocillo. Esto se multiplica por 10 ya que se calcula que una célula es infectada por 10 virus y dividido por 0,3 que es el volumen en ml que se ha utilizado para infectar cada pocillo. El resultado lo expresamos como pfu/ml.

### 5.4 Infección de células C2C12 con adenovirus

#### *Material*

---

- ✓ Stock de adenovirus
- ✓ Medio de cultivo de células C2C12
- ✓ Medio de diferenciación de células C1C12

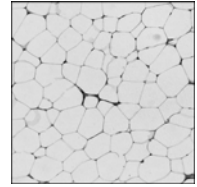
#### *Procedimiento*

---

- Se siembran placas multipocillo de 6 pocillos con células C2C12.
- Al día siguiente se infectan durante 2 horas con 100 pfu/ml de adenovirus recombinantes que expresarán myc-DMPK o proteína verde fluorescente (GFP)
- Se cambia el medio celular de crecimiento por medio de diferenciación y las células se mantienen en el incubador durante 2 días.
- El día del tratamiento, las células se lavan y se ayunan durante 2 horas (se les pone medio nuevo sin suero fetal).

- Se les añade insulina a una concentración final de 1  $\mu\text{M}$  y se incuba durante 30 minutos a 37°C
- Transcurrido el tiempo de incubación se procede a la extracción proteica tal y como se describe en el apartado de Material y métodos 2.5. Extracción de proteínas a partir de un cultivo celular.

## Capítulo 6. TÉCNICAS HISTOLÓGICAS



### 6.1 Protocolo de fijación e inclusión de tejidos

#### 6.1.1 Páncreas y tejidos adiposos

La técnica histológica abarca los procedimientos a los que se somete un tejido para proporcionar imágenes de estructuras contrastadas, para su estudio bajo microscopía óptica o electrónica. El protocolo incluye la obtención de la muestra, su corte y montaje. En el apartado de Material y métodos 1.5.2. Extracción de tejidos, se describe cómo se obtienen los distintos tejidos de ratón. Las muestras histológicas analizadas en esta tesis fueron procesadas con la colaboración del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Barcelona. El procedimiento se describe brevemente a a continuación:

##### 6.1.1.1 Fijación

La fijación del tejido se realiza sumergiendo las muestras en paraformaldehído 4% (en PBS) o formalina 10% durante como mínimo 4 horas y como máximo 16. El tejido adiposo se fija en etanol 95°.

##### 6.1.1.2 Deshidratación

Se deshidrata la muestra para posteriormente poder incluirla en el medio de montaje que es hidrofóbico. Para ello se sumergen las muestras durante 30 minutos en alcoholes de graduación progresivamente mayor: 70%, 90% y 100%.

##### 6.1.1.3 Aclarado

Una vez deshidratado el tejido se aclara o diafaniza 16 horas con xileno o xilol que es miscible tanto con alcohol como con el medio de inclusión a utilizar, parafina en este caso. Al final de la incubación, se sumerge 30 minutos más en un nuevo recipiente con una solución de xilol nueva.

##### 6.1.1.4 Inclusión

Dado que los tejidos son estructuras blandas y frágiles, incluso después de la fijación es necesaria la inclusión en un medio de soporte. Se coloca la muestra de tejido en un recipiente y se le agrega la parafina fundida a 60°C. Se coloca la muestra en una estufa de 4 a 16 horas manteniendo la temperatura a 60°C. Debido al calor, el xilol se evapora de manera que la parafina embebe toda la muestra. Seguidamente, se coloca la pieza y un poco de parafina fundida en un molde de metal de forma rectangular y se deja solidificar a temperatura ambiente sobre una placa metálica enfriada por hielo, formándose un bloque sólido de parafina con el trozo de tejido incluido. Los bloques así preparados pueden almacenarse a temperatura ambiente.

### 6.1.1.5 Corte y Montaje

Los cortes se realizan con un micrótomo para obtener cortes de un grosor entre 5 y 8  $\mu\text{m}$ . Los cortes se colocan en un baño de agua con gelatina al 1% a 37°C donde se extienden ligeramente y las arrugas y pliegues debidos a la manipulación desaparecen. Luego, con portaobjetos tratados con poly-lisina se “pescan” las muestras. De esta manera en un mismo portaobjeto se obtienen varios cortes del mismo bloque. Los cortes se guardan 16 horas en una estufa a 37°C para dejar evaporar la solución de montaje y terminar de adherir.

## 6.2 Tratamiento de portaobjetos con poly-lisina

El tratamiento con poly-lisina permite que los cortes histológicos de bloques de parafina se fijen correctamente al portaobjetos. Es importante realizar este tratamiento usando recipientes de plástico. No se debe añadir una solución ya usada a otra acabada de preparar. La solución de trabajo dura 3 meses a 4°C. Se pueden tratar 900 portaobjetos por cada litro de solución.

### *Material*

---

- ✓ Portaobjetos de cristal limpios
- ✓ Poly-lisina (SIGMA)

### *Procedimiento*

---

- Se prepara una dilución de trabajo 1:10 de la solución comercial de poly-lisina con H<sub>2</sub>O bidestilada. Si se encuentra almacenada a 4°C se deja atemperar.
- Se ponen los portaobjetos en la solución de trabajo durante 5 minutos.
- Se secan 1 hora a 60°C o bien 16 horas a temperatura ambiente.

## 6.3 Tinción hematoxilina-eosina

### *Material*

---

- ✓ Hematoxilina de Mayer (SIGMA)
- ✓ Eosina Y (SIGMA)
- ✓ Etanoles de 50%, 70%, 90% y 100%.
- ✓ Xilol
- ✓ Pertex

### *Procedimiento*

---

- Se desparafinan los cortes sumergiendo los portaobjetos en xilol durante 1 minuto. Se repite en una nueva solución de xilol.
- Se hidrata el corte sumergiendo los portaobjetos en una serie de alcoles de graduación decreciente durante 1 minuto en cada uno de ellos hasta llegar a agua

destilada: etanol absoluto, etanol al 96%, etanol 70%, etanol a 50% y agua destilada.

- Los portaobjetos con las muestras ya hidratadas se colocan un nuevo recipiente (tipo Coplin) evitando que los cortes se sequen durante el cambio de recipiente.
- Los cortes se sumergen durante 15 minutos en hematoxilina y seguidamente se realiza un lavado con agua corriente durante 5 minutos para que tenga lugar el viraje del colorante.
- Se realiza un nuevo lavado, esta vez con agua destilada durante 30 segundos.
- Se sumergen los cortes durante 30 segundos más en alcohol 95% y se tiñen en eosina durante no más de 45 segundos.
- Se lavan los portaobjetos 2 veces con agua destilada durante 1 minuto.
- Una vez teñidos los cortes se deshidratan sumergiéndolos durante 1 minuto en: etanol 50%, 70%, 96% y etanol absoluto.
- Finalmente, se aclaran con 2 lavados de xilol de 1 minuto cada uno, se añade medio de montaje permanente PERTEX y se tapa con un cubreobjeto.
- Las preparaciones se dejan secar durante 16 horas como mínimo.

#### 6.4 Inmunodetección de insulina en páncreas.

##### *Material*

---

- ✓ Etanoles de 50%, 70%, 90% y 100%.
- ✓ PBS
- ✓ Xilol
- ✓ Mowiol
- ✓ Tritón 0,2% en PBS
- ✓ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%
- ✓ Albúmina sérica bovina 0,2% en PBS
- ✓ Anticuerpo primario contra la Insulina (DAKO)
- ✓ Anticuerpo secundario contra cabra conjugado con peroxidasa (SIGMA)
- ✓ Reactivo AEC (SIGMA)
- ✓ Azul de toluidina
- ✓ Bolígrafo PAP

##### *Procedimiento*

---

- En primer lugar se desparafinan los cortes de páncreas: 15 minutos en xilol dos veces y 5 minutos en etanoles de graduación decreciente: absoluto, 70%, 50%.
- Se lavan 3 minutos con agua destilada y 5 minutos con PBX1.
- Se permeabiliza el tejido no más de 20 minutos en PBSX1 con Tritón al 0,2%.
- Se lava durante 5 minutos en PBSX1.
- Como se revelará con peroxidasa se bloquea el enzima endógeno del tejido. Esto lo hace sumergiendo los portaobjetos en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 3 minutos.

- Se retira la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lavando con PBSX1 durante 10 minutos.
- Las posibles uniones inespecíficas del anticuerpo se bloquean con una solución del de BSA 0,2% en PBSX1 durante 30 minutos.
- Se seca el portaobjetos y alrededor de los cortes. Se dibuja un círculo con el bolígrafo, la tinta hidrofóbica del bolígrafo sirve para delimitar las soluciones que aplicaremos al área donde se encuentran los cortes.
- Se incuba con una dilución (1:100) del anticuerpo primario contra la insulina en BSA 0,1% en PBSX1, durante 2 horas a RT o 16-18 horas a 4°C.
- El exceso de anticuerpo se retira con 2 lavados de PBSX1 de 5 minutos.
- Se incuba con una dilución del anticuerpo en BSA 0,1% en PBSX1, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se elimina el exceso de anticuerpo secundario con 2 lavados de 5 minutos con PBSX1.
- Se revela con un sustrato de la peroxidasa, para ello se prepara el reactivo AEC siguiendo las instrucciones del proveedor. Para 4 ml: 80 µl de acetato, 40 µl de AEC y 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Se exponen los cortes al reactivo AEC durante 30 segundos aproximadamente pero es crucial comprobar la tinción con ayuda de un microscopio para que no sea excesiva.
- En cuanto los islotes se hagan visibles se lava con agua corriente.
- Se hace una tinción de contraste con azul de toluidina durante unos segundos, de nuevo sin excederse para poder distinguir el marcaje de la insulina.
- Se monta en portaobjetos con unas gotas de Mowiol.

## 6.5 Cálculo del área del islote.

### *Procedimiento*

---

- Una vez realizada la inmunodetección de insulina, se toman imágenes con un microscopio de campo claro (Microscopio Leica DM R, Leica Microsystems GmbH)
- Se captan las imágenes de todos los islotes de una sección de tejido. Se utilizan los siguientes parámetros: objetivo 20X, aumento lateral 1x, aumento de la cámara 0,63X.
- Se calculan las áreas de todos los islotes de cada sección con el programa MacBiophotonics Image J software<sup>1</sup>. Se utiliza como referencia una imagen de un objeto con medidas conocidas tomada en las mismas condiciones que las muestras a analizar. Si se usa una cámara de Newbauer, el objeto de referencia es el lateral de uno de los cuadros que mide 333,33 µm. Con la herramienta *Selección de línea*, se dibuja una línea a lo largo del lateral de ese cuadro. En el menú *Plugins* se selecciona el submenú *Spatial calibration* y de ahí la opción *Set scale*. Se introduce

---

<sup>1</sup> <http://www.macbiophotonics.ca/downloads.htm>



la medida de la línea y a partir de ese momento el programa calculará las áreas que seleccionemos teniendo en cuenta la equivalencia de la línea calibrada a escala.

- Las áreas se seleccionan dibujando el contorno de los islotes con la herramienta *Freehand selection*.
- El cálculo de las áreas completas de las secciones se realiza usando un escáner convencional con las opciones de documento opaco y película gris. En este caso el objeto que se toma como referencia es una regla. El cálculo del área de la sección o corte se realiza mediante el programa Image J de la misma manera que se ha descrito para los islotes.



## Capítulo 7. REACTIVOS



### 7.1 Soluciones de uso rutinario

#### 7.1.2 PBS

136 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Se ajusta el pH a 7,4 con HCl y se esteriliza con el autoclave.

#### 7.1.3 TAEX50

2 M Tris  
5,71% Ácido acético glacial  
0,5 M EDTA

#### 7.1.4 TBSX20

400 mM TrisHCl  
3 M NaCl  
En H<sub>2</sub>O bidestilada

#### 7.1.5 Tampón de carga de ADN X6

40 % (peso/volumen) sucrosa  
0,1 % bromofenolblue  
En H<sub>2</sub>O MilliQ

#### 7.1.6 Mowiol 4-88 (CALBIOCHEM)

Se disuelven 7,2 g Mowiol 4-88 (usar guantes y mascarilla porque es muy tóxico) en 14,3 ml glicerol. Se deja durante una hora que se mezcle a temperatura ambiente. Se añaden 18 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Se deja 2 horas más en agitación. Se añaden 36 ml de Tris-HCl 0,2 M a pH 8,5. Se incuba 2 horas a 50°C en un baño con agitación. Se centrifuga a 5000g 15 minutos. Se alícuota y se congela a -20°C. El Mowiol preparado será estable durante 2 años.

#### 7.1.7 Medio LB (Luria-Bertani)

Para 500 ml:

5 g de Bacto-Triptona  
2,5 g de Bacto-Yeast Extract  
5 g de NaCl (MERCK)

Se disuelve en 400 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. Se ajusta el pH con NaOH 5M y se lleva a 500 ml con H<sub>2</sub>O bidestilada.

Se autoclava con el programa de líquidos: 120°C durante 20 minutos.

### 7.1.8 Placas LB-Agar

A 500 ml de LB se le añaden 7,5 g de Bacto-Agar que se disuelve en el autoclave (120°C, 20 minutos). Cuando lo se saca del autoclave se debe esperar a que baje hasta los 50°C para añadir los antibióticos. En esta tesis se ha utilizado Kanamicina (SIGMA) a una concentración de 60 µg/ml y Ampicilina (Laboratorios Normon) a 125 µg/. Se reparte la solución aún líquida en placas de 10 mm de diámetro.

### 7.1.9 Activación de ortovanadato de sodio

El ortovanadato de sodio ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) requiere ser activado para obtener el máximo de inhibición de las fosfotirosilfosfatasas. Este procedimiento depolimeriza el vanadato y lo hace más potente. Procedimiento:

- Se prepara una solución de 200 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (SIGMA) en un vaso de precipitados PYREX. Es mejor disolverlo en poca  $\text{H}_2\text{O}$  ya que se debe que ajustar el pH
- Se ajusta el pH a 10 utilizando NaOH 1N ó HCl 1N. A este pH la solución se tornará de color amarillo.
- Se pone la solución a hervir hasta que se vuelve incolora.
- Se deja enfriar a RT.
- Se reajusta el pH a 10, la solución puede cambiar de nuevo su color a amarillo. Se repiten los pasos anteriores hasta que la solución sea incolora a pH 10.
- Se congela el  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  activado en alícuotas a -20°C.

## 7.2 Cebadores

Nombre	Secuencia 5'→3'
Neo_fwd	CGC ATT GCA TCA GCC ATG ATG G
Neo_rev	GGA GAG GCT ATT CGG CTA TGA C
Exo3_fwd	CTC TTG CTG TCA TCT CGG TT
Exo3_rev	GTA GGA GAG AAG CTA CAG GA
Neo462f	ACC GGC TTC CAT CCG AGT ACG
Neo462r	GGC TAT TCG GCT ATG ACT GGG C
Neo3	GCC AAT ATG GGA TCG GGC CAT TGA
Neo4	CCT CAG AAG AAC TCG TCA AGA AGG
PGC-1 $\alpha$ _fwd	TGATGACAGTGAAGATGAAAGTGATAAAC
PGC-1 $\alpha$ _rev	GGCGACACATCGAACAATGA
PPAR $\beta$ 2_fwd	TGCTCAAGTATGGTGTCCATGAG
PPAR $\beta$ 2_rev	TGAGATGAGGACTCCATCTTTATTCA
Adiponectin_fwd	TCCTGGAGAGAAGGGAGAGAAAG
Adiponectin_rev	CCCTTCAGCTCCTGTCTATTCC
TBP_fwd	ACCCTTCACCAATGACTCCTATG
TBP_rev	ATGATGACTGCAGCAAATCGC

## 7.3 Vectores de expresión

	Resistencia	Provisos por	Descritos en
pCIneo WT DMPK	Ampicilina	Dr. M.B. Perryman (Univ. de Colorado, USA)	Bush y cols. 2000
pCIneo $\Delta$ MA DMPK	Ampicilina	Dr. M.B. Perryman (Univ. de Colorado, USA)	Bush y cols. 2000
pCIneo K110A DMPK	Ampicilina		Kaliman y cols. 2005
pc DNA3 R Ins-YFP	Ampicilina	Dr. Tarik Issad (Inst. Cocchin, Francia)	Boute y cols. 2001
pEGFP-N1 R IGF1	Kanamicina	Dr. R. O'Connor (Univ. Nac. de Irlanda)	
pEGF-N1 $\beta$ 2-AR	Kanamicina	Dr. Guangyu Wu (New Orleans, USA)	
pCDNA4	Ampicilina		

## 7.4 Cálculos estadísticos

Los datos estadísticos se han calculado utilizando el programa Excel de Microsoft Office. Se han realizado t de Student, suponiendo homocedasticidad de la varianza. Se consideran estadísticamente significativos los valores de p menores a 0,5.

## 7.5 Anticuerpos

PRIMARIOS									
Anticuerpo contra	Huésped	Clonalidad	Isotipo	Peso	Casa comercial	Número de catálogo	Western	Dilución	
Actina	Conejo	Policlonal		42 kDa	SIGMA	#A2066	1:500	Western	Immuno
Akt	Conejo	Policlonal		60 kDa	Cell Signaling	#9272	1:1000	1:1000	1:50
Fosfo-Akt	Conejo	Policlonal		60 kDa	Cell Signaling	#9271	1:1000	1:1000	1:25
Caveolin 3	Ratón	Monoclonal	IgG1	18 kDa	BD Transduction Labs	#610420	1:5000		
DMPK murina	Conejo	Policlonal		80 kDa	ZYMED Labs	34-9900	1:250		
DMPK humana	Ratón					3D10	1:200		
GM130					Amersham Biosciences				1:100
GSK3β	Conejo	Policlonal		46 kDa	Cell Signaling	9332	1:1000	1:1000	1:100
Fosfo-GSK3β(Ser9)	Conejo	Policlonal		46 kDa	Cell Signaling	9336	1:1000	1:1000	1:100
Insulin Receptor β	Conejo	Policlonal		95 kDa	BD Transduction Labs	611276	1:250	1:250	1:25
IgF-I Receptor β	Conejo	Policlonal		95 kDa	Cell Signaling	3027	1:1000	1:1000	1:150
Fosfo-IgF-I Receptor									
(Tyr1135/1136)/Insulin Receptor	Conejo	Monoclonal	IgG	95 kDa	Cell Signaling	3024	1:1000	1:1000	-
(Tyr1150/1151) (19H7)									
myc		Monoclonal			ATCC				
Nar+/K+ ATPase α-1, clon C464.6	Ratón	Monoclonal	IgG1k	100 kDa	Upstate	05-369	1:10000	1:10000	
PKA C-α	Conejo	Policlonal		42 kDa	Cell Signaling	4782	1:1000	1:1000	1:50
Fosfo-PKA C-α	Conejo	Policlonal		42 kDa	Cell Signaling	4781	1:1000	1:1000	
Fosfo-substratos de PKA	Conejo	Monoclonal	IgG	-	Cell Signaling	9624	1:5000	1:5000	
PLN, clon A1	Ratón	Monoclonal	IgG1	25 kDa	Upstate	25954	1:1000	1:1000	1:200
Fosfo-PLN (Ser16)	Conejo	Purific. Afin.	IgG	5/25 kDa	Upstate	07-052	1:500	1:500	

SECUNDARIOS									
Anticuerpo contra	Huésped	Conjugado	Casa comercial	Número de catálogo	Western	Dilución			
IgG de ratón	Asno	Peroxidasa	Jackson Laboratories	715-035-150	1:25000*	Western	Immuno		
IgG de conejo	Asno	Peroxidasa	Jackson Laboratories	711-035-152	1:25000*				
IgG de ratón	Cabra	Cy5	Jackson Laboratories	625-650				1:400	
IgG de ratón	Cabra	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	A11012				1:400	
IgG de conejo	Asno	Alexa Fluor 555	Molecular Probes	A21428				1:400	
Faloidina	-	Alexa Fluor 594	Molecular Probes	A12381				1:800	

(\*) Los secundarios de Jackson se preparan en alícuotas de 25 µl que se congelan a -20°C. Cuando una alícuota se usa por primera vez se añade el mismo volumen de glicerol, para que no sufra congelaciones y descongelaciones que deterioren el funcionamiento de los anticuerpos.

## Bibliografía

---





## Bibliografía

- (2000). "New nomenclature and DNA testing guidelines for myotonic dystrophy type 1 (DM1). The International Myotonic Dystrophy Consortium (IDMC)." Neurology **54**(6): 1218-21.
- Accili, D., C. Frapier, et al. (1989). "A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-resistant diabetes." Embo J **8**(9): 2509-17.
- Adrian, R. H. and S. H. Bryant (1974). "On the repetitive discharge in myotonic muscle fibres." J Physiol **240**(2): 505-15.
- Alwazzan, M., E. Newman, et al. (1999). "Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat." Hum Mol Genet **8**(8): 1491-7.
- Amano, M., K. Chihara, et al. (1999). "The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity." J Biol Chem **274**(45): 32418-24.
- An, P., B. I. Freedman, et al. (2005). "Genome-wide linkage scans for fasting glucose, insulin, and insulin resistance in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Blood Pressure Program: evidence of linkages to chromosome 7q36 and 19q13 from meta-analysis." Diabetes **54**(3): 909-14.
- Annane, D., D. Duboc, et al. (1994). "Correlation between decreased myocardial glucose phosphorylation and the DNA mutation size in myotonic dystrophy." Circulation **90**(6): 2629-34.
- Arai, M. (2000). "Function and regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase: advances during the past decade and prospects for the coming decade." Jpn Heart J **41**(1): 1-13.
- Artero, R., A. Prokop, et al. (1998). "The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of Drosophila muscles and is regulated by Dmef2." Dev Biol **195**(2): 131-43.
- Ashizawa, T. and P. S. Harper (2006). Myotonic Dystrophies: an Overview. GENETIC INSTABILITIES AND NEUROLOGICAL DISEASES. R. D. Wells and T. Ashizawa. Houston, Texas A&M University: 21-34.
- Aslanidis, C., G. Jansen, et al. (1992). "Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect." Nature **355**(6360): 548-51.
- Barbosa, J., F. Q. Nuttall, et al. (1974). "Plasma insulin in patients with myotonic dystrophy and their relatives." Medicine (Baltimore) **53**(4): 307-23.
- Barreca, T., A. Muratorio, et al. (1980). "Evaluation of twenty-four-hour secretory patterns of growth hormone and insulin in patients with myotonic dystrophy." J Clin Endocrinol Metab **51**(5): 1089-92.
- Batten, F. E. and H. P. Gibb (1909). "MYOTONIA ATROPHICA." Brain **32**(2): 187-205.
- Begemann, G., N. Paricio, et al. (1997). "muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in Drosophila, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins." Development **124**(21): 4321-31.
- Benders, A. A., P. J. Groenen, et al. (1997). "Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca<sup>2+</sup> homeostasis in skeletal muscle cells." J

- Clin Invest **100**(6): 1440-7.
- Benders, A. A., R. A. Wevers, et al. (1996). "Ion transport in human skeletal muscle cells: disturbances in myotonic dystrophy and Brody's disease." Acta Physiol Scand **156**(3): 355-67.
- Berul, C. I., C. T. Maguire, et al. (1999). "DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model." J Clin Invest **103**(4): R1-7.
- Berul, C. I., C. T. Maguire, et al. (2000). "Progressive atrioventricular conduction block in a mouse myotonic dystrophy model." J Interv Card Electrophysiol **4**(2): 351-8.
- Bhakta, D., M. R. Lowe, et al. (2004). "Prevalence of structural cardiac abnormalities in patients with myotonic dystrophy type I." Am Heart J **147**(2): 224-7.
- Bjornholm, M. and J. R. Zierath (2005). "Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes." Biochem Soc Trans **33**(Pt 2): 354-7.
- Boucher, C. A., S. K. King, et al. (1995). "A novel homeodomain-encoding gene is associated with a large CpG island interrupted by the myotonic dystrophy unstable (CTG)<sub>n</sub> repeat." Hum Mol Genet **4**(10): 1919-25.
- Brook, J. D., M. E. McCurrach, et al. (1992). "Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member." Cell **68**(4): 799-808.
- Bruning, J. C., M. D. Michael, et al. (1998). "A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance." Mol Cell **2**(5): 559-69.
- Bush, E. W., S. M. Helmke, et al. (2000). "Myotonic dystrophy protein kinase domains mediate localization, oligomerization, novel catalytic activity, and autoinhibition." Biochemistry **39**(29): 8480-90.
- Buxton, J., P. Shelbourne, et al. (1992). "Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy." Nature **355**(6360): 547-8.
- Buyalos, R. P., R. V. Jackson, et al. (1998). "Androgen Response to Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Stimulation with Naloxone in Women with Myotonic Muscular Dystrophy." J Clin Endocrinol Metab **83**(9): 3219-3224.
- Canicio, J., P. Ruiz-Lozano, et al. (2001). "Nuclear factor kappa B-inducing kinase and I kappa B kinase-alpha signal skeletal muscle cell differentiation." J Biol Chem **276**(23): 20228-33.
- Carango, P., J. E. Noble, et al. (1993). "Absence of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) mRNA as a result of a triplet repeat expansion in myotonic dystrophy." Genomics **18**(2): 340-8.
- Cardani, R., E. Mancinelli, et al. (2006). "Muscleblind-like protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 and DM2." Eur J Histochem **50**(3): 177-82.
- Carrasco, M., J. Canicio, et al. (2002). "Identification of intracellular signaling pathways that induce myotonic dystrophy protein kinase expression during myogenesis." Endocrinology **143**(8): 3017-25.
- Carter, J. N. and K. S. Steinbeck (1985). "Reduced adrenal androgens in patients with

- myotonic dystrophy." J Clin Endocrinol Metab **60**(3): 611-4.
- Cho, D. H. and S. J. Tapscott (2007). "Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2." Biochim Biophys Acta **1772**(2): 195-204.
- Ciaraldi, T. P., L. Carter, et al. (2001). "Effects of the long-acting insulin analog insulin glargine on cultured human skeletal muscle cells: comparisons to insulin and IGF-I." J Clin Endocrinol Metab **86**(12): 5838-47.
- Cline, G. W., K. F. Petersen, et al. (1999). "Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes." N Engl J Med **341**(4): 240-6.
- Colleran, J. A., R. J. Hawley, et al. (1997). "Value of the electrocardiogram in determining cardiac events and mortality in myotonic dystrophy." Am J Cardiol **80**(11): 1494-7.
- Cudworth, A. G. and B. A. Walker (1975). "Carbohydrate metabolism in dystrophia myotonica." J Med Genet **12**(2): 157-61.
- Cummings, C. J. and H. Y. Zoghbi (2000). "Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 281-328.
- Dansithong, W., S. Paul, et al. (2005). "MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1." J Biol Chem **280**(7): 5773-80.
- Davies, J., H. Yamagata, et al. (1992). "Comparison of the myotonic dystrophy associated CTG repeat in European and Japanese populations." J Med Genet **29**(11): 766-9.
- Davis, B. M., M. E. McCurrach, et al. (1997). "Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7388-93.
- Day, J. W. and L. P. Ranum (2005). "RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies." Neuromuscul Disord **15**(1): 5-16.
- Day, J. W., K. Ricker, et al. (2003). "Myotonic dystrophy type 2: molecular, diagnostic and clinical spectrum." Neurology **60**(4): 657-64.
- Day, J. W., R. Roelofs, et al. (1999). "Clinical and genetic characteristics of a five-generation family with a novel form of myotonic dystrophy (DM2)." Neuromuscul Disord **9**(1): 19-27.
- Di Cunto, F., E. Calautti, et al. (1998). "Citron rho-interacting kinase, a novel tissue-specific ser/thr kinase encompassing the Rho-Rac-binding protein Citron." J Biol Chem **273**(45): 29706-11.
- Dugani, C. B. and A. Klip (2005). "Glucose transporter 4: cycling, compartments and controversies." EMBO Rep **6**(12): 1137-42.
- Dunne, P. W., E. T. Walch, et al. (1994). "Phosphorylation reactions of recombinant human myotonic dystrophy protein kinase and their inhibition." Biochemistry **33**(35): 10809-14.
- Edstrom, L. and R. Wroblewski (1989). "Intracellular elemental composition of single muscle fibres in muscular dystrophy and dystrophia myotonica." Acta Neurol Scand **80**(5): 419-24.
- Egea, G., F. Lazaro-Diequez, et al. (2006). "Actin dynamics at the Golgi complex in

- mammalian cells." Curr Opin Cell Biol **18**(2): 168-78.
- Eguez, L., A. Lee, et al. (2005). "Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein." Cell Metab **2**(4): 263-72.
- Fardaei, M., M. T. Rogers, et al. (2002). "Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells." Hum. Mol. Genet. **11**(7): 805-814.
- Fecchi, K., D. Volonte, et al. (2006). "Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells." Faseb J **20**(6): 705-7.
- Feng, J., M. Ito, et al. (1999). "Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase." J Biol Chem **274**(52): 37385-90.
- Fernandez, A. M., J. Dupont, et al. (2002). "Muscle-specific inactivation of the IGF-I receptor induces compensatory hyperplasia in skeletal muscle." J Clin Invest **109**(3): 347-55.
- Fernandez-Real, J. M., A. Molina, et al. (1999). "Tumor necrosis factor system activity is associated with insulin resistance and dyslipidemia in myotonic dystrophy." Diabetes **48**(5): 1108-12.
- Finsterer, J. (2002). "Myotonic dystrophy type 2." European Journal of Neurology **9**(5): 441-447.
- Foti, M., G. Porcheron, et al. (2007). "The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(4): 1242-7.
- Franke, C., H. Hatt, et al. (1990). "Characteristics of Na<sup>+</sup> channels and Cl<sup>-</sup> conductance in resealed muscle fibre segments from patients with myotonic dystrophy." J Physiol **425**: 391-405.
- Fu, Y. H., D. L. Friedman, et al. (1993). "Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy." Science **260**(5105): 235-8.
- Fu, Y. H., A. Pizzuti, et al. (1992). "An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy." Science **255**(5049): 1256-8.
- Fujii, J., A. Ueno, et al. (1987). "Complete complementary DNA-derived amino acid sequence of canine cardiac phospholamban." J Clin Invest **79**(1): 301-4.
- Fuller, W., P. Eaton, et al. (2001). "Differential centrifugation separates cardiac sarcolemmal and endosomal membranes from Langendorff-perfused rat hearts." Anal Biochem **293**(2): 216-23.
- Furling, D., D. Lemieux, et al. (2001). "Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts." Neuromuscul Disord **11**(8): 728-35.
- Goden, P., R. C. Griggs, et al. (1969). "Studies of plasma insulin in myotonic dystrophy." J Clin Endocrinol Metab **29**(5): 684-90.
- Gomez, J. M., A. Molina, et al. (1999). "Insulin regulation of leptin synthesis and secretion in humans: the model of myotonic dystrophy." Clin Endocrinol (Oxf) **50**(5): 569-75.
- Grice, J. E., J. Jackson, et al. (1991). "Adrenocorticotropin hyperresponsiveness in

- myotonic dystrophy following oral fenfluramine administration." J Neuroendocrinol **3**(1): 69-73.
- Grice, J. E., R. V. Jackson, et al. (1995). "Adrenocorticotropin hyperresponse to the corticotropin-releasing hormone-mediated stimulus of naloxone in patients with myotonic dystrophy." J Clin Endocrinol Metab **80**(1): 179-84.
- Groenen, P. J., D. G. Wansink, et al. (2000). "Constitutive and regulated modes of splicing produce six major myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) isoforms with distinct properties." Hum Mol Genet **9**(4): 605-16.
- Guiraud-Dogan, C., A. Huguet, et al. (2007). "DM1 CTG expansions affect insulin receptor isoforms expression in various tissues of transgenic mice." Biochim Biophys Acta **1772**(11-12): 1183-91.
- Hagemann, D. and R. P. Xiao (2002). "Dual site phospholamban phosphorylation and its physiological relevance in the heart." Trends Cardiovasc Med **12**(2): 51-6.
- Hall, A. (1998). "Rho GTPases and the actin cytoskeleton." Science **279**(5350): 509-14.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." Faseb J **9**(8): 576-96.
- Harley, H. G., S. A. Rundle, et al. (1992). "Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy." Lancet **339**(8802): 1125-8.
- Harper, P. S. (2001). Myotonic Dystrophy, WB Saunders, London.
- Harris, S., C. Moncrieff, et al. (1996). "Myotonic dystrophy: will the real gene please step forward!" Hum Mol Genet **5 Spec No**: 1417-23.
- Harris, T. E. and J. C. Lawrence, Jr. (2003). "TOR signaling." Sci STKE **2003**(212): re15.
- Hartshorne, D. J., M. Ito, et al. (1998). "Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation." J Muscle Res Cell Motil **19**(4): 325-41.
- Ho, T. H., D. Bundman, et al. (2005). "Transgenic mice expressing CUG-BP1 reproduce splicing mis-regulation observed in myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **14**(11): 1539-47.
- Ho, T. H., B. N. Charlet, et al. (2004). "Muscleblind proteins regulate alternative splicing." Embo J **23**(15): 3103-12.
- Hofmann-Radvanyi, H., C. Lavedan, et al. (1993). "Myotonic dystrophy: absence of CTG enlarged transcript in congenital forms, and low expression of the normal allele." Hum Mol Genet **2**(8): 1263-6.
- Huang, C. C. and H. C. Kuo (2005). "Myotonic dystrophies." Chang Gung Med J **28**(8): 517-26.
- Huff, T. A., E. S. Horton, et al. (1967). "Abnormal insulin secretion in myotonic dystrophy." N Engl J Med **277**(16): 837-41.
- Hund, E., O. Jansen, et al. (1997). "Proximal myotonic myopathy with MRI white matter abnormalities of the brain." Neurology **48**(1): 33-7.
- Huss, J. M. and D. P. Kelly (2004). "Nuclear receptor signaling and cardiac energetics." Circ Res **95**(6): 568-78.
- Ichikawa, K., M. Ito, et al. (1996). "Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity." J Biol Chem **271**(9): 4733-

40.

- Ishikura, S. and A. Klip (2008). "Muscle cells engage Rab8A and myosin Vb in insulin-dependent GLUT4 translocation." Am J Physiol Cell Physiol **295**(4): C1016-25.
- Ishikura, S., A. Koshkina, et al. (2008). "Small G proteins in insulin action: Rab and Rho families at the crossroads of signal transduction and GLUT4 vesicle traffic." Acta Physiol (Oxf) **192**(1): 61-74.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, et al. (1996). "The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase." Embo J **15**(8): 1885-93.
- Jackson, R. V., G. A. Fleming, et al. (1988). "Increased pro-opiomelanocortin-derived peptide release in myotonic dystrophy." Aust Paediatr J **24 Suppl 1**: 70-3.
- Jacobs, A. E., A. A. Benders, et al. (1990). "The calcium homeostasis and the membrane potential of cultured muscle cells from patients with myotonic dystrophy." Biochim Biophys Acta **1096**(1): 14-9.
- Jansen, G., D. Bachner, et al. (1995). "Structural organization and developmental expression pattern of the mouse WD-repeat gene DMR-N9 immediately upstream of the myotonic dystrophy locus." Hum Mol Genet **4**(5): 843-52.
- Jansen, G., P. J. Groenen, et al. (1996). "Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice." Nat Genet **13**(3): 316-24.
- JeBailey, L., A. Rudich, et al. (2004). "Skeletal muscle cells and adipocytes differ in their reliance on TC10 and Rac for insulin-induced actin remodeling." Mol Endocrinol **18**(2): 359-72.
- JeBailey, L., O. Wanono, et al. (2007). "Ceramide- and oxidant-induced insulin resistance involve loss of insulin-dependent Rac-activation and actin remodeling in muscle cells." Diabetes **56**(2): 394-403.
- Jiang, H., A. Mankodi, et al. (2004). "Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons." Hum Mol Genet **13**(24): 3079-88.
- Jin, S., M. Shimizu, et al. (2000). "Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells." Cell Motil Cytoskeleton **45**(2): 133-48.
- Johansson, A., B. Ahren, et al. (2002a). "Testosterone and diurnal rhythmicity of leptin, TNF-alpha and TNF-II receptor in insulin-resistant myotonic dystrophy patients." Int J Obes Relat Metab Disord **26**(10): 1386-92.
- Johansson, Å., K. Boman, et al. (2001). "Increased levels of tPA antigen and tPA/PAI-1 complex in myotonic dystrophy." Journal of Internal Medicine **249**(6): 503-510.
- Johansson, A., K. Carlstrom, et al. (2000). "Abnormal cytokine and adrenocortical hormone regulation in myotonic dystrophy." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3169-76.
- Johansson, A., T. Olsson, et al. (2002b). "Abnormal release of incretins and cortisol after oral glucose in subjects with insulin-resistant myotonic dystrophy." Eur J Endocrinol **146**(3): 397-405.
- Jones, L. R., H. K. Simmerman, et al. (1985). "Purification and characterization of phospholamban from canine cardiac sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem

**260**(12): 7721-30.

- Kadambi, V. J., S. Ponniah, et al. (1996). "Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice." J Clin Invest **97**(2): 533-9.
- Kaibuchi, K., S. Kuroda, et al. (1999). "Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells." Annu Rev Biochem **68**: 459-86.
- Kaliman, P., D. Catalucci, et al. (2005). "Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **280**(9): 8016-21.
- Kanadia, R. N., K. A. Johnstone, et al. (2003). "A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy." Science **302**(5652): 1978-80.
- Kawakami, K., S. Sato, et al. (2000). "Six family genes--structure and function as transcription factors and their roles in development." Bioessays **22**(7): 616-26.
- Khan, A. H. and J. E. Pessin (2002). "Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways." Diabetologia **45**(11): 1475-83.
- Khayat, Z. A., P. Tong, et al. (2000). "Insulin-induced actin filament remodeling colocalizes actin with phosphatidylinositol 3-kinase and GLUT4 in L6 myotubes." J Cell Sci **113 Pt 2**: 279-90.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science **273**(5272): 245-8.
- Kirby, R. J., G. M. Hamilton, et al. (2001). "Drosophila homolog of the myotonic dystrophy-associated gene, SIX5, is required for muscle and gonad development." Curr Biol **11**(13): 1044-9.
- Klesert, T. R., D. H. Cho, et al. (2000). "Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy." Nat Genet **25**(1): 105-9.
- Klesert, T. R., A. D. Otten, et al. (1997). "Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP." Nat Genet **16**(4): 402-6.
- Klip, A. (2009). "The many ways to regulate glucose transporter 4." Appl Physiol Nutr Metab **34**(3): 481-7.
- Knutson, V. P. (1991). "Cellular trafficking and processing of the insulin receptor." Faseb J **5**(8): 2130-8.
- Koga, R., Y. Nakao, et al. (1994). "Decreased myotonin-protein kinase in the skeletal and cardiac muscles in myotonic dystrophy." Biochem Biophys Res Commun **202**(1): 577-85.
- Kondo, R. P., D. A. Dederko, et al. (2006). "Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform." J Physiol **571**(Pt 1): 131-46.
- Krahe, R., T. Ashizawa, et al. (1995). "Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing." Genomics **28**(1): 1-14.
- Krentz, A. J., P. M. Clark, et al. (1992). "Hyperproinsulinaemia in patients with myotonic dystrophy." Diabetologia **35**(12): 1170-2.
- Kurihara, T. (2005). "New classification and treatment for myotonic disorders." Intern Med **44**(10): 1027-32.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lam, L. T., Y. C. Pham, et al. (2000). "Characterization of a monoclonal antibody panel shows that the myotonic dystrophy protein kinase, DMPK, is expressed almost exclusively in muscle and heart." Hum Mol Genet **9**(14): 2167-73.
- Lavedan, C., H. Hofmann-Radvanyi, et al. (1993). "Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism." Am J Hum Genet **52**(5): 875-83.
- Lee, H. C., M. K. Patel, et al. (2003). "Abnormal Na channel gating in murine cardiac myocytes deficient in myotonic dystrophy protein kinase." Physiol Genomics **12**(2): 147-57.
- LeRoith, D. (2007). "Dyslipidemia and glucose dysregulation in overweight and obese patients." Clin Cornerstone **8**(3): 38-52.
- Leung, T., X. Q. Chen, et al. (1996). "The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton." Mol Cell Biol **16**(10): 5313-27.
- Leung, T., X. Q. Chen, et al. (1998). "Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization." Mol Cell Biol **18**(1): 130-40.
- Lindemann, J. P., L. R. Jones, et al. (1983). "beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in guinea pig ventricles." J Biol Chem **258**(1): 464-71.
- Liquori, C. L., K. Ricker, et al. (2001). "Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9." Science **293**(5531): 864-7.
- Llagostera, E., D. Catalucci, et al. (2007). "Role of Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) in Glucose Homeostasis and Muscle Insulin Action." PLoS ONE **2**(11): e1134.
- Llamusi, B. and R. Artero (2008). "Molecular Effects of the CTG Repeats in Mutant Dystrophia Myotonica Protein Kinase Gene." Curr Genomics **9**(8): 509-16.
- Lopez de Munain, A., A. M. Cobo, et al. (1995). "Influence of the sex of the transmitting grandparent in congenital myotonic dystrophy." J Med Genet **32**(9): 689-91.
- Lueck, J. D., C. Lungu, et al. (2007). "Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1." Am J Physiol Cell Physiol **292**(4): C1291-7.
- Luo, L., T. Lee, et al. (1997). "Genghis Khan (Gek) as a putative effector for Drosophila Cdc42 and regulator of actin polymerization." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 12963-8.
- Luo, W., I. L. Grupp, et al. (1994). "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation." Circ Res **75**(3): 401-9.
- Machuca-Tzili, L., D. Brook, et al. (2005). "Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review." Muscle Nerve **32**(1): 1-18.
- Mackenzie, L., H. L. Roderick, et al. (2004). "The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction." J Cell Sci **117**(26): 6327-6337.



- MacLennan, D. H. and E. G. Kranias (2003). "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 566-77.
- Maeda, M., C. S. Taft, et al. (1995). "Identification, tissue-specific expression, and subcellular localization of the 80- and 71-kDa forms of myotonic dystrophy kinase protein." *J Biol Chem* **270**(35): 20246-9.
- Mahadevan, M., C. Tsilfidis, et al. (1992). "Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene." *Science* **255**(5049): 1253-5.
- Mahadevan, M. S., R. S. Yadava, et al. (2006). "Reversible model of RNA toxicity and cardiac conduction defects in myotonic dystrophy." *Nat Genet* **38**(9): 1066-70.
- Mankodi, A. (2008). "Myotonic disorders." *Neurol India* **56**(3): 298-304.
- Mankodi, A., X. Lin, et al. (2005). "Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy." *Circ Res* **97**(11): 1152-5.
- Mankodi, A., E. Logigian, et al. (2000). "Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat." *Science* **289**(5485): 1769-73.
- Mankodi, A., M. P. Takahashi, et al. (2002). "Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of CIC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy." *Mol Cell* **10**(1): 35-44.
- Marchini, C., R. Lonigro, et al. (2000). "Correlations between individual clinical manifestations and CTG repeat amplification in myotonic dystrophy." *Clin Genet* **57**(1): 74-82.
- Marshall, S. (1985). "Kinetics of insulin receptor internalization and recycling in adipocytes. Shunting of receptors to a degradative pathway by inhibitors of recycling." *J Biol Chem* **260**(7): 4136-44.
- Martin, G., K. Schoonjans, et al. (1997). "Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators." *J Biol Chem* **272**(45): 28210-7.
- Mathieu, J., P. Allard, et al. (1999). "A 10-year study of mortality in a cohort of patients with myotonic dystrophy." *Neurology* **52**(8): 1658-62.
- Matsumura, T., H. Iwahashi, et al. (2009). "A cross-sectional study for glucose intolerance of myotonic dystrophy." *J Neurol Sci* **276**(1-2): 60-5.
- Meola, G. (2000a). "Clinical and genetic heterogeneity in myotonic dystrophies." *Muscle Nerve* **23**(12): 1789-99.
- Meola, G. (2000b). "Myotonic dystrophies." *Curr Opin Neurol* **13**(5): 519-25.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (1999). "Reduced cerebral blood flow and impaired visual-spatial function in proximal myotonic myopathy." *Neurology* **53**(5): 1042-50.
- Meola, G., V. Sansone, et al. (1996). "A family with an unusual myotonic and myopathic phenotype and no CTG expansion (proximal myotonic myopathy syndrome): a challenge for future molecular studies." *Neuromuscul Disord* **6**(3): 143-50.
- Miller, J. W., C. R. Urbinati, et al. (2000). "Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy." *Embo J* **19**(17): 4439-48.
- Mistry, D. J., J. R. Moorman, et al. (2001). "Skeletal muscle Na currents in mice

- heterozygous for Six5 deficiency." *Physiol Genomics* **6**(3): 153-8.
- Morales, F., P. Cuenca, et al. (2003). "Miotonía congénita: caracterización clínica de una familia costaricense afectada por la enfermedad de Thomsen." *Neuroeje*(17): 82-86.
- Morales-Montero, F. and P. Cuenca-Berger (2003). "Aspectos genéticos y moleculares de las enfermedades miotónicas." *Rev Neurol* **38**(7): 668-674.
- Morin, N., V. Visentin, et al. (2002). "Tyramine stimulates glucose uptake in insulin-sensitive tissues in vitro and in vivo via its oxidation by amine oxidases." *J Pharmacol Exp Ther* **303**(3): 1238-47.
- Morrone, A., E. Pegoraro, et al. (1997). "RNA metabolism in myotonic dystrophy: patient muscle shows decreased insulin receptor RNA and protein consistent with abnormal insulin resistance." *J Clin Invest* **99**(7): 1691-8.
- Mounsey, J. P., J. E. John, 3rd, et al. (2000b). "Phospholemman is a substrate for myotonic dystrophy protein kinase." *J Biol Chem* **275**(30): 23362-7.
- Mounsey, J. P., D. J. Mistry, et al. (2000a). "Skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase." *Hum Mol Genet* **9**(15): 2313-20.
- Moxley, R. T., 3rd, R. C. Griggs, et al. (1978). "Decreased insulin sensitivity of forearm muscle in myotonic dystrophy." *J Clin Invest* **62**(4): 857-67.
- Muranyi, A., R. Zhang, et al. (2001). "Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates the myosin phosphatase targeting subunit and inhibits myosin phosphatase activity." *FEBS Lett* **493**(2-3): 80-4.
- Nagamitsu, S. and T. Ashizawa (2002). "Myotonic dystrophies." *Adv Neurol* **88**: 293-314.
- Nakagawa, O., K. Fujisawa, et al. (1996). "ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice." *FEBS Lett* **392**(2): 189-93.
- Novelli, G., M. Gennarelli, et al. (1993). "Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle." *Biochem Mol Biol Int* **29**(2): 291-7.
- O'Coilain, D. F., C. Perez-Terzic, et al. (2004). "Transgenic overexpression of human DMPK accumulates into hypertrophic cardiomyopathy, myotonic myopathy and hypotension traits of myotonic dystrophy." *Hum Mol Genet* **13**(20): 2505-18.
- Okimura, Y., K. Chihara, et al. (1988). "Discordance between growth hormone (GH) responses after GH-releasing hormone and insulin hypoglycemia in myotonic dystrophy." *J Clin Endocrinol Metab* **67**(5): 1074-9.
- Okoli, G., N. Carey, et al. (1998). "Over expression of the murine myotonic dystrophy protein kinase in the mouse myogenic C2C12 cell line leads to inhibition of terminal differentiation." *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3): 905-11.
- Orengo, J. P., P. Chambon, et al. (2008). "Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(7): 2646-51.
- Otten, A. D. and S. J. Tapscott (1995). "Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5465-9.
- Pall, G. S., K. J. Johnson, et al. (2003). "Abnormal contractile activity and calcium

- cycling in cardiac myocytes isolated from DMPK knockout mice." Physiol Genomics **13**(2): 139-46.
- Patel, N., C. Huang, et al. (2006). "Cellular location of insulin-triggered signals and implications for glucose uptake." Pflugers Arch **451**(4): 499-510.
- Pelargonio, G., A. Dello Russo, et al. (2002). "Myotonic dystrophy and the heart." Heart **88**(6): 665-70.
- Perseghin, G., A. Caumo, et al. (2003). "Contribution of abnormal insulin secretion and insulin resistance to the pathogenesis of type 2 diabetes in myotonic dystrophy." Diabetes Care **26**(7): 2112-8.
- Perseghin, G., M. Comola, et al. (2004). "Postabsorptive and insulin-stimulated energy and protein metabolism in patients with myotonic dystrophy type 1." Am J Clin Nutr **80**(2): 357-64.
- Personius, K. E., J. Nautiyal, et al. (2005). "Myotonia and muscle contractile properties in mice with SIX5 deficiency." Muscle Nerve **31**(4): 503-5.
- Petersen, K. F., D. Laurent, et al. (1998). "Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans." J Clin Invest **101**(6): 1203-9.
- Philips, A. V., L. T. Timchenko, et al. (1998). "Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy." Science **280**(5364): 737-41.
- Phillips, M. F. and P. S. Harper (1997). "Cardiac disease in myotonic dystrophy." Cardiovasc Res **33**(1): 13-22.
- Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction." Nature **423**(6939): 550-5.
- Pusch, M. (2002). "Myotonia caused by mutations in the muscle chloride channel gene CLCN1." Hum Mutat **19**(4): 423-34.
- Ranum, L. P. and T. A. Cooper (2006). "RNA-mediated neuromuscular disorders." Annu Rev Neurosci **29**: 259-77.
- Ranum, L. P. and J. W. Day (2002). "Myotonic dystrophy: clinical and molecular parallels between myotonic dystrophy type 1 and type 2." Curr Neurol Neurosci Rep **2**(5): 465-70.
- Ranum, L. P., P. F. Rasmussen, et al. (1998). "Genetic mapping of a second myotonic dystrophy locus." Nat Genet **19**(2): 196-8.
- Reddy, S., D. J. Mistry, et al. (2002). "Effects of age and gene dose on skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase." Muscle Nerve **25**(6): 850-7.
- Reddy, S., D. B. Smith, et al. (1996). "Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy." Nat Genet **13**(3): 325-35.
- Ricker, K. (1999). "Myotonic dystrophy and proximal myotonic myopathy." J Neurol **246**(5): 334-8.
- Ricker, K., T. Grimm, et al. (1999). "Linkage of proximal myotonic myopathy to chromosome 3q." Neurology **52**(1): 170-1.
- Ricker, K., M. C. Koch, et al. (1994). "Proximal myotonic myopathy: a new dominant disorder with myotonia, muscle weakness, and cataracts." Neurology **44**(8): 1448-52.

- Ridley, A. J. (2006). "Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking." Trends Cell Biol **16**(10): 522-9.
- Riento, K. and A. J. Ridley (2003). "Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 446-56.
- Rinaldi, F., A. Botta, et al. (2008). "Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the small-conductance calcium activated potassium channel (SK3) gene as genetic modifier of the cardiac phenotype in myotonic dystrophy type 1 patients." Acta Myol **27**: 82-9.
- Roberts, R., N. A. Timchenko, et al. (1997). "Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13221-6.
- Rogers, S. L. and V. I. Gelfand (2000). "Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 57-62.
- Roland, J. T., A. K. Kenworthy, et al. (2007). "Myosin Vb interacts with Rab8a on a tubular network containing EHD1 and EHD3." Mol Biol Cell **18**(8): 2828-37.
- Roland, J. T., L. A. Lapierre, et al. (2009). "Alternative splicing in class V myosins determines association with Rab10." J Biol Chem **284**(2): 1213-23.
- Rong, J. X., Y. Qiu, et al. (2007). "Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone." Diabetes **56**(7): 1751-60.
- Rothman, D. L., I. Magnusson, et al. (1995). "Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 983-7.
- Rothman, D. L., R. G. Shulman, et al. (1992). "<sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate. Evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus." J Clin Invest **89**(4): 1069-75.
- Saba, S., B. A. Vanderbrink, et al. (1999). "Localization of the sites of conduction abnormalities in a mouse model of myotonic dystrophy." J Cardiovasc Electrophysiol **10**(9): 1214-20.
- Salvatori, S., M. Fanin, et al. (2005). "Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1." Neurol Sci **26**(4): 235-42.
- Sarkar, P. S., B. Appukuttan, et al. (2000). "Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts." Nat Genet **25**(1): 110-4.
- Sarkar, P. S., J. Han, et al. (2004). "In situ hybridization analysis of Dmpk mRNA in adult mouse tissues." Neuromuscul Disord **14**(8-9): 497-506.
- Savage, D. B., K. F. Petersen, et al. (2007). "Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance." Physiol Rev **87**(2): 507-20.
- Savkur, R. S., A. V. Philips, et al. (2001). "Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy." Nat Genet **29**(1): 40-7.
- Schara, U. and B. G. Schoser (2006). "Myotonic dystrophies type 1 and 2: a summary

- on current aspects." Semin Pediatr Neurol **13**(2): 71-9.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, et al. (1996). "PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene." Embo J **15**(19): 5336-48.
- Seznec, H., O. Agbulut, et al. (2001). "Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities." Hum Mol Genet **10**(23): 2717-26.
- Seznec, H., A. S. Lia-Baldini, et al. (2000). "Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability." Hum Mol Genet **9**(8): 1185-94.
- Shimizu, M., W. Wang, et al. (2000). "Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase." FEBS Lett **475**(3): 273-7.
- Simmerman, H. K. and L. R. Jones (1998). "Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function." Physiol Rev **78**(4): 921-47.
- Sovari, A. A., C. K. Bodine, et al. (2007). "Cardiovascular manifestations of myotonic dystrophy-1." Cardiol Rev **15**(4): 191-4.
- Steinert, H. (1909). "Über das klinische und anatomische Bild des Muskelschwunds der Myotoniker." Dtsch Z Nervenheilkd **37**: 58-104.
- Storbeck, C. J., S. Drmanic, et al. (2004). "Inhibition of myogenesis in transgenic mice expressing the human DMPK 3'-UTR." Hum Mol Genet **13**(6): 589-600.
- Storbeck, C. J., L. A. Sabourin, et al. (1998). "Definition of regulatory sequence elements in the promoter region and the first intron of the myotonic dystrophy protein kinase gene." J Biol Chem **273**(15): 9139-47.
- Stumvoll, M., B. J. Goldstein, et al. (2005). "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." Lancet **365**(9467): 1333-46.
- Taneja, K. L., M. McCurrach, et al. (1995). "Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues." J Cell Biol **128**(6): 995-1002.
- Taniguchi, C. M., B. Emanuelli, et al. (2006). "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(2): 85-96.
- Ter Keurs, H. E. and P. A. Boyden (2007). "Calcium and arrhythmogenesis." Physiol Rev **87**(2): 457-506.
- Thirone, A. C., C. Huang, et al. (2006). "Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport." Trends Endocrinol Metab **17**(2): 72-8.
- Thornton, C. A., R. C. Griggs, et al. (1994). "Myotonic dystrophy with no trinucleotide repeat expansion." Ann Neurol **35**(3): 269-72.
- Thornton, C. A., J. P. Wymer, et al. (1997). "Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene." Nat Genet **16**(4): 407-9.
- Timchenko, L., W. Nastainczyk, et al. (1995). "Full-length myotonin protein kinase (72 kDa) displays serine kinase activity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5366-70.
- Timchenko, L. T., J. W. Miller, et al. (1996b). "Identification of a (CUG)<sub>n</sub> triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy." Nucleic Acids Res **24**(22): 4407-14.

- Timchenko, L. T., N. A. Timchenko, et al. (1996a). "Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy." Hum Mol Genet **5**(1): 115-21.
- Timchenko, N. A., Z. J. Cai, et al. (2001). "RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1." J Biol Chem **276**(11): 7820-6.
- Timchenko, N. A., R. Patel, et al. (2004). "Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis." J Biol Chem **279**(13): 13129-39.
- Tsilfidis, C., A. E. MacKenzie, et al. (1992). "Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy." Nat Genet **1**(3): 192-5.
- Udd, B., R. Krahe, et al. (1997). "Proximal myotonic dystrophy--a family with autosomal dominant muscular dystrophy, cataracts, hearing loss and hypogonadism: heterogeneity of proximal myotonic syndromes?" Neuromuscul Disord **7**(4): 217-28.
- van Herpen, R. E., R. J. Oude Ophuis, et al. (2005). "Divergent mitochondrial and endoplasmic reticulum association of DMPK splice isoforms depends on unique sequence arrangements in tail anchors." Mol Cell Biol **25**(4): 1402-14.
- van Tilburg, J. H. O., L. A. Sandkuijl, et al. (2003). "A Genome-Wide Scan in Type 2 Diabetes Mellitus Provides Independent Replication of a Susceptibility Locus on 18p11 and Suggests the Existence of Novel Loci on 2q12 and 19q13." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2223-2230.
- Vialettes, B., J. Pouget, et al. (1986). "Mechanism and significance of insulin resistance in myotonic dystrophy." Horm Metab Res **18**(6): 395-9.
- Vlachopapadopoulou, E., J. J. Zachwieja, et al. (1995). "Metabolic and clinical response to recombinant human insulin-like growth factor I in myotonic dystrophy--a clinical research center study." J Clin Endocrinol Metab **80**(12): 3715-23.
- Wakimoto, H., C. T. Maguire, et al. (2002). "Characterization of cardiac conduction system abnormalities in mice with targeted disruption of Six5 gene." J Interv Card Electrophysiol **7**(2): 127-35.
- Walsh, J. C., J. R. Turtle, et al. (1970). "Abnormalities of insulin secretion in dystrophia myotonica." Brain **93**(4): 731-42.
- Wang, G. S., D. L. Kearney, et al. (2007). "Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy." J Clin Invest **117**(10): 2802-11.
- Wang, J., E. Pegoraro, et al. (1995). "Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation." Hum Mol Genet **4**(4): 599-606.
- Wang, Y. H., S. Amirhaeri, et al. (1994). "Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene." Science **265**(5172): 669-71.
- Wansink, D. G., R. E. van Herpen, et al. (2003). "Alternative splicing controls myotonic dystrophy protein kinase structure, enzymatic activity, and subcellular localization." Mol Cell Biol **23**(16): 5489-501.
- Wansink, D. G. and B. Wieringa (2003). "Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1)." Cytogenet Genome Res **100**(1-4): 230-42.
- Wissmann, A., J. Ingles, et al. (1997). "Caenorhabditis elegans LET-502 is related to

Rho-binding kinases and human myotonic dystrophy kinase and interacts genetically with a homolog of the regulatory subunit of smooth muscle myosin phosphatase to affect cell shape." Genes Dev **11**(4): 409-22.

Woodman, S. E., F. Sotgia, et al. (2004). "Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases." Neurology **62**(4): 538-43.

Yamanouchi, Y., E. Arikawa, et al. (1995). "Limb-girdle muscular dystrophy: clinical and pathologic reevaluation." J Neurol Sci **129**(1): 15-20.

Zhao, Y., P. Loyer, et al. (1997). "Cloning and chromosomal location of a novel member of the myotonic dystrophy family of protein kinases." J Biol Chem **272**(15): 10013-20.

Zisman, A., O. D. Peroni, et al. (2000). "Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance." Nat Med **6**(8): 924-8.





Anexo. Artículos publicados



A continuación se adjuntan los artículos que se han publicado durante la realización de esta tesis por fecha de publicación.

1. Artículo de investigación:

**Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action.**

Llagostera E, Catalucci D, Marti L, Liesa M, Camps M, Ciaraldi TP, Kondo R, Reddy S, Dillmann WH, Palacin M, Zorzano A, Ruiz-Lozano P, Gomis R, Kaliman P. PLoS One. **2007** Nov 7;2(11):e1134.

2. Artículo de revisión:

**Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1.**

Kaliman P, Llagostera E. Cell Signal. **2008** Nov;20(11):1935-41. Epub 2008 May 18.

3. Artículo de investigación:

**High-fat diet induced adiposity and insulin resistance in mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase.**

Llagostera E, Carmona MC, Vicente M, Escorihuela RM, Kaliman P. FEBS Lett. 2009 Jun 18;583(12):2121-5. Epub **2009** May 29.



---

Artículo 1

**Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action.**

Llagostera E, Catalucci D, Marti L, Liesa M, Camps M, Ciaraldi TP, Kondo R, Reddy S, Dillmann WH, Palacin M, Zorzano A, Ruiz-Lozano P, Gomis R, Kaliman P. PLoS One. 2007 Nov 7;2(11):e1134.



Artículo 2

---

**Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1.**

Kaliman P, Llagostera E. Cell Signal. 2008 Nov;20(11):1935-41. Epub 2008 May 18.





# Role of Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) in Glucose Homeostasis and Muscle Insulin Action

Esther Llagostera<sup>1\*</sup>, Daniele Catalucci<sup>2,3\*</sup>, Luc Marti<sup>4</sup>, Marc Liesa<sup>4</sup>, Marta Camps<sup>1</sup>, Theodore P. Ciaraldi<sup>2</sup>, Richard Kondo<sup>2</sup>, Sita Reddy<sup>5</sup>, Wolfgang H. Dillmann<sup>2</sup>, Manuel Palacin<sup>1,4</sup>, Antonio Zorzano<sup>1,4</sup>, Pilar Ruiz-Lozano<sup>6</sup>, Ramon Gomis<sup>7</sup>, Perla Kaliman<sup>7\*</sup>

1 Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, 2 University of California at San Diego, La Jolla, California, United States of America, 3 Istituto per la Ricerca e Cura del Cancro (IRCC) Multimedica, Milan, Italy, 4 Institute for Research in Biomedicine, Barcelona Science Park, Barcelona, Spain, 5 Institute for Genetic Medicine, University of Southern California at Los Angeles, Los Angeles, California, United States of America, 6 The Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, California, United States of America, 7 Endocrinology and Diabetes Unit, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain

**Myotonic dystrophy 1 (DM1) is caused by a CTG expansion in the 3'-untranslated region of the DMPK gene, which encodes a serine/threonine protein kinase. One of the common clinical features of DM1 patients is insulin resistance, which has been associated with a pathogenic effect of the repeat expansions. Here we show that DMPK itself is a positive modulator of insulin action. DMPK-deficient (*dmpk*<sup>-/-</sup>) mice exhibit impaired insulin signaling in muscle tissues but not in adipocytes and liver, tissues in which DMPK is not expressed. *Dmpk*<sup>-/-</sup> mice display metabolic derangements such as abnormal glucose tolerance, reduced glucose uptake and impaired insulin-dependent GLUT4 trafficking in muscle. Using DMPK mutants, we show that DMPK is required for a correct intracellular trafficking of insulin and IGF-1 receptors, providing a mechanism to explain the molecular and metabolic phenotype of *dmpk*<sup>-/-</sup> mice. Taken together, these findings indicate that reduced DMPK expression may directly influence the onset of insulin-resistance in DM1 patients and point to *dmpk* as a new candidate gene for susceptibility to type 2-diabetes.**

Citation: Llagostera E, Catalucci D, Marti L, Liesa M, Camps M, et al (2007) Role of Myotonic Dystrophy Protein Kinase (DMPK) in Glucose Homeostasis and Muscle Insulin Action. PLoS ONE 2(11): e11334. doi:10.1371/journal.pone.0001134

## INTRODUCTION

Type 2 diabetes is a heterogeneous disease and a major international public health threat. It is widely accepted that type 2 diabetes results from a combination of genetic susceptibility and other risk factors including obesity, increased age, hypertension, and lifestyle [1]. Insulin resistance, which is a major factor in the development of type 2 diabetes [2], is a common metabolic feature in myotonic dystrophy 1 (DM1), an autosomal dominant neuromuscular disorder [3]. DM1 patients frequently exhibit normal basal insulin levels but excessive insulin release after a glucose load, indicating a compensatory beta-cell response to tissue insulin insensitivity [4,5]. Whole-body glucose disposal in DM1 patients is reduced by 15–25% following insulin infusion [6] and experiments with forearm muscle indicate a 70% decrease in insulin sensitivity in skeletal muscle [7]. The DM1 mutation has been identified as the expansion of an unstable CTG-repeat in the 3'-untranslated region of a gene encoding DMPK (myotonic dystrophy protein kinase) [8,9]. Insulin resistance in DM1 has been associated with aberrant splicing of the insulin receptor RNA due to a toxic effect of the CUG-expanded repeats, which are transcribed from the mutated *dmpk* gene but are retained in the nucleus altering the normal metabolism of RNAs [10,11]. However, whether the entire endocrine pathology of DM1 is caused by alterations in RNA processing remains to be seen. Indeed, DM1 patients show a 50% decrease in DMPK expression [12] and studies of *dmpk* knockout mice indicate that at least some of the features of DM1 result from haploinsufficiency of DMPK [13–15]. Interestingly, *dmpk* gene is located on chromosome 19q13, in which quantitative trait loci (QTLs) for type 2 diabetes-associated phenotypes have been identified by two independent genome-wide linkage scans among large and multiple ethnicity populations [16,17].

DMPK is mainly expressed in muscle [18], which is a key target tissue for insulin-dependent regulation of glucose metabolism [19]. Structurally, DMPK presents homology with protein kinases of the Rho family (Rho-kinase), which have important roles in the organization of the cytoskeleton and several cellular processes including intracellular protein trafficking and metabolism [20,21].

Although little is known about the mechanisms that regulate DMPK activity, it has been described that DMPK is activated in response to G protein second messengers [22] and that the actin cytoskeleton-linked GTPase Rac-1 binds to DMPK, promoting its transphosphorylation activity in a GTP-sensitive manner [23]. Here we examined the role of DMPK in the regulation of insulin action and glucose homeostasis using a DMPK-deficient mouse model [13]. We show that DMPK plays a role in the regulation of whole-body glucose disposal and muscle insulin sensitivity through a mechanism that involves the intracellular trafficking of insulin and IGF-1 receptors.

## RESULTS

### *Dmpk*<sup>-/-</sup> mice exhibit insulin signaling defects in skeletal and cardiac muscles

We used *dmpk*-null mice to explore the involvement of DMPK in insulin action. We first analyzed cardiac and skeletal muscles, in which DMPK is preferentially expressed [18]. *Dmpk*<sup>-/-</sup> mice showed normal expression of the insulin receptor and other

Academic Editor: Brian McCabe, Columbia University, United States of America

Received August 9, 2007; Accepted October 14, 2007; Published November 7, 2007

Copyright: © 2007 Llagostera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by SAF2004-01281 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain and the "Ramón y Cajal Research Program" (to PK), and National Institutes of Health Grant HL065484 (to PR-L).

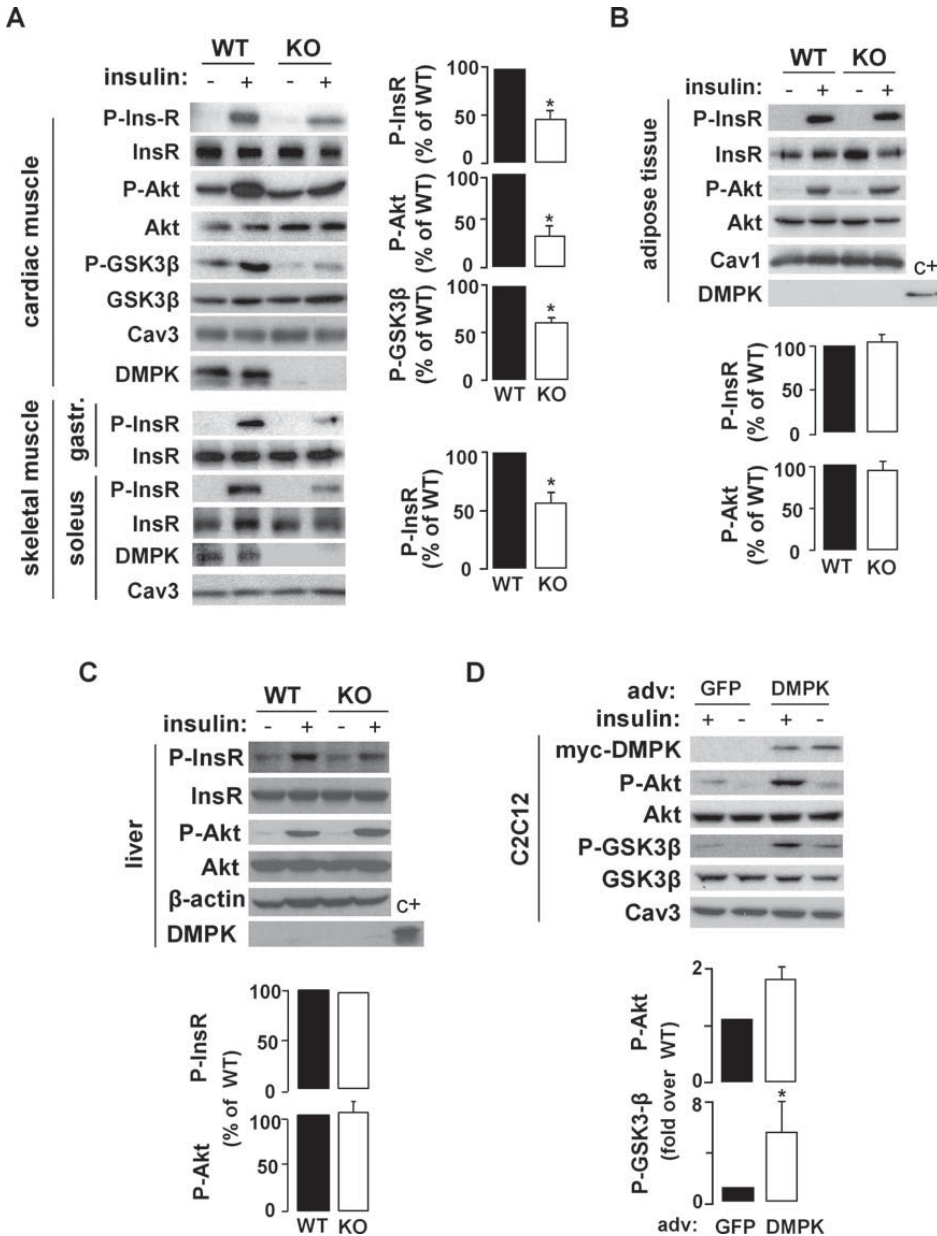
Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: pkaliman@clinic.ub.es

† These authors contributed equally to this work.

components of the insulin signaling pathway, such as the protein kinase Akt and glycogen synthase kinase  $3\beta$  (GSK3- $\beta$ ) (Fig. 1 A). However, abnormalities were found in the activation of the insulin signaling pathway in both cardiac and skeletal muscle. Insulin-induced autophosphorylation of the insulin/IGF-I receptor

(Tyr1150/1151-InsR; Tyr1135/1136-IGF-1R) was substantially decreased in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice after insulin treatment *in vivo* ( $54 \pm 10\%$  decrease in cardiac muscle;  $44 \pm 10\%$  decrease in skeletal muscle) (Fig. 1 A). Phosphorylation of other components of the insulin signaling pathway such as Ser473-Akt and Ser9-GSK3- $\beta$  was also



**Figure 1. DMPK regulates muscle insulin signaling.** (A) Cardiac and skeletal muscles (soleus and gastrocnemius); (B) white adipose tissue; and (C) liver homogenates from *dmpk*<sup>-/-</sup> and wild type mice were analysed by Western blot. Caveolin 3, caveolin 1 and  $\beta$ -actin were used as loading controls. Heart homogenate was loaded as positive control for DMPK expression in B and C. (D) C2C12 myoblasts transduced with recombinant adenovirus for myc-DMPK or green fluorescent protein (GFP) as control were analyzed by Western blot. Caveolin 3 was used as loading control. Data are means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  vs control values ( $n = 3-5$ ). doi:10.1371/journal.pone.0001134.g001

severely reduced in cardiac muscle from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice (39±5% decrease in Akt phosphorylation; 67±9% decrease in GSK3-β phosphorylation) (Fig. 1 A). In contrast, insulin-induced autophosphorylation of the insulin/IGF-I receptor and phosphorylation of Ser473-Akt were preserved in adipose tissue and liver (Fig. 1 B and C, respectively), in which DMPK is not expressed. These results suggest that insulin signaling defects in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice are restricted to DMPK-expressing tissues. A role of DMPK in muscle insulin signaling was corroborated by overexpression of DMPK in C2C12 skeletal muscle cells. In myoblasts transduced with myc-tagged wild-type DMPK-adenovirus, insulin-stimulated phosphorylation of Ser473-Akt and Ser9-GSK3-β was increased 1.8±0.2- and 5.5±2.6-fold, respectively, compared to control cells (Fig. 1 D).

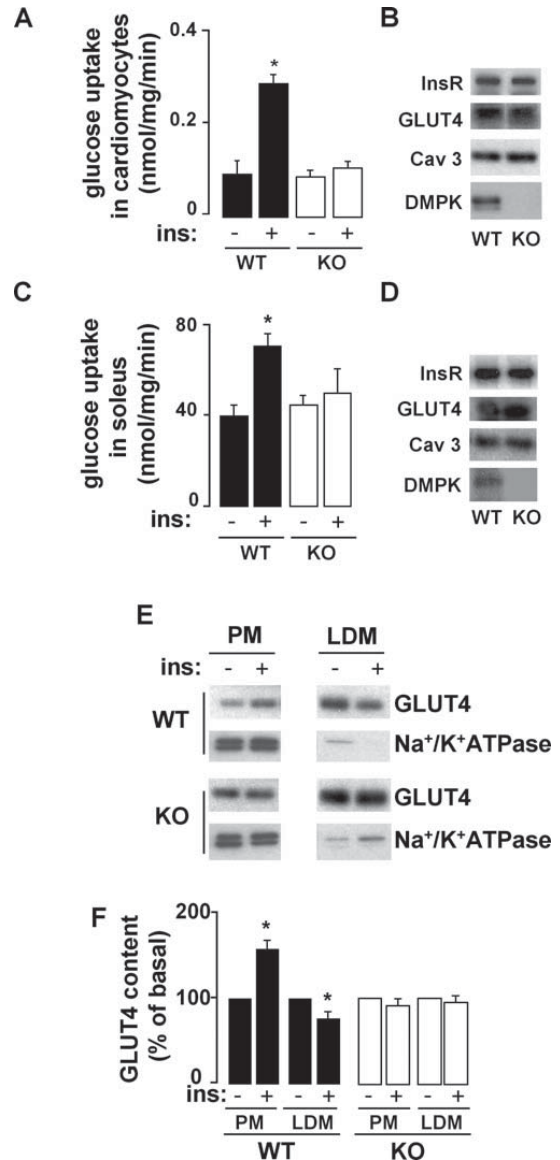
### Metabolic alterations in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice

To examine whether *dmpk*<sup>-/-</sup> mice display muscle insulin resistance, we first measured insulin-stimulated glucose transport in cardiac and skeletal muscle. In myocytes isolated from left ventricles and soleus muscles from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice, insulin-stimulated glucose transport was decreased compared with wild-type mice (Fig. 2 A and C, respectively). The alterations in glucose uptake were not due to a decrease in the insulin receptor or the glucose transporter GLUT4 expression levels (Fig. 2 B and D). Moreover, expression of caveolin 3, a specific muscular marker of *caveolae* that is altered in other forms of muscular dystrophies [24] and is required for insulin-stimulated glucose uptake [25], was also normal in cardiac and skeletal muscles from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice. We further studied the role of DMPK in muscle insulin sensitivity by analyzing GLUT4 translocation, a critical muscle response to insulin. We performed subcellular fractionations of cardiac muscle membranes from wild-type and *dmpk*<sup>-/-</sup> mice. Endosomes and sarcolemmal membrane fractions were separated by successive spins of homogenates (Fig. 2 E). Low density microsomes (LDM) fractions were enriched in GLUT4 and contained very low levels of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, indicating that such fractions were mostly devoid of plasma membrane. In wild-type mice, GLUT4 content in plasma membrane (PM) fraction was increased 51±15% by insulin injection, at the expense of the LDM pool of GLUT4, which showed 23±4% reduction upon insulin treatment. Insulin-induced translocation of GLUT4 from LDM to PM was not detected in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2 F).

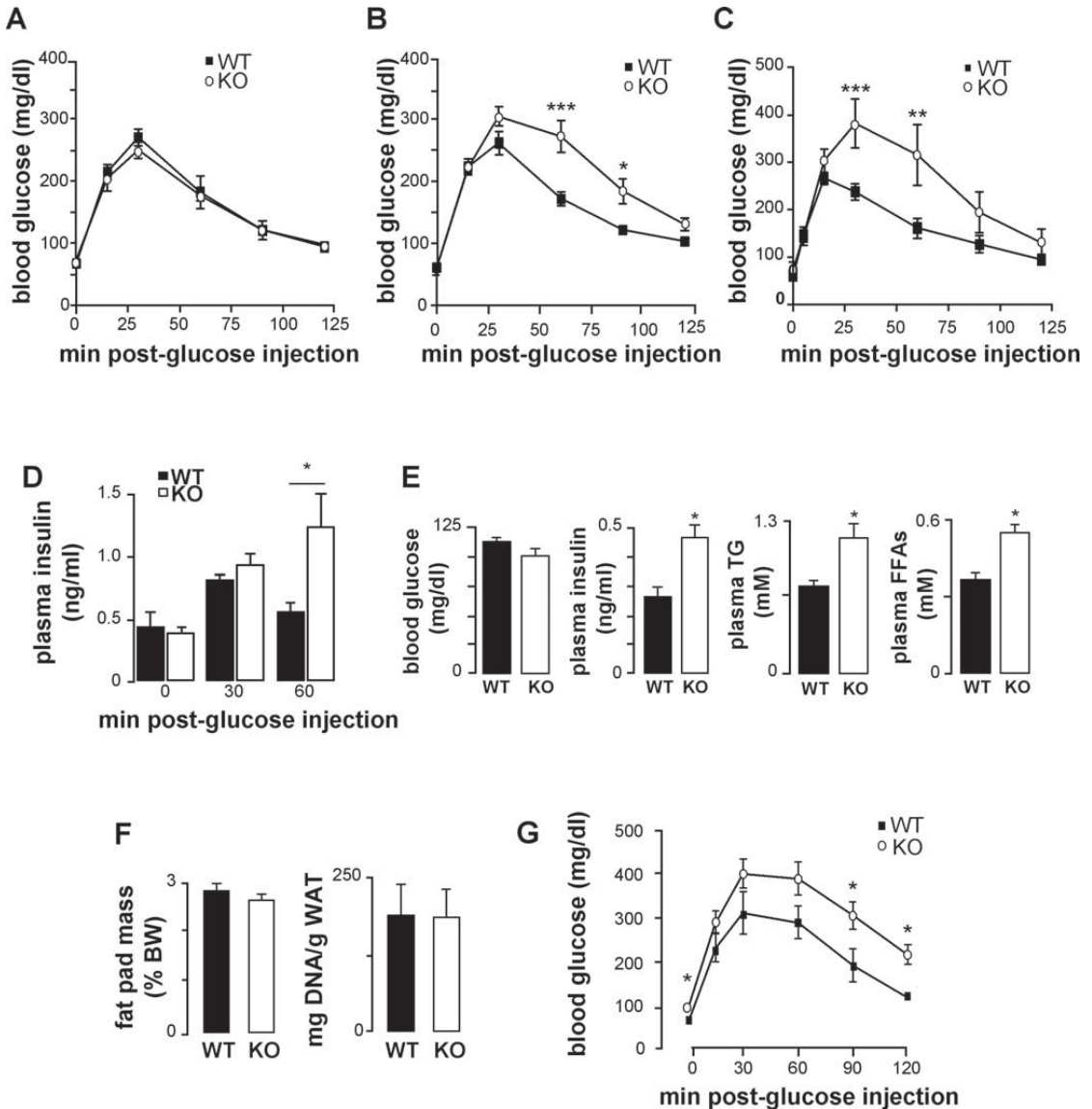
Glucose tolerance tests performed at 4 weeks of age were similar for *dmpk*<sup>-/-</sup> and wild-type mice (Fig. 3 A). In contrast, at 8–10 weeks of age glucose tolerance in both male and female *dmpk*<sup>-/-</sup> mice was altered (Fig. 3 B and C, respectively). Plasma insulin levels measured during glucose tolerance tests were also elevated in *dmpk*<sup>-/-</sup> as compared to wild-type mice (Fig. 3 D). However, *dmpk*<sup>-/-</sup> mice showed normal fasting glucose and glycemia returned to baseline 2 h after glucose injection in both groups. Fasted *dmpk*<sup>-/-</sup> mice showed normal insulin, triglyceride and free fatty acid levels (Table 1) while these parameters in fed animals were higher than those from control animals (Fig. 3 E). No increases in fat-cell mass or fat-cell number were detected in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3 F). The glucose intolerant response of *dmpk*<sup>-/-</sup> mice placed on a high-fat diet for 8 weeks was more severe than that of *dmpk*<sup>-/-</sup> mice on a standard chow diet. Indeed, this metabolic stress significantly increased fasting blood glucose levels as well as glycemia 2 h after the glucose overload in *dmpk*<sup>-/-</sup> compared to wild type mice (Fig. 3 G).

### DMPK is required for insulin receptor targeting to the plasma membrane

Regarding the molecular mechanism whereby DMPK activity could influence insulin receptor signaling, previous observations



**Figure 2. Decreased insulin-dependent glucose transport and abnormal GLUT4 translocation in *dmpk*<sup>-/-</sup> muscle.** (A, C) *Ex vivo* glucose uptake in myocytes isolated from left ventricles (n=6 per group) and soleus muscles (n=3 per group), stimulated with or without insulin (100 nM). (B, D) Insulin receptor, glucose transporter GLUT4, caveolin 3 and DMPK protein contents were analyzed in cardiomyocytes and soleus, respectively, from wild-type (WT) and *dmpk*<sup>-/-</sup> (KO) mice (n=3). (E, F) Subcellular fractions were prepared from cardiac ventricles of basal and insulin-treated mice. (E) Plasma membranes (PM) and low density microsomes (LDM) were analysed by SDS-Page and Western blot. Representative autoradiograms from 3 experiments are shown. Equal amounts of membrane proteins (4 μg) from the different fractions were laid on gels. (F) GLUT4 translocation was quantified from 3 independent experiments. (Data are mean±SEM; \*P<0.05 vs unstimulated values)  
doi:10.1371/journal.pone.0001134.g002



**Figure 3. Metabolic parameters in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice.** Glucose tolerance tests of (A) 4-week-old males; (B) 8–10-week-old males; (C) 8–10-week-old females. (wild type, black squares; *dmpk*<sup>-/-</sup> mice, white circles). (n = 5–8 mice per group) (D) Plasma insulin, during glucose tolerance test performed on 16 h-fasted mice (n = 5–8 for each group). (E) Insulin, triglycerides, and free fatty acids (FFAs) concentrations in plasma from fed mice (n = 8–14 for each group). (F) Glucose tolerance tests on 4-month-old males on high fat diet (n = 8 per group; wild type, black squares; *dmpk*<sup>-/-</sup> mice, white circles). Data are mean ± SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001 vs wild-type values. doi:10.1371/journal.pone.0001134.g003

led us to analyze the role of DMPK in stress fiber formation: (i) DMPK function has been associated with the regulation of cytoskeleton in lens cells [26], and (ii) it has recently been shown that disruption of the actin cytoskeleton leads to alterations in insulin receptor localization and signaling [27]. We used two mutants of DMPK: myc-K110ADMPK, a kinase deficient form mutated at the ATP-binding site [28], and myc-ΔMADMPK,

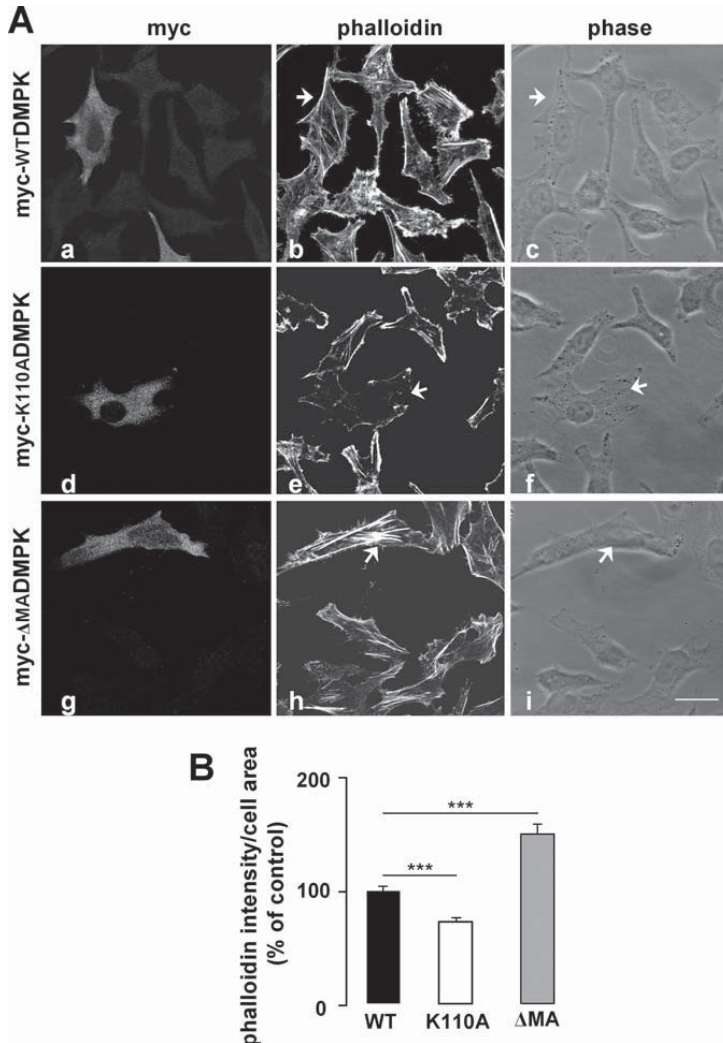
which lacks C-terminal residues 550–629 but retains kinase activity [22]. HeLa cells were transiently transfected with wild-type myc-DMPK, myc-K110ADMPK or myc-ΔMADMPK. Transfected cells were analyzed after 3-h starvation to determine the stress fiber content in steady state (Fig. 4 A and B). The stress fiber pattern in cells expressing myc-WTDMPK was indistinguishable from that of the surrounding untransfected cells (Fig. 4 A, a–c and

**Table 1. Metabolic parameters in fasted *dmpk*<sup>-/-</sup> mice.**

	<i>dmpk</i> <sup>+/+</sup>	<i>dmpk</i> <sup>-/-</sup>
Weight (g)	18±1	17±2
Blood glucose (mg/dl)	53.33± 4.84	54.60±2.16
Plasma insulin (ng/ml)	0.34±0.08	0.37±0.09
Plasma triglycerides (mM)	0.85±0.06	0.79±0.05

Data are means±SEM, (n=8-20)  
doi:10.1371/journal.pone.0001134.t001

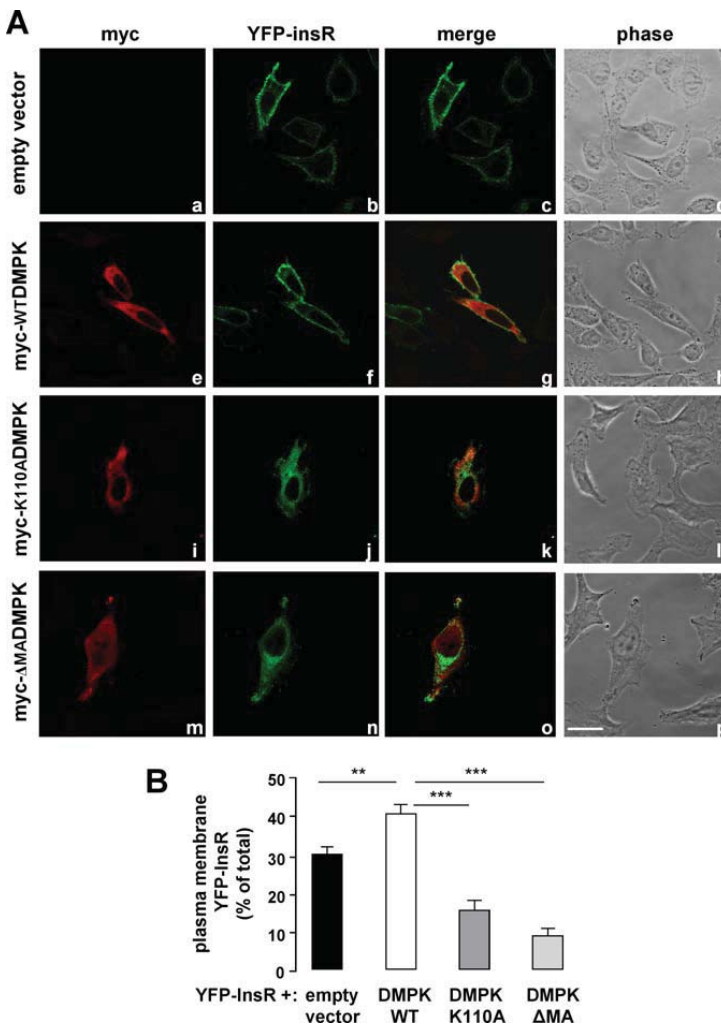
Fig. 4 B). Expression of the kinase-dead mutant myc-K110ADMPK resulted in a disassembly of stress fibers (Fig. 4 A, d-f and Fig. 4 B) while myc- $\Delta$ MADMPK induced a gross condensation of actin filaments within the cell (Fig. 4 A, g-i and Fig. 4 B). These results were consistent with those previously reported for DMPK in lens cells and for the DMPK homolog ROK $\alpha$  in HeLa cells [26,29]. Having verified the effect of DMPK mutants in stress fiber formation in HeLa cells, we analyzed their effect in the intracellular trafficking of the insulin receptor. HeLa cells were transiently co-transfected with yellow fluorescent protein-tagged InsR (YFP-InsR) along with myc-WTDMPK,



**Figure 4. Overexpression of DMPK mutants alters stress fiber formation in HeLa cells. (A)** Stress fiber formation was analyzed by phalloidin labeling. Cells were transfected with myc-WTDMPK (a-c), the kinase-dead myc-K110ADMPK mutant (d-f), and the C-terminal lacking myc- $\Delta$ MADMPK mutant (g-i). Arrowheads indicate the transfected cells. Scale bar, 24  $\mu$ m (applies to all panels). Representative images from 3 independent experiments are shown. **(B)** Stress fiber formation was quantified using the Image J software as phalloidin intensity/cell area. Values for untransfected cells were set as 100%. Means from three independent experiments with 20 cells analyzed per condition are shown. Data are mean±SEM; \*\*\**P*<0.0001 vs untransfected cells.  
doi:10.1371/journal.pone.0001134.g004

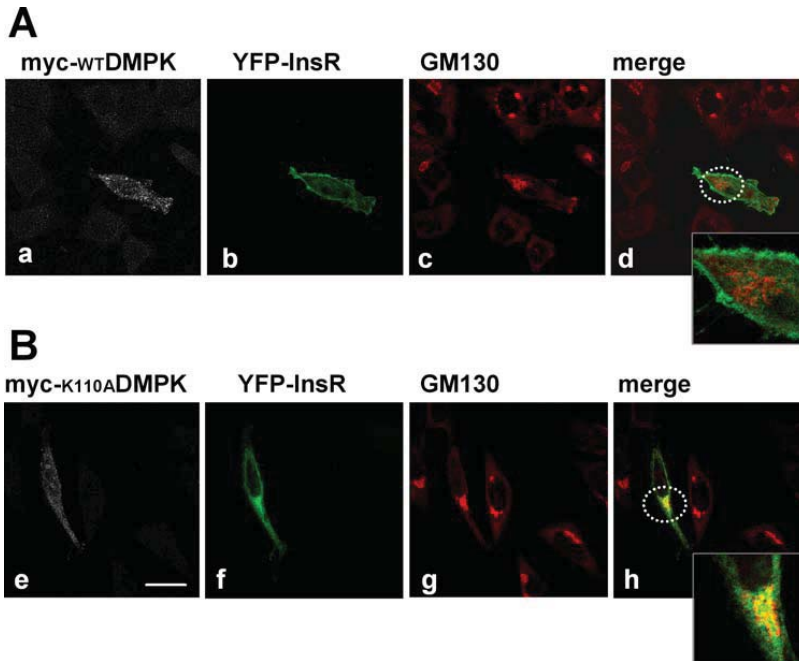
myc-K110ADMPK, myc- $\Delta$ MADMPK or empty vector as control. Co-transfected cells were analyzed by confocal immunofluorescence after 3-h starvation to determine the localization of YFP-InsR in steady state. In cells expressing either empty vector or myc-WTDMPK, YFP-InsR was targeted to the cell surface (Fig. 5 A, a–d and e–h, respectively). Quantification analysis showed that the overexpression of myc-WTDMPK induced a significant increase in the receptor density at the plasma membrane compared to control cells (Fig. 5 B). In contrast, in the presence of either myc-K110ADMPK or myc- $\Delta$ MADMPK mutants, YFP-InsR was retained in intracellular structures (Fig. 5 A, i–l and m–p, respectively), with no evident co-localization with the DMPK

mutants (Fig. 5 A, k and o). For both mutants, the percentages of YFP-InsR at the plasma membrane were significantly decreased compared to control cells (Fig. 5 B). To identify the intracellular compartments in which the YFP-InsR was retained, HeLa cells were transfected with the vector encoding this protein and myc-WTDMPK or myc-K110ADMPK and subjected to staining with anti-myc antibody and a series of markers for different organelles. Co-localization studies revealed that in the presence of myc-K110ADMPK, the intracellularly retained receptor partially coincides with the Golgi matrix protein GM130 (Fig. 6). No evidence of co-localization was detected with early endosomes (EEA1) or to recycling endosomes (transferrin receptor) (not shown).



**Figure 5. DMPK is required for insulin receptor targeting to the plasma membrane.** (A) HeLa cells were transiently co-transfected with YFP-InsR along with control empty vector (a–d), myc-WTDMPK (e–h), myc-K110ADMPK (i–l) or myc- $\Delta$ MADMPK (m–p). Shown are representative images of 3 independent experiments. Scale bar, 24  $\mu$ m (applies to all panels). (B) Receptor percentage at the cell surface was quantified by using Image J software. Means from three independent experiments with 20 cells analyzed per condition are shown. Data are mean  $\pm$  SEM; \*\* $P$ <0.001; \*\*\* $P$ <0.0001 vs untransfected cells.

doi:10.1371/journal.pone.0001134.g005



**Figure 6. Effect of kinase-deficient mutant DMPK (myc-K110ADMPK) on YFP-InsR subcellular distribution.** HeLa cells were transiently co-transfected with YFP-InsR along with myc-WTDMPK (upper panels) or myc-K110ADMPK (lower panels). Cellular distribution of YFP-InsR partially coincides with that of Golgi complex protein GM130 in cells expressing myc-K110ADMPK (panel h). Dashed circles in b and f show the magnified areas. Scale bar, 24  $\mu$ m. Representative images of 3 independent experiments are shown. doi:10.1371/journal.pone.0001134.g006

To further analyze DMPK role in insulin receptor trafficking, we measured the insulin binding activity in cardiomyocytes isolated from *dmpk*<sup>-/-</sup> and wild type mice. <sup>125</sup>I-insulin binding assays were carried out at 12°C on cells from 16-h fasted mice to analyze cell surface binding in the absence of internalization. Cells from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice showed a 36±8% (n=4, p<0.05) decrease in <sup>125</sup>I-insulin binding at 0.033 nM insulin concentration compared to controls (Table 2). This decrease was associated with a reduced number of receptors at the cell surface with no apparent changes in receptor affinity for the ligand as the percentage of <sup>125</sup>I-insulin displacement at saturating unlabeled insulin concentrations was similar in both groups (58±13% and 62±8% displacement for wild type and *dmpk*<sup>-/-</sup> mice, respectively). To better understand the metabolic phenotype of *dmpk*<sup>-/-</sup> mice, we also analyzed the impact of DMPK in the IGF1-receptor intracellular trafficking.

The results obtained by co-transfection of GFP-tagged IGF-1 receptor along with myc-WTDMPK, myc-K110ADMPK, myc- $\Delta$ MADMPK or empty vector as control were similar to those obtained for the insulin receptor (Fig. 7 A and B).

## DISCUSSION

In this study, we addressed the molecular and metabolic function of DMPK, a poorly characterized serine/threonine protein kinase. Consistent with the preferential expression of DMPK in muscle tissues [18], we show that *dmpk*<sup>-/-</sup> mice exhibit insulin signaling defects in cardiac and skeletal muscle. Our data indicate that *dmpk*<sup>-/-</sup> mice present a significant degree of metabolic alteration, reflected in elevated glucose levels in glucose tolerance tests and increased circulating fed insulin and lipid levels. As observed in DM1 patients [4], *dmpk*<sup>-/-</sup> mice show higher concentrations of plasma insulin than wild-type mice in the glucose tolerance tests. These mice exhibit impaired glucose uptake and GLUT4 translocation indicating that decreased insulin sensitivity in muscle could be at the basis of the observed metabolic alterations. Indeed, *dmpk*<sup>-/-</sup> mice show normal adiposity and insulin signaling in adipose tissue and liver, in which DMPK is not expressed.

Insulin-induced autophosphorylation of insulin/IGF1-R in response to insulin is influenced by the number of receptors at the cell surface. Correct intracellular trafficking of the InsR is critical for insulin sensitivity and it has been shown that mutations in the InsR gene that impair the transport of the receptor to the plasma membrane lead to type 2 diabetes in humans [30]. After insulin binding, InsR is rapidly internalized and either sent to lysosomes for degradation, or recycled to the plasma membrane

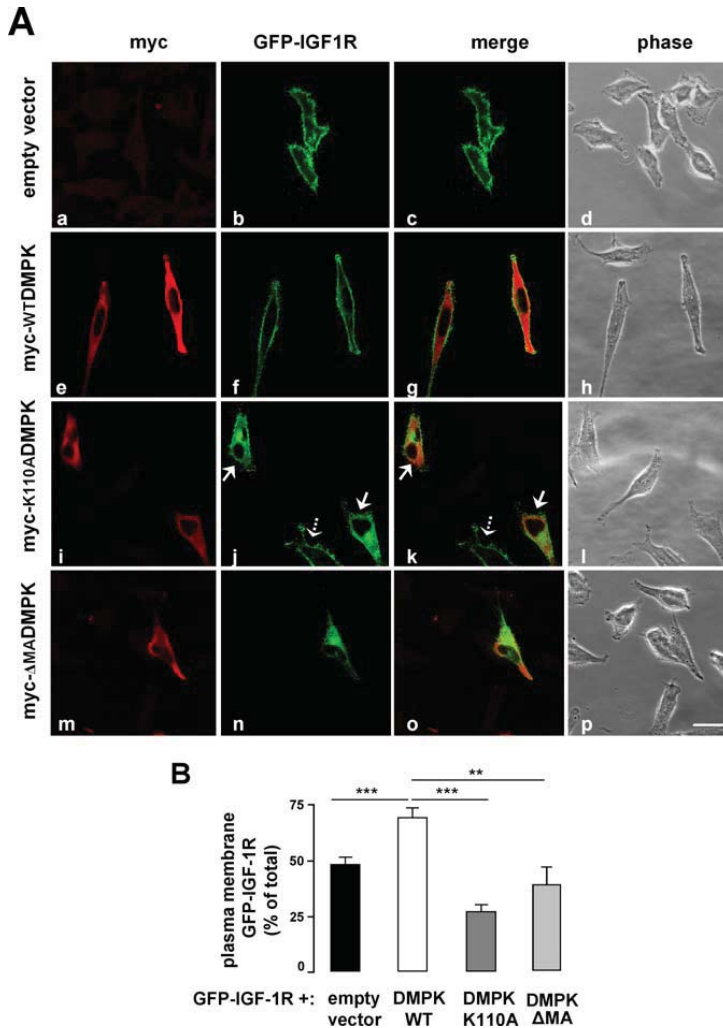
**Table 2. Insulin binding to isolated cardiomyocytes.**

[insulin] nM	% insulin bound/10 <sup>5</sup> cells	
	<i>dmpk</i> <sup>+/+</sup>	<i>dmpk</i> <sup>-/-</sup>
0.033	6.0±0.5	3.8±0.4*
1	2.4±0.5	1.4±0.3

Results expressed as % of <sup>125</sup>I-insulin specifically bound at the indicated insulin concentration.

\*P<0.05 vs. WT (n=4)

doi:10.1371/journal.pone.0001134.t002



**Figure 7. DMPK is required for IGF-1 receptor targeting to the plasma membrane.** (A) HeLa cells were transiently co-transfected with GFP-IGF-1 along with control empty vector (a–d), myc-WTDMPK (e–h), myc-K110ADMPK (i–l), or myc-ΔMADMPK (m–p). Dotted arrows in panel k and l show a cell which incorporated the GFP-IGF-1 plasmid, expressing the receptor at the plasma membrane. In the same panels, neighboring cells co-expressing the receptor and myc-K110ADMPK are indicated by continuous arrows; in these cells, the accumulation of the receptor in intracellular compartments is observed. Shown are representative images of 3 independent experiments. Scale bar, 24 μm (applies to all panels). (B) Receptor percentage at the cell surface was quantified by using Image J software. Means from three independent experiments with 20 cells analyzed per condition are shown. Data are mean ± SEM; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  vs untransfected cells. doi:10.1371/journal.pone.0001134.g007

for another round of binding, activation, and internalization [31]. Our results show that: (i) the insulin receptor expression levels in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice are normal; (ii) the insulin binding to the plasma membrane of *dmpk*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes is decreased; (iii) the overexpression of kinase-deficient and C-terminal truncated DMPK mutants leads to the retention of the InsR in intracellular compartments; and (iv) the overexpression of wild-type myc-DMPK increased the percentage of YFP-InsR at the cell surface. Altogether, these data indicate that DMPK is involved in InsR intracellular trafficking. However, this molecular mechanism cannot fully explain the metabolic alterations observed in

*dmpk*<sup>-/-</sup> mice, especially considering the previous characterization of the muscle-insulin receptor knockout (MIRKO) mice which do not show glucose intolerance [32]. For this reason, we analyzed whether DMPK also regulated the targeting of IGF-1 receptor to the plasma membrane. Indeed, functional inactivation of the IGF-1 and insulin receptors in skeletal muscle (MKR mice) leads to type 2 diabetes phenotype [33]. Interestingly, the glucose tolerance tests performed in 4-week-old MKR mice are very similar to those observed in 8–10-week-old *dmpk*<sup>-/-</sup> animals. However, in contrast to MKR mice, older *dmpk*<sup>-/-</sup> mice do not develop type 2 diabetes. The milder phenotype of *dmpk*<sup>-/-</sup> mice compared to MKR mice



is consistent with a mechanism involving a reduction of InsR and IGF-1R function rather than full inactivation of these receptors.

We show that the kinase and C-terminal domains in DMPK are positive and negative regulators, respectively, of the cytoskeleton reorganization. Similar functions were previously found for DMPK in lens cells [26] and for homologous domains in Rho kinase  $\alpha$  [29]. Both kinase and C-terminal domain mutants of DMPK alter insulin and IGF-1 receptor targeting to the plasma membrane and stress-fiber formation; however, whether these effects are functionally related remains to be determined. One possibility is that DMPK could be involved in the biogenesis of Golgi-derived transport carriers through regulation of actin cytoskeleton dynamics. Indeed, when actin dynamics is impaired by a variety of actin toxins that depolymerize or stabilize actin filaments, the Golgi complex shows significant structural changes [34]. Interestingly, we detected that the receptor intracellular accumulation caused by DMPK kinase-deficient mutant partially co-localizes with the Golgi matrix protein GM130.

In summary, our study provides *in vivo* and *in vitro* evidence for the role of DMPK in the regulation of insulin action and glucose homeostasis. Taken together, these findings indicate that reduced DMPK expression may directly influence the onset of insulin-resistance in myotonic dystrophy 1 patients and suggest that DMPK could represent a susceptibility gene to type 2-diabetes.

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse experiments

All animal studies were performed in accordance with the guidelines and under approval of the Institutional Review Committee for the Animal Care and Use of the University of Barcelona and by the animal welfare regulations of the University of California, San Diego. The *dmpk*<sup>-7/+</sup> heterozygous mice on 129SV background were generated by Reddy *et al.* [13]. These mice were mated to produce littermates that were homozygous for intact DMPK allele (WT) and homozygous for the null DMPK allele (KO). Except when indicated, 3-month-old male mice were used in experiments shown. Mice were backcrossed for at least 9 times maintaining the animals as congenic in the colony. Female mice were also analyzed in most of the studies presented with similar results.

### Physiological assays

The following measurements were performed on randomly fed or on 16-h fasted animals when indicated. We measured blood glucose levels on whole venous blood using an automatic glucose monitor (One Touch Basic, Lifescan). Plasma insulin levels were measured by ELISA, using rat insulin as a standard (Crystal Chem). Free fatty acids and triglyceride levels were quantified from plasma using kits from Wako (NEFA-C Ki and Triglyceride L-Type, respectively). We performed glucose tolerance test on 16 h fasted mice injected intraperitoneally with D-glucose (2 g/kg body weight, Sigma). For high-fat diet treatment, mice were individually placed on a fat-adjusted diet (60 kcal% from fat, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ) for 8 weeks.

### Cardiomyocyte isolation and glucose uptake assays

Left ventricle myocytes from 3-month-old mice were prepared by collagenase digestion as described previously [35] except that cells were finally resuspended in D-glucose-free DMEM (Gibco) supplemented with sodium pyruvate (0.22 mg/ml) and 0.2% BSA. Cardiomyocyte suspensions at 10% cytocrit were incubated with or without 100 nM insulin at 35°C for 30 min. The transport assay was initiated by the addition of 2-deoxy-D-glucose (1 mM

final concentration, containing 0.5  $\mu$ Ci of 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H]glucose, Amersham Pharmacia Biotech). Glucose uptake was terminated after 20 min by transferring the cell suspension to microfuge tubes and immediately centrifuged at 100 $\times$ g for 30 s. Cell pellets were washed 3 times in ice-cold 50 mM D-glucose in PBS. Background activity was determined by measuring the transport in a solution that contained 50 mM D-glucose. Cells were lysed with 1 ml of ice-cold 0.1 N NaOH with 0.1% SDS and aliquots were taken for determination of radioactivity and protein levels.

For skeletal muscle glucose uptake assays, mice were sacrificed by cervical dislocation and soleus muscles were rapidly dissected. Muscles were then allowed to recover for 15 min in flasks containing 2 ml of incubation medium (D-glucose-free DMEM (Gibco) supplemented with 0.22 mg/ml sodium pyruvate and 0.2% BSA), continuously oxygenated with 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> in a shaking water bath (35°C). After recovery, glucose transport was performed by adding 2-deoxy-D-[<sup>3</sup>H]glucose (1 mM, 1  $\mu$ Ci/ml) and (<sup>14</sup>C)mannitol (19 mM, 0.3  $\mu$ Ci/ml) for 20 min and then, muscles were frozen, weighed, and digested in 1 ml of 0.5 N NaOH. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting for dual labels and the extracellular and intracellular spaces were calculated as described [36].

### Subcellular membrane fractionation

Separation of cardiac sarcolemmal and endosomal membranes from mouse hearts was performed by differential centrifugation as previously described [37]. Successive spins at 100 $\times$ g, 5,000 $\times$ g, 20,000 $\times$ g, 50,000 $\times$ g and 100,000 $\times$ g were performed. Membranes pelleting at 20,000 $\times$ g [plasma membrane fraction, PM] were enriched in the plasma membrane marker Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. To obtain a fraction containing the intracellular GLUT4 pool, the 20,000 g supernatant was centrifuged for 30 min at 50,000 $\times$ g, resulting in the separation of a high-density microsome fraction [highly contaminated with plasma membranes] and a low-density microsomes (LDM) fraction in the supernatant. This supernatant was finally ultracentrifuged for 60 min at 100,000 $\times$ g to obtain the LDM pellet. Combining the quantitated signals from LDM and PM fractions indicates that 83 $\pm$ 5% of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase is found in PM fraction, while 77 $\pm$ 2% of GLUT4 is in LDM (n = 3, p<0.05).

### <sup>125</sup>I-insulin binding assays

Insulin binding in suspended cells was measured as described [38]. Human biosynthetic insulin was a kind gift from Eli Lilly Co. (Indianapolis, IN). A <sup>14</sup>-<sup>125</sup>I-human insulin was purchased from Perkin-Elmer (Boston, MA). Cells were exposed to a tracer concentration of A<sup>14</sup>-<sup>125</sup>I-labeled human insulin and varying concentrations of unlabeled human insulin for 4 hr at 12°C. Reactions were terminated by layering duplicate aliquots of the binding reaction over dibutyl phthalate in microcentrifuge tubes and centrifuging at 14,000 $\times$ g for 30 sec. The supernatant was aspirated off and the radioactivity in cell pellets determined. Specific binding was calculated by subtracting non-specific binding measured in the presence of a large excess (1.67  $\mu$ M) of unlabeled insulin.

### Weight and DNA content of WAT

Perirenal, perigonadal and subcutaneous adipose tissues were carefully dissected and weighed to determine the fat pad weight as percentage of total body weight. To determine fat pad cell number, perirenal adipose tissue was resected, weighed, and immediately frozen in liquid nitrogen. About 50  $\mu$ g of tissue were homogenized, and genomic DNA was extracted using Quant-iT PicoGreen (Invitrogen) as described by the manufacturer. DNA was measured by fluorimetric method.

## Biochemical analyses

16-h fasted mice were injected intraperitoneally with D-glucose (1 g/kg body weight) and 10 min later, with insulin (5 U/kg body weight). After 10 min, heart, skeletal muscle, adipose tissue and liver were rapidly extracted, freeze clamped in liquid nitrogen and homogenized as described previously [28]. Control tissues from untreated fasted mice were obtained in parallel. Immunoblotting analyses were performed following standard procedures. Antibodies to mouse DMPK were from Zymed Laboratories. Antibodies to insulin receptor  $\beta$ -subunit, caveolin 3 and caveolin 1 were from BD Transduction Laboratories. All other antibodies used were from Cell Signaling Technology. Immunoblots were scanned and signals were quantified using HP Precisionscan Pro and Syngene Gene Tools software. Shown are representative immunoblot data from at least 3 independent experiments which were quantified and expressed as the mean  $\pm$  SEM relative ratio of phosphoprotein to total protein between untreated and insulin-treated mice.

**Gene transfer by adenovirus vectors** Adenoviruses expressing myc-tagged human DMPK were generated by homologous recombination as described [28]. Subconfluent C2C12 cells were infected for 2 h with 100 plaque-forming units/cell of adenovirus vector encoding either myc-DMPK or green fluorescent protein (GFP) before the addition of a suitable volume of myogenic culture media (DMEM with 5% horse serum and antibiotics). After 2 days, myotubes were treated with or without 100 nM insulin for 30 min at 37°C, harvested, lysed and analyzed by immunoblotting as described above.

**Cell transfection and confocal microscopy** For cell transfection experiments, HeLa cells on coverslips were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Plasmids used were: myc-tagged wtDMPK and myc-tagged  $\Delta$ MADMPK [22]; myc-tagged K110ADMPK [28]; yellow fluorescent protein-tagged insulin receptor (YFP-InsR) [39]; and green fluorescent protein-tagged IGF-1 receptor (GFP-IGF-1) [40]. Thirty-six hours after transfection, cells were serum starved for 3 h, then washed in PBS, fixed for 30 minutes in 4% w/v paraformaldehyde and processed

for immunofluorescence as described above. Antibodies used were anti-myc rabbit polyclonal antibody (Upstate), anti-myc mAb 9E10 (ATCC), mAb anti-GM130 [Amersham Biosciences], anti-mouse Cy5-conjugated IgG (Jackson), anti-rabbit Alexa Fluor 555 IgG (Molecular Probes) and anti-mouse Alexa Fluor 594 IgG [Molecular Probes]. For staining of actin filaments, the coverslips were incubated with phalloidin conjugated to Alexa Fluor 594 (Molecular Probes). Cells were examined using a Zeiss LSM510 confocal laser microscope with an oil immersion 63 $\times$ /NA1.3 objective. Micrographs shown are representative optical sections imaged through the centre of the cell. At least 20 cells for each condition of 3 independent experiments were examined and subjected to quantification analyses using Image J software.

## Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  standard error. Statistical analysis was performed using a two-tailed unpaired *t*-test. Two-way analysis of variance (ANOVA) was applied for multiple comparisons, followed by the Bonferroni *post hoc* test. Values of  $P < 0.05$  were considered as statistically significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. B. Perryman (University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO), Dr. Tarik Issad (Institute Cochin, CNRS, Paris, France), and Dr R. O'Connor (National University of Ireland, Cork, Ireland) for generously providing the plasmids encoding myc-WTDMPK and myc- $\Delta$ MADMPK, YFP-InsR, and GFP-IGF-1R, respectively. We thank Meritxell Vicente Marti for excellent technical support, the Animal Research Center (SEA-PCB) staff for their invaluable assistance in animal experimentation and Dr. M. Calvo and A. Bosch from the Scientific Services (Universitat de Barcelona-IDIBAPS) for their support with confocal techniques.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PK. Performed the experiments: PK DC ML MC PR EL LM TC RK. Analyzed the data: PK RG EL LM TC. Contributed reagents/materials/analysis tools: SR AZ MP PK DC RG WD. Wrote the paper: PK.

## REFERENCES

- O'Rahilly S, Barroso I, Wareham NJ (2005) Genetic factors in type 2 diabetes: the end of the beginning? *Science* 307: 370–373.
- Biddinger SB, Kahn CR (2006) From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 68: 123–158.
- Harper PS (1989) *Myotonic Dystrophy 2<sup>nd</sup> edn* W B Saunders London UK.
- Krentz AJ, Clark PM, Cox L, Williams AC, Nattaras M (1992) Hyperproinsulinaemia in patients with myotonic dystrophy. *Diabetologia* 35: 1170–1172.
- Vialeto B, Pouget J, Viard R, Moulin JP, Serra-trice G, et al. (1986) Mechanism and significance of insulin resistance in myotonic dystrophy. *Horm Metab Res* 18: 395–399.
- Moxley RT, Corbett AJ, Minaker KL, Rowe JW (1984) Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. *Ann Neurol* 15: 157–162.
- Moxley RT III, Griggs RC, Goldblatt D, VanGelder V, Herr BE, et al. (1978) Decreased insulin sensitivity of forearm muscle in myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 62: 857–867.
- Brook JD, McCurrach ME, Harley HG, Buckler AJ, Church D, et al. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy-expansion of a trinucleotide CTG repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68: 799–808.
- Mahadevan M, Tsiflidis C, Sabourin L, Shutter G, Amemiya C, et al. (1992) Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255: 1253–1255.
- Savkur RS, Philips AV, Cooper TA (2001) Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29: 40–47.
- Dansithong W, Paul S, Comai L, Reddy S (2005) MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DMI. *J Biol Chem* 280: 5773–5780.
- Salvatori S, Fanin M, Trevisan CP, Furlan S, Reddy S, et al. (2005) Decreased expression of DMPK: correlation with CTG repeat expansion and fibre type composition in myotonic dystrophy type 1. *Neurol Sci* 4: 235–242.
- Reddy S, Smith DB, Rich MM, Lefterovich JM, Reilly P, et al. (1996) Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13: 325–335.
- Jansen G, Groenen PJ, Bachner D, Jap PH, Coerwinkel M, et al. (1996) Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13: 316–324.
- Berul CI, Maguire CT, Aronovitz MJ, Greenwood J, Miller C, et al. (1999) DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103: R1–7.
- An P, Freedman BI, Hanis CL, Chen YD, Weder AB, et al. (2005) Genome-wide linkage scans for fasting glucose, insulin, and insulin resistance in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Blood Pressure Program: evidence of linkages to chromosome 7q36 and 19q13 from meta-analysis. *Diabetes* 54: 909–914.
- van Tilburg JH, Skuijl LA, Strengman E, van Someren H, Rigters-Aris CA, et al. (2003) A genome-wide scan in type 2 diabetes mellitus provides independent replication of a susceptibility locus on 10p11 and suggests the existence of novel loci on 2q12 and 19q13. *Clin Endocrinol Metab* 88: 2223–2230.
- Lam LT, Pham YC, Man NT, Morris GE (2000) Characterization of a monoclonal antibody panel shows that the myotonic dystrophy protein kinase, DMPK, is expressed almost exclusively in muscle and heart. *Hum Mol Genet* 9: 2167–2173.
- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, et al. (2000) Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* 8: 924–928.

20. Ridley AJ (2001) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* 2: 303–310.
21. Furukawa N, Ongusaha P, Jahng WJ, Araki K, Choi CS, et al. (2005) Role of Rho-kinase in regulation of insulin action and glucose homeostasis. *Cell Metab* 2: 119–129.
22. Bush EW, Helmke SM, Birnbaum RA, Perryman MB (2000) Myotonic dystrophy protein kinase domains mediate localization, oligomerization, novel catalytic activity, and autoinhibition. *Biochemistry* 39: 8480–8490.
23. Shimizu M, Wang W, Walch ET, Dunne PW, Epstein HF (2000) Rac-1 and Raf-1 kinases, components of distinct signaling pathways, activate myotonic dystrophy protein kinase. *FEBS Lett* 475: 273–277.
24. Woodman SE, Sotgia F, Galbiati F, Minetti C, Lisanti MP (2004) Caveolinopathies: mutations in caveolin-3 cause four distinct autosomal dominant muscle diseases. *Neurology* 62: 538–543.
25. Fecchi K, Volonte D, Hezel MP, Schmeck K, Galbiati F (2006) Spatial and temporal regulation of GLUT4 translocation by flotillin-1 and caveolin-3 in skeletal muscle cells. *FASEB J* 20: 705–707.
26. Jin S, Shimizu M, Balasubramanyam A, Epstein HF (2000) Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) induces actin cytoskeletal reorganization and apoptotic-like blebbing in lens cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 45: 133–148.
27. Foti M, Porcheron G, Fournier M, Maeder C, Carpentier JL (2007) The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1242–1247.
28. Kaliman P, Catalucci D, Lam JT, Kondo R, Gutierrez JC, et al. (2005) Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280: 8016–8021.
29. Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L (1996) The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol* 16: 5313–5327.
30. Accili D, Frapier C, Mosthaf L, McKeon C, Elbein SC, et al. (1989) A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-resistant diabetes. *EMBO J* 8: 2509–2517.
31. Knutson VP (1991) Cellular trafficking and processing of the insulin receptor. *FASEB J* 5: 2130–2138.
32. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, et al. (1998) A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2: 559–569.
33. Fernandez AM, Kim JK, Yakar S, Dupont J, Hernandez-Sanchez C, et al. (2001) Functional inactivation of the IGF-I and insulin receptors in skeletal muscle causes type 2 diabetes. *Genes Dev* 15: 1926–1934.
34. Egea G, Lazaro-Dieguez F, Vilella M (2006) Actin dynamics at the Golgi complex in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 18: 168–178.
35. Kondo RP, Dederko DA, Teutsch C, Chrast J, Catalucci D, et al. (2006) Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart : a role for repolarization waveform. *J Physiol* 571: 131–146.
36. Morin N, Visentin V, Galise D, Marti L, Zorzano A, et al. (2002) Tyramine stimulates glucose uptake in insulin-sensitive tissues in vitro and in vivo via its oxidation by amine oxidases. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 1238–1247.
37. Fuller W, Eaton P, Medina RA, Bell J, Shattock MJ (2001) Differential centrifugation separates cardiac sarcolemmal and endosomal membranes from Langendorff-perfused rat hearts. *Anal Biochem* 293: 216–223.
38. Ciaraldi TP, Carter L, Seipke G, Mudaliar S, Henry RR (2001) Effects of the long-acting insulin analog insulin glargine on cultured human skeletal muscle cells: comparisons to insulin and IGF-I. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5838–5847.
39. Issad T, Boute N, Boubekeur S, Lacasa D (2005) Interaction of PTPB with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 87: 111–116.
40. Buckley DA, Loughran G, Murphy G, Fennelly C, O'Connor R (2002) Identification of an IGF-1R kinase regulatory phosphatase using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and a GFP tagged IGF-1R in mammalian cells. *Mol Pathol* 55: 46–54.



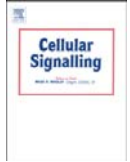
---

Artículo 3

**High-fat diet induced adiposity and insulin resistance in mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase.**

Llagostera E, Carmona MC, Vicente M, Escorihuela RM, Kaliman P. FEBS Lett. 2009 Jun 18;583(12):2121-5. Epub 2009 May 29.





## Review

## Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1

Perla Kaliman <sup>a,\*</sup>, Esther Llagostera <sup>b</sup><sup>a</sup> Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)-Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Spain<sup>b</sup> Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 April 2008

Accepted 12 May 2008

Available online 18 May 2008

## Keywords:

Myotonic dystrophy

DMPK

Neuromuscular disease

## ABSTRACT

Myotonic dystrophy 1 (DM1) is an autosomal, dominant inherited, neuromuscular disorder. The DM1 mutation consists in the expansion of an unstable CTG-repeat in the 3'-untranslated region of a gene encoding DMPK (myotonic dystrophy protein kinase). Clinical expression of DM1 is variable, presenting a progressive muscular dystrophy that affects distal muscles more than proximal and is associated with the inability to relax muscles appropriately (myotonia), cataracts, cardiac arrhythmia, testicular atrophy and insulin resistance. DMPK is a Ser/Thr protein kinase homologous to the p21-activated kinases MRCK and ROCK/rho-kinase/ROK. The most abundant isoform of DMPK is an 80 kDa protein mainly expressed in smooth, skeletal and cardiac muscles. Decreased DMPK protein levels may contribute to the pathology of DM1, as revealed by gene target studies. Here we review current understanding of the structural, functional and pathophysiological characteristics of DMPK.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Contents

1.	Introduction . . . . .	1935
1.1.	DMPK expression and localization . . . . .	1936
1.2.	DMPK structure and activity . . . . .	1936
2.	DMPK targets . . . . .	1936
2.1.	CUG-binding protein . . . . .	1937
2.2.	Phospholemman . . . . .	1937
2.3.	Myosin phosphatase target subunit . . . . .	1937
2.4.	Phospholamban . . . . .	1937
3.	DMPK function . . . . .	1937
3.1.	Skeletal muscle integrity . . . . .	1937
3.2.	Cardiac muscle atrioventricular conduction . . . . .	1937
3.3.	Ion-channel gating . . . . .	1937
3.4.	Cell metabolism . . . . .	1939
4.	A molecular mechanism for DMPK: cytoskeleton reorganization and intracellular trafficking . . . . .	1939
5.	Myotonic dystrophy 1: three mechanisms and a missing connection? . . . . .	1940
	Acknowledgment . . . . .	1940
	References . . . . .	1940

## 1. Introduction

Myotonic dystrophy (DM) is an autosomal, dominant inherited, neuromuscular disorder that was first described by Steinert in 1909

[1]. In 1992, the DM1 mutation was identified as the expansion of an unstable CTG-repeat in the 3'-untranslated region of a gene encoding DMPK (myotonic dystrophy protein kinase) [2–4]. Mild clinical symptoms of myotonic dystrophy appear in subjects carrying a DMPK allele of at least 50 repeats, and severely affected patients carry expansions of several thousand repeats [5]. Clinical expression of DM is extremely variable, presenting a progressive muscular

\* Corresponding author.

E-mail address: [pkaliman@clinic.ub.es](mailto:pkaliman@clinic.ub.es) (P. Kaliman).

dystrophy that affects distal muscles more than proximal and is associated with the inability to relax muscles appropriately (myotonia), cataracts, cardiac arrhythmia, testicular atrophy and insulin resistance [6,7]. The prevalence of DM1 in most populations is approximately 1:8000 and DM families are highly affected by the phenomenon of anticipation, as a result of which the disease has an earlier onset and a more severe course in subsequent generations [8].

Studies in mice have suggested that several mechanisms may be simultaneously contributing to generate the wide spectrum of symptoms observed in DM1. For example, (i) *dmpk*-knockout mice develop mild myopathy and cardiac abnormalities [9–11], (ii) knockout mice for *Six5* – the DMPK 5'-flanking gene – present cataracts [12,13] and (iii) mice expressing mRNA with CUG repeats manifest clinical myotonia and histological features of DM1 [14–17]. In the first model, it is proposed that the repeat expansion affects the level of DMPK expression *in cis* by altering its transcription or by retaining DMPK transcripts in the cell nucleus as a result of which they cannot be transported to the cytoplasm. This results in a decrease in the amount of DMPK protein, or haploinsufficiency. In the second model, the DNA structure of expanded repeats most likely produces changes in chromatin configuration which affect the expression of adjacent genes *Six5* (homologue of *Drosophila* sine oculis homeobox 5) and *DMWD* (dystrophia myotonica-containing WD repeat motif). Finally, the DM1 mutation could act at the RNA level in a transdominant gain-of-function manner. The expanded CUG-containing transcripts sequester specific RNA-binding proteins into nuclear foci, leading to abnormal RNA splicing of several genes.

Here we review current understanding of the structural, functional and pathophysiological characteristics of DMPK. For description of other molecular mechanisms proposed for DM1 pathogenesis, and other unstable repeat expansion diseases such as Myotonic Dystrophy 2 (DM2), we refer the reader to earlier reviews [7,18,19].

### 1.1. DMPK expression and localization

Initial efforts to understand the relationship between DM pathology and the expanded trinucleotide repeats in DMPK gene included the analysis of DMPK mRNA levels in tissues from patients. Most of these studies found that the DM1 mutation resulted in a decrease in total DMPK mRNA [20–25]. In accordance with mRNA data, it was found that DM subjects presented low abundance of DMPK protein in heart and skeletal muscle [26]. In skeletal muscles from DM1 patients, DMPK concentration was found to be decreased to about 50% and the protein decrease did not seem correlated with the CTG repeat length [27]. These studies suggested that haplotype insufficiency was a potential mechanism for disease expression, with greatly reduced DMPK expression from the mutant allele and normal expression from the unaffected allele.

Regarding the DMPK tissue expression pattern, *in situ* hybridization analysis showed that DMPK mRNA is expressed in a range of adult mouse tissues including skeletal muscle, heart, smooth muscle, bone, testis, pituitary, brain, eye, skin, thymus, lung, intestinal epithelium, cartilage and liver. DMPK mRNA was not detected in the ovary, pancreas or kidney [28]. In the developing mouse embryo, DMPK mRNA is primarily detected in all major muscles in the skeletal structures, cardiac muscle, diaphragm, and smooth muscle of the lung and gut [29].

### 1.2. DMPK structure and activity

The phylogenetic tree that contains DMPK also includes ROCKs (also known as Rho kinases) which were initially described to mediate the formation of RhoA-induced stress fibres and focal adhesions through their effects on the phosphorylation of myosin light chain (MLC) [30,31]. Other kinases homologous to DMPK are the cell division control protein 42 (Cdc42)-binding kinases (MRCK) and citron kinase [30]. In general, these kinases consist of an amino-terminal kinase domain that is followed by a potential coiled-coil-forming region and other functional motifs at the carboxyl terminus.

By prediction from gene structure data and by direct mRNA expression studies, it was shown that multiple DMPK isoforms could arise in both humans and mice as a result of alternative splicing. Groenen et al. [32] showed that six major DMPK mRNA isoforms, conserved in humans and mice, are produced by a combination of three alternative splice events. All isoforms share an N-terminal domain, a kinase domain and a coiled coil region, while alternative splicing determines presence or absence of a 5-amino-acid VSGGG motif and the nature of the C-terminus. Wansink et al. [33] showed that the internal VSGGG motif appears to modulate DMPK autophosphorylation activity while the nature of the alternate C-terminus of DMPK could define substrate specificity, as well as intracellular localization. Recombinant DMPK isoforms with a hydrophobic C terminus target to the endoplasmic reticulum (ER), while isoforms with a more hydrophilic C terminus bind to the mitochondrial outer membrane. Proteins with a very short C-terminal tail adopt a cytosolic location. Four C-termini have been described among DMPK isoforms. A very short 2 aminoacid-long tail was found in the smooth-muscle-specific short isoforms. The long isoforms, specific for skeletal muscle, heart and brain have either hydrophobic or relatively hydrophilic tails. A minor human-specific DMPK isoform (DMPK G) carries a fourth type of tail [33]. Comparison between the subcellular localization of individual DMPK isoforms of mice and humans indicated that orthologous splice isoforms of humans and mice behave differently [34]. Analyses of skeletal muscle biopsies using an antibody directed to the DMPK C-terminal domain found two forms of the kinase, DMPK-1 and DMPK-2. The larger DMPK-1 form was assumed to be the primary translation product from which a smaller DMPK-2 form was generated by proteolysis near the carboxy terminus [35]. Maeda et al. showed that an antibody directed to the DMPK C-terminal domain detected endogenous cardiac DMPK as two immunoreactive isoforms with apparent molecular sizes of 71 and 80 kDa and localized DMPK to neuromuscular junctions in skeletal muscle and intercalated discs in heart and Purkinje fibers [26]. Taking into account the variety of DMPK isoforms described, it is intriguing that using a panel of 16 monoclonal antibodies against several different DMPK epitopes, Lam et al [36] detected DMPK as a single protein of approximately 80 kDa, only in skeletal muscle, cardiac muscle and, to a lesser extent, smooth muscle.

Functionally, the Ser/Thr kinase activity of DMPK has been probed by *in vitro* assays using a wide spectrum of synthetic peptides and putative physiological substrates [33,35,37,38]. The predicted ATP-binding site (Lys100) was corroborated by lysine-to-alanine mutation, which generated kinase deficient forms of DMPK [33,39]. The C-terminal domain appears to play an autoinhibitory role, as the activity of a carboxy-terminally truncated DMPK is increased approximately 3-fold for MBP [35] or 10-fold for MYPT1 [33]. This inhibitory activity of the full-length kinase was mapped to what appears to be a pseudosubstrate auto-inhibitory domain at the extreme carboxy terminus of DMPK which has also been implicated in oligomerization (residues 550–629) [35]. Interestingly, the carboxy-terminal domain of the homologous Rho-kinases also constitute an autoinhibitory region that reduces their kinase activity [40].

### 2. DMPK targets

DMPK prefers peptide substrates with an arginine residue upstream of the phosphoacceptor site (serine or threonine), followed by a hydrophobic residue (leucine or valine), followed by another arginine [35]. This consensus motif – R x x S/T L/V R – is similar to that of PKC in preferring upstream and downstream basic residues and, also similar to that of CaMK II and phosphorylase kinase in preferring a downstream hydrophobic residue. Thus, the DMPK phosphorylation motif appears to be overlapping yet distinct from previously described classes of kinases. The screening of a library of about 35 synthetic peptides showed that the optimal DMPK substrate sequences should consist of three to four arginine (or lysine) residues at distinct positions N-terminal to the phosphoacceptor [33]. Both studies coincide in identifying a minimal DMPK substrate consensus motif with a



positively charged aminoacid at the  $-2$  position and a hydrophobic residue at the  $+1$  position from the Ser/Thr phosphoacceptor.

### 2.1. CUG-binding protein

Proteins that specifically bind to triplet repeats in DNA and others that bind to triplet repeats in RNA have been described [41,42]. One of these RNA CUG-binding proteins, CUG-BP/hNab50, binds specifically to RNA (CUG)<sub>8</sub> repeats [41], the triplet repeat found in the DMPK mRNA, responsible for DM1. Interestingly, the phosphorylation status and intracellular distribution of this RNA CUG-binding protein are altered in a homozygous DM1 patient and in DMPK knockout mice; moreover, CUG-BP/hNab50 is a substrate for DMPK both *in vivo* and *in vitro* [43]. Based on these observations, a model of an autoregulatory loop in which expanded CUG repeats sequester CUG-BP and reduce DMPK protein expression has been proposed. In this model, decreased DMPK levels lead to an increase of hypophosphorylated CUG-BP, which accumulates in nuclei of DM patients and alters the global processing of mRNAs. CUG-BP expression was found to be increased in DM1 skeletal muscle [44] and heart [45] and it has been implicated in abnormal alternative splicing of insulin receptor and cardiac troponin T pre-mRNAs.

### 2.2. Phospholemman

Phospholemman (PLM), is a major membrane substrate for phosphorylation by protein kinases A and C, which induces Cl currents when expressed in *Xenopus* oocytes [46]. PLM is a good substrate for a C-terminal truncated form of DMPK *in vitro* and co-expression of DMPK with PLM in oocytes reduced both Cl currents and expression of PLM in oocyte membranes [46]. The confirmation of this mechanism *in vivo* could shed light on one of the cardinal features of DM which is myotonia. Indeed, electrophysiological studies have evidenced reduced muscle chloride conductance and membrane depolarization in myotonia [47]. In addition, genetic studies have demonstrated mutations in the skeletal muscle chloride channel gene CLCN1 in myotonia congenita patients [48]. It would be interesting to determine the phosphorylation status and intracellular localization of PLM in the transgenic mice overexpressing DMPK (Tg26-hDMPK), which show reduced ClC-1 chloride channel expression in the sarcolemma of skeletal muscles [49].

### 2.3. Myosin phosphatase target subunit

DMPK phosphorylates the C-terminal domain of myosin phosphatase target subunit (MYPT1) *in vitro*, in a similar way to Rho-kinase, and this phosphorylation inhibits the phosphatase activity of MYPT1 [50,51]. A consequence of myosin phosphatase inhibition is to increase the level of myosin light chain phosphorylation, which leads to Ca<sup>2+</sup> sensitization in smooth muscle [52] and cytoskeletal rearrangements (increase in stress fibers and focal adhesions) in non-muscle cells [53]. Further studies on MYPT1 phosphorylation status and activity in DMPK knockout and DMPK overexpressing mice may help us to understand the role of DMPK in cytoskeletal reorganization (discussed below).

### 2.4. Phospholamban

Electrophysiological studies in cardiac muscles from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice suggest that DMPK is critical to the modulation of cardiac contractility and the maintenance of proper cardiac conduction activity [10,11]. Under physiological conditions, PLN phosphorylation at serine 16 by PKA leads to proportional increases in the rate of Ca<sup>2+</sup> uptake into sarcoplasmic reticulum (SR) and accelerates ventricular relaxation [54]. Phospholamban (PLN) was reported to be hyperphosphorylated in cardiac homogenates obtained from *dmpk*<sup>-/-</sup> [55]. However, we found that serine 16 PLN is under-phosphorylated in SR vesicles from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice and that this correlates with highly reduced SR Ca<sup>2+</sup> uptake in *dmpk*<sup>-/-</sup> ventricular homogenates [29]. Recent data from our lab indicate that even if DMPK

phosphorylates PLN *in vitro*, its role in the modulation of ventricular function might be indirect through regulation of  $\beta$ -adrenergic receptor density at the plasma membrane, which in turn may influence PKA activation and PLN phosphorylation (Llagostera et al., unpublished data).

## 3. DMPK function

### 3.1. Skeletal muscle integrity

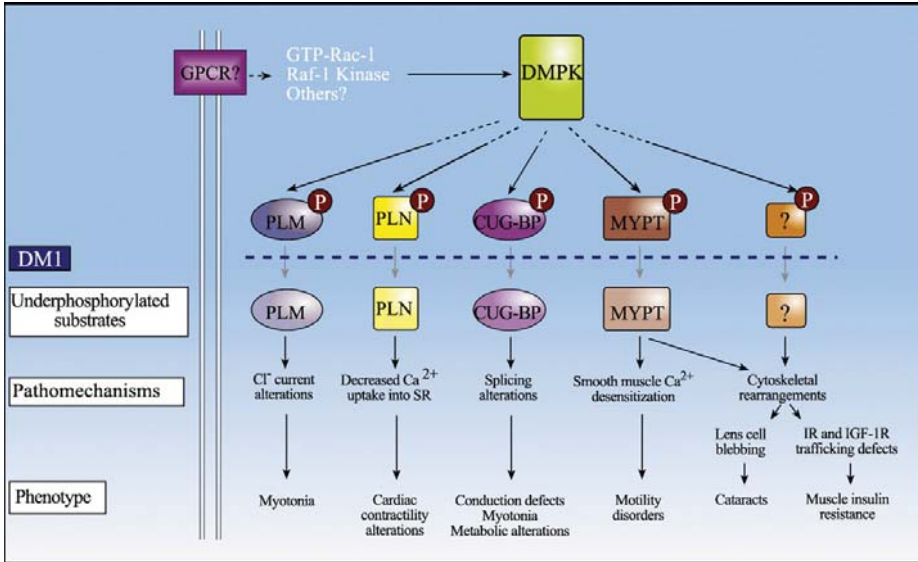
DMPK is mainly expressed in skeletal and cardiac muscles [36]. In skeletal muscle, DMPK gene contains a low level promoter that operates in conjunction with an enhancer element in the first intron with conserved MyoD-responsive E-boxes [56]. In L6E9 and C2C12 muscle cells, DMPK expression is upregulated through a canonical myogenic pathway (i.e. phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor- $\kappa$ B, nitric oxide synthase, and p38 mitogen-activated protein kinase), supporting the notion of a functional implication of DMPK in the generation and/or maintenance of the skeletal muscle [57,58]. The role of DMPK in myogenesis is one of the most widely studied functional aspects of this kinase, because of the muscular atrophy observed in DM1 patients. Mice lacking DMPK develop an adult-onset progressive myopathy though the muscular phenotype of these mice is milder than that observed in DM1 patients [9,10]. A transgenic murine line, named Tg26-hDMPK, carrying approximately 25 extra copies of the fully intact hDMPK, bearing a (CTG)<sub>11</sub> repeat tract with normal tissue distribution, recapitulated various muscle traits of myotonic dystrophy in 11–15-month-old mice [49]. In these mice, the overproduction of wild-type (WT) hDMPK protein and/or its mRNA was coupled to cytoarchitectural derangements and distortion of ionic homeostasis in heart, skeletal muscle and smooth muscle cells. These animals showed disruption of normal skeletal muscle function, indicated *in vivo* by walking difficulty, atrophy of type I fibers with moderate hypertrophy of type II fibers, mitochondria accumulation in the subsarcolemmal space and between myofibrils and increase in the number of fibers with central nuclei. Similarly, DMPK overexpression in mouse myogenic C2C12 cell line inhibits terminal differentiation [59]. Taken together, these data suggest that DMPK protein dosage is relevant for skeletal muscle proper structure and function.

### 3.2. Cardiac muscle atrioventricular conduction

Cardiovascular disease is one of the most prevalent causes of death in DM patients. Cardiac mortality occurs because of progressive left ventricular dysfunction, ischemic heart disease, pulmonary embolism, or unexpected sudden death [60]. Electrophysiological studies in skeletal and cardiac muscles from DM patients and from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice showed defects in intracellular Ca<sup>2+</sup> cycling [55,61–63]. *Dmpk*<sup>-/-</sup> mice display a cardiac phenotype that reproduces many cardiac conduction defects observed in DM patients, including first-, second-, and third-degree atrioventricular block [11,64,65]. A cardiac phenotype is also observed in heterozygous *dmpk*<sup>+/-</sup> mice, which develop first-degree heart block, a conduction defect strikingly similar to that observed in DM patients [11]. In *dmpk*<sup>-/-</sup> mice, a decrease in cardiomyocyte SR Ca<sup>2+</sup> uptake is detectable at 14 weeks of age, which is much earlier than the first signs of muscle weakness [7–10 months], thus suggesting that Ca<sup>2+</sup> cycling alterations are primary to cardiac dysfunction [9,29].

### 3.3. Ion-channel gating

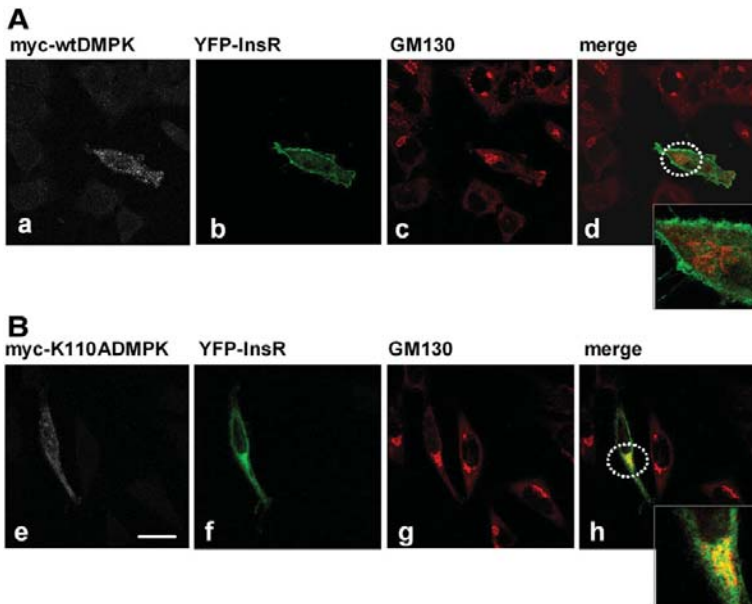
The biological role of DMPK in cellular ion homeostasis, has been studied by several groups in skeletal and cardiac muscles. Benders et al. [61], showed that *in vitro*-differentiated myotubes from *dmpk*<sup>-/-</sup> mice exhibit a higher resting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> than wild-type myotubes because of an altered open probability of voltage-dependent L-type Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> channels. The mutant myotubes exhibit smaller and slower Ca<sup>2+</sup> responses upon triggering by acetylcholine or high external K<sup>+</sup>.



**Fig. 1.** Hypothetical model for the pathophysiological role of DMPK in DM1. DMPK kinase activity is induced by binding to activated GTPase Rac-1 and Ras-activated Raf-1. The membrane receptors involved in these pathways are unknown. Phosphorylation targets described for DMPK are correlated to various physiological alterations found in DMPK transgenic mice, DMPK-overexpressing systems and/or the human disease. PLM, phospholemman; CUG-BP, CUG-Binding Protein; MYPT1, Myosin Phosphatase-1; MP, Myosin Phosphatase; PLN, Phospholamban; GPCR, G-Protein Coupled Receptor. IR, insulin receptor; IGF-1R, insulin-like growth factor-1 receptor.

Enhanced basal contractility has also been associated with increase in intracellular calcium in single *dmpk*<sup>-/-</sup> cardiomyocytes [55]. Additional studies on *dmpk*<sup>-/-</sup> mice showed abnormal skeletal and cardiac muscle Na<sup>+</sup> channel gating, indicating that DMPK deficiency may be associated

with silencing of muscle Na<sup>+</sup> channels [66,67]. Transgenic mice overexpressing DMPK (Tg26-hDMPK) show reduced CIC-1 chloride channel expression in the sarcolemma of skeletal muscles along with myofiber ultrastructure abnormalities [49]. However, the molecular



**Fig. 2.** Involvement of DMPK in insulin receptor trafficking: effect of kinase-deficient mutant DMPK on YFP-InsR subcellular distribution. HeLa cells were transiently co-transfected with YFP-InsR along with myc-WTDMPK (upper panels) or myc-K110ADMPK (lower panels). Cellular distribution of YFP-InsR partially coincides with that of Golgi complex protein GM130 in cells expressing mutant DMPK (panel h). Dashed circles in b and f show the magnified areas. Scale bar, 24 μm. YFP-InsR, yellow fluorescent protein-insulin receptor; myc-WTDMPK, myc-tagged wild type DMPK; myc-K110ADMPK myc-tagged kinase deficient mutant DMPK; YFP-InsR, yellow fluorescent protein-insulin receptor. (Reproduced from reference 69, doi:10.1371/journal.pone.0001134.g006).

mechanisms by which DMPK modulates muscle ion homeostasis remain to be identified.

### 3.4. Cell metabolism

DMPK is highly expressed in muscle, which is a key target tissue for insulin-dependent regulation of glucose metabolism [68]. We have recently shown that *dmpk*<sup>-/-</sup> mice exhibit decreased insulin sensitivity in cardiac and skeletal muscles but normal insulin signaling in adipose tissue and liver, in which DMPK is not detected [69]. *Dmpk*<sup>-/-</sup> mice show impaired insulin-induced glucose uptake and GLUT4 translocation in muscle. Metabolic alteration in *dmpk*<sup>-/-</sup> mice is reflected in glucose intolerance and increased circulating insulin and lipid levels in fed mice. As observed in DM1 patients [70], *dmpk*<sup>-/-</sup> mice show higher concentrations of plasma insulin than wild-type mice in glucose tolerance tests [69].

## 4. A molecular mechanism for DMPK: cytoskeleton reorganization and intracellular trafficking

A compelling view of the current data on modulation of DMPK activity, DMPK substrates and the phenotype observed in DM1 patients, DM1 transgenic mouse models and/or cell systems can be summarised in a hypothetical model (Fig. 1).

Mechanistically, the close relationship of DMPK to the Rho-kinases has led to speculation as to whether DMPK activity is regulated *in vivo* by small G proteins, particularly of the Rho family. Although DMPK

lacks obvious binding sites for known G proteins, DMPK isolated from cells exposed to GTP- $\gamma$ -S exhibits approximately twice the activity of DMPK isolated from untreated cells. This observation was consistent with a G protein regulatory mechanism, but whether this regulation occurs via direct binding of a G protein (as with the Rho-kinases) or indirectly (possibly via intermediate kinases) remains to be determined [35]. Shimizu et al [71] showed that the actin cytoskeleton-linked GTPase Rac-1 binds to DMPK, and coexpression of Rac-1 and DMPK activates its transphosphorylation activity in a GTP-sensitive manner. They also found that DMPK binds Raf-1 kinase, the Ras-activated molecule of the MAP kinase pathway and that purified Raf-1 kinase phosphorylates and activates DMPK.

In this context, we have recently shown that the kinase and C-terminal domains in DMPK are positive and negative regulators, respectively, of cytoskeleton reorganization in HeLa cells [69]. Similar functions were previously found for DMPK in lens cells [39] and for homologous domains in Rho kinase  $\alpha$  [31]. The Rho/Rho kinase pathway is involved in regulating actin/myosin interactions, the formation of stress fibers, and the degree of polymerization of tubulin which are processes involved in trafficking membrane proteins between the endoplasmic reticulum/Golgi and the plasma membrane [72–74]. DMPK can also mediate the translocation of transmembrane receptors to the plasma membrane. Indeed, both kinase and C-terminal domain mutants of DMPK alter insulin and IGF-1 receptor targeting to the plasma membrane [69]. We detected that the overexpression of DMPK kinase-deficient mutant causes insulin receptor intracellular accumulation in the Golgi matrix (Fig. 2, reproduced from [69]). From these observations,

**Table 1**  
Pathophysiology of animal models for DM1

Phenotype	Pathomechanism	Model	Observations	References
Myopathy	DMPK dosage	<i>dmpk</i> <sup>-/-</sup> mice	Late-onset, progressive skeletal myopathy (fiber degeneration and fibrosis)	[9]
		Transgenic murine line overexpressing hDMPK gene (Tg26-hDMPK)	Size changes in head and neck muscle fibres at older age.	[10]
		Transgenic mice with expanded hDMPK 3'-UTR	Deficient exercise endurance, myotonic discharges, fiber degeneration	[49]
	RNA toxicity	Inducible and skeletal muscle-specific expression of expanded CTGs	Inhibition of myogenesis	[81]
		Disruption of the mouse <i>Mbn1</i> gene.	Severe muscle wasting.	[82]
	Six5 deficiency	Mutant analysis of Six5 homologue in <i>Drosophila</i> .	Myotonia at 6 weeks of age.	[80]
			Abnormal development of muscle.	[83]
Cardiac defects	DMPK dosage	<i>dmpk</i> <sup>-/-</sup> mice	Hypertrophic cardiomyopathy and enhanced neonatal mortality.	[10]
		Transgenic murine line overexpressing hDMPK gene (Tg26-hDMPK)	First-, second-, and third-degree atrioventricular (A–V) block.	[11,64]
		Transgenic mice expressing the DMPK 3' UTR	Significantly prolonged PR and HV intervals.	[65]
	RNA toxicity	<i>Six5</i> <sup>-/-</sup> mice	Enhanced basal contractility	[55]
			Impaired Ca <sup>2+</sup> uptake in SR, PLN is hypo-phosphorylated.	[29]
	Six5 deficiency		Cardiomyopathic remodeling	[49]
Insulin Resistance	DMPK dosage	<i>dmpk</i> <sup>-/-</sup> mice	Muscle insulin resistance, abnormal glucose tolerance.	[69]
		siRNA for MBNL1 and MBNL2. Overexpression of CUG-BP	Abnormal insulin receptor (IR) splicing.	[78]
		Mice with human genomic DM1 region with expanded (>350 CTG) repeats.	Abnormal regulation of IR mRNA splicing in all the tissues investigated.	[79]
		<i>Six5</i> <sup>-/-</sup> mice	Non-determined	
Ocular alterations	DMPK dosage	Overexpression of DMPK in cultured lens epithelial cells.	Apoptotic-like blebbing of the plasma membrane and reorganization of the actin cytoskeleton.	[39]
		Disruption of the mouse <i>Mbn1</i> gene.	Ocular cataracts.	[80]
		<i>Six5</i> <sup>-/-</sup> mice	Homozygous mutant mice developed lenticular opacities.	[12]
		<i>Six5</i> <sup>-/-</sup> mice	Cataracts. Rate and severity inversely related to Six5 dosage.	[13]
Ion channel gating	DMPK dosage	<i>dmpk</i> <sup>-/-</sup> mice	Altered intracellular calcium concentration	[61]
		Transgenic murine line overexpressing hDMPK gene (Tg26-hDMPK)	Na <sup>+</sup> gating abnormality	[66]
		Transgenic mice expressing the DMPK 3' UTR	Non-inactivating Na <sup>+</sup> current	[67]
		HSA <sup>18</sup> transgenic mice (human skeletal actin mRNA with 250 CUG repeats inserted in the 3'UTR)	Myocardial intracellular calcium overload	[49]
	RNA toxicity	<i>Six5</i> <sup>-/-</sup> mice	Reduced ClC-1 chloride channels in skeletal muscle sarcolemma	[77]
			Loss of ClC-1 protein from the muscle surface membrane	[14]
	Six5 deficiency	<i>Six5</i> <sup>-/-</sup> mice	Normal Na <sup>+</sup> channel gating	[84]

a role for DMPK in the biogenesis of Golgi-derived transport carriers through regulation of actin cytoskeleton dynamics can be speculated. Understanding the functional interactions of DMPK with the microtubular network and small G proteins, and the mechanisms through which DMPK regulates intracellular trafficking processes, may clarify the pathophysiological role of DMPK. Indeed, a scenario in which DMPK regulates the membrane targeting of a variety of transmembrane proteins could explain its pleiotropic functions, i.e. skeletal muscle differentiation and function, cardiac muscle contractility, ion channel gating and cell metabolism.

### 5. Myotonic dystrophy 1: three mechanisms and a missing connection?

Three different models have been proposed to understand the precise mechanisms that link the nucleotide expansion with the clinical manifestation of DM1: haploinsufficiency of DMPK, altered expression of neighboring genes, and RNA toxicity. However, a compiliatory analysis of studies on different DM1 models (Table 1) reveals a complex picture in which these three separate mechanisms appear to contribute simultaneously to the onset of each particular DM1 clinical feature: (i) Mice lacking DMPK present late-onset myopathy [9,10] and DMPK-over-expressing mice show skeletal muscle fiber degeneration [49]. Transgenic mice expressing the human DMPK 3'-UTR also exhibit inhibition of myogenesis [81,82] and a muscleblind knockout model presents muscle abnormalities [80]. Myotonia and muscle contractile properties were not found in mice with *Six5* deficiency [75] but the *Drosophila* homolog of *Six5* is required for muscle development [83]; (ii) Experimental evidence shows that cardiac conduction defects are independently associated with DMPK dosage [10,11,29,49], with under-expression of *Six5* (one of the *dmpk* flanking-genes) [75,76], and with RNA toxicity [77]; (iii) Insulin resistance onset in DM1 patients has been associated with aberrant splicing of the insulin receptor due to RNA toxic effects possibly acting through MBNL1 [78,79] and with reduced expression of DMPK [69]; (iv) Ocular cataracts, eye degeneration or apoptotic-like blebbing in lens cells have been attributed to loss of *Six5* in mice [12,13], to toxic gain of function of the expanded RNA [80] and to overexpression of DMPK inactive mutant [39], respectively; (v) Ion-channel gating defects in cardiac and/or skeletal muscles have also been independently associated with DMPK dosage [49,66,67], RNA toxicity [77] and muscleblind-like 1 knockout mice [80]. It is tempting to speculate that these apparently independent pathomechanisms might in fact converge upon functional links between DMPK activity, RNA toxicity and *Six5* gene product. Further research is required to clarify these paradigmatic observations.

### Acknowledgment

This project was supported by SAF2007-63353 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

### References

- [1] H. Steinert, Dtsch. Z. Nervenheilkd. (1909) 58.
- [2] J.D. Brook, M.E. McCurrach, H.G. Harley, A.J. Buckler, D. Church, H. Aburatani, K. Hunter, V.P. Stanton, J.P. Thirion, T. Hudson, et al., Cell 68 (1992) 799.
- [3] M. Mahadevan, C. Tsilifidis, L. Sabourin, G. Shuttler, C. Amemiya, G. Jansen, C. Neville, M. Narang, J. Barcelo, K. O'Hoy, et al., Science 255 (1992) 1253.
- [4] Y.H. Fu, A. Pizzuti, R.G. Fenwick Jr., J. King, S. Rajnarayan, P.W. Dunne, J. Dubel, G.A. Nasser, T. Ashizawa, P. de Jong, et al., Science 255 (1992) 1256.
- [5] J. Davies, H. Yamagata, P. Shelbourne, J. Buxton, T. Ogihara, P. Nokelainen, M. Nakagawa, R. Williamson, K. Johnson, T. Miki, J. Med. Genet. 29 (1992) 766.
- [6] P.S. Harper, Myotonic Dystrophy, third ed. WB Saunders, London, 2001.
- [7] L. Machuca-Tzili, D. Brook, D. Hilton-Jones, Muscle Nerve 32 (2005) 1.
- [8] H.G. Harley, S.A. Rundle, W. Reardon, J. Myring, S. Crow, J.D. Brook, P.S. Harper, D.J. Shaw, Lancet 339 (1992) 1125.
- [9] S. Reddy, D.B. Smith, M.M. Rich, J.M. Leferovich, P. Reilly, B.M. Davis, K. Tran, H. Rayburn, R. Bronson, D. Cross, R.J. Balice-Gordon, D. Housman, Nat. Genet. 13 (1996) 325.
- [10] G. Jansen, P.J. Groenen, D. Bachner, P.H. Jap, M. Coerwinkel, F. Oerlemans, W. van den Broek, B. Gohlsch, D. Pette, J.J. Plomp, P.C. Molenaar, M.G. Nederhoff, C.J. van Echteld, M. Dekker, A. Berns, H. Hameister, B. Wieringa, Nat. Genet. 13 (1996) 316.
- [11] C.I. Berul, C.T. Maguire, M.J. Aronovitz, J. Greenwood, C. Miller, J. Gehrmann, D. Housman, M.E. Mendelsohn, S. Reddy, J. Clin. Invest. 103 (1999) R1.
- [12] T.R. Klesert, D.H. Cho, J.I. Clark, J. Maylie, J. Adelman, L. Snider, E.C. Yuen, P. Soriano, S.J. Tapscott, Nat. Genet. 25 (2000) 105.
- [13] P.S. Sarkar, B. Appukuttan, J. Han, Y. Ito, C. Ai, W. Tsai, Y. Chai, J.T. Stout, S. Reddy, Nat. Genet. 25 (2000) 110.
- [14] A. Mankodi, M.P. Takahashi, H. Jiang, C.L. Beck, W.J. Bowers, R.T. Moxley, S.C. Cannon, C.A. Thornton, Mol. Cell. 10 (2002) 35.
- [15] A. Mankodi, E. Logigian, L. Callahan, C. McClain, R. White, D. Henderson, M. Krym, C.A. Thornton, Science 289 (2000) 1769.
- [16] H. Seznec, A.S. Lia-Baldini, C. Duros, C. Fouquet, C. Lacroix, H. Hofmann-Radvanyi, C. Junien, G. Gourdon, Hum. Mol. Genet. 9 (2000) 1185.
- [17] H. Seznec, O. Agbulut, N. Sergeant, C. Savouret, A. Ghestem, N. Tabti, J.C. Willer, L. Ourth, C. Duros, E. Brisson, C. Fouquet, G. Butler-Browne, A. Delacourte, C. Junien, G. Gourdon, Hum. Mol. Genet. 10 (2001) 2717.
- [18] D.H. Cho, S.J. Tapscott, Biochim. Biophys. Acta. 1772 (2007) 195.
- [19] L.P. Ranum, J.W. Day, Am. J. Hum. Genet. 74 (2004) 793.
- [20] P. Carango, J.E. Noble, H.G. Marks, V.L. Funanage, Genomics 18 (1993) 340.
- [21] H. Hofmann-Radvanyi, C. Lavedan, J.P. Rabes, D. Savoy, C. Duros, K. Johnson, C. Junien, Hum. Mol. Genet. 2 (1993) 1263.
- [22] G. Novelli, M. Gennarelli, G. Zelano, A. Pizzuti, C. Fattorini, C.T. Caskey, B. Dallapiccola, Biochem. Mol. Biol. Int. 29 (1993) 291.
- [23] Y.H. Fu, D.L. Friedman, S. Richards, J.A. Peariman, R.A. Gibbs, A. Pizzuti, T. Ashizawa, M.B. Perryman, G. Scarlato, R.G. Fenwick Jr., et al., Science 260 (1993) 235.
- [24] R. Koga, Y. Nakao, Y. Kurano, T. Tsukahara, A. Nakamura, S. Ishiura, I. Nonaka, K. Arahata, Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1994) 577.
- [25] J. Wang, E. Pegoraro, E. Menegazzo, M. Gennarelli, R.C. Hoop, C. Angelini, E.P. Hoffman, Hum. Mol. Genet. 4 (1995) 599.
- [26] M. Maeda, C.S. Taft, E.W. Bush, E. Holder, W.M. Bailey, H. Neville, M.B. Perryman, R.D. Bies, J. Biol. Chem. 270 (1995) 20246.
- [27] S. Salvadori, M. Fanin, C.P. Trevisan, S. Furlan, S. Reddy, J.I. Nagy, C. Angelini, Neurol. Sci. 26 (2005) 235.
- [28] P.S. Sarkar, J. Han, S. Reddy, Neuromuscul. Disord. 14 (2004) 497.
- [29] P. Kaliman, D. Catalucci, J.T. Lam, R. Kondo, J.C. Gutierrez, S. Reddy, M. Palacin, A. Zorzano, K.R. Chien, P. Ruiz-Lozano, J. Biol. Chem. 280 (2005) 8016.
- [30] K. Riento, A.J. Ridley, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 4 (2003) 446.
- [31] T. Leung, X.Q. Chen, E. Manser, L. Lim, Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 5313–5327.
- [32] P.J. Groenen, D.G. Wansink, M. Coerwinkel, W. van den Broek, G. Jansen, B. Wieringa, Hum. Mol. Genet. 9 (2000) 605.
- [33] D.G. Wansink, R. van Herpen, M.M. Coerwinkel-Driessen, P.J. Groenen, B.A. Hemmings, B. Wieringa, Mol. Cell. Biol. 23 (2003) 5489.
- [34] R.E. van Herpen, R.J. Oude Ophuis, M. Wijers, M.B. Bennink, F.A. van de Loo, J. Fransen, B. Wieringa, D.G. Wansink, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 1402.
- [35] E.W. Bush, S.M. Helmke, R.A. Birnbaum, M.B. Perryman, Biochemistry 39 (2000) 8480.
- [36] L.T. Lam, Y.C. Pham, T.M. Nguyen, G.E. Morris, Hum. Mol. Genet. 9 (2000) 2167.
- [37] P.W. Dunne, E.T. Walch, H.F. Epstein, Biochemistry 33 (1994) 10809.
- [38] L. Timchenko, W. Nastainczyk, T. Schneider, B. Patel, F. Hofmann, C.T. Caskey, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (1995) 5366.
- [39] S. Jin, M. Shimizu, A. Balasubramanyam, H.F. Epstein, Cell. Motil. Cytoskeleton. 45 (2000) 133.
- [40] M. Amano, K. Chihara, N. Nakamura, T. Kaneko, Y. Matsuura, K. Kaibuchi, J. Biol. Chem. 274 (1999) 32418.
- [41] L.T. Timchenko, J.W. Miller, N.A. Timchenko, D.R. DeVore, K.V. Datar, L. Lin, R. Roberts, C.T. Caskey, M.S. Swanson, Nucleic Acids Res. 24 (1996) 4407.
- [42] L.T. Timchenko, N.A. Timchenko, C.T. Caskey, R. Roberts, Hum. Mol. Genet. 5 (1996) 115.
- [43] R. Roberts, N.A. Timchenko, J.W. Miller, S. Reddy, C.T. Caskey, M.S. Swanson, L.T. Timchenko, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 (1997) 13221.
- [44] R.S. Savkur, A.V. Philips, T.A. Cooper, Nat. Genet. 29 (2001) 40.
- [45] N.A. Timchenko, Z.J. Cai, A.L. Welm, S. Reddy, T. Ashizawa, L.T. Timchenko, J. Biol. Chem. 276 (2001) 7820–7826.
- [46] J.P. Mounsey, J.E. John 3rd, S.M. Helmke, E.W. Bush, J. Gilbert, A.D. Roses, M.B. Perryman, L.R. Jones, J.R. Moorman, J. Biol. Chem. 275 (2000) 23362.
- [47] R.H. Adrian, S.H. Bryant, J. Physiol. 240 (1974) 505.
- [48] M. Pusch, Hum. Mutat. 19 (2002) 423.
- [49] D.F. O'Coilain, C. Perez-Terzic, S. Reyes, G.C. Kane, A. Behfar, D.M. Hodgson, J.A. Strommen, X.K. Liu, W. van den Broek, D.G. Wansink, B. Wieringa, A. Terzic, Hum. Mol. Genet. 13 (2004) 2505.
- [50] A. Muranyi, R. Zhang, F. Liu, K. Hirano, M. Ito, H.F. Epstein, D.J. Hartshorne, FEBS Lett. 493 (2001) 80.
- [51] K. Kimura, M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, K. Kaibuchi, Science 273 (1996) 245.
- [52] D.J. Hartshorne, M. Ito, F. Erdodi, J. Muscle Res. Cell. Motil. 19 (1998) 325.
- [53] K. Kaibuchi, S. Kuroda, M. Amano, Annu. Rev. Biochem. 68 (1999) 459–486.
- [54] M. Arai, Jpn. Heart J. 41 (2000) 1.
- [55] G.S. Pall, K.J. Johnson, G.L. Smith, Physiol. Genomics. 13 (2003) 139.
- [56] C.J. Storbeck, L.A. Sabourin, J.D. Waring, R.G. Korneluk, J. Biol. Chem. 273 (1998) 9139.
- [57] J. Cancio, P. Ruiz-Lozano, M. Carrasco, M. Palacin, K. Chien, A. Zorzano, P. Kaliman, J. Biol. Chem. 276 (2001) 20228.
- [58] M. Carrasco, J. Cancio, M. Palacin, A. Zorzano, P. Kaliman, Endocrinology 143 (2002) 3017.
- [59] G. Okoli, N. Carey, K.J. Johnson, D.J. Watt, Biochem. Biophys. Res. Commun. 246 (1998) 905.

- [60] G. Pelargonio, A. Dello Russo, T. Sanna, G. De Martino, F. Bellocchi, *Heart* 88 (2002) 665–670.
- [61] A.A. Benders, P.J. Groenen, F.T. Oerlemans, J.H. Veerkamp, B. Wieringa, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1440.
- [62] A.E. Jacobs, A.A. Benders, A. Oosterhof, J.H. Veerkamp, P. van Mier, R.A. Wevers, E.M. Joosten, *Biochim. Biophys. Acta.* 1096 (1990) 14.
- [63] A.A. Benders, R.A. Wevers, J.H. Veerkamp, *Acta. Physiol. Scand.* 156 (1996) 355.
- [64] C.I. Berul, C.T. Maguire, J. Gehrmann, S. Reddy, *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 4 (2000) 351.
- [65] S. Saba, B.A. Vanderbrink, B. Luciano, M.J. Aronovitz, C.I. Berul, S. Reddy, D. Housman, M.E. Mendelsohn, N.A. Estes 3rd, P.J. Wang, *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 10 (1999) 1214.
- [66] J.P. Mounsey, D.J. Mistry, C.W. Ai, S. Reddy, J.R. Moorman, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 2313.
- [67] H.C. Lee, M.K. Patel, D.J. Mistry, Q. Wang, S. Reddy, J.R. Moorman, J.P. Mounsey, *Physiol. Genomics.* 12 (2003) 147.
- [68] A. Zisman, O.D. Peroni, E.D. Abel, M.D. Michael, F. Mauvais-Jarvis, B.B. Lowell, J.F. Wojtaszewski, M.F. Hirshman, A. Virkamaki, L.J. Goodyear, C.R. Kahn, B.B. Kahn, *Nat. Med.* 6 (2000) 924.
- [69] E. Llagostera, D. Catalucci, L. Marti, M. Liesa, M. Camps, T.P. Ciaraldi, R. Kondo, S. Reddy, W.H. Dillmann, M. Palacin, A. Zorzano, P. Ruiz-Lozano, R. Gomis, P. Kaliman, *PLoS ONE* 2 (2007) e1134.
- [70] A.J. Krentz, P.M. Clark, L. Cox, A.C. Williams, M. Nattrass, *Diabetologia* 35 (1992) 1170.
- [71] M. Shimizu, W. Wang, E.T. Walch, P.W. Dunne, H.F. Epstein, *FEBS Lett.* 475 (2000) 273.
- [72] A. Hall, *Science* 279 (1998) 509.
- [73] A.J. Ridley, *Trends Cell. Biol.* 16 (2006) 522–529.
- [74] S.L. Rogers, V.I. Gelfand, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 12 (2000) 57.
- [75] K.E. Personius, J. Nautiyal, S. Reddy, *Muscle Nerve* 31 (2005) 503.
- [76] H. Wakimoto, C.T. Maguire, M.C. Sherwood, M.M. Vargas, P.S. Sarkar, J. Han, S. Reddy, C.I. Berul, *J. Interv. Card. Electrophysiol.* 7 (2002) 127.
- [77] M.S. Mahadevan, R.S. Yadava, Q. Yu, S. Balijepalli, C.D. Frenzel-McCardell, T.D. Bourne, L.H. Phillips, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1066.
- [78] W. Dansithong, S. Paul, L. Comai, S. Reddy, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5773.
- [79] C. Guiraud-Dogan, A. Huguot, M. Gomes-Pereira, E. Brisson, G. Bassez, C. Junien, G. Gourdon, *Biochim. Biophys. Acta* 1772 (2007) 1183.
- [80] R.N. Kanadia, K.A. Johnstone, A. Mankodi, C. Lungu, C.A. Thornton, D. Esson, A.M. Timmers, W.W. Hauswirth, M.S. Swanson, *Science* 302 (2003) 1978.
- [81] C.J. Storbeck, S. Drmanic, K. Daniel, J.D. Waring, F.R. Jirik, D.J. Parry, N. Ahmed, L.A. Sabourin, J.E. Ikeda, R.G. Korneluk, *Hum. Mol. Genet.* 13 (2004) 589.
- [82] J.P. Orengo, P. Chambon, D. Metzger, D.R. Mosier, G.J. Snipes, T.A. Cooper, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 2646.
- [83] R.J. Kirby, G.M. Hamilton, D.J. Finnegan, K.J. Johnson, A.P. Jarman, *Curr. Biol.* 11 (2001) 1044.
- [84] D.J. Mistry, J.R. Moorman, S. Reddy, J.P. Mounsey, *Physiol. Genomics.* 6 (2001) 153–158.





## High-fat diet induced adiposity and insulin resistance in mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase

Esther Llagostera<sup>a</sup>, Mari Carmen Carmona<sup>b</sup>, Meritxell Vicente<sup>b</sup>, Rosa María Escorihuela<sup>c</sup>, Perla Kaliman<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Diabetes and Obesity Laboratory, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

<sup>c</sup> *Medical Psychology Unit, Department of Psychiatry and Forensic Medicine, School of Medicine, Institute of Neurosciences, Autonomous University of Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 April 2009

Revised 26 May 2009

Accepted 26 May 2009

Available online 29 May 2009

Edited by Laszlo Nagy

#### Keywords:

Myotonic dystrophy 1

DMPK, Diet

Diabetes

Obesity

Insulin resistance

### ABSTRACT

**Myotonic dystrophy 1 (MD1) is caused by a CTG expansion in the 3'-untranslated region of the myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) gene. MD1 patients frequently present insulin resistance and increased visceral adiposity. We examined whether DMPK deficiency is a genetic risk factor for high-fat diet-induced adiposity and insulin resistance using the DMPK knockout mouse model. We found that high-fat fed DMPK knockout mice had significantly increased body weights, hypertrophic adipocytes and whole-body insulin resistance compared with wild-type mice. This nutrient–genome interaction should be considered by physicians given the cardiometabolic risks and sedentary lifestyle associated with MD1 patients.**

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Myotonic dystrophy 1 (MD1), an autosomal dominant neuromuscular disorder, is the most common form of adult muscular dystrophy [1]. The MD1 mutation has been identified as the expansion of an unstable CTG-repeat in the 3'-untranslated region of a gene encoding the serine/threonine protein kinase myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) [2–5].

Studies in mice have indicated that several mechanisms may simultaneously contribute to the wide spectrum of symptoms observed in MD1 [6,7]. One of the mechanisms proposed is that the repeat expansion affects the level of DMPK expression in *cis* by altering its transcription or by retaining DMPK transcripts in the cell nucleus. This results in a decrease in the amount of DMPK protein expression, or haploinsufficiency. Results from DMPK knockout mice – which develop mild myopathy, cardiac abnormalities and metabolic alterations – give experimental support to this mechanism [8–11].

Insulin resistance, which is a major factor in the development of type 2 diabetes [12], is a metabolic feature in MD1 patients, who frequently exhibit normal basal insulin levels but excessive insulin

release after a glucose load [13,14]. Whole-body glucose disposal in MD1 patients is reduced by 15–25% following insulin infusion [15] and experiments with forearm muscle indicate a 70% decrease in insulin sensitivity in skeletal muscle [16]. In MD1 patients, fat mass is significantly increased and lean body mass is decreased [17–20]. Computerized tomography (CT) scanning at the umbilical level revealed increased visceral fat area in MD1 patients compared with healthy controls. Visceral fat area in MD1 patients correlated positively with plasma glucose levels in the glucose tolerance test, and with serum total cholesterol and triglycerides [21]. Moreover, comparison between MD1 patients with long and short CTG repeat expansions did not reveal significant differences in body mass index or body fat mass [22], indicating that their fat accumulation is not exclusively related with the degree of toxicity of the long repeats.

Here we explored whether DMPK deficiency is a genetic risk factor for adiposity and systemic insulin resistance, by examining the metabolic phenotype of DMPK KO mice after a 6-week high-fat diet (HFD). We found that under the dietary stress of a high-fat regime, DMPK knockout mice developed more overweight and whole-body insulin resistance than wild type mice. These data indicate that in MD1 patients, DMPK underexpression may interact with environmental factors to induce a phenotype of prediabetes and increased adiposity.

\* Corresponding author.

E-mail address: [pkaliman@clinic.ub.es](mailto:pkaliman@clinic.ub.es) (P. Kaliman).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Mouse experiments

All animal studies were performed in accordance with the guidelines and under approval of the Institutional Review Committee for the Animal Care and Use of the University of Barcelona. The *dmpk*<sup>-/+</sup> heterozygous mice on 129SV background were generated by Reddy et al. [8]. Mice were backcrossed at least 9 times maintaining them as congenic in the colony.

The normal diet contained 4% fat by weight (11% of calories from fat) (Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Teklad, Madison, WI), while the high-fat diet had 34.9% fat by weight (60% of calories from fat) (D12492, Research Diets; New Brunswick, NJ). For diet treatments, 2-month old male mice were individually fed a normal or a fat-adjusted diet for 6 weeks (two cohorts of DMPK knockout and wild-type mice, each containing at least 10 animals/genotype/diet). Weight and food intake were measured daily.

### 2.2. Home cage activity

Home cage activity was automatically recorded by video tracking in specially designed individual cages for automated recordings (Med Associates, Inc.). Mice were monitored by an infra-red-sensitive camera mounted above the cages, which was connected to a computer running the video tracking software programmed to measure two types of activity: ambulation (horizontal displacements) and small movements (grooming behaviour, small rearings and stereotyped movements). The session lasted 24 h, starting between 2:00 and 3:00 pm. Lights were automatically turned off at 8:00 pm and on at 8:00 am.

### 2.3. Metabolic measurements

Blood glucose levels in whole venous blood were measured using an automatic glucose monitor (AccuChek®, Roche Diagnostics One Touch Basic, Lifescan). Plasma insulin levels were measured by ELISA, using rat insulin as a standard (Crystal Chem). Insulin tolerance tests (ITT) were performed on animals that had been fasted overnight and injected with 0.75 unit/kg body weight of human regular insulin (Lilly). LINCO Research Mouse Adiponectin ELISA Kit (Cat.#EZMADP-60K) was used to determine adiponectin levels in plasma samples from fed male mice. Liver lipid was extracted as described [23]. Free fatty acids, cholesterol and triglyceride levels were measured using kits from Wako Chemicals.

### 2.4. Histological studies

Adipose tissues were fixed in 95% ethanol, embedded in paraffin and cut into 8 µm sections. Hematoxylin and eosin staining was performed following standard protocols. Image areas were determined using the MacBiophotonics Image J software. Average adipocyte size was determined in 15 randomly selected fields per animal, from a total of 5 animals per condition. A relative estimation of the total number of cells was obtained as cell number/mm<sup>2</sup> × total tissue weight (mg).

Pancreas were fixed in phosphate buffered paraformaldehyde (4% w/v), dehydrated, embedded in paraffin and cut into 5 µm sections. Insulin immunostaining was performed using a peroxidase indirect labeling technique, as previously reported [24]. Islet area was determined by manually circumscribing the outline of all the islets in a section from a total of three tissue sections per animal (*n* = 5 animals/group).

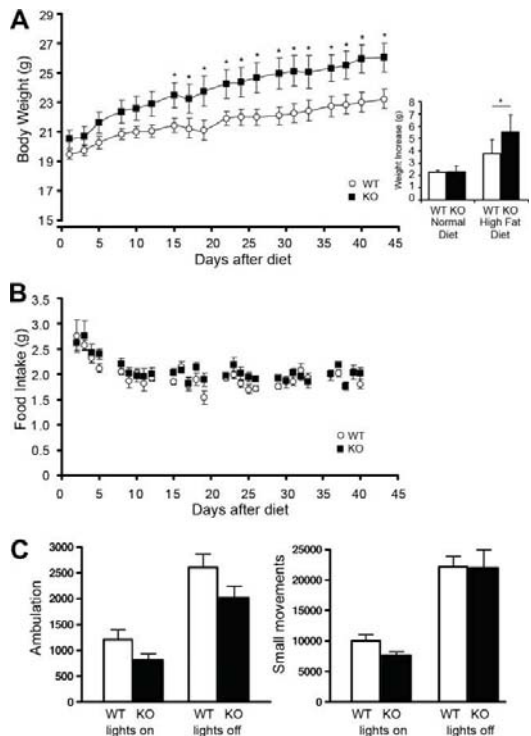
### 2.5. Statistical analysis

Data are presented as mean ± S.E. Statistical analysis was performed using a two-tailed unpaired *t*-test. Values of *P* < 0.05 were considered as statistically significant.

## 3. Results

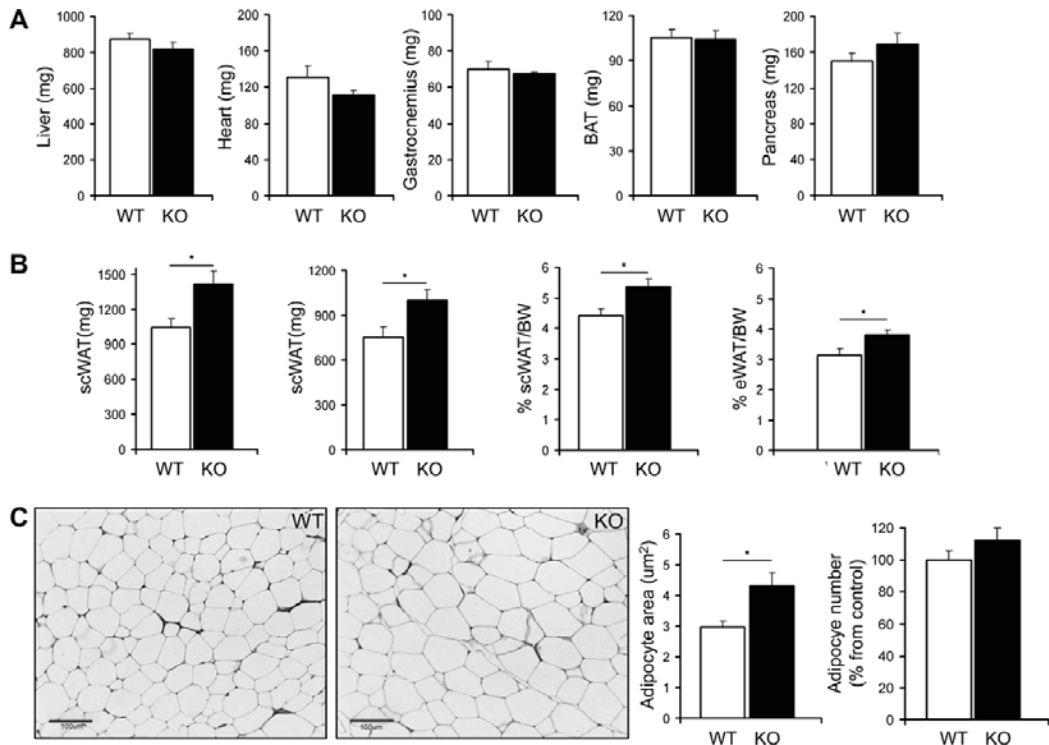
Body weight of DMPK knockout (KO) and wild type (WT) mice fed normal chow or high-fat (HF) diet was monitored. Absolute body weight and body weight increase were already significantly higher after 2 weeks of HF diet in the DMPK KO mice and the difference persisted over time (Fig. 1A). This difference was not due to increased food intake, as both KO and WT mice consumed comparable amounts of food during this period (Fig. 1B). Body weights of KO on a normal diet were similar to those of control mice (Fig. 1A). Overweight in KO compared to WT mice could not be attributed to mobility impairment as assessed in home cage activity studies (Fig. 1C). Therefore, the increased weight gain of KO compared to WT mice, despite equal energy intake and physical activity, implicates DMPK in the regulation of energy balance.

No differences in the weight of liver, heart, skeletal muscle, brown adipose tissue, or pancreas were observed between WT and KO mice on high fat diet (Fig. 2A). However, the weights of epididymal and subcutaneous white adipose tissues (WAT) were



**Fig. 1.** (A) Changes in body weight of DMPK knockout (KO) and wild type (WT) mice (*n* = 10 animals/group) during a 6-week high-fat diet. The box shows body weight increases from mice fed a standard (St) or high-fat (HF) diet for 6 weeks. (B) Food intake of *DMPK*<sup>-/-</sup> and wild type mice during the 6-week high fat diet. (C) Home cage activity was automatically recorded by video tracking in specially designed home cages for automated recordings. Ambulation (horizontal displacements) and small movements (grooming behaviour, small rearings and stereotyped movements) were measured (*n* = 8 animals/group). Data are means ± S.E.M. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 versus the corresponding wild-type value.





**Fig. 2.** (A) Weight of various tissues (from left to right: liver, heart, gastrocnemius, brown adipose tissue and pancreas) from DMPK knockout (KO) and wild type (WT) mice ( $n = 10$  animals/group) at the end of the 6-week high-fat diet. (B) Weight of subcutaneous (sc) and epididymal (e) white adipose tissue (WAT) from KO and WT mice at the end of the 6-week high fat diet ( $n = 10$  animals/group). (C) Representative hematoxylin and eosin staining of epididymal WAT from KO and WT mice at the end of the 6-week high-fat diet ( $n = 5$  animals/group). Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . (D) Distribution of adipocyte size in epididymal WAT from KO and WT mice at the end of the 6-week high fat diet ( $n = 5$  animals/group). (E) Estimation of adipocyte number in epididymal WAT from KO and WT mice at the end of the 6-week high-fat diet ( $n = 5$  animals/group). Data are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus the corresponding wild-type value.

significantly increased in DMPK KO mice (Fig. 2B). WAT weight was similar in wild type and DMPK KO mice fed a normal diet (data not shown). A significant increase in the size of adipocytes in epididymal WAT was observed in the KO mice fed a HF diet compared with WT controls ( $45 \pm 10\%$  increase,  $n = 5$  per condition analyzed,  $P = 0.014$ ) (Fig. 2C and D); this effect was not accompanied by a significant difference in cell number (Fig. 2E). We did not detect significant differences in the expression of PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$  or adiponectin in WAT from KO compared with WT mice after the HF diet (data not shown).

Table 1 summarizes metabolic parameters of KO and WT mice on normal and HF diet. While the insulin plasma levels remained similar in both groups after the HF diet, fast glycaemia

in HF-fed KO mice was significantly higher than that of WT mice ( $P = 0.008$ ). Plasma adiponectin was comparable between WT and DMPK KO mice. Similar plasma lipid levels were found in KO and WT mice fed high fat diets. Triglyceride and cholesterol accumulation in liver was similar in KO and WT mice after the HF diet, indicating that DMPK did not influence hepatic lipid storage.

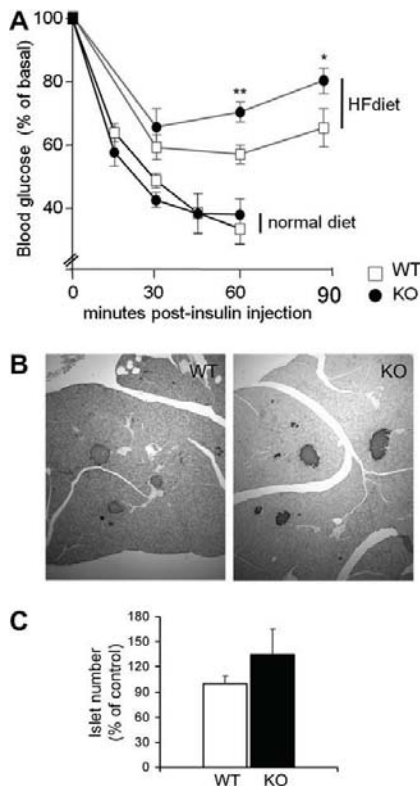
We examined the effect of *dmpk* ablation on whole-body insulin sensitivity after 6 weeks on HF diet. Insulin tolerance tests (ITT) revealed no differences in the blood glucose levels between KO and WT mice on normal chow (Fig. 3A). Both groups showed a decreased response to exogenous insulin after the HF diet intervention, reflecting increased insulin resistance at these pharmacological levels of hormone. However, DMPK KO mice developed a

**Table 1**

Metabolic parameters from mice fed a normal or high-fat diet for 6 weeks. All data are means  $\pm$  S.E.M.

	Normal diet		High-fat diet	
	WT	KO	WT	KO
Glycaemia (mg/dL) (fed)	114.2 $\pm$ 4.26	109.2 $\pm$ 3.86	122.5 $\pm$ 3.78	119.4 $\pm$ 3.91
Glycaemia (mg/dL) (fast)	64.00 $\pm$ 2.58	65.07 $\pm$ 2.16	74.43 $\pm$ 5.06	96.29 $\pm$ 4.88*
Insulinemia ( $\mu\text{g/mL}$ ) (fed)	N.D.	N.D.	1.36 $\pm$ 0.14	1.06 $\pm$ 0.10
Insulinemia ( $\mu\text{g/mL}$ ) (fast)	N.D.	N.D.	0.20 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.02
Plasma adiponectin (ng/mL)	11.55 $\pm$ 0.81	11.47 $\pm$ 1.04	13.19 $\pm$ 0.79	13.29 $\pm$ 0.72
Plasma TG (g/L)	N.D.	N.D.	0.53 $\pm$ 0.04	0.59 $\pm$ 0.05
Plasma NEFA (mM)	N.D.	N.D.	1.11 $\pm$ 0.12	1.21 $\pm$ 0.13
Hepatic TAG (mg/g)	21.30 $\pm$ 1.16	23.96 $\pm$ 3.04	86.94 $\pm$ 22.91	68.33 $\pm$ 12.00
Hepatic CHOL (mg/g)	1.36 $\pm$ 0.08	1.34 $\pm$ 0.08	5.05 $\pm$ 0.59	3.89 $\pm$ 0.22

\*  $P < 0.05$  ( $n = 10$  animals/group).



**Fig. 3.** (A) Insulin tolerance test. Blood glucose levels in KO and WT mice ( $n = 10$ /group) fed a normal or high-fat diet for 6 weeks were determined at the indicated times after intraperitoneal injection with a bolus of insulin. (B) Peroxidase immunostaining of pancreatic sections with insulin antibodies. Representative sections of pancreas from KO and WT mice at the end of the 6-week high fat-diet are shown ( $n = 5$  animals/group). (C) The number of islets containing insulin positive cells per pancreas area ( $\text{mm}^2$ ) was measured in pancreas sections from KO and WT mice at the end of the 6-week high fat-diet, as indicated in Methods ( $n = 5$  animals/group). All data are means  $\pm$  S.E.M.  $P < 0.05$ ,  $^* P < 0.01$  versus the corresponding wild-type value.

more severe systemic insulin resistance than the WT mice (Fig. 3A).

In order to establish whether insulin resistance in the DMPK KO mice affected the insulin-producing cells, we immunostained pancreatic tissue sections to specifically analyze insulin expression. (Fig. 3B and C). No differences were observed in the measurement of pancreatic beta cell mass in the KO mice compared with the WT mice after the high fat diet.

#### 4. Discussion

We have recently provided in vivo and in vitro evidence for the role of DMPK in the regulation of insulin action and glucose homeostasis [25]. Those findings indicated that reduced DMPK expression may directly influence the onset of insulin-resistance in MD1 patients and suggested that DMPK could represent a susceptibility gene to type 2-diabetes. Here we demonstrate that a high-fat (HF) diet leads to adverse metabolic outcomes (i.e. systemic insulin resistance and visceral fat accumulation) in a genetic context of DMPK deficiency.

Our data show that a HF diet aggravates the already altered metabolic phenotype of DMPK KO mice fed a normal diet. Indeed,

compared with the WT control mice, the DMPK KO mice on the HF diet exhibited increased body weight and fat mass. Interestingly, when fed a normal diet, the KO mice showed no alterations in the insulin tolerance tests. However, after the HF diet, systemic insulin sensitivity was significantly lower in KO compared with WT mice. After 6 weeks on a HF diet, KO mice also showed increased white adipose tissue mass compared with WT, in the absence of any detectable change in pancreas structure, adipocyte marker expression, or adiponectin secretion. The increase in adipose tissue mass correlated with adipocyte hypertrophy. After the HF regime, DMPK KO mice showed a slight but significant increase in fast glycaemia but did not show differences in fed blood glucose, plasma insulin or plasma lipid levels compared with WT mice.

It is well established that accumulation of lipids in non-adipose cells leads to cell dysfunction, i.e. insulin resistance in skeletal muscle [26] and impaired insulin secretion and apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells [27,28]. The finding that serum lipid levels were not elevated in DMPK KO mice as compared with WT mice, and that both groups had similar triglyceride content in liver, indicates that the increase in lipid storage in adipose tissue in DMPK KO mice may have protected these mice from systemic lipotoxicity and further impairment of glucose homeostasis and metabolic alterations.

In MD1 patients, the primary muscular disease usually leads to inactivity and sedentary lifestyles, which in turn may contribute to overweight and obesity, as well as cardiometabolic risk. Moreover, overweight and obesity often lead to prediabetes which confers a 6-fold increased risk of diabetes compared with normal glucose tolerance [29]. In this context, our data showing that DMPK KO mice present significantly higher metabolic risks under a HF diet than the WT mice (i.e. insulin resistance and visceral adiposity), point to a nutrient-genome interaction which physicians should take into account for early prevention and management of co-morbid cardiometabolic risks in Myotonic Dystrophy 1 patients.

#### Acknowledgements

We thank Dr. Sita Reddy (University of California Los Angeles), for generously providing the *dmpk*<sup>-/-</sup> heterozygous mice. We thank the Animal Research Center (SEA-PCB) staff for their assistance in animal experimentation and Dr. Rosa Gasa for helpful discussions. This project was supported by SAF2007-63353 from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain (IP: PK) and DPS2008-06998-CO2-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (IP: RME) and the ISCIII project CP07/00152 (IP: MCC).

#### References

- [1] Harper, P.S. (2001) Myotonic Dystrophy, 3rd ed, WB Saunders, London.
- [2] Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T., et al. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy-expansion of a trinucleotide CTG repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 68, 799–808.
- [3] Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., et al. (1992) Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253–1255.
- [4] Jansen, G., Mahadevan, M., Amemiya, C., Wormskamp, N., Segers, B., Hendriks, W., O'Hoy, K., Baird, S., Sabourin, L., Lennon, G., et al. (1992) Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nat. Genet.* 1, 261–266.
- [5] Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick Jr., R.G., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P., et al. (1992) An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256–1258.
- [6] Machuca-Tzili, L., Brook, D. and Hilton-Jones, D. (2005) Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: A review. *Muscle Nerve* 32, 1–18.
- [7] Wansink, D.G. and Wieringa, B. (2003) Transgenic mouse models for myotonic dystrophy type 1 (DM1). *Cytogenet. Genome Res.* 100 (1–4), 230–242.
- [8] Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Lefterovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cross, D., et al. (1996) Mice lacking the myotonic

- dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat. Genet.* 13, 325–335.
- [9] Jansen, G., Groenen, P.J., Bachner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., et al. (1996) Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat. Genet.* 13, 316–324.
- [10] Berul, C.I., Maguire, C.T., Aronovitz, M.J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrman, J., Housman, D., Mendelsohn, M.E. and Reddy, S. (1999) DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J. Clin. Invest.* 103, R1–R7.
- [11] Kaliman, P. and Llagostera, E. (2008) Myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and its role in the pathogenesis of myotonic dystrophy 1. *Cell. Signal.* 20, 1935–1941.
- [12] Biddinger, S.B. and Kahn, C.R. (2006) From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 123–158.
- [13] Krentz, A.J., Clark, P.M., Cox, L., Williams, A.C. and Natrass, M. (1992) Hyperproinsulinaemia in patients with myotonic dystrophy. *Diabetologia* 35, 1170–1172.
- [14] Vialettes, B., Pouget, J., Viard, R., Moulin, J.P., Serratrice, G. and Vaque, P. (1986) Mechanism and significance of insulin resistance in myotonic dystrophy. *Horm. Metab. Res.* 18, 395–399.
- [15] Moxley, R.T., Corbett, A.J., Minaker, K.L. and Rowe, J.W. (1984) Whole body insulin resistance in myotonic dystrophy. *Ann. Neurol.* 15, 157–162.
- [16] Moxley III, R.T., Griggs, R.C., Goldblatt, D., VanGelder, V., Herr, B.E. and Thiel, R. (1978) Decreased insulin sensitivity of forearm muscle in myotonic dystrophy. *J. Clin. Invest.* 62, 857–867.
- [17] Moorjani, S., Gaudet, D., Laberge, C., Thibault, M.C., Mathieu, J., Morissette, J., Lupien, P.J., Brun, D. and Gagné, C. (1989) Hypertriglyceridemia and lower LDL cholesterol concentration in relation to apolipoprotein E phenotypes in myotonic dystrophy. *Can. J. Neurol. Sci.* 16, 129–133.
- [18] Fernández-Real, J.M., Molina, A., Broch, M., Ricart, W., Gutiérrez, C., Casamitjana, R., Vendrell, J., Soler, J. and Gómez-Sáez, J.M. (1999) Tumor necrosis factor system activity is associated with insulin resistance and dyslipidemia in myotonic dystrophy. *Diabetes* 48, 1108–1112.
- [19] Gómez, J.M., Molina, A., Fernández-Castañer, M., Casamitjana, R., Martínez-Matos, J.A. and Soler, J. (1999) Insulin regulation of leptin synthesis and secretion in humans: The model of myotonic dystrophy. *Clin. Endocrinol.* 50, 569–575.
- [20] Perseghin, G., Comola, M., Scifo, P., Benedini, S., De Cobelli, F., Lanzi, R., Costantino, F., Lattuada, G., Battezzati, A., Del Maschio, A. and Luzi, L. (2004) Postabsorptive and insulin-stimulated energy and protein metabolism in patients with myotonic dystrophy type 1. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 357–364.
- [21] Nozaki, S., Miyai, I. and Kang, J. (1992) Intra-abdominal visceral fat in myotonic dystrophy. *Rinsho Shinkeigaku.* 32, 521–523.
- [22] Johansson, A., Andrew, R., Forsberg, H., Cederquist, K., Walker, B.R. and Olsson, T. (2001) Glucocorticoid metabolism and adrenocortical reactivity to ACTH in myotonic dystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4276–4283.
- [23] Rodríguez-Sureda, V. and Peinado-Onsurbe, J. (2005) A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using small amount of tissue. *Anal. Biochem.* 343, 277–282.
- [24] Fernández-Alvarez, J., Barberà, A., Nadal, B., Barceló-Batllo, S., Piquer, S., Claret, M., Guinovart, J.J. and Gomis, R. (2004) Stable and functional regeneration of pancreatic beta-cell population in nSTZ-rats treated with tungstate. *Diabetologia* 47, 470–477.
- [25] Llagostera, E., Catalucci, D., Marti, L., Liesa, M., Camps, M., Ciaraldi, T.P., Kondo, R., Reddy, S., Dillmann, W.H., Palacin, et al. (2007) Role of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) in glucose homeostasis and muscle insulin action. *PLoS ONE* 2, e1134.
- [26] Shulman, G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 171–176.
- [27] Zhou, Y.P. and Grill, V. (1995) Long term exposure to fatty acids and ketones inhibits B-cell functions in human pancreatic islets of Langerhans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 1584–1590.
- [28] Shimabukuro, M., Zhou, Y.T., Levi, M. and Unger, R.H. (1998) Fatty acid-induced beta cell apoptosis: A link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2498–2502.
- [29] LeRoith, D. (2007) Dyslipidemia and glucose dysregulation in overweight and obese patients. *Clin. Cornerstone.* 8, 38–52.

