



PRINCIPE FELIPE  
CENTRO DE INVESTIGACION



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

FibroStatin

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

***Goodpasture antigen-binding protein  
(GPBP) y su efector GPBP-interacting  
protein de 130-kDa (GIP130) dirigen la  
formación de miofibrillas.***

PROGRAMA DE DOCTORADO:

BIOQUÍMICA CLINICOMÉDICA E INMUNOLOGÍA

**TESIS DOCTORAL**

**Presentada por:** Ernesto López Pascual

**Dirigida por:** Juan Saus Mas y Francisco José Revert Ros

2013



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al doctor Juan Saus su labor como director de esta tesis y sobre todo, la oportunidad que me ha dado permitiéndome trabajar en su laboratorio y compartir su proyecto, más si cabe al ser ciertamente un riesgo que muchos en su lugar no habrían asumido. Por supuesto al doctor Francisco Revert con quien he coincidido en estos años durante más tiempo que con mi familia, debo agradecer además de su labor como director, su disposición a escuchar propuestas, sus explicaciones científicas, su enorme paciencia, sus consejos y su amabilidad. También quiero mostrar mi gratitud al doctor Fernando Revert por su colaboración y sus enseñanzas y a FIBROSTATIN S.L. que ha sido indispensable para el desarrollo del trabajo que se presenta.

A mis compañeros de laboratorio: Aida, Anas, Andreu, Carmen, Carolina, Christine, Dani, Filo, Héctor, Jesús, Marcos, María, Mario, M<sup>a</sup> Elena, Nacho, Natalia, Raül, Roberto, Sandra, Vanesa y Zahara que me han ayudado, me han enseñado y han hecho más ameno el trabajo. También quiero agradecer la labor del personal de los servicios tecnológicos del *Centro de Investigación Príncipe Felipe* que me ha atendido: Alberto y Eva de microscopía confocal, Alicia y Domingo de citometría y Mario de microscopía electrónica, cuya ayuda ha sido indispensable.

A don Isidro, P. Costa, P. Puente, P. Crescente, a la doctora Marisa Gras y a los doctores Daniel Vidal y José Barat que durante el transcurso de mi infancia, mi adolescencia o mi juventud además de darme clases que considero valiosas para mi formación, han contribuido tal vez sin saberlo, a que me esfuerce por mejorar, a que me ilusione por aprender, a que controle mis nervios (un poco), a que analice los problemas con más calma y a que disfrute de mi trabajo entre otras cosas. Gracias a otras personas que sin darme clases como José Luís, mi tío Juan, el doctor Ory Ramon, etc. han contribuido de la misma manera.

A mis amigos de siempre Carlos, Ernesto y Antonio que me han ayudado a “desconectar” cuando lo necesitaba.

Especialmente doy las gracias a mi familia: a mis padres, que han permitido que estudiara lo que creí conveniente y se han esforzado tantísimo por mí. A mi hermano y a mi cuñada con quienes he compartido mis alegrías y mis tristezas. A los últimos en llegar Elena y César, que me han dado alegría y ganas de seguir.

De manera particular, doy las gracias a la que ha estado en contacto más directo con mi trabajo durante estos últimos años, a la que más lo ha sufrido, por su paciencia, por su comprensión..., a mi mujer M<sup>a</sup> Carmen.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS..... V

ÍNDICE DE FIGURAS ..... XI

**1 INTRODUCCIÓN GENERAL ..... 3**

1.1 Enfermedad de Goodpasture, colágeno IV y GPBP, una proteína  
cinasa que regula la organización de la red de colágeno IV en el  
glomérulo renal ..... 3

1.2 La expresión de *COL4A3BP*, el gen que codifica GPBP, está  
relacionada con múltiples fenómenos biológicos ..... 9

1.3 Los productos de *COL4A3BP* se expresan mayoritariamente en el  
músculo estriado e interaccionan con una nueva familia de proteínas,  
las proteínas GIP ..... 10

1.4 El músculo y el sarcómero..... 11

1.5 Planteamiento de objetivos..... 14

**2 METODOLOGÍA..... 19**

2.1 Modelos animales..... 19

2.2 Anticuerpos..... 19

2.3 Cultivos celulares..... 21

2.4 Vectores, oligonucleótidos y construcciones de cDNA..... 22

2.5 Expresión transitoria de proteínas recombinantes..... 25

2.6 Obtención de clones estables..... 26

2.7 Extracción de RNA ..... 26

2.8 Técnicas de PCR..... 27

2.9 Genotipado de ratones y mioblastos ..... 27

2.10 Análisis de la expresión de genes mediante RT- PCR..... 28

2.11 Aislamiento de miofibrillas..... 30

2.12 Obtención y cuantificación de extractos de proteína..... 31

2.13 Purificación de proteínas..... 33

2.14 Inmunoprecipitaciones ..... 34

2.15 Ensayos de *far Western*..... 36

2.16 Ensayos de fosforilación *in vitro*..... 37

2.17 Cálculo de la actividad citocromo c oxidasa ..... 37

2.18 Inmunofluorescencias de miofibrillas aisladas y cultivos celulares ..... 37

2.19 Preparación de muestras para microscopía electrónica..... 39

2.20 Tinciones histológicas e inmunohistoquímicas..... 40

2.21 Ensayos funcionales en modelos murinos..... 40

2.22 Programas informáticos y servidores..... 42

<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL</b> .....	<b>47</b>
3.1	La expresión y localización de las isoformas de GPBP en el músculo esquelético .....	47
3.2	Expresión del gen <i>Col4a3bp</i> durante la diferenciación de mioblastos C2C12.....	53
3.3	La expresión del gen <i>Col4a3bp</i> regula la diferenciación de los mioblastos C2C12.....	57
3.4	Caracterización de ratones modificados genéticamente (KO o <i>knockout</i> ) que no expresan mGPBP-1 (ratones <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> ) .....	58
3.4.1	Los mioblastos <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> muestran dificultad para fusionarse y para organizar las miofibrillas.....	60
3.4.2	Caracterización bioquímica y morfológica del músculo estriado de ratones <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> .....	65
3.5	Caracterización de ratones transgénicos que expresan GPBP-1 humana (ratones Tg-hGPBP-1) .....	70
3.5.1	La expresión de hGPBP-1 en los mioblastos de ratón Tg-hGPBP-1 facilita el ensamblaje del citoesqueleto miofibrilar durante la miogénesis.....	71
3.5.2	Análisis bioquímicos y morfológicos del tejido muscular y las miofibrillas de los ratones Tg-hGPBP-1.....	73
3.5.3	La expresión de hGPBP-1 disminuye la resistencia física de los ratones y promueve la aparición de agregados tubulares en el tejido muscular.....	76
3.6	Proteínas del músculo esquelético que interaccionan con GPBP-1.....	79
3.6.1	VAP-A: Co-localización e interacción con GPBP-1.....	80
3.6.2	<i>GPBP-interacting proteins</i> (GIPs): isoformas de FILIP1L preferentemente expresadas en músculo estriado.....	81
3.7	Principales características de la estructura primaria de las proteínas GIP .....	87
3.7.1	El dominio CortBP2 y características estructurales de las isoformas derivadas del gen <i>FILIP1L</i> y de genes ortólogos.....	87
3.7.1.1	El dominio CortBP2 es la región más conservada en las proteínas GIP, L-FILIP, CTTNBP2 y CTTBP2NL.....	91
3.7.2	Proteínas del gen <i>FILIP1L</i> y de genes parálogos conservan consensos PxxP en sus extremos carboxilos.....	96

3.8	Expresión recombinante de las isoformas principales del gen <i>FILIP1L</i> ....	98
3.9	Interacción de GPBP-1 con proteínas de la familia <i>FILIP1L</i> .....	100
3.9.1	Fosforilación de GIP130 y GIP90 por GPBP-1.....	101
3.10	Estudios de GPBP y GIP130 en mioblastos C2C12.....	103
3.11	Interacción de GIP130 con la cadena pesada de la miosina <i>in vitro</i> .....	105
3.12	GIP130 facilita el ensamblaje de miofibrillas en células C2C12 en diferenciación.....	107
3.12.1	Influencia de GPBP-1 en la asociación de GIP130 con la miosina.....	108
3.13	Estudio de la expresión de las isoformas del gen de ratón <i>Filip1l</i> durante la miogénesis de mioblastos C2C12.....	110
3.14	La silenciamiento de mGIP130 en mioblastos C2C12 compromete la estructuración del citoesqueleto de miosina durante la miogénesis.....	113
3.15	Las proteínas mGIP130 y mGPBP co-inmunoprecipitan a partir de extractos de músculo de ratón.....	114
3.16	En el músculo esquelético humano se expresan isoformas GIP de diferente peso molecular que muestran un patrón de distribución estriado.....	116
3.17	La miosina muscular y mGPBP-1 co-localizan con mGIP130 en miofibrillas de ratón.....	117
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES FINALES.....</b>	<b>121</b>
4.1	GPBP-1 es una proteína miofibrilar.....	121
4.2	Las proteínas GPBP son necesarias para la miogénesis.....	121
4.2.1	GPBP-1 promueve la fusión celular y el ensamblado de miofibrillas durante la miogénesis.....	121
4.3	<i>In vivo</i> la acumulación de GPBP-2 en el citoplasma suple la ausencia de GPBP-1.....	122
4.4	GPBP-1 interacciona con GIP130, una proteína del sarcómero que se une a la cadena pesada de la miosina muscular.....	123
4.5	El dominio CortBP2 y el motivo PxxPxxPxxP de GIP130 podrían ser los puntos de anclaje de GPBP-1 y miosina respectivamente.....	124
4.6	GPBP-1 interacciona con la proteína de membrana del retículo sarcoplásmico VAP-A y posiciona retículo sarcoplásmico y sarcómeros.....	125
4.7	GIP130 es el efector de GPBP-1 en la miofibrillogénesis.....	128
4.8	El puente molecular VAP-A-GPBP-1-GIP130-miosina es crítico en el alineamiento del RS con la maquinaria contráctil.....	129
4.9	El papel de las proteínas GPBP y GIP en la organización del citoesqueleto en los miocitos abre nuevas vías de investigación.....	131
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>135</b>





## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>3(IV)NC1</b>	<i>Goodpasture antigen, type <u>IV</u> collagen <u>alpha</u> <u>3</u> chain <u>NC1</u> domain</i> (antígeno Goodpasture, dominio NC1 de la cadena alfa 3 del colágeno IV)
<b>Akt</b>	Isoformas murinas de la proteína cinasa Akt: Akt1, Akt2 y Akt3
<b>AT</b>	<u>A</u> gregados <u>t</u> ubulares
<b>BSA</b>	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin (albúmina sérica bovina)
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>COL4A3BP</b>	Gen humano: <i><u>C</u>ollagen, <u>t</u>ype <u>IV</u>, <u>a</u>lpha <u>3</u> <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i> . Proteína de unión a la cadena alfa 3 del colágeno IV
<b>Col4a3bp</b>	Gen murino: <i><u>C</u>ollagen, <u>t</u>ype <u>IV</u>, <u>a</u>lpha <u>3</u> <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i> . Proteína de unión a la cadena alfa 3 del colágeno IV
<b>col4a3bp</b>	Gen de pez cebra: <i><u>C</u>ollagen, <u>t</u>ype <u>IV</u>, <u>a</u>lpha <u>3</u> <u>b</u>inding <u>p</u>rotein</i> . Proteína de unión a la cadena alfa 3 del colágeno IV
<b>CortBP2</b>	Dominio proteico: <i><u>C</u>ortactin <u>B</u>inding <u>P</u>rotein <u>2</u></i> (proteína de unión a la cortactina, variante 2)
<b><math>\Delta\Delta</math>Ct</b>	Delta-delta ciclo umbral.
<b>CTTNBP2</b>	Gen humano: <i><u>C</u>ortactin <u>B</u>inding <u>P</u>rotein <u>2</u></i> (proteína de unión a la cortactina, variante 2)
<b>CTTNBP2</b>	<i><u>C</u>ortactin <u>B</u>inding <u>P</u>rotein <u>2</u></i> (proteína de unión a la cortactina, variante 2)
<b>CTTNBP2NL</b>	Gen humano: <i><u>C</u>ortactin <u>B</u>inding <u>P</u>rotein <u>2</u> <u>N</u>-terminus <u>l</u>ike</i> (proteína con extremo N terminal similar al de CTTNBP2)
<b>CTTNBP2NL</b>	<i><u>C</u>ortactin <u>B</u>inding <u>P</u>rotein <u>2</u> <u>N</u>-terminus <u>l</u>ike</i> (proteína con extremo N terminal similar al de CTTNBP2)
<b>DAPI</b>	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	<i><u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle <u>M</u>edium</i> (medio de Eagle modificado por Dulbecco)

## ÍNDICES

---

<b>EBI</b>	<i>European Bioinformatics Institute</i> (Instituto Europeo de Bioinformática)
<b>EEM</b>	Error estándar de media.
<b>EGFP</b>	<i>Enhanced green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente potenciada)
<b>EGTA</b>	<i>Ethylene glycol tetraacetic acid</i> (ácido tetraacético de etilenglicol)
<b>FILIP1</b>	Gen humano: <i>Filamin A Interacting Protein 1</i> (proteína que interacciona con filamina A)
<b>FILIP1</b>	<i>Filamin A Interacting Protein 1</i> (proteína que interacciona con filamina A)
<b>FILIP1L</b>	Gen humano: <i>Filamin A Interacting Protein 1-like</i> (proteína similar a la proteína que interacciona con filamina A)
<b>FILIP1L</b>	<i>Filamin A Interacting Protein 1-like</i> (proteína similar a la proteína que interacciona con filamina A)
<b>FILIP1L-102</b>	<i>Filamin A Interacting Protein 1-like-102</i> KDa (proteína similar a la proteína que interacciona con filamina A de 102 KDa)
<b>FLAG</b>	Péptido con secuencia DYKDDDDK
<b>FLAG-GPBP-1</b>	GPBP-1 recombinante con el péptido FLAG fusionado en posición N terminal
<b>FLAG-hGPBP-1</b>	GPBP-1 recombinante con el péptido FLAG fusionado en posición N terminal expresada en ratones transgénicos o en mioblastos derivados de ellos
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
<b>GIP</b>	<i>GPBP-interacting protein</i> (proteína que interacciona con GPBP)
<b>GIP90</b>	GIP de 90 kDa
<b>GIP130/GIP130a</b>	GIP de 130 kDa isoforma a
<b>GIP130b</b>	GIP de 130 kDa isoforma b
<b>GIP130c</b>	GIP de 130 kDa isoforma c

<b>GIP130d</b>	GIP de 130 kDa isoforma d
<b>GIP130-EGFP</b>	GIP130a recombinante con la proteína EGFP fusionada en posición C terminal
<b>GPBP</b>	<i>Goodpasture antigen-binding protein</i> (proteína de unión al antígeno Goodpasture). Productos del gen <i>COL4A3BP</i>
<b>GPBP-1</b>	Isoforma 1 de GPBP
<b>GPBP-2</b>	Isoforma 2 de GPBP
<b>GPBP-3</b>	Isoforma 3 de GPBP
<b>GPBPs</b>	Isoformas de GPBP
<b>GRP78</b>	<i>Glucose-regulated protein, 78 kDa</i> (proteína regulada por glucosa de 78 kDa)
<b>GST</b>	<u>G</u> lutati <u>o</u> n- <u>S</u> - <u>T</u> ransferasa
<b>HE</b>	<u>H</u> ematoxilina- <u>e</u> osina
<b>hGPBP-1</b>	GPBP-1 recombinante humana expresada en ratones transgénicos o en mioblastos derivados de ellos
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> (peroxidasa de rábano)
<b>L-FILIP</b>	<i>Large-Filamin A Interacting Protein</i> proteína que interacciona con filamina A, variante grande). Producto del gen <i>FILIP1L</i>
<b>LUZP1</b>	Gen humano: <i>Leuzine Zipper Protein 1</i> (proteína con cremallera de leucina 1)
<b>LUZP1</b>	<i>Leuzine Zipper Protein 1</i> (proteína con cremallera de leucina 1). Producto del gen <i>LUZP1</i>
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal antibodies</i> (anticuerpos monoclonales)
<b>MBG</b>	<u>M</u> embrana <u>b</u> asal <u>g</u> lomerular
<b>MCII70</b>	Subunidad de 70 kD del complejo II mitocondrial
<b>ME</b>	<u>M</u> icroscopía <u>e</u> lectrónica
<b>MEM</b>	Medio mínimo esencial de Eagle

## ÍNDICES

---

<b>mFILIP1L-102</b>	FILIP1L-102 murina
<b>mGIP130</b>	GIP130 murina
<b>mGPBP</b>	GPBP murina. Productos del gen <i>Col4a3bp</i>
<b>mGPBP-1</b>	GPBP-1 murina
<b>mGPBP-2</b>	GPBP-2 murina
<b>mGPBP-3</b>	GPBP-3 murina
<b>Mybp-C</b>	<i>Myosin-binding Protein-C</i> (proteína de unión a la miosina, variante C)
<b>MYHC</b>	<i>Myosin heavy chain</i> (cadena pesada de la miosina)
<b>N</b>	<u>N</u> ewton (unidad de Fuerza)
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
<b>OVA</b>	<u>O</u> vo <u>a</u> lbúmina
<b>PB</b>	<i>Phosphate buffer</i> (tampón fosfato, pH 7.4)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampón fosfato salino, pH 7.4)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
<b>PH</b>	Dominio proteico: <i>Pleckstrin homology</i> (con homología a la pleckstrina)
<b>PMSF</b>	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
<b>PPII</b>	<i>Polyproline II helix</i> (hélice de poliprolina tipo II)
<b>PVDF</b>	<i>Polyvinylidene fluoride</i> (fluoruro de polivinilideno)
<b>PYGB</b>	<i>Phosphorylase, glycogen</i> (glucógeno fosforilasa)
<b>rGIP130</b>	GIP130a recombinante humana generada en levadura
<b>rGPBP-1</b>	GPBP-1 recombinante humana generada en levadura
<b>RE</b>	<u>R</u> etículo <u>e</u> ndoplásmico

<b>RS</b>	<u>R</u> etículo <u>s</u> arcoplásmico
<b>RT</b>	<u>R</u> etro <u>t</u> ranscription (retrotranscripción)
<b>SBF</b>	<u>S</u> uero <u>b</u> ovino <u>f</u> etal
<b>SC</b>	<u>S</u> uero de <u>c</u> aballo
<b>SDS</b>	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate (dodecil sulfato de sodio)
<b>SDS-PAGE</b>	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
<b>SH3</b>	Dominio proteico: <u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>3</u> (dominio con homología a Src-3)
<b>SH3-like</b>	Dominio proteico: <u>S</u> rc <u>h</u> omology <u>3-like</u> (similar al dominio SH3)
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin RNA</i> (RNA de horquilla corta)
<b>START</b>	Dominio proteico: <u>S</u> teroidogenic <u>a</u> cute <u>r</u> egulatory <u>p</u> rotein ( <u>StAR</u> )-related <u>l</u> ipid <u>t</u> ransfer (de transferencia de lípidos relacionado con la proteína StAR)
<b>TAE</b>	<u>T</u> ris <u>A</u> cetate <u>E</u> DTA (tampón Tris Acetato EDTA)
<b>TBS</b>	<u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (tampón Tris salino)
<b>TBST</b>	<u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline- <u>T</u> ween (tampón Tris salino Tween 20)
<b>Tg-hGPBP</b>	<u>T</u> ransgenic <u>h</u> uman <u>GPBP</u> (transgénico de GPBP humano)
<b>TRITC</b>	<u>T</u> etramethylrhodamine-5-(6)- <u>i</u> sothiocyante (tetrametilrodamina-5-6-isotiocianato)
<b>UV</b>	<u>U</u> ltra <u>V</u> ioleta
<b>VAP-A</b>	<u>V</u> esicle-associated membrane protein-associated protein <u>A</u> (proteína asociada a la proteína de membrana asociada a vesícula, variante A)



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1.	Esquema del ensamblaje del colágeno IV en la MBG.....	5
FIG. 2.	Representación esquemática de los rasgos estructurales más relevantes de GPBP-1. ....	7
FIG. 3.	Micrografía electrónica de la MBG en un ratón transgénico que expresa GPBP humana. ....	9
FIG. 4.	Esquema de la asociación de los filamentos de actina con la miosina en las miofibrillas. ....	13
FIG. 5.	Esquema representativo de la estructura del sarcómero en relajación y contracción. ....	14
FIG. 6.	Detección de GPBP en músculo esquelético humano.....	47
FIG. 7.	Alineamiento de las estructuras primarias de GPBP-1, GPBP-2, mGPBP-1 y mGPBP-2 .....	49
FIG. 8.	Detección de GPBP en músculo esquelético de ratón.....	49
FIG. 9.	Expresión comparativa de las isoformas de mGPBP en distintos músculos de ratón. ....	50
FIG. 10.	Estudio de la localización de mGPBP-1 en miofibrillas de ratón mediante inmunofluorescencia.....	52
FIG. 11.	Representación esquemática de la acumulación de mGPBP-1 en la línea M. ....	53
FIG. 12.	Expresión de diferentes isoformas de mGPBP en células C2C12 en diferenciación. ....	55
FIG. 13.	En células C2C12 en diferenciación aumenta la expresión del mRNA para mGPBP-1 y -3 y disminuye la del mRNA para mGPBP-2. ....	56
FIG. 14.	Localización de mGPBP-1 en células C2C12 en diferenciación. ....	57
FIG. 15.	La expresión de proteínas mGPBP es necesaria para la diferenciación de mioblastos C2C12. ....	58
FIG. 16.	Genotipado de ratones <i>gpbp-1<sup>+/+</sup></i> , <i>gpbp-1<sup>+/-</sup></i> y <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> . ....	60
FIG. 17.	Expresión comparativa de las isoformas de mGPBP en mioblastos <i>gpbp-1<sup>+/+</sup></i> y <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> . ....	61

## ÍNDICES

---

FIG. 18. Los mioblastos de ratones <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> no expresan mGPBP-1, -3. ....	61
FIG. 19. Fosforilación de las proteínas mGPBP durante la miogénesis. ....	63
FIG. 20. Los mioblastos <i>gpbp-1<sup>+/+</sup></i> y <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> expresan marcadores de diferenciación. ....	64
FIG. 21. Análisis comparativo del proceso de diferenciación en mioblastos <i>gpbp-1<sup>+/+</sup></i> y <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> . ....	65
FIG. 22. Estudio de la expresión de isoformas de mGPBP en ratones <i>gpbp-1<sup>+/+</sup></i> y <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> . ....	66
FIG. 23. Las proteínas mGPBP-1 y mGPBP-2 se encuentran en la línea M de las miofibrillas de ratones <i>gpbp-1<sup>+/+</sup></i> y <i>gpbp-1<sup>-/-</sup></i> , respectivamente. ....	68
FIG. 24. La ausencia de mGPBP-1 no altera la fuerza de sujeción de los ratones. ....	69
FIG. 25. La ausencia de mGPBP-1 en los músculos no altera de forma significativa la resistencia física de los ratones. ....	70
FIG. 26. Caracterización de la expresión recombinante de hGPBP-1 en los mioblastos Tg-hGPBP-1. ....	71
FIG. 27. La expresión de FLAG-hGPBP-1 potencia la miogénesis. ....	72
FIG. 28. GPBP-1 se expresa en las proximidades de las miofibrillas en formación. ....	73
FIG. 29. GPBP-1 es una proteína presente en miofibrillas de ratón. ....	74
FIG. 30. Inmunopurificación de la proteína recombinante FLAG-hGPBP-1 a partir de extractos de miofibrillas de ratones Tg-hGPBP-1. ....	75
FIG. 31. La expresión de hGPBP-1 en el ratón no altera su fuerza de sujeción. ....	76
FIG. 32. La expresión de hGPBP-1 en ratones disminuye su resistencia física. ....	77
FIG. 33. La actividad de la citocromo c oxidasa mitocondrial en los ratones Tg-hGPBP-1 y en sus controles son similares. ....	78
FIG. 34. La expresión de hGPBP-1 en ratones no altera la expresión de la proteína mitocondrial MCII70 ni del marcador de estrés de retículo endoplásmico GRP78. ....	78



FIG. 35. Los ratones Tg-hGPBP-1 desarrollan agregados tubulares.....	79
FIG. 36. VAP-A y mGPBP-1 co-localizan en músculo esquelético de ratón. ....	80
FIG. 37. VAP-A se une específicamente a GPBP. ....	81
FIG. 38. Representación de la estructura exón-intrón del gen <i>FILIP1L</i> y de la secuencia exónica presente en cada uno de los mRNAs generados por este gen humano. ....	82
FIG. 39. La poliadenilación retardada y consiguiente transcripción del exón 9 de <i>FILIP1L</i> produce un acortamiento del exón 8.....	84
FIG. 40. El exón 9 de <i>FILIP1L</i> tiene expresión restringida. ....	85
FIG. 41. Secuencia de nucleótidos del cDNA de la especie EU531865 y del correspondiente DNA. ....	86
FIG. 42. Alineamiento múltiple de las secuencias utilizadas para modelizar el dominio CortBP2. ....	88
FIG. 43. El dominio CortBP2 de las proteínas GIP participa en la interacción con GPBP-1. ....	89
FIG. 44. Esquema representativo de la historia evolutiva del gen <i>FILIP1L</i> y los genes humanos relacionados.....	90
FIG. 45. El dominio Cortbp2 es la región con mayor homología entre las proteínas parálogas de GIP130. ....	95
FIG. 46. Esquema comparativo de los rasgos estructurales conservados entre proteínas ortólogas de GIP130. ....	96
FIG. 47. Esquema comparativo de los rasgos estructurales presentes en las isoformas <i>FILIP1L</i> . ....	97
FIG. 48. Esquema comparativo de los rasgos estructurales conservados entre GIP130 y proteínas parálogas.....	98
FIG. 49. Expresión recombinante de isoformas producidas por el gen <i>FILIP1L</i> . ....	99
FIG. 50. Análisis electroforético comparativo de L-FILIP y GIP130.....	99
FIG. 51. Anticuerpos monoclonales contra polipéptidos expresados por <i>FILIP1L</i> . ....	100
FIG. 52. GPBP-1 interacciona con GIP90 y con GIP130 en células 293.....	101
FIG. 53. GIP90 y GIP130 se comportan de modo diferente en ensayos de fosforilación con GPBP-1. ....	102

## ÍNDICES

---

FIG. 54. Distribución de GIP130 y GPBP-1 en células C2C12 en crecimiento (sin diferenciar).....	103
FIG. 55. Distribución de GIP130 y GPBP-1 en células C2C12 después de 1 día de diferenciación. ....	104
FIG. 56. Distribución de GIP130 y GPBP en células C2C12 después de 3 días de diferenciación. ....	105
FIG. 57. GIP130 se une a la cadena pesada de miosina muscular.....	106
FIG. 58. GIP130 co-inmunoprecipita con la miosina muscular.....	106
FIG. 59. GIP130 facilita el ensamblaje de miosina en células diferenciadas. ....	108
FIG. 60. GPBP-1 condiciona la co-distribución de GIP130 y miosina en mioblastos de ratón en diferenciación. ....	109
FIG. 61. La expresión recombinante de GPBP-1 rescata parcialmente el fenotipo de mioblastos <i>gbbp-1<sup>-/-</sup></i> . ....	110
FIG. 62. Alineamiento de las estructuras primarias humanas de GIP130 y FILIP1L-102 y de sus respectivas proteínas ortólogas de ratón mGIP130 y mFILIP1L-102. ....	112
FIG. 63. La expresión de mGIP130 se induce en la miogénesis.....	113
FIG. 64. La silenciamiento de mGIP130 en células C2C12 altera la miofibrillogénesis.....	114
FIG. 65. mGIP130 interacciona con mGPBP-1 en tejido muscular. ....	116
FIG. 66. Expresión de proteínas GIP en músculo humano. ....	117
FIG. 67. GIP130, mGPBP-1 y miosina co-localizan en la línea M de la zona H de las miofibrillas.....	118

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**



# **1 INTRODUCCIÓN GENERAL**

## **1.1 Enfermedad de Goodpasture, colágeno IV y GPBP, una proteína cinasa que regula la organización de la red de colágeno IV en el glomérulo renal.**

La enfermedad de Goodpasture es una enfermedad autoinmune descrita únicamente en humanos, que se caracteriza por cursar con una glomerulonefritis rápidamente progresiva y una hemorragia pulmonar (Goodpasture, 1919). El ataque inmunológico lo llevan a cabo anticuerpos dirigidos contra la cadena  $\alpha_3$  del colágeno tipo IV o simplemente colágeno IV (Saus *et al.* 1988), un componente principal de las membranas basales, que son estructuras de la matriz extracelular situadas en los lindes entre las células y el tejido conjuntivo de sostén (para Revisión ver Hudson *et al.* 2003).

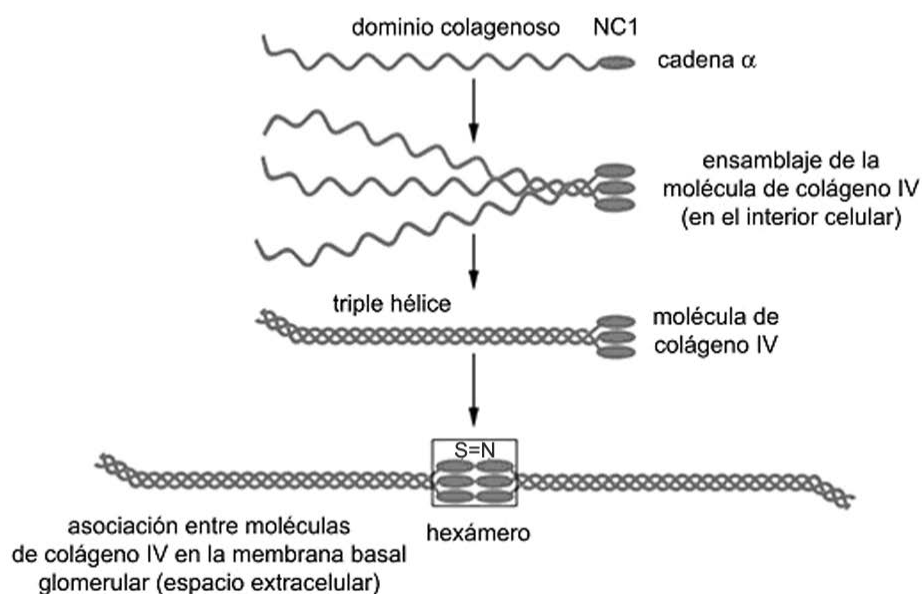
El colágeno IV está compuesto por seis cadenas  $\alpha$  estructuralmente emparentadas ( $\alpha_1$ - $\alpha_6$ ) (Soininen *et al.* 1987; Hostikka y Tryggvason, 1988; Hostikka *et al.* 1990; Myers *et al.* 1990; Leinonen *et al.* 1994; Mariyama *et al.* 1994; Oohashi *et al.* 1994; Zhou *et al.* 1994). En cada cadena  $\alpha$ (IV) se distingue una región N terminal colagenosa triple-helicoidal, y otra región C terminal globular no colagenosa denominada dominio NC1. Tres cadenas  $\alpha$  se asocian entre sí formando un protómero, y entre todos los protómeros de colágeno IV teóricamente posibles, sólo se han descubierto en la naturaleza las asociaciones  $\alpha_1.\alpha_1.\alpha_2$ (IV),  $\alpha_3.\alpha_4.\alpha_5$ (IV) y  $\alpha_5.\alpha_5.\alpha_6$ (IV). En las membranas basales, cuatro protómeros interaccionan a través del extremo N terminal y dos a través del dominio NC1. La asociación entre los dominios NC1 de dos

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

protómeros genera un hexámero de dominios NC1, o simplemente hexámero, que se puede aislar mediante digestión con colagenasa bacteriana. En las redes de colágeno IV sólo se han encontrado tres tipos de hexámeros:  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$ ;  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})-\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$ ; y  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 5.\alpha 5.\alpha 6(\text{IV})$ , de los que en la membrana basal glomerular (MBG) sólo se expresan los dos primeros, en redes de colágeno IV diferentes aunque íntimamente asociadas. La red de colágeno IV de la MBG está estabilizada por puentes disulfuro establecidos entre cisteínas de regiones triple helicoidales de protómeros próximos, siendo estos puentes más abundantes en la red  $\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})-\alpha 3.\alpha 4.\alpha 5(\text{IV})$  que en la red  $\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})-\alpha 1.\alpha 1.\alpha 2(\text{IV})$  (Gunwar *et al.* 1998). Además, clásicamente se había propuesto la existencia de enlaces disulfuro intermoleculares estabilizando el hexámero (Siebold *et al.* 1988), aunque recientemente se ha descubierto la existencia de enlaces tipo sulfilimina (-S=N-) entre residuos de Met e hidroxil-Lys de protómeros (trímeros) adyacentes en la MBG, y de este modo la existencia de enlaces disulfuro estabilizando el hexámero se ha puesto en duda (Vanacore *et al.* 2009) (Fig. 1). Por otra parte, la estructura terciaria de los dominios NC1 de cadenas  $\alpha$  individuales está también estabilizada por puentes disulfuro establecidos entre residuos de Cys de la misma cadena (Timpl *et al.* 1981). La existencia de diferentes distribuciones de puentes disulfuro en el dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  estabilizando conformaciones alternativas ha puesto en evidencia que este dominio diversifica su estructura (Calvete *et al.* 2006). Los autoanticuerpos que se generan en la enfermedad de Goodpasture van dirigidos exclusivamente contra el dominio NC1 de la cadena  $\alpha 3(\text{IV})$  [ $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ ], por lo que a este dominio también se le conoce como (auto)antígeno Goodpasture (Saus *et al.*

1988). Dentro del dominio  $\alpha3(IV)NC1$  hay diversos epitopos crípticos reconocidos por los anticuerpos Goodpasture (Wieslander *et al.* 1985; Borza *et al.* 2000), agrupados en dos regiones principales (Netzer *et al.* 1999). La accesibilidad de los anticuerpos Goodpasture depende del grado de reforzamiento de la estructura del hexámero mediante enlaces intermoleculares (Hudson *et al.* 2003). Estos autoanticuerpos se depositan de forma lineal en la MBG y en la membrana basal alveolar del pulmón, causando las dos manifestaciones clínicas cardinales de la enfermedad de Goodpasture (Lerner *et al.* 1967).



**FIG. 1. Esquema del ensamblaje del colágeno IV en la MBG.** Se esquematiza la formación de hexámeros de colágeno IV que se inicia en el interior de la célula y se concluye en el espacio extracelular. S=N simboliza la formación de puentes sulfilimina entre trímeros adyacentes. La existencia de enlaces -S-S- estabilizando el hexámero es controvertida y no aparece reflejada en la ilustración.

A pesar de la alta homología estructural existente entre las seis cadenas  $\alpha(IV)$ , sólo el dominio  $\alpha3(IV)NC1$  ha demostrado tener capacidad inmunopatogénica en animales de experimentación (Kalluri *et al.* 1994). El dominio  $\alpha3(IV)NC1$

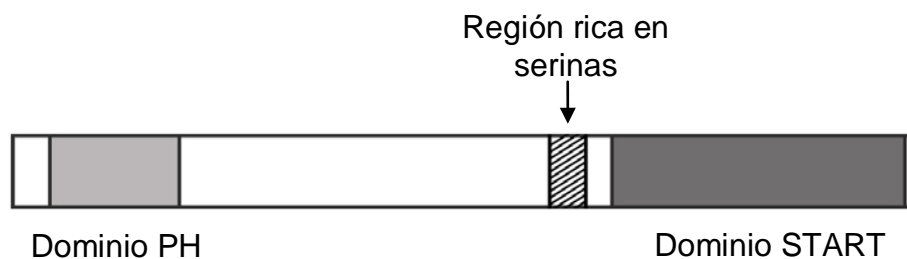
## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

humano, a diferencia de sus homólogos de animales inferiores, presenta procesamiento alternativo de exones, lo que da lugar a distintas isoformas con masas moleculares diferentes (Bernal *et al.* 1993). Por otra parte, dentro de una homología estructural generalizada, en el extremo N terminal del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  humano hay una región altamente divergente respecto a regiones homólogas de cadenas  $\alpha 3(\text{IV})$  de otras especies, y respecto a otras cadenas  $\alpha(\text{IV})$  humanas. Esta región contiene un motivo RGD para la unión a receptores celulares tipo integrina que forma parte de un consenso de fosforilación para diversas proteínas cinasas (KRGDS<sup>9</sup>) (Quinones *et al.* 1992). La secuencia KRGDS<sup>9</sup> es fosforilada por cinasas endógenas en la Ser<sup>9</sup>, lo que es una característica exclusiva del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  humano (Revert *et al.* 1995). Además de esto, recientemente se ha comprobado que el motivo KRGDS<sup>9</sup> es un sitio principal de anclaje de las células podocitarias (epiteliales) a la MBG en la barrera de filtración glomerular, lo que sugiere que el estado de fosforilación de la Ser<sup>9</sup> puede regular esta unión e impactar de ese modo en la fisiología renal (Borza *et al.* 2008). Por otra parte, como hemos dicho, la estructura terciaria del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  está diversificada, de modo que en la red de colágeno de la MBG se ensamblan múltiples isómeros conformacionales o confómeros, estabilizados por distintos patrones de puentes disulfuro intracatenarios. Los distintos confómeros condicionan el grado de dimerización en el hexámero y por ende su accesibilidad a los autoanticuerpos, sugiriendo que la isomerización conformacional desempeña un papel central en el proceso de exposición del epitopo Goodpasture durante la patogénesis (Calvete *et al.* 2006).



Con el propósito de identificar proteínas que interaccionan con la región divergente N terminal del dominio  $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$  humano, se utilizaron de forma combinada un péptido sintético que representa esta región y anticuerpos monoclonales específicos para rastrear diversas bibliotecas de expresión humanas y se identificó GPBP (*Goodpasture antigen-binding protein*), una proteína de 624 residuos que une y fosforila la región de interés (Raya *et al.* 1999). La proteína GPBP, expresada por el gen *COL4A3BP* (*Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein*) en 5q13, contiene varios dominios estructurales, entre los cuales queremos destacar el dominio START (*Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer*), el dominio PH (*Pleckstrin homology*) y una región de 26 residuos rica en serinas codificada por el exón 11 del gen (Fig. 2).



**FIG. 2. Representación esquemática de los rasgos estructurales más relevantes de GPBP-1.** Se muestra la ubicación de los dominios PH y START y del dominio rico en Ser codificado por el exón 11 de *COL4A3BP*.

Actualmente se conocen tres isoformas de GPBP: 1) GPBP-1 fue la primera que se describió y corresponde al producto canónico del gen *COL4A3BP* (Raya *et al.* 1999); 2) GPBP-2 (antes llamada GPBP $\Delta$ 26) resulta de un fenómeno de empalme alternativo de exones en el que se ha eliminado el exón 11 de *COL4A3BP*, que codifica un dominio de 26 residuos rico en serinas (Raya *et al.*

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

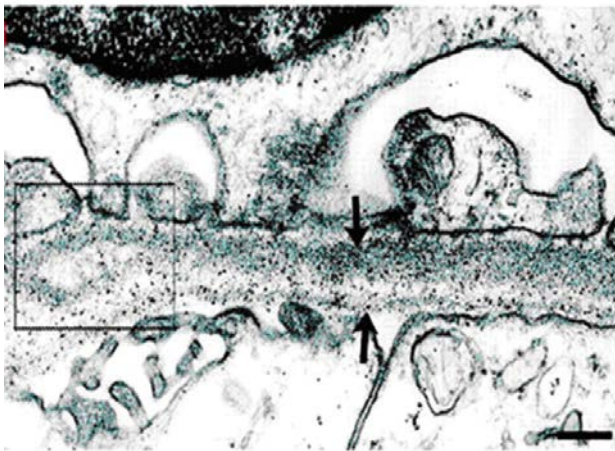
2000); 3) GPBP-3 (antes llamada GPBP de 91 kDa) es una isoforma que se genera por una iniciación alternativa de traducción en un codón no canónico (Thr) situado en posición 5' con respecto a la Met canónica (Revert *et al.* 2008). GPBP-1 y 2 presentan un tamaño molecular aparente en torno a 77 kDa, mientras que GPBP-3 da origen a un polipéptido de 91 kDa que mediante modificaciones post-traduccionales puede generar un polipéptido mayor de 120 kDa (Revert *et al.* 2008).

GPBP-1 es soluble y exportable, se encuentra en el espacio extracelular e interactúa con el colágeno IV (Revert *et al.* 2007; Revert *et al.* 2008). GPBP-2 es una proteína de 598 residuos cuya localización está limitada al citosol (Revert *et al.* 2008). Tanto GPBP-1 como GPBP-2 tienen actividad proteínica *in vitro* y son capaces de autofosforilarse, aunque la actividad específica de GPBP-1 es superior a la de GPBP-2 (Raya *et al.* 2000). Por su parte, las isoformas de 91 y 120 kDa de GPBP-3 son proteínas asociadas a las membranas de la vía secretora que regulan la secreción de GPBP-1 (Revert *et al.* 2008), y su actividad cinasa no ha sido determinada.

Las proteínas GPBP<sup>(1)</sup> han sido relacionadas con diversas condiciones autoinmunes (Raya *et al.* 2000). Así, en riñones afectados por la enfermedad de Goodpasture, la expresión de GPBP es entre 3 y 4 veces superior a la detectada en riñones control, y en experimentos *in vitro* GPBP cataliza la síntesis de confómeros de  $\alpha3(\text{IV})\text{NC1}$  que son característicos del estado de enfermedad (Saus 2005), lo que sugiere *a priori* que GPBP es parte de la

(1) En adelante, el término GPBP y su plural GPBPs se utilizarán para hacer referencia genérica a proteínas procedentes de *COL4A3BP* sin especificar isoformas.

maquinaria que cataliza la formación de la red de colágeno IV *in vivo* y que su forma de operar está alterada en la condición autoinmune. De hecho, en experimentos realizados con ratones transgénicos que expresan GPBP-1 humana (Tg-hGPBP-1) de forma no regulada, se induce una glomerulonefritis que cursa con una alteración en la organización de las redes de colágeno IV de la MBG (Revert *et al.* 2007), tal y como se advierte en la Fig. 3.



**FIG. 3. Micrografía electrónica de la MBG en un ratón transgénico que expresa GPBP humana.** Se advierte la fusión defectuosa de los componentes epitelial y endotelial (flechas) de la MBG, con la formación de “ojales” en el seno del componente epitelial (recuadro). En condiciones normales los dos componentes endotelial y epitelial permanecen fusionados sin solución de continuidad. Imagen procedente de la referencia Revert *et al.* 2007. (Barra 0.2  $\mu$ m)

### **1.2 La expresión de *COL4A3BP*, el gen que codifica GPBP, está relacionada con múltiples fenómenos biológicos.**

Hasta la fecha se han publicado diversos estudios con modelos animales en los que limitando la expresión de genes ortólogos de *COL4A3BP* se ha demostrado la relevancia del gen en el desarrollo. De este modo, el gen ortólogo de *Drosophila melanogaster* codifica una única proteína de 601 residuos (*GenBank accession* NP\_648199) cuya ausencia provoca estrés oxidativo y acortamiento de la vida en esta especie (Rao *et al.* 2007). En pez cebra (*Danio rerio*), *col4a3bp* genera dos mRNAs (EU000165 y EU000166) que

## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

codifican los polipéptidos *gbbp-1* y *gbbp-2*, ortólogas de las proteínas GPBP-1 y GPBP-2 (Granero-Moltó *et al.* 2008). *Gbbp-1* desempeña un papel importante y específico en el desarrollo embrionario del cerebro y del tejido muscular, pues su ausencia provoca apoptosis en estos tejidos, de modo que la sobreexpresión de *gbbp-2* no supe la falta de *gbbp-1* (Granero-Moltó *et al.* 2008). En ratón (*Mus musculus*), el gen *Col4a3bp* también genera las dos isoformas mGPBP-1<sup>(2)</sup> y mGPBP-2 (AF232932 y AF232934, respectivamente). Se ha demostrado que la ablación completa de la expresión de *Col4a3bp* en ratones *knockout* produce inviabilidad del embrión y muerte intrauterina. A diferencia de los resultados obtenidos en pez cebra, en este estudio, no se detectó muerte celular en los embriones de ratón, que abortaron de forma espontánea presentando degeneración mitocondrial (Wang *et al.* 2009).

### **1.3 Los productos de *COL4A3BP* se expresan mayoritariamente en el músculo estriado e interaccionan con una nueva familia de proteínas, las proteínas GIP.**

El gen *COL4A3BP* presenta su mayor nivel de expresión en músculo esquelético y cardíaco, de acuerdo con estudios previos de *Northern blot* (Raya *et al.* 1999). En vistas a esclarecer si GPBP pudiera actuar sobre alguna proteína muscular de manera similar a como lo hace con el colágeno en la MBG, se buscaron posibles sustratos de GPBP en músculo esquelético mediante la técnica de dos-híbridos en levadura. Se identificó así un fragmento de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) de 800pb, denominado I-20, a partir del cual se efectuó la clonación molecular de 5 cDNAs no

(2) En adelante se usará el término mGPBP para hacer referencia genérica a las proteínas producidas por *Col4a3bp*.

descritos previamente que resultaron proceder del gen *FILIP1L* (*Filamin A Interacting Protein 1-like*) situado en la región genómica 3q12, del que también procedía un cDNA previamente descrito (U53445) que codificaba una proteína conocida como *Downregulated in Ovarian Cancer 1* (DOC1) (Mok *et al.* 1994). Las nuevas proteínas FILIP1L se unían de forma específica a GPBP-1, por lo que fueron denominadas GIP (*GPBP-Interacting Proteins*). Todas contienen características propias de proteínas estructurales, como una región para la que se predice estructura superhelicoidal (*coiled-coil*) y cremalleras de leucina. Cuatro de estas isoformas son de aproximadamente 130 kDa: GIP130a (AF514867), GIP130b (AF514868), GIP130c (AF514869), GIP130d (AY642382) y una de ellas, GIP90 (AF329092) de aproximadamente 90 kDa. Por otra parte, estudios de *Northern blot* demuestran que aunque el gen *FILIP1L* tiene amplia expresión en tejidos humanos, las proteínas GIP tienen expresión preferencial en músculo esquelético y cardíaco (Revert-Ros 2004), que son también los tejidos de expresión dominante para las proteínas GPBP (Raya *et al.* 1999).

### **1.4 El músculo y el sarcómero.**

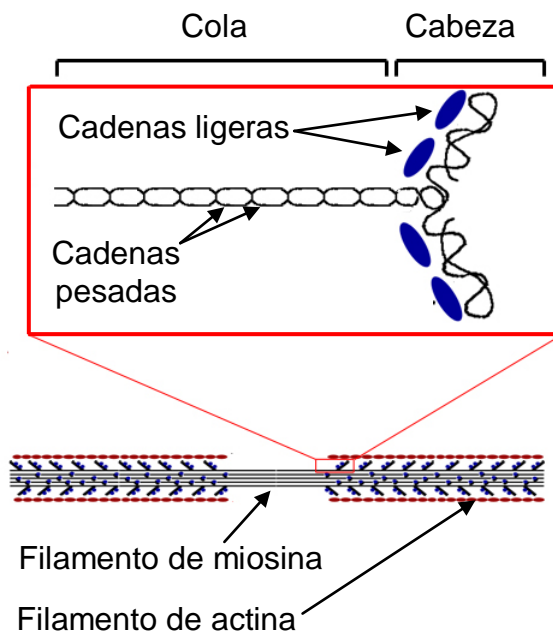
El músculo esquelético constituye más de la mitad del peso corporal del ser humano. Su función principal es generar movimientos coordinados tanto voluntarios como involuntarios, y se caracteriza y diferencia de otros tejidos musculares por permanecer anclado al esqueleto. El proceso de formación y determinación de células musculares se denomina miogénesis, que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, y en los procesos de mantenimiento, desarrollo y reparación muscular.

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

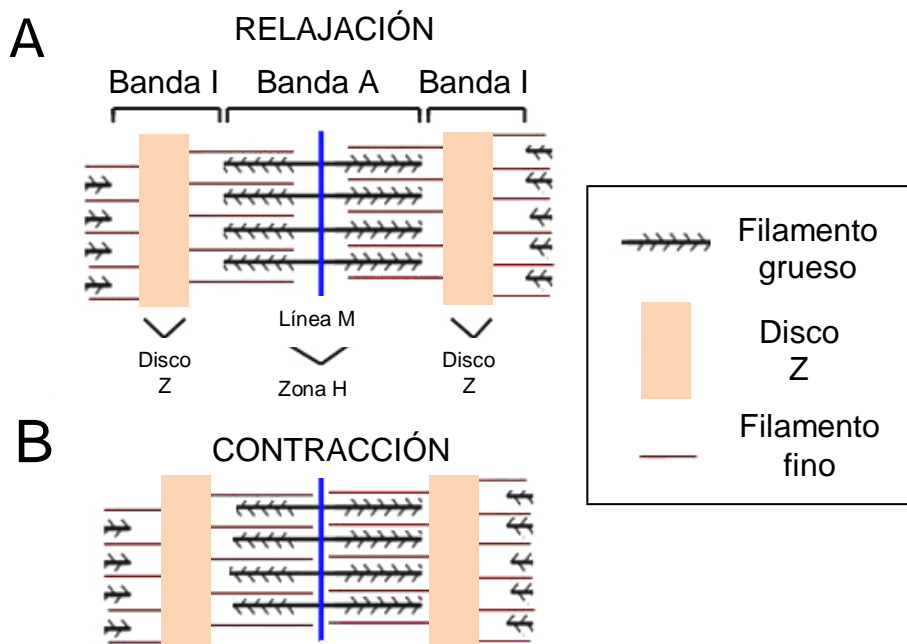
Durante la miogénesis, los cambios de expresión génica que se producen en los miocitos permiten que se fusionen y que formen fibras musculares (miotubos), al tiempo que se modifica su citoesqueleto y se generan las miofibrillas (Bassel-Duby y Olson, 2006; O'Connor *et al.* 2008), que constituyen la maquinaria contráctil del músculo. En las miofibrillas se distinguen dos tipos de filamentos: los filamentos gruesos, compuestos principalmente por miosina muscular, la cual constituye más del 50% de la masa proteica de la miofibrilla; y los filamentos finos, formados fundamentalmente por actina, que supone a su vez el 20% de la masa proteica miofibrilar.

Tal y como se esquematiza en la Fig. 4, la miosina muscular tiene estructura cuaternaria hexamérica, con dos cadenas pesadas (220 kDa) y cuatro ligeras (17-20 kDa), y en ella se distinguen dos cabezas globulares y una cola de estructura superhelicoidal (*coiled-coil*). Las moléculas de miosina se asocian a través de sus colas para formar los filamentos gruesos, y a través de sus cabezas establecen interacciones con los filamentos finos, formados principalmente por actina polimerizada.



**FIG. 4. Esquema de la asociación de los filamentos de actina con la miosina en las miofibrillas.** Se esquematiza la ubicación de las cadenas ligeras y pesadas que componen la cabeza y la cola de un hexámero de miosina muscular.

La unidad básica de las miofibrillas es el sarcómero. En los sarcómeros se distinguen las bandas A (regiones con miosina), que están separadas unas de otras por bandas I (regiones sin miosina). En el centro de las bandas A se sitúa la zona H y dentro de esta se encuentra la línea M, donde se cruzan las colas de cadenas pesadas de miosina orientadas en sentidos opuestos. En el centro de la banda I se ubica el disco Z, en el que se anclan los filamentos de actina de dos sarcómeros adyacentes (Fig. 5). Las líneas M y discos Z confieren rigidez a la estructura de la miofibrilla. Se entiende por sarcómero la región de una miofibrilla comprendida entre dos discos Z consecutivos. En la contracción muscular los filamentos de actina se deslizan sobre los de miosina, con lo que se aproximan los discos Z entre sí y se acorta el sarcómero (Craig y Padrón, 2004; Guyton y Hall, 2006).



**FIG. 5. Esquema representativo de la estructura del sarcómero en relajación y contracción.** Se representa la ubicación de los filamentos gruesos (miosina) y los filamentos finos (actina) en un sarcómero relajado (A) y contraído (B). En la contracción muscular, los filamentos finos se deslizan sobre los gruesos por acción de las cabezas de miosina. La distancia entre discos Z se reduce y el grosor de la zona H disminuye.

### 1.5 Planteamiento de objetivos.

Teniendo en cuenta que: **1)** GPBP-1 regula la formación de estructuras supramoleculares de colágeno IV en la membrana basal glomerular, **2)** GPBP-1 es necesario para la miogénesis en pez cebra, y **3)** las proteínas que interaccionan con GPBP (GIP) son estructurales y se expresan principalmente en músculo estriado, se planteó la cuestión de si las proteínas GPBP podrían organizar en el músculo la formación de las miofibrillas, con la participación de las proteínas GIP, de modo análogo a como GPBP regula la formación de la red de colágeno a través de su interacción con la cadena  $\alpha 3(\text{IV})$ .



Por todo ello, el objetivo principal del presente trabajo es:

Profundizar en el estudio de las funciones de las proteínas GPBP en el músculo usando modelos celulares y animales modificados genéticamente, prestando especial atención a la formación de miofibrillas, así como estudiar la participación de las proteínas GIP en el cumplimiento de los cometidos de GPBP en el tejido muscular.



# **METODOLOGÍA**



## 2 METODOLOGÍA

### 2.1 Modelos animales.

Se obtuvieron ratones que no expresaban GPBP-1 y -3. Los ratones se obtuvieron por eliminación selectiva del exón 11 del gen *Col4a3bp* del ratón. Las secuencias específicas que permiten la escisión del material genético se integraron por recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón, a ambos lados del exón 11 del gen *Col4A3bp*. El exón 11 codifica una región de veintiséis residuos exclusivos de mGPBP-1 y -3 (Revert-Ros *et al.* 2011).

La obtención de ratones transgénicos Tg-hGPBP-1 que expresan la proteína recombinante humana fusionada al péptido señal FLAG ha sido descrita anteriormente (Revert *et al.* 2007).

### 2.2 Anticuerpos.

Se emplearon anticuerpos policlonales de conejo para la detección de la cadena pesada de miosina muscular (Abcam), de actina (Sigma), actinina (Sigma), Akt (Cell Signalling Technology) y GRP78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa) (Sigma). Se usaron anticuerpos monoclonales de ratón para la detección de la señal FLAG (Sigma), de tubulina (Sigma) y de la cadena pesada de la miosina muscular (Sigma). Para detectar gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón cedidos por Erwin Knecht. La detección de VAP-A (*Vesicle-associated*

## METODOLOGÍA

---

*membrane protein-associated protein A*) se hizo con anticuerpos policlonales de cabra (Santa Cruz Biotechnology).

En nuestro laboratorio se obtuvieron y caracterizaron anticuerpos contra proteínas GPBP y GIP (Raya *et al.* 1999; Revert *et al.* 2008; Miralem *et al.* 2010; Revert-Ros *et al.* 2011). Para detectar de manera específica las isoformas del gen *FILIP1L* que expresan los exones 1-4 (las proteínas GIP), se utilizaron los anticuerpos monoclonales (mAb) de ratón mAb-3<sub>GIP</sub>. Para detectar tanto proteínas GIP como FILIP1L-102, así como otras isoformas y proteínas ortólogas de ratón, se utilizaron los anticuerpos monoclonales de ratón mAb-8<sub>GIP</sub>. Para detectar las proteínas de ratón mGPBP-1 y mGPBP-3 se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón mAb-e26, y las isoformas GPBP-1, -2 humana y de ratón se detectaron con anticuerpos monoclonales de ratón mAb-14 o mAb-N27. En ocasiones la detección de estas isoformas se llevó a cabo con anticuerpos policlonales purificados a partir de suero de conejos inmunizados con GPBP-1 conjugada a glutatión-S-transferasa (GST). En estos casos, los sueros inmunes se sometieron a cromatografía de afinidad en una columna de GST-GPBP-1 para purificar los anticuerpos, y posteriormente se eliminaron los anticuerpos contra GST utilizando otra columna de afinidad cargada con proteína GST. Además, también se utilizaron anticuerpos comerciales policlonales contra GPBP obtenidos en pollo (Abcam).

En los estudios de *Western blot*, *far Western* e inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos secundarios, anti-IgG de ratón y de conejo (Promega), anti-IgG de cabra y anti-IgY de pollo (Sigma) conjugados con peroxidasa de rábano (HRP).

Para las inmunofluorescencias se emplearon anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (Molecular Probes) o tetrametilrodamina-5-6-isotiocianato (TRITC) (Sigma), anti-IgG de cabra conjugados con TRITC (Sigma), y anti-IgG de conejo conjugados con Alexa Fluor 647 (Invitrogen).

### **2.3 Cultivos celulares.**

Las células HeLa se cultivaron en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 1% L-glutamina. Las células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*) fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de SBF. Las células C2C12 fueron cultivadas en DMEM con 20% de SBF para su propagación y en DMEM con 2% de suero de caballo (SC) para inducir su diferenciación. Todos los medios usados en cultivos celulares contenían 1% de penicilina/estreptomina.

Los cultivos primarios de mioblastos de ratón se obtuvieron a partir de ratones macho *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (n=2) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (n=2) de tres meses de edad, y de ratones macho Tg-hGPBP-1 (n=2) y de sus controles (n=2) de dos meses de edad, esencialmente según un método descrito previamente (Frock *et al.* 2006). En el procedimiento, los cuádriceps de los ratones fueron diseccionados y procesados de manera individualizada. Los músculos fueron divididos en pequeños trozos con la ayuda de un bisturí y digeridos con colagenasa tipo II (375 U/mL) en medio F10 (GIBCO), durante 1 hora a 37 °C. Tras esta incubación, los fragmentos musculares fueron disgregados con la ayuda de una

## **METODOLOGÍA**

---

pipeta en medio F10 suplementado con 15% de SC, 1% de penicilina/estreptomicina y 1,2 mM de CaCl<sub>2</sub>, y posteriormente transferidos a placas previamente tapizadas con gelatina (Sigma) al 0,67%. Para favorecer el crecimiento e impedir la diferenciación de los mioblastos, se añadió al medio de cultivo factor de crecimiento de fibroblastos recombinante humano (Biosource), a una concentración de 4 ng/mL, repitiéndose el tratamiento cada 12 h. En este medio de cultivo los mioblastos fueron cultivados hasta su inmortalización en placas tapizadas con gelatina, con cambios de placa cada 3 días, tras lo que fueron adaptados al medio de crecimiento de las células C2C12. La diferenciación de estos mioblastos se indujo de manera análoga a la de los mioblastos C2C12.

### **2.4 Vectores, oligonucleótidos y construcciones de cDNA.**

Para la expresión transitoria de proteína GPBP en C2C12 se utilizó la construcción pc-FLAG-n4' (Raya *et al.* 1999), obtenida a partir del vector pcDNA3 (Invitrogen), y que expresa la proteína GPBP-1 con el péptido FLAG fusionado en posición N terminal. Para el desarrollo de una línea celular de HEK 293 con expresión inducible de GPBP-1 se utilizó el vector pTet-On (Contech) y la construcción pTRE2hyg-n4', que se obtuvo insertando el cDNA completo de GPBP-1 n4' (GenBank accession AF136450) en el vector pTRE2hyg (Clontech).

Las construcciones plasmídicas pcDNA3-FLAG-GIP130a, pRK5-c-Myc-hL-FILIP, pRK5-c-Myc-GIP130a, pRK5-c-Myc-GIP130b, pRK5-c-Myc-GIP130c, pRK5-c-Myc-GIP130d, pRK5-c-Myc-GIP90 y pRK5-c-Myc-FILIP1L-102,



utilizadas para expresar las correspondientes proteínas recombinantes con secuencias FLAG o c-Myc en posición N terminal, se obtuvieron mediante técnicas estándar de DNA recombinante usando los vectores pcDNA3 (Invitrogen) o pRK5-c-Myc (suministrado por Jacques Camonis). Para la obtención de los cDNAs de GIP130a, GIP130d y GIP90, 5 µg de RNA de músculo esquelético humano fueron sometidos a retrotranscripción (RT) con el oligonucleótido ON-GIP-EX6c (5'-TAGAAGAAAACGATTTTTTAATAAAA-3'), seguida de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con ON-GIP-10m (5'-CTGAGAGGGTGTCCAAAAAGAGAAG-3') y ON-GIP-EX6c, y de una segunda PCR anidada con ON-GIP-12m (5'-GGAATTACCAGGTGTGATCAACAC-3') y ON-GIP-8c (5'-GACTGGGATTTGGAATGCC-3'). Para obtener el cDNA de FILIP1L-102, una biblioteca de cDNA de músculo esquelético humano fue sometida a PCR con los oligonucleótidos ON-DOC1m (5'-AAAGGATCCATGGTGGTGGATGAACAGC-3') y ON-DOCS (5'-AAAAAAGTCGACCAGTATGGACTGGATGAG-3'). Los cDNAs de GIP130b y GIP130d se obtuvieron de forma similar mediante RT con el oligonucleótido ON-DOC-1c (5'-TAAGTGCACACTCGATATGAC-3'), seguida de una primera PCR con ON-GIP-10m y ON-DOC-1c, y de una segunda PCR anidada con ON-GIP-12m y ON-DOCS. Una estrategia similar se utilizó para obtener el cDNA de L-FILIP, utilizando para la RT ON-KIAA-c (5'-AAAAGCTTATACCCCCTTAGCCACTGCCC-3') y ON-hKIAA-m (5'-AAAAAAGGATCCATGAGATCTCGAAACCAAGGTG-3') y ON-hKIAA-c (5'-AAAAAAGTCGACTCAGCCCTTCCCCCTGG-3') para la PCR.

## **METODOLOGÍA**

---

Para obtener el cDNA de GIP130 de ratón (mGIP130), RNA de miotubos C2C12 fue sometido a RT con el oligonucleótido ON-XRm-1c (5'-CTGCATAGTCACATCAAGTGT-3') seguida de dos PCRs anidadas, primero con ON-XRm-1m (5'-GTGCTCAGGCTCCACTGCTG-3') y ON-XRm-1c, y después con ON-XRm-2m (5'-GAGAACGGCCAGGCGTGATG-3') y ON-XRm-2c (5'-CCAGATACTCTTGTTTCAGTC-3'). El cDNA de FILIP1L-102 de ratón (mFILIP1L-102) se obtuvo de modo similar usando ON-XRm-1c para la RT, ON-mDOC-mod (5'-GGCGCCCGCAGCTCAGA-3') y ON-XRm-1c para la primera PCR, ON-mDOC 1m (5'-GCCCGCAGCTCAGATTAAAGAA-3') y ON-XRm-2c para la segunda PCR.

En todos los casos los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa y los productos clonados en los vectores correspondientes y la fidelidad de los fragmentos clonados determinada mediante secuenciación nucleotídica.

Para expresar la proteína GIP130a con la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) en posición C terminal (GIP130-EGFP), se obtuvo la construcción pRK5-c-Myc-GIP130a-EGFP modificando la construcción previa pRK5-c-Myc-GIP130a mediante inserción del cDNA de EGFP del plásmido p-EGFP-N1 (Clontech), en posición 3' respecto al cDNA de GIP130a. A partir de pRK5-c-Myc-GIP130a-EGFP se eliminó el cDNA de GIP130a y se generó pRK5-c-Myc-EGFP, utilizado como control en nuestros ensayos.

Para los estudios de silenciación del gen *Col4a3bp* y de mGIP130 en células de ratón C2C12, se utilizó un método basado en la expresión de RNA horquilla corta o *short hairpin RNA* (shRNA) desarrollado con el sistema pSilencer™ 2.1-U6 hygro (Ambion). Las características de las construcciones utilizadas en estos experimentos se detallan a continuación:

- pSi-GPBP/GPBP $\Delta$ 26-2, descrito previamente (Revert *et al.* 2008), y que genera un shRNA dirigido contra todos los mRNAs humanos de GPBP: 5'-ACAGAGUAUGGCUGCAGAG-3'. Pese a diferir en tres bases respecto a la secuencia homóloga del mRNA correspondiente de ratón, el plásmido resultó eficaz para silenciar las isoformas de GPBP en células C2C12.
- pSi-U6-mGIP-2 genera un shRNA dirigido contra los mRNAs murinos que codifican proteínas GIP (principalmente GIP130): 5'-GAAGAGUGAUGAAUUCAUA-3'.

### **2.5 Expresión transitoria de proteínas recombinantes.**

Se realizó mediante transfección con el sistema de fosfato de calcio (Promega) o con Lipofectamina (Invitrogen), siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

### **2.6 Obtención de clones estables.**

Las líneas de C2C12 silenciadas para el gen *Col4a3bp* y para mGIP130 se obtuvieron transfectando las células mediante el sistema de fosfato de calcio (Promega) con la construcción correspondiente (ver apartado 2.4). Después de la transfección las células fueron cultivadas en medio de crecimiento suplementado con higromicina (InvivoGen) a 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como antibiótico selector. Las colonias resistentes que aparecieron fueron cultivadas posteriormente en placas separadas, reduciéndose a 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  la concentración del higromicina del medio de cultivo. Siguiendo el mismo método, transfectando el plásmido pSilencer™ 2.1-U6 hygro (Ambion) se obtuvieron las líneas control.

Para obtener una línea celular que expresaba GPBP-1 de modo inducible (293-n4'), un millón de células HEK 293 fueron transfectadas con 10  $\mu\text{g}$  de plásmido pTet-On y se obtuvo un clon resistente cultivando las células con 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de geneticina. Un millón de células de este clon fueron transfectadas con 10  $\mu\text{g}$  de pTRE2hygro-n4, y posteriormente seleccionadas y propagadas con 200 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de higromicina, respectivamente.

### **2.7 Extracción de RNA.**

El RNA de muestras de tejidos o células cultivadas se aisló utilizando TRI-REAGENT (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

## **2.8 Técnicas de PCR.**

Para ensayos de PCR se empleó DNA polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) (Stratagen), *Expand Long Template PCR System* (Roche) o *AmpliTaq GOLD polymerase* (Applied Biosystems).

## **2.9 Genotipado de ratones y mioblastos.**

Para el genotipado de los ratones, se cortaron 0,5 cm de la parte terminal de la cola de cada ratón siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de Ética para el Bienestar Animal (CEBA). A partir de cada muestra de tejido se purificó DNA con el *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante, que se utilizó como molde en dos ensayos de PCR (PCR-1 y PCR-2) en los que se emplearon como cebadores de la reacción la parejas de oligonucleótidos cuyas secuencias se detallan a continuación.

- Oligonucleótidos utilizados como cebadores en el ensayo de PCR-1:  
ON-LoxP71F (5'-CTCTTCTCAGGAATTTAGGTAGGAAGGG-3')  
ON-LoxP71R (5'- GCAGCAAGTGCTGGACTCCACGCACC-3')
  
- Oligonucleótidos utilizados como cebadores en el ensayo de PCR-2:  
ON-Lox71F y ON-KOE11R (5'-TACTATAATCCCAGTGAAGGGTCAGG-3')

Las PCRs se llevaron a cabo en un termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) utilizando la polimerasa *AmpliTaq GOLD*

## **METODOLOGÍA**

---

*Polymerase* (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 3 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 45 seg a 94 °C, 15 seg a 60 °C y 20 seg a 72 °C, con un período final de extensión de 5 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón Tris Acetato EDTA (TAE), y visualizados con bromuro de etidio y luz ultravioleta (UV).

Se utilizó el mismo sistema de PCR y los mismos oligonucleótidos para confirmar la procedencia de los mioblastos extraídos de ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>*.

### **2.10 Análisis de la expresión de genes mediante RT- PCR.**

Para estudios de expresión de *Col4a3bp*, 75 ng de RNA total de tejido o de mioblastos de ratón fueron sometidos a RT con el sistema *Ready-To-Go-You-Prime-First* (GE Healthcare), y el cDNA resultante se amplificó y analizó esencialmente como se indica en el apartado anterior.

Para cuantificar la expresión de mRNA por PCR cuantitativo, se utilizó el mismo sistema de RT pero para la amplificación del cDNA correspondiente se utilizó la polimerasa *AmpliTaq GOLD* y el sistema *SYBR Green PCR Master Mix* con un detector *SDS 5700* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- En los estudios de cuantificación de mGPBP-1 y mGPBP-3, se utilizaron como cebadores los oligonucleótidos ON-GPBP-26-1F (5'-GCTGTTGAAGCTGCTCTTGACA-3') y ON-GPBP<sub>e</sub>26-1R (5'-CCTGGGAGCTGAATCTGTGAA-3'), y en los de mGPBP-2 los oligonucleótidos ON-GPBP-26-1F y ON-GPBP-26-1R (5'-TCTCTTCAACCTTTTGGACA-3').
- La expresión de mGIP130 en líneas celulares de C2C12 con mGIP130 silenciado se cuantificó de forma análoga utilizando para la PCR los cebadores ON-mGIP-9m (5'-AGCGAGAGGGTGCCCAAAA-3') y ON-mGIP-9c (5'-ATCACGCCTGGCCGTTCT-3').
- Para normalizar los resultados de PCR cuantitativa se determinaron los niveles de expresión de GAPDH con los oligonucleótidos ON-GAPDH-m (5'-GGGAAGCCCATCACCATCT-3') y ON-GAPDH-c (5'-CGACATACTCAGCACCGGC-3'). Los cálculos se realizaron con el método de  $\Delta\Delta C_t$  (delta-delta ciclo umbral).
- Las PCRs sobre librerías de cDNA para valorar la expresión del exón IX se realizaron con los oligonucleótidos ON-I20-4m (5'-GAAGGTATGCTAATGAACGAG-3') y ON-DOC-1c para las PCRs intra-exón VIII, y con los oligonucleótidos ON-I20-4m y ON-GIP-8c para las PCRs inter-exones VIII-IX.

## **METODOLOGÍA**

---

- Las PCRs convencionales realizadas para valorar la expresión de mGPBP-1, -2 y -3 en músculo de ratón se llevaron a cabo con los oligonucleótidos ON-GPBP-26-1F y ON-2c-RAT (5'TGTGGTTCTGTACCATTTCTTCAA-3').
- La expresión de los cDNAs de mGIP130 y mFILIP1L-102 por PCR convencional en células C2C12 se detectó con los oligonucleótidos utilizados para la obtención del cDNA que codifica cada proteína (apartado 2.4.)

### **2.11 Aislamiento de miofibrillas.**

El aislamiento de miofibrillas de ratón se realizó esencialmente según el método descrito por McGrath *et al.* (2006). Específicamente, los animales fueron sacrificados por asfixia con CO<sub>2</sub>. Las patas traseras se escindieron e incubaron con 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 75 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA), 0,5% Triton X-100, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y 10 µg/mL de leupeptina (tampón de rigidez), durante 24 h a 4 °C con agitación suave. Pasado este tiempo, los músculos fueron extraídos con pinzas y bisturí, eliminándose la piel, la grasa y el hueso. Las piezas musculares se recogieron en un tubo, se resuspendieron en tampón de rigidez frío sin Triton X-100 (5 mL/g) y se homogeneizaron con un *polytron* (Omni International) en dos intervalos de 30 seg. Las miofibrillas se aislaron por centrifugación a 1500 x g durante 10 min, y fueron lavadas tres veces con tampón de rigidez sin Triton X-100. Los sedimentos, que contenían las



miofibrillas aisladas, se resuspendieron en tampón de rigidez (sin Triton-X100) que contenía glicerol al 50%, y fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

### **2.12 Obtención y cuantificación de extractos de proteína.**

Los extractos de proteína muscular de ratón se obtuvieron a partir de gastrocnemio o diafragma. Tras el sacrificio del animal, los músculos fueron diseccionados, congelados en nitrógeno líquido y guardados a -80 °C hasta su uso. Para facilitar la extracción, en primer lugar se pulverizó el tejido muscular congelado sobre un mortero enfriado con nitrógeno líquido. El polvo muscular fue homogeneizado con *polytron* en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% dodecil sulfato de sodio (SDS), 10 µg/mL leupeptina y 1 mM PMSF. Los homogeneizados fueron mantenidos 30 min en hielo, aclarados por centrifugación (16000 x g, 5 min a 4 °C) y almacenados a -20 °C hasta su análisis. Los extractos de proteína muscular humana se obtuvieron de modo similar a partir de biopsias de donantes anónimos.

Para la extracción de proteínas, los cultivos celulares fueron lavados dos veces con tampón fosfato salino, pH 7.4 (PBS) y lisados durante 30 min a 4 °C en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10 µg/mL leupeptina y 1 mM PMSF. Para el análisis de expresión de Akt se lisaron en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1% Twen 20, 0,2% Nonidet P-40, 50 mM β-glicerofosfato de sodio, 0,2 mM ortovanadato de sodio, 10 µg/mL leupeptina y 1 mM PMSF. Los lisados fueron procesados y almacenados como los homogeneizados. En algunos casos, los lisados almacenados fueron

## METODOLOGÍA

---

descongelados y tratados con  $\lambda$ -fosfatasa (New England Biolabs) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Cuando se indica, miofibrillas de ratón previamente aisladas se lavaron tres veces en tampón de rigidez sin Triton X-100, se resuspendieron en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% SDS, 10  $\mu$ g/mL leupeptina, 1 mM PMSF y se incubaron durante 30 min a 4 °C. Los extractos obtenidos fueron tratados como los lisados y homogeneizados.

Los extractos de proteínas solubles y del citoesqueleto de mioblastos C2C12 en diferenciación se obtuvieron esencialmente según el método descrito por Clark *et al.* (2008). Los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se lisaron durante 10 minutos a 4 °C con tampón de extracción de citoesqueleto (50 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 2  $\mu$ g/mL de aprotinina y 2  $\mu$ g/mL de leupeptina). Los lisados fueron centrifugados a 16000 x g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes (fracción soluble) fueron recogidos y almacenados a -20 °C hasta su uso. El material precipitado (fracción insoluble que contiene el citoesqueleto) fue lavado tres veces con tampón de extracción, resuspendido en el mismo tampón y almacenado a -20 °C. La extracción de proteínas de cada fracción se completó con tampón de carga para electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Cantidades equivalentes de los extractos soluble e insoluble de cada muestra fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos apropiados.

La concentración en todos los extractos de proteínas solubles fue determinada con el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

### **2.13 Purificación de proteínas.**

Células de la levadura *Pichia pastoris* de la cepa GS115 (Invitrogen) fueron transformadas con pHIL-FLAG-GIP130a-poliHis (Revert-Ros 2004; Revert-Ros *et al.* 2011) mediante electroporación utilizando *Electroporator II* (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron diversos clones de levadura transformados, en los que la expresión de la proteína recombinante se comprobó mediante *Western blot* con anticuerpo anti-FLAG, y el clon con mayor nivel de expresión fue utilizado para producir la proteína recombinante. El clon se cultivó en un fermentador Biostat A (B. Braun Biotech International), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células de 300 mL coleccionadas mediante centrifugación se rompieron con bolas de vidrio (Sigma) en 300 mL de solución de rotura desnaturizante (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 1% Triton X-100, 0,5% SDS, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM PMSF). Los fragmentos celulares fueron eliminados con dos centrifugaciones consecutivas a 4000 x g durante 10 min y a 45000 x g durante 20 min. El sobrenadante final fue incubado con 3 mL de resina Talon™ Metal Affinity Resin (Clontech) con agitación suave durante 12 h. La resina fue introducida posteriormente en un cartucho de plástico para formar una columna, y lavada con 50 mL de 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 100 mM NaCl. La proteína unida a la resina fue eluida con cinco volúmenes de columna de 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 100 mM NaCl, 100 mM imidazol. La proteína purificada fue posteriormente

## **METODOLOGÍA**

---

dializada contra concentraciones decrecientes de urea (6, 4, 2 y 0 M) en tampón Tris salino (TBS) para evitar la formación de agregados insolubles.

Para purificar GPBP-1 recombinante humana generada en levadura (rGPBP-1) se siguieron procedimientos similares con levaduras transformadas con pHIL-FLAG-n4' (Raya *et al.* 1999), empleándose en este caso solución de rotura no desnaturizante (40 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glicerol, 1 mM PMSF). El sobrenadante final obtenido se incubó con 3 mL de resina anti-FLAG Affinity Resin (Sigma), se empaquetó en columna, la columna fue lavada con 50 mL de solución de rotura no desnaturizante, y la proteína retenida eluida con cinco volúmenes de una solución de 100 µg/mL de péptido FLAG en TBS.

Las proteínas purificadas fueron caracterizadas por SDS-PAGE seguida de tinción con azul de *Coomassie* o de *Western blot*.

Todos los procedimientos se realizaron a 4 °C desde el momento en que se rompían las células.

### **2.14 Inmunoprecipitaciones.**

La proteína GPBP-1 con el péptido FLAG fusionado en posición N terminal (FLAG-GPBP-1) fue extraída durante 16 h con resina anti-FLAG (Sigma) a partir de lisados de mioblastos de ratón Tg-hGPBP-1, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para co-inmunoprecipitar mGPBP y mGIP130, 500  $\mu$ g de extractos de diafragma, fueron llevados a 150 mM NaCl, preclarados con 50  $\mu$ L de proteína A-sefarosa (2 h a 4 °C), e incubados con o sin anticuerpos N27 (5  $\mu$ g) durante 16 h y posteriormente extraídos con 50  $\mu$ L de proteína A-sefarosa durante 2 h.

Para co-inmunoprecipitar GPBP-1 y GIP130, células 293-n4' fueron transfectadas con pRK5-c-Myc-GIP130a o con pRK5-c-Myc durante 24 h a 37 °C. Posteriormente los cultivos fueron incubados con 1  $\mu$ g/mL de doxiciclina durante otras 24 h para inducir la expresión de GPBP-1, tras lo que las células fueron lisadas y los extractos inmunoprecipitados con resina anti-c-Myc-agarosa (Sigma) durante 24 h.

Para co-inmunoprecipitar miosina miofibrilar y GIP130, miofibrillas de ratón fueron centrifugadas a 16000 x g durante 5 min, resuspendidas en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 8 M urea y sonicadas. El material así solubilizado (500  $\mu$ g) fue dializado durante 16 h frente a TBS en presencia o ausencia de 2  $\mu$ g/mL de FLAG-GIP130 expresada en levadura. Los dializados fueron centrifugados a 1000 x g durante 3 min y los sobrenadantes fueron inmunoprecipitados con resina anti-FLAG-agarosa durante 16 h (Sigma).

Las extracciones de proteínas y las inmunoprecipitaciones se efectuaron a 4 °C. Las resinas se hicieron sedimentar por centrifugación (1000 x g, 1-3 min), fueron lavadas tres veces con tampón 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (15 min), resuspendidas en tampón de carga reductor para

SDS-PAGE y calentadas a 100 °C durante 3 min. Las inmunoprecipitaciones fueron analizadas por *Western blot* con anticuerpos apropiados.

### **2.15 Ensayos de *far Western***

Para estudiar la interacción de GIP130 con la miosina muscular, extractos de miofibrillas de ratón fueron analizadas mediante SDS-PAGE y el gel fue teñido con azul de *Coomassie*, o sometido a electrotransferencia a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana fue bloqueada con leche desnatada al 5% en tampón Tris salino-Tween 20 (TBST) durante 45 min a temperatura ambiente, y después incubada durante 2 h a 37 °C con GIP130 recombinante purificada generada en levadura (rGIP130) (1 µg/mL). Tras la incubación, y después de tres lavados de 5 min con un TBST suplementado con NaCl hasta conseguir una concentración de 500 mM NaCl, la proteína rGIP130 unida a miosina fue detectada con anticuerpos monoclonales mAb-3<sub>GIP</sub> y anticuerpos secundarios apropiados. Para estudiar la interacción de GPBP-1 con VAP-A, rGPBP-1 fue analizada mediante SDS-PAGE, el gel fue teñido con azul de *Coomassie*, o sometido a electrotransferencia a una membrana de PVDF. La membrana fue bloqueada, incubada con 1 µg/mL de VAP-A (GenWay Biotech) en TBST durante 1 h a 37 °C, lavada tres veces con TBST, e incubada con anticuerpos específicos contra VAP-A y anticuerpos secundarios apropiados.

### **2.16 Ensayos de fosforilación *in vitro*.**

Las proteínas recombinantes fueron incubadas en 25 mM  $\beta$ -glicerofosfato (pH 7.0), 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 8 mM  $MgCl_2$ , 5 mM  $MnCl_2$ , 95 mM NaCl, 1 mM DTT y 0.132  $\mu$ M [ $^{32}P$ - $\gamma$ ] ATP, en un volumen total de 50  $\mu$ L, durante 10 min a 30° C. La reacción se detuvo con 10  $\mu$ L de 8 M urea, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2.5%  $\beta$ -mercaptoetanol, las mezclas fueron analizadas por SDS-PAGE, *Western blot* y autorradiografía, y las proteínas detectadas con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma) usando el kit *ChemiLucent* (Chemicon International).

### **2.17 Cálculo de la actividad citocromo c oxidasa**

Mitocondrias de tejido cardíaco o de tejido muscular fresco de ratón fueron aisladas con el *Mitochondria Isolation Kit* (Sigma), y la actividad citocromo c oxidasa mitocondrial fue determinada con el *Cytochrome c Oxidase Assay Kit* (Sigma).

### **2.18 Inmunofluorescencias de miofibrillas aisladas y cultivos celulares**

En una placa de cultivos de 24 pocillos con cristales tapizados durante 4 h con 1% poli-L-lisina (Sigma), se dispensó una suspensión de miofibrillas de ratón (100  $\mu$ L/pocillo). La placa fue incubada a 4 °C durante 16 h y posteriormente llevada a temperatura ambiente. Las miofibrillas inmovilizadas fueron lavadas tres veces con PBS, fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min, y bloqueadas durante 30 min con 10% SC y 1% BSA (albúmina sérica

## **METODOLOGÍA**

---

bovina) en PBS. Posteriormente, las miofibrillas fueron incubadas durante 2 h en cámara húmeda con anticuerpos específicos diluidos en 1% BSA en PBS, lavadas tres veces durante 5 min con PBS e incubadas con anticuerpos secundarios apropiados diluidos en 1% BSA en PBS durante 1 h en oscuridad. Finalmente, las miofibrillas fueron lavadas de nuevo con PBS y visualizadas con líquido de montaje para fluorescencia (Dako).

Para las inmunofluorescencias de cultivos celulares, se sembraron  $10^4$  células sobre cristales tapizados con poli-L-lisina en una placa de cultivos de 24 pocillos, y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Las células fueron entonces transfectadas y sometidas a diferenciación, tras lo que fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min. Seguidamente, las células fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 5 min, lavadas extensivamente con PBS, bloqueadas con 3% BSA en PBS e incubadas durante 2 h con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Posteriormente, las células fueron lavadas extensivamente con PBS e incubadas durante 1 h en oscuridad con anticuerpos secundarios diluidos igualmente en solución de bloqueo. Finalmente, las células fueron lavadas de nuevo con PBS y montadas para su visualización con diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1  $\mu$ g/mL).

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente excepto las incubaciones con anticuerpos primarios, que se efectuaron a 37 °C en cámara húmeda. Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS.



### **2.19 Preparación de muestras para microscopía electrónica.**

Para analizar músculos de ratón, se utilizaron ratones sacrificados en atmosfera de CO<sub>2</sub>, o perfundidos directamente en 0,1 M tampón fosfato pH 7.4 (PB) con paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2,5%. Los órganos aislados a partir de ratones sacrificados con CO<sub>2</sub>, o los ratones enteros fijados por perfusión, fueron sumergidos durante 16 o 24 h, respectivamente, en tampón de perfusión a 4 °C. Después de la fijación, los tejidos se lavaron en PB y se mantuvieron a 4 °C en PB con 0,1% de NaN<sub>3</sub> hasta su uso. Cortes de 200 µm obtenidos con un vibratomo (Leica VT-1000), fueron fijados durante 1,5 h en PB con tetróxido de osmio al 2%, sumergidos en agua fría y después deshidratados con lavados consecutivos de 5-10 min con etanol frío (30%, 50% y 70%). Seguidamente, los cortes fueron sumergidos en una disolución de acetato de uranilo al 2% en 70% etanol a 4 °C durante 2,5 h. Posteriormente fueron lavados con concentraciones crecientes de etanol (70%, 96% y 100%), y finalmente lavados dos veces en óxido de propileno e incluidos en araldita (Durcupan, Fluka). Los cortes semifinos (1,5 µm) fueron obtenidos con cuchilla de diamante y teñidos con azul de toluidina al 1%. A partir de los semifinos se obtuvieron cortes ultrafinos (0,08 µm) también con cuchilla de diamante. Los cortes ultrafinos fueron teñidos con citrato de plomo (solución de Reynold) y observados en un microscopio electrónico de transmisión *Tecnai G2 Spirit* (FEI).

Para el análisis morfológico de mioblastos de ratón, cultivos diferenciados sobre portaobjetos de plástico Permanox™ con pocillos (Nunc) fueron fijados primeramente con 3,5% de glutaraldehído en 0,1M PB pH 7.4 durante 30 min a

37 °C, y después con 1% de tetróxido de osmio en 0,1 M PB pH 7.4 durante 30 min a la misma temperatura. Posteriormente, las células fueron marcadas con 2% de acetato de uranilo en oscuridad durante 1 h a 4 °C, lavadas con 0,1 M PB pH 7.4, deshidratadas con etanol e incluidas en araldita, y posteriormente procesadas y observadas de forma análoga a la empleada con muestras de tejido muscular.

### **2.20 Tinciones histológicas e inmunohistoquímicas.**

Las técnicas de hematoxilina-eosina (HE) se desarrollaron según procedimientos estándar. Para el marcaje inmunohistoquímico se siguió el protocolo ABC-peroxidasa anteriormente descrito (Hsu *et al.* 1981). En ambos casos, los estudios con tejido muscular de ratón se realizaron sobre cortes de 2 µm de grosor obtenidos a partir de muestras incluidas en parafina. La inmunohistoquímica con tejido humano se realizó sobre preparaciones comerciales que contenían múltiples tejidos (DACO). Para la detección de las proteínas GIP se utilizó el anticuerpo mAb-3<sub>GIP</sub>, y para la detección de GPBP-1/2/3 se utilizaron anticuerpos policlonales de pollo (Abcam).

### **2.21 Ensayos funcionales en modelos murinos.**

Se realizaron con ratones de edades comprendidas entre cuatro y cinco meses. Para estimar la fuerza puntual de los ratones se utilizó un medidor de fuerza de sujeción o *Grip Strength Meter* (Bioseb) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para las pruebas de fatiga se utilizó una cinta transportadora o *Treadmill* (Panlab LE8700) adaptada a la anatomía de los ratones. Este modelo contiene una rejilla metálica ubicada inmediatamente detrás del inicio de la cinta con capacidad para generar pequeñas descargas eléctricas al contacto con el animal. Las descargas de la rejilla estimulan el movimiento del ratón hacia la cinta transportadora, que no deja de moverse durante el ensayo. El equipo registra la distancia recorrida por los animales en cada ensayo, y dispone de un *software* mediante el cual se puede controlar la velocidad de la cinta y la intensidad de descarga eléctrica de la rejilla. La inclinación de la cinta se puede regular manualmente, y las dimensiones del espacio en el que se ubica el ratón impiden que gire durante el ensayo. Antes de iniciar los ensayos los ratones fueron pesados y adaptados al funcionamiento del sistema, haciéndoles correr sobre la cinta transportadora 5 min diarios a una velocidad de 10 m/min, durante tres días consecutivos. La inclinación de la cinta fue de 0° de inclinación el primer día, 5° en sentido ascendente el segundo y 10° en sentido ascendente el tercero.

En un primer ensayo, se cronometró el tiempo hasta la fatiga de los ratones durante el ejercicio físico haciéndoles correr en la cinta de manera ascendente (10° de inclinación) hasta el agotamiento. El ensayo se inició a una velocidad de 40 m/min, que fue aumentada a razón de 1 m/min cada 30 s. En el momento en que un ratón permanecía más de 10 s recibiendo el estímulo eléctrico sobre la rejilla se consideró que estaba agotado y se dio por finalizado el ensayo. En los casos en los que se llegaron a alcanzar los 50 m/min, se mantuvo esta velocidad hasta producirse el agotamiento del ratón.

## **METODOLOGÍA**

---

Se calculó el trabajo desarrollado por cada ratón durante el ensayo de resistencia con la fórmula siguiente: Trabajo (J) = Peso (Kg) x 9,8 m/s<sup>2</sup> (aceleración de la gravedad) x Distancia recorrida (m) x seno 10°. Los 10° corresponden a la inclinación del plano en el que se desarrolló el movimiento y [Distancia (m) x seno 10°] representa la distancia vertical recorrida por el ratón durante el ensayo.

Transcurridas 24 h tras el primer ensayo, los ratones fueron sometidos a un segundo ensayo que constó de tres pruebas en las que se mantuvieron las mismas condiciones del ensayo anterior a excepción del límite máximo de velocidad que se fijó en 60 m/min. La prueba se llevó a cabo durante tres días consecutivos dejando 24 h de descanso entre cada prueba. Para calcular el trabajo desarrollado por cada ratón se utilizó la misma fórmula que en el primer ensayo.

### **2.22 Programas informáticos y servidores.**

Los estudios estadísticos fueron realizados con el programa *Graphpad Prism*.

Los alineamientos de aminoácidos se llevaron a cabo con el programa “*Clustalw2-Multiple Sequence Alignment*”, “*Clustalw Omega-Multiple Sequence Alignment*” del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), con el programa BLASTP del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), o con el programa *PRALINE multiple sequence alignment (Centre of Investigative Bioinformatics Vrije Universiteit Amsterdam)*

La relación filogenética entre los genes humanos parálogos a FILIP1L fue realizada con el servidor *Ensemble* (<http://www.ensembl.org>), proyecto conjunto del Laboratorio de Biología Molecular Europeo, el EBI y el *Wellcome Trust Sanger Institute*.

Los servidores utilizados para predecir dominios conservados, motivos de unión y características estructurales de proteínas a partir de sus secuencias primarias se detallan a continuación:

Las regiones *Coiled-coil* fueron predichas según el método de Lupas *et al.* (1991) con el programa “*COILS*”.

Para predecir la presencia de cremalleras de leucina se utilizó el programa “*2ZIP*” basado en el trabajo de Bornberg-Bauer *et al.* (1998).

Para la predicción de las regiones de unión a proteínas en regiones desordenadas y los motivos de unión a dominio con homología a Src 3 (SH3) se utilizó el programa ANCHOR (Dosztányi *et al.* 2009).

Los dominios conservados en proteínas se detectaron mediante el programa “*conserved domains*” facilitado por el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).



**RESULTADOS Y**  
**DESARROLLO**  
**ARGUMENTAL**





### 3 RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

#### 3.1 La expresión y localización de las isoformas de GPBP en el músculo esquelético

En estudios anteriores de *Northern blot* se había observado una expresión preferencial de *COL4A3BP* en el músculo estriado (Raya *et al.* 1999). Para investigar la expresión de GPBP en este tejido se analizó la expresión de GPBP-1 y GPBP-2 mediante *Western blot* e inmunohistoquímica utilizando mAb-14, un anticuerpo que reconoce ambas isoformas (Raya *et al.* 1999; Raya *et al.* 2000; Revert *et al.* 2008). Se detectó un polipéptido principal con una masa molecular de 70-80 kDa, que podía representar tanto GPBP-1 como GPBP-2, y mostraba un patrón de distribución estriado (Fig. 6).



**FIG. 6. Detección de GPBP en músculo esquelético humano.** **A**, Extractos de músculo esquelético humano se analizaron mediante *Western blot* con anticuerpos mAb-14 (izquierda) o en ausencia de los mismos (derecha). Las barras y números a la izquierda de la imagen, en esta figura y en las siguientes, indican la posición y masa molecular de los estándares usados en el estudio. **B**, Imagen de músculo esquelético humano obtenida por técnicas de inmunohistoquímica utilizando los mismos anticuerpos que en **A**. Amplificación: 1000 x

Para continuar los estudios se utilizó como modelo el ratón, cuyas proteínas mGPBP-1 y mGPBP-2 presentan un alto grado de conservación respecto a las

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

humanas (Fig. 7) y son reconocidas por los mismos anticuerpos (ver más adelante).

```
GPBP-1      MSDNQSWNS SGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYYKSEDE 60
GPBP-2      MSDNQSWNS SGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYYKSEDE 60
mGPBP-1    MSDNQSWNS SGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYYKSEDE 60
mGPBP-2    MSDNQSWNS SGSEEDPETESGPPVERCGVLSKWTNYIHGWQDRWVVLKNNALSYYKSEDE 60
*****

GPBP-1      TEYGCRGSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDVWYLAQDPDHRQQWIDAI EQHKTESG 120
GPBP-2      TEYGCRGSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDVWYLAQDPDHRQQWIDAI EQHKTESG 120
mGPBP-1    TEYGCRGSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDVWYLAQDPDHRQQWIDAI EQHKTESG 120
mGPBP-2    TEYGCRGSICLSKAVITPHDFDECRFDISVNDVWYLAQDPDHRQQWIDAI EQHKTESG 120
*****

GPBP-1      YGSESSLRRHGMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQK 180
GPBP-2      YGSESSLRRHGMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQK 180
mGPBP-1    YGSESSLRRHGMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQK 180
mGPBP-2    YGSESSLRRHGMVSLVSGASGYSATSTSSFKKGHSLREKLAEMETFRDILCRQVDTLQK 180
*****

GPBP-1      YFDACADAVSKDELQRDKVVEDEDDFPTTRS DGDFLHSTNGNKEKLFPHVTPKGINGID 240
GPBP-2      YFDACADAVSKDELQRDKVVEDEDDFPTTRS DGDFLHSTNGNKEKLFPHVTPKGINGID 240
mGPBP-1    YFDVCADAVSKDELQRDKVVEDEDDFPTTRS DGDFLHSTNGNKEKLFPHVTPKGINGID 240
mGPBP-2    YFDVCADAVSKDELQRDKVVEDEDDFPTTRS DGDFLHSTNGNKEKLFPHVTPKGINGID 240
***.*****

GPBP-1      FKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMVKREDSWQKRLDKETEKRRRTEEAYKNAMTELKK 300
GPBP-2      FKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMVKREDSWQKRLDKETEKRRRTEEAYKNAMTELKK 300
mGPBP-1    FKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMVKREDSWQKRDREVEKRRRVEEAYKNVMEELKK 300
mGPBP-2    FKGEAITFKATTAGILATLSHCIELMVKREDSWQKRDREVEKRRRVEEAYKNVMEELKK 300
*****

GPBP-1      KSHFGGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEKVRHLHWPTSLPSGD AFS 360
GPBP-2      KSHFGGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEKVRHLHWPTSLPSGD AFS 360
mGPBP-1    KPRFGGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEKVRHLHWPTSLPSGD TFS 360
mGPBP-2    KPRFGGPDYEEGPNSLINEEEFFDAVEAALDRQDKIEEQSQSEKVRHLHWPTSLPSGD TFS 360
*.:*****

GPBP-1      SVGTHRFVQKPYSRSSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQVEEMVQNHMTYSLQDVGGDANWQL 420
GPBP-2      SVGTHRFVQK-----VEEMVQNHMTYSLQDVGGDANWQL 394
mGPBP-1    SVGTHRFVQKPYSRSSSMSSIDLVSASDDVHRFSSQVEEMVQNHMTYSLQDVGGDANWQL 420
mGPBP-2    SVGTHRFVQK-----VEEMVQNHMTYSLQDVGGDANWQL 394
*****

GPBP-1      VVEEGEMKVYRREVEENGIVLDPLKATHAVKGVGTGHEVCNYFWNV DVRNDWETT IENFHV 480
GPBP-2      VVEEGEMKVYRREVEENGIVLDPLKATHAVKGVGTGHEVCNYFWNV DVRNDWETT IENFHV 454
mGPBP-1    VVEEGEMKVYRREVEENGIVLDPLKATHAVKGVGTGHEVCNYFWNV DVRNDWETT IENFHV 480
mGPBP-2    VVEEGEMKVYRREVEENGIVLDPLKATHAVKGVGTGHEVCNYFWNV DVRNDWETT IENFHV 454
*****

GPBP-1      VETLADNAIIYQTHKR VWPASQRDVLYLSVIRKIPALTENDPETWIVCNFSDHDSAPL 540
GPBP-2      VETLADNAIIYQTHKR VWPASQRDVLYLSVIRKIPALTENDPETWIVCNFSDHDSAPL 514
mGPBP-1    VETLADNAIIYQTHKR VWPASQRDVLYLSAIRKIPALTENDPETWIVCNFSDHDSAPL 540
mGPBP-2    VETLADNAIIYQTHKR VWPASQRDVLYLSAIRKIPALTENDPETWIVCNFSDHDSAPL 514
*****
```

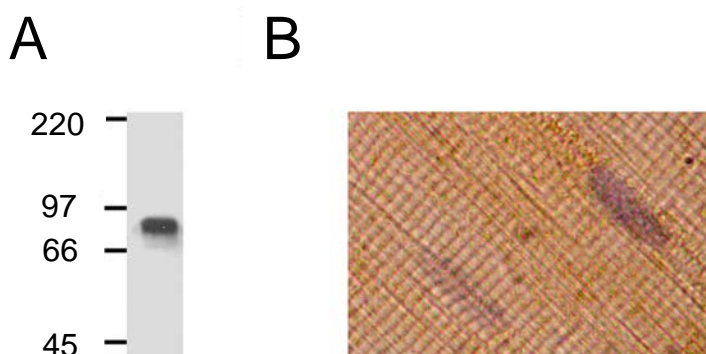
## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

```
GPBP-1      NNRCVRAKINVAMICQTLVSPPEGNQEISRDNILCKITYVANVNPGGWAPASVLRVAKR 600
GPBP-2      NNRCVRAKINVAMICQTLVSPPEGNQEISRDNILCKITYVANVNPGGWAPASVLRVAKR 574
mGPBP-1     NNRCVRAKINIAMICQTLVSPPEGDQEISRDNILCKITYVANVNPGGWAPASVLRVAKR 600
mGPBP-2     NNRCVRAKINIAMICQTLVSPPEGDQEISRDNILCKITYVANVNPGGWAPASVLRVAKR 574
*****:*****:*****

GPBP-1      EYPKFLKRFTSYVQEKTAGKPILF 624
GPBP-2      EYPKFLKRFTSYVQEKTAGKPILF 598
mGPBP-1     EYPKFLKRFTSYVQEKTAGKPILF 624
mGPBP-2     EYPKFLKRFTSYVQEKTAGKPILF 598
*****
```

**FIG. 7. Alineamiento de las estructuras primarias de GPBP-1, GPBP-2, mGPBP-1 y mGPBP-2.** Los números de acceso a la base de datos de NCBI son NP\_005704.1, NP\_112729.1, NP\_075909.1 y NP\_001157694.1, respectivamente. Se encuadran las secuencias de GPBP-1 y de mGPBP-1 codificadas por el exón 11 de los genes *COL4A3BP* humano y *Col4a3bp* de ratón, respectivamente. Los asteriscos indican que los residuos alineados son idénticos en las cuatro isoformas.

Así, extractos protéicos musculares y cortes de tejido muscular parafinado de ratón fueron similarmente analizados (Fig. 8). No se observaron diferencias reseñables entre muestras humanas y de ratón.

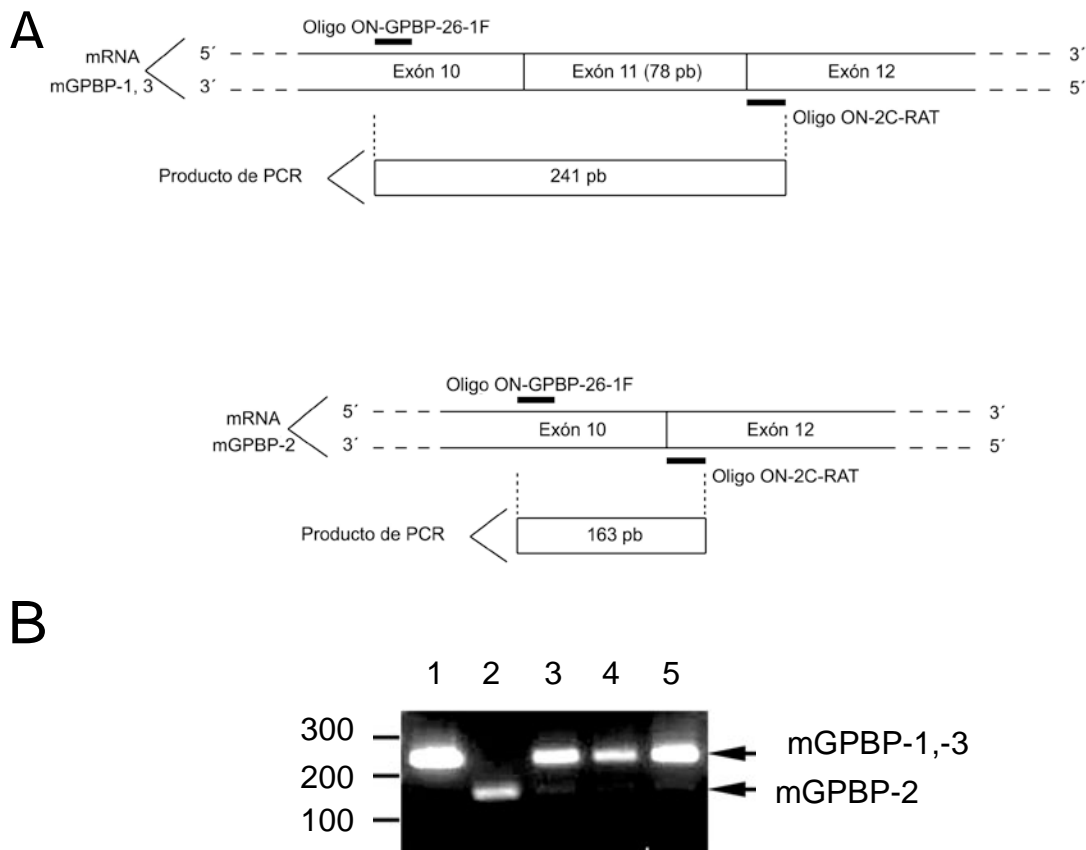


**FIG. 8. Detección de GPBP en músculo esquelético de ratón.** Anticuerpos mAb-14 fueron utilizados para analizar un extracto de músculo esquelético de ratón (50 µg) por *Western blot* (A) o inmunohistoquímica (B) esencialmente como en la Fig. 6. Amplificación: 400 x

Para averiguar la identidad exacta de los polipéptidos detectados por mAb-14, se analizaron mediante RT-PCR extractos de RNA total obtenidos de distintos músculos de las patas traseras del ratón (gastrocnemio, sóleo y cuádriceps). Se utilizaron como cebadores para la PCR una pareja de oligonucleótidos

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

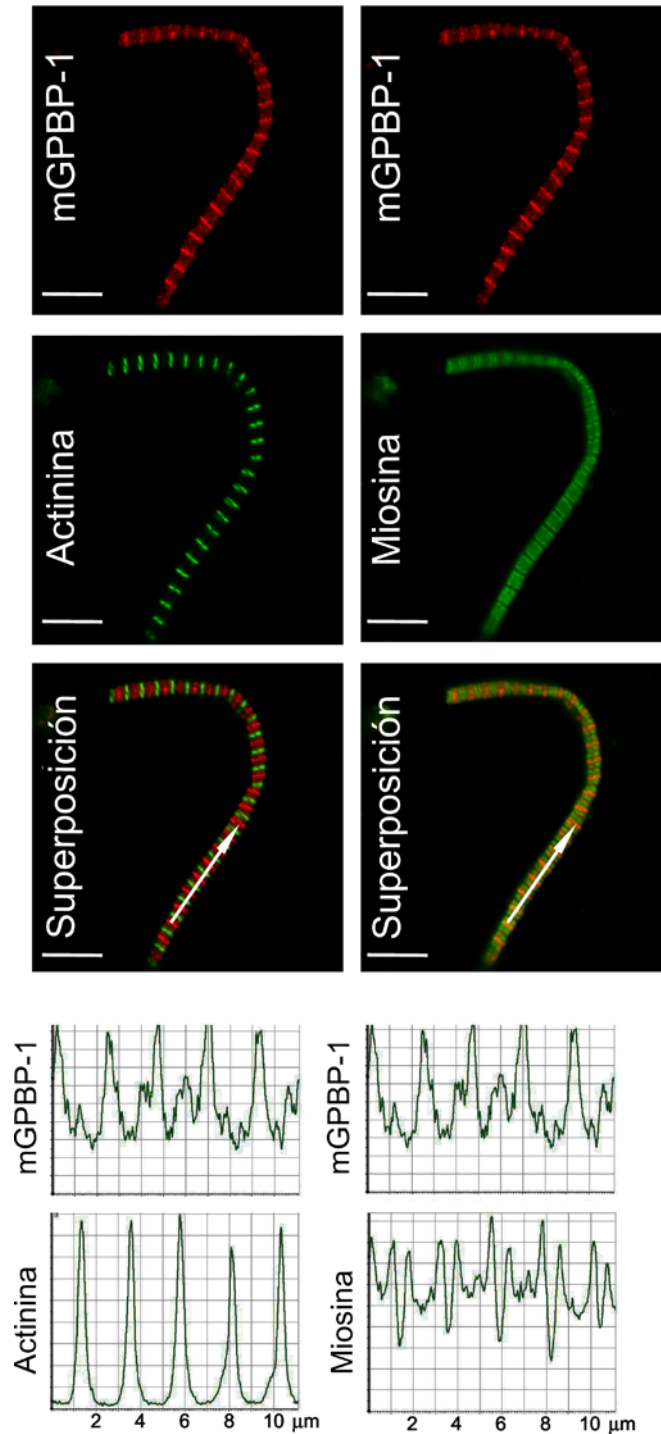
capaces de hibridar en los exones 10 y 12, lo que permitió comparar los niveles de expresión de mGPBP-1 respecto a la de mGPBP-2 en una misma reacción, ya que el tamaño de los productos generados difiere en los 78 pb del exón 11 ausente en el cDNA de mGPBP-2 (Fig. 9A). Los resultados obtenidos en todos los músculos estudiados mostraron que la mayor parte del mRNA expresado correspondía a mGPBP-1 (Fig. 9B), lo que significa que la señal obtenida por mAb-14 en los análisis de expresión era mayoritariamente atribuible a mGPBP-1.



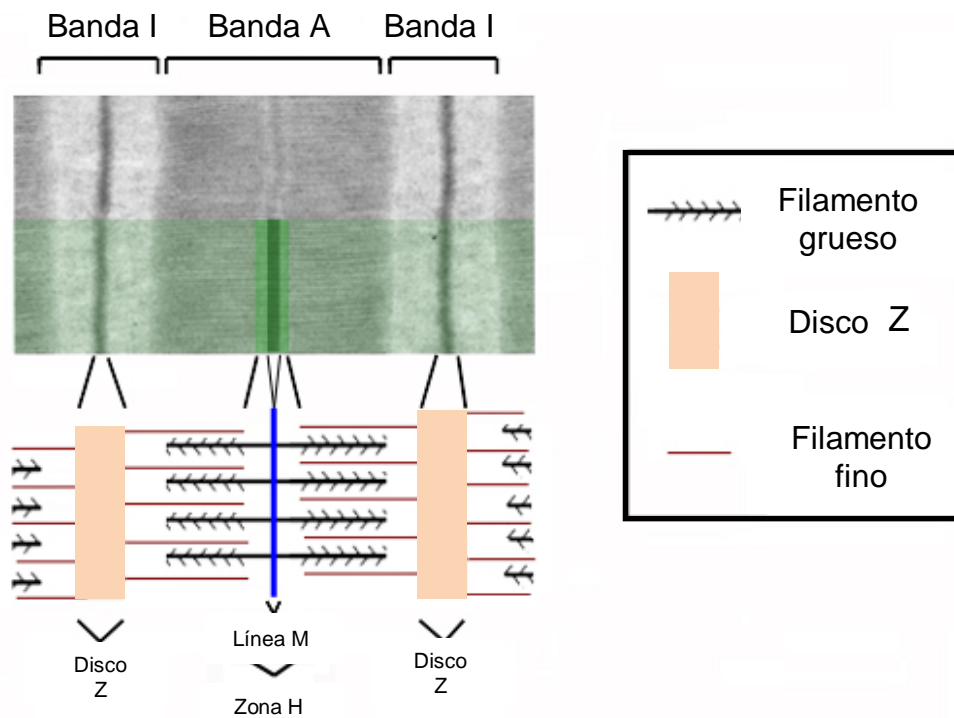
**FIG. 9. Expresión comparativa de las isoformas de mGPBP en distintos músculos de ratón.** En **A**, se indican los exones de interés y los sitios de hibridación de los oligonucleótidos utilizados en la PCR mostrada en **B** sobre barras que representan los mRNA individuales de mGPBP-1 y -3 y de mGPBP-2. En **B**, RNA total extraído de músculo gastrocnemio (calle 3), sóleo (calle 4) y cuádriceps (calle 5) de ratón adulto se retrotranscribió y el híbrido mRNA-cDNA se utilizó de molde para PCR con los oligonucleótidos indicados en **A**. Las mezclas se analizaron mediante una electroforesis sobre gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Se utilizaron como controles las mezclas de PCR resultantes de amplificar pVAX-pCAGS-Stop-mGPBP que contiene el cDNA de mGPBP-1 (calle 1) y pVAX-pCAGS-Stop-mGPBP-2, con el cDNA de mGPBP-2 (calle 2). En esta y en figuras siguientes las barras y los números indican la posición y el tamaño en pares de bases de los estándares de tamaño utilizados en el estudio. Se señala con una flecha la posición del producto indicado.

El patrón de distribución estriado revelado por los anticuerpos mAb-14 en los estudios de inmunohistoquímica (Fig. 8B) indicaban la posible presencia de mGPBP-1 en las miofibrillas, el aparato contráctil de las células musculares. Para comprobarlo, se aislaron miofibrillas a partir de músculos de la pata trasera de ratón y se analizaron por microscopía confocal (Fig. 10). En las miofibrillas, la miosina muscular y la actinina tienen distribuciones mutuamente excluyentes: mientras la miosina se encuentra a lo largo de la banda A de la miofibrilla, la actinina tiene una localización restringida al disco Z, que ocupa el centro de las bandas I.

En las imágenes obtenidas se evidenció que mGPBP-1 se localiza preferentemente en el centro de la banda A, es decir, en la línea M donde entrecruzan las colas de miosina orientadas en direcciones opuestas. En la Fig. 11 se muestran de forma esquematizada los distintos niveles de detección de mGPBP-1 en el sarcómero. La intensidad del color verde se corresponde con el nivel de expresión de mGPBP-1.



**FIG. 10. Estudio de la localización de mGPBP-1 en miofibrillas de ratón mediante inmunofluorescencia.** Miofibrillas de músculos de las extremidades posteriores de un ratón C57BL/6 fueron analizadas por microscopía confocal usando anticuerpos policlonales obtenidos en pollo contra las proteínas GBP, anticuerpos policlonales contra miosina obtenidos en conejo, y anticuerpos monoclonales contra actinina producidos en ratón. En los gráficos de la parte inferior de la imagen se muestran las distribuciones de fluorescencia a lo largo de las regiones indicadas por las flechas en las imágenes superpuestas, e indican los puntos de acumulación de cada proteína. Queda de manifiesto que mGPBP-1 y actinina tienen localizaciones alternadas y que su co-localización es muy escasa. Por el contrario, mGPBP-1 se localiza en el centro de la banda A (línea M) que queda definida por la distribución de miosina. Barras: 5 µm



**FIG. 11. Representación esquemática de la acumulación de mGPBP-1 en la línea M.** En la parte superior se muestra una micrografía de un sarcómero. Se muestran coloreadas en verde zonas del sarcómero en las que se detecta mGPBP-1, correspondiendo la intensidad de color con el nivel de expresión. En la parte inferior se representa, alineado con la micrografía, un esquema representativo de la estructura del sarcómero.

### 3.2 Expresión del gen *Col4a3bp* durante la diferenciación de mioblastos C2C12.

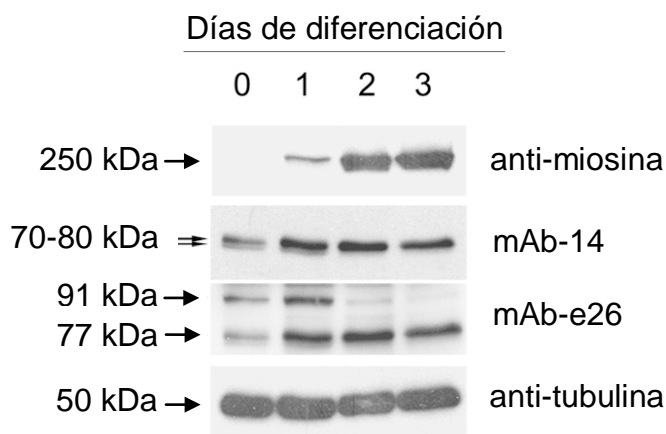
Con la intención de estudiar la expresión de las proteínas mGPBP a lo largo del proceso de diferenciación muscular, utilizamos el modelo *ex vivo* proporcionado por la línea celular de mioblastos inmortalizados C2C12 (Yaffe y Saxel, 1977). Estos mioblastos derivan de ratones que sufren hipertrofia muscular, se propagan en un medio de cultivo convencional (DMEM) con 20% de SBF, y cuando se cultivan con baja concentración de suero, los cultivos de C2C12 inician un proceso miogénico en el que los mioblastos se fusionan para generar miotubos con múltiples núcleos mitóticamente inactivos. Durante la miogénesis,

## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

los miofibros expresan marcadores de diferenciación como la miosina muscular, que forma miofibrillas con capacidad contráctil.

Mediante la técnica de *Western blot* se analizaron extractos de proteína de cultivos de C2C12 en diferenciación. Para controlar la progresión de la miogénesis se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la cadena pesada de la miosina. Para detectar las proteínas GPBP se utilizaron los anticuerpos monoclonales mAb-14 y mAb-e26, previamente descritos (Raya *et al.* 1999; Revert *et al.* 2008). Con mAb-14 se detectaron dos polipéptidos reactivos de 70-80 kDa compatibles con mGPBP-1 y 2, pero mientras la expresión del polipéptido inferior disminuía progresivamente a lo largo de la diferenciación, la del polipéptido de mayor tamaño aumentaba. El anticuerpo mAb-e26 reconoce específicamente los 26 aminoácidos exclusivos de GPBP-1 y GPBP-3 codificados por el exón 11 del gen *COL4A3BP*. Dada la alta conservación del exón 11 en el gen *Col4a3bp* de ratón, mAb-e26 también detecta las proteínas murinas mGPBP-1 y mGPBP-3. Con mAb-e26 se detectaron dos polipéptidos, uno de 77 kDa (mGPBP-1), cuya expresión aumentaba durante la diferenciación, y otro de aproximadamente 91 kDa (mGPBP-3) cuya expresión disminuía a medida que avanzaba la miogénesis (Fig. 12).



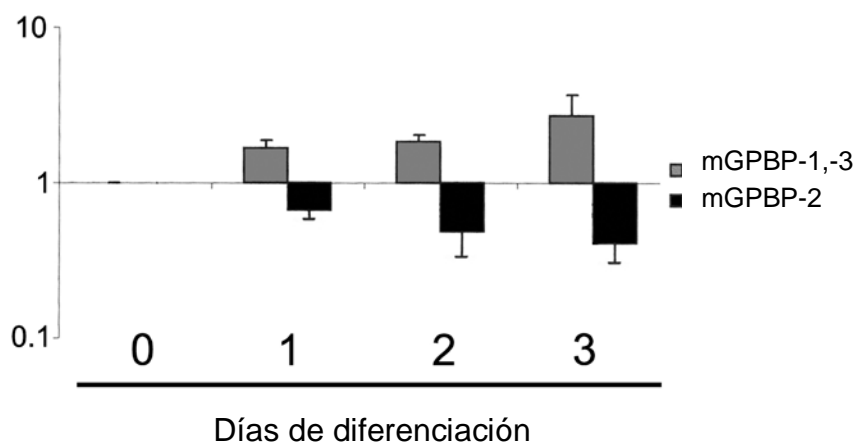


**FIG. 12. Expresión de diferentes isoformas de mGPBP en células C2C12 en diferenciación.** Cantidades similares (50  $\mu$ g) de extractos de células C2C12 diferenciadas durante los días que se indican, fueron analizadas por *Western blot* con los anticuerpos referidos. Con las flechas se señalan los polipéptidos de masas moleculares indicadas detectados en el estudio.

Estudios anteriores realizados con proteína recombinante humana, habían demostrado que la isoforma GPBP-3 facilita la exportación de la isoforma GPBP-1 (Revert *et al.* 2008). Por ello, la progresiva disminución de expresión de mGPBP-3 durante la miogénesis de cultivos C2C12 explicaría el aumento coordinado de mGPBP-1 en los lisados, como consecuencia de la acumulación de esta última proteína en el interior de las células en diferenciación. Por otra parte, la progresiva disminución de mGPBP-2 a lo largo del proceso miogénico, justifica su práctica ausencia en tejido muscular adulto y sugeriría que el empalme alternativo de exones que elimina el exón 11, se reprime paulatinamente durante la diferenciación. De acuerdo con esta idea, estudios de RT-PCR cuantitativa realizados con extractos de RNA total de células C2C12 en diferenciación, demostraban que los niveles del mRNA que codifica el exón 11 (mGPBP-1 y mGPBP-3) aumentaban durante la miogénesis, opuestamente a lo que se observaba con los niveles del mRNA de mGPBP-2

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

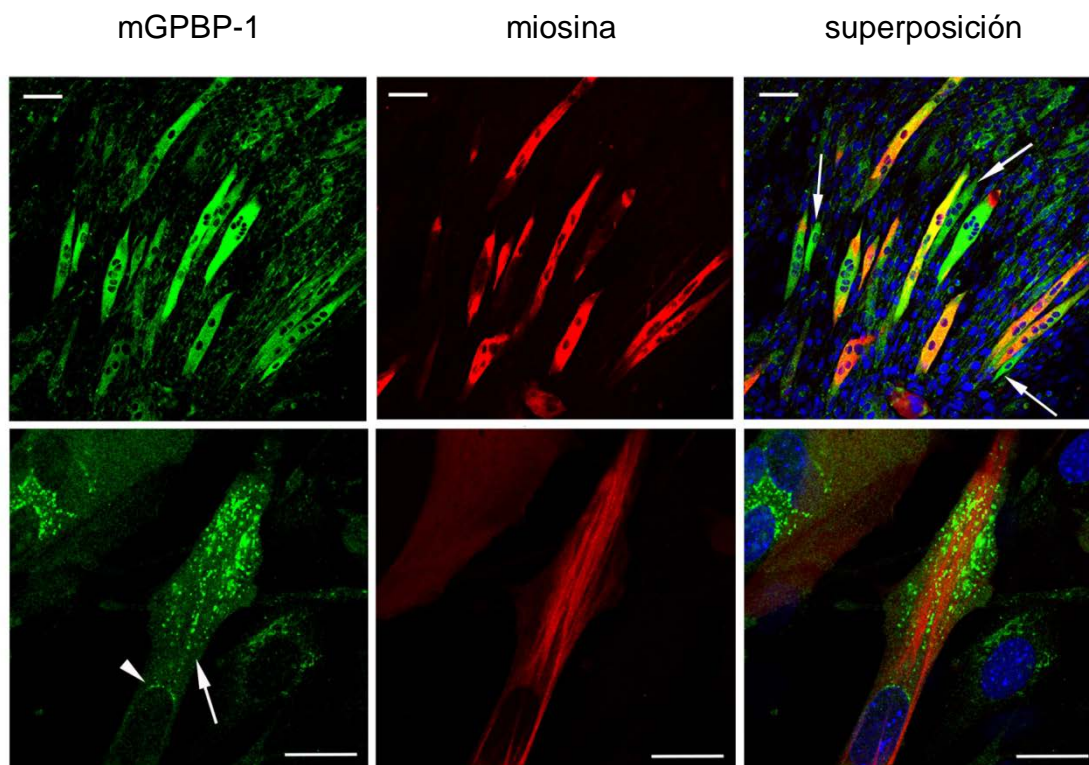
(Fig. 13). Habida cuenta de que la traducción de mGPBP-3 está reprimida (Fig. 12), el mRNA común para mGPBP-1 y -3 virtualmente sólo traduce mGPBP-1.



**FIG. 13.** En células C2C12 en diferenciación aumenta la expresión del mRNA para mGPBP-1 y -3 y disminuye la del mRNA para mGPBP-2. Extractos de RNA total de células C2C12 en diferenciación fueron analizados por PCR cuantitativa con oligonucleótidos específicos para las isoformas mGPBP-1 y -3, o para la isoforma mGPBP-2. Los cálculos se realizaron por el procedimiento  $\Delta\Delta C_t$  usando el mRNA de GAPDH como normalizador.

Con el fin de estudiar con mayor detalle el aumento de expresión de mGPBP-1 durante la miogénesis, se realizaron estudios de microscopía confocal de inmunofluorescencia con células C2C12 en diferenciación (Fig. 14). De este modo, se pudo constatar que todas las células que presentaban expresión de miosina contaban con niveles relativamente elevados de mGPBP-1, aunque no todas las células con niveles aumentados de mGPBP-1 mostraban expresión de miosina muscular. (Fig. 14, panel superior, flechas). Finalmente, mGPBP-1 se podía encontrar difuso en el citoplasma o distribuido en agregados que podían ocupar posiciones intermiofibrilares (Fig. 14, panel inferior, izquierda, flecha) o yuxtannucleares (Fig. 14, panel inferior, izquierda, cabeza de flecha). Esto sugería que la síntesis de miosina en células C2C12 en diferenciación

viene precedida por un aumento de expresión de mGPBP-1 que se distribuye ordenadamente entre las miofibrillas en formación.



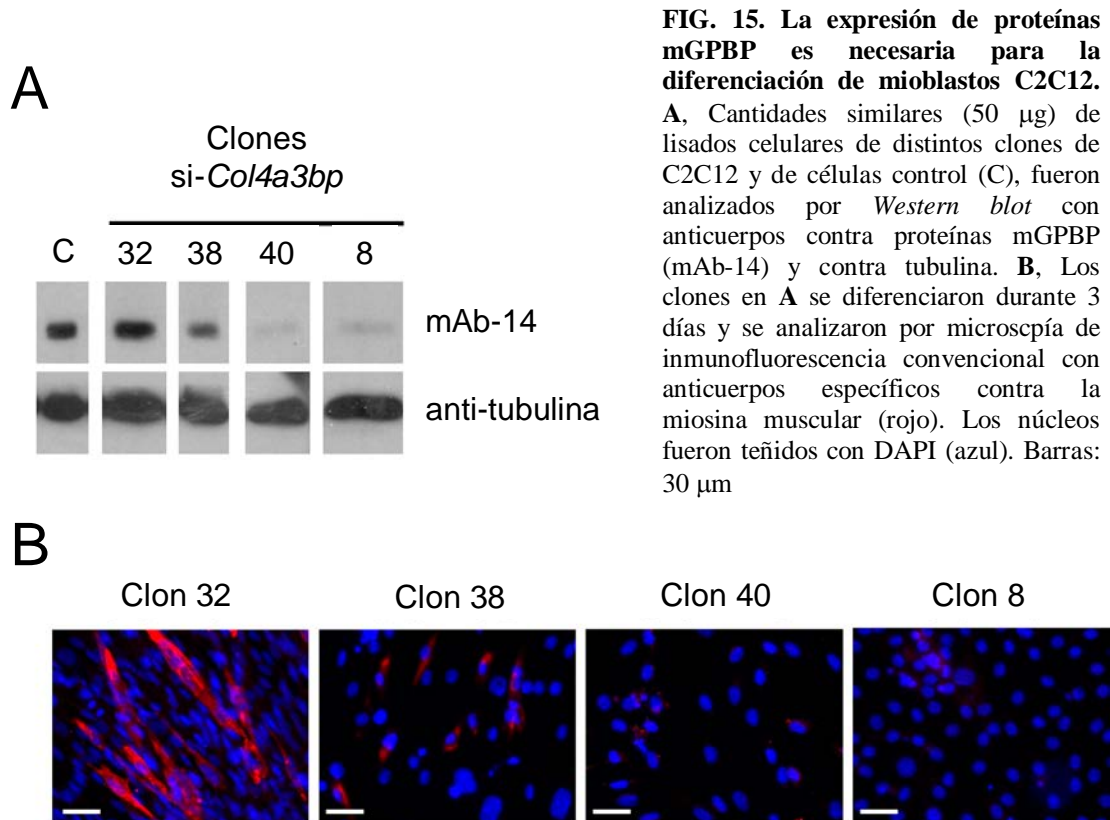
**FIG. 14. Localización de mGPBP-1 en células C2C12 en diferenciación.** Células C2C12 en diferenciación (3 días) se analizaron por microscopía confocal con anticuerpos policlonales de conejo contra GPBP (verde), y con anticuerpos monoclonales contra la cadena pesada de la miosina muscular (rojo). Los núcleos celulares fueron visualizados con DAPI (azul). En las tres imágenes de la parte superior se muestra un campo con varios miotubos. Con flechas se señalan células con expresión aumentada de mGPBP-1 en las que no hay expresión detectable de miosina. Barras: 60  $\mu\text{m}$ . En la parte inferior de la figura se muestra con mayor detalle la distribución de mGPBP-1 en las células C2C12 en diferenciación. La flecha y la punta de flecha señalan la presencia de mGPBP-1 en el espacio intermiofibrilar y en el perinúcleo, respectivamente. Barras: 20  $\mu\text{m}$ .

### **3.3 La expresión del gen *Col4a3bp* regula la diferenciación de los mioblastos C2C12.**

Para estudiar el papel del gen *Col4a3bp* en la diferenciación muscular, se utilizaron técnicas de *short-hairpin* (sh) RNA con el objetivo de obtener clones de C2C12 con una expresión diferencial de *Col4a3bp* (Fig. 15A), y estudiar su

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

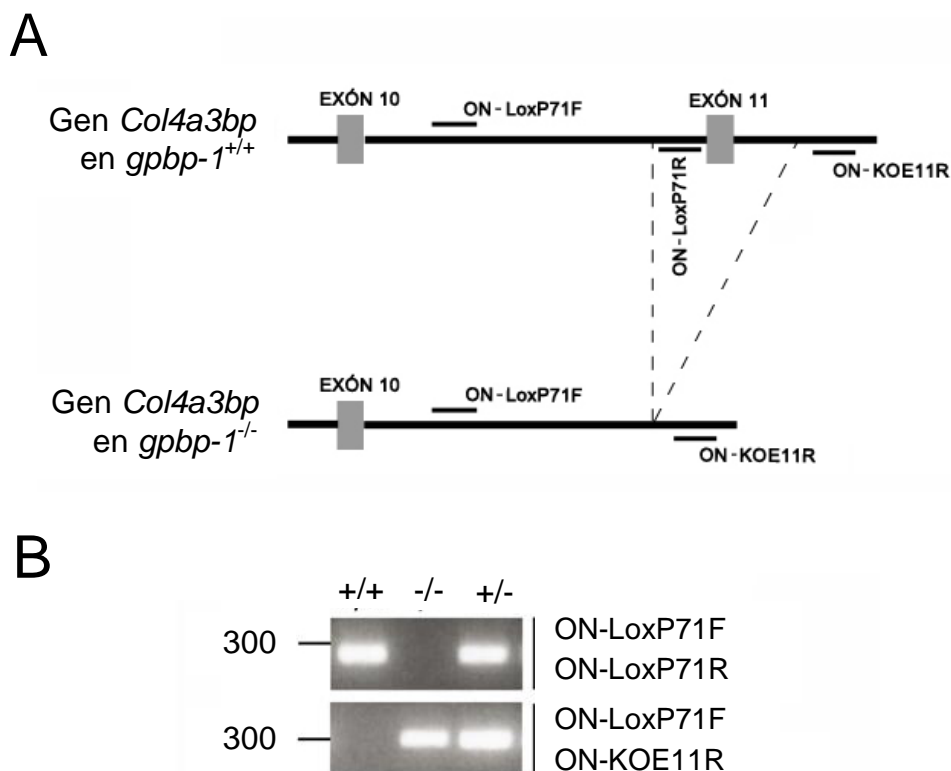
capacidad para diferenciarse. Mediante microscopía de inmunofluorescencia se comprobó que el grado de diferenciación, determinado por los niveles de fusión celular y por la expresión de miosina muscular, correlacionaba bien con el nivel de expresión de proteínas mGPBP (Fig. 15B).



### 3.4 Caracterización de ratones modificados genéticamente (KO o *knockout*) que no expresan mGPBP-1 (ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>*).

Dado que durante la diferenciación de mioblastos de ratón la expresión de mGPBP-2 y -3 disminuye al tiempo que aumenta la de mGPBP-1 (Fig. 12), cabía la posibilidad de que la miogénesis dependiese específicamente de esta última isoforma. Con el propósito de estudiar de manera específica la importancia de mGPBP-1 en la miogénesis, se produjeron ratones *knockout*

(KO) para el exón 11 del gen *Col4a3bp*. Este exón está representado en el mRNA que genera las isoformas mGPBP-1 y -3; no obstante y dado que la traducción de GPBP-3 está reprimida durante la diferenciación (Fig. 12) la eliminación del exón 11 virtualmente representa la supresión de GPBP-1 en los miocitos. Se estudió la bioquímica y morfología de los músculos de los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y se analizó la capacidad miogénica de sus mioblastos en condiciones *ex vivo*. Además, se evaluó la fuerza y la resistencia física de los ratones. Se consideraron ratones controles los obtenidos a partir de la misma colonia que carecían de modificación genética (*gpbp-1<sup>+/+</sup>*). El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR sobre DNA purificado a partir de las colas de los ratones. Se realizaron dos reacciones de PCR por cada DNA según se muestran en el esquema de la Fig. 16. La reacción 1 genera producto únicamente a partir de DNA procedente de ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y heterocigotos (*gpbp-1<sup>+/-</sup>*) y la reacción 2 únicamente a partir de DNA procedente de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y *gpbp-1<sup>+/-</sup>*. Las secuencias de los oligonucleótidos y las condiciones de las PCR se detallan en el apartado Metodología.

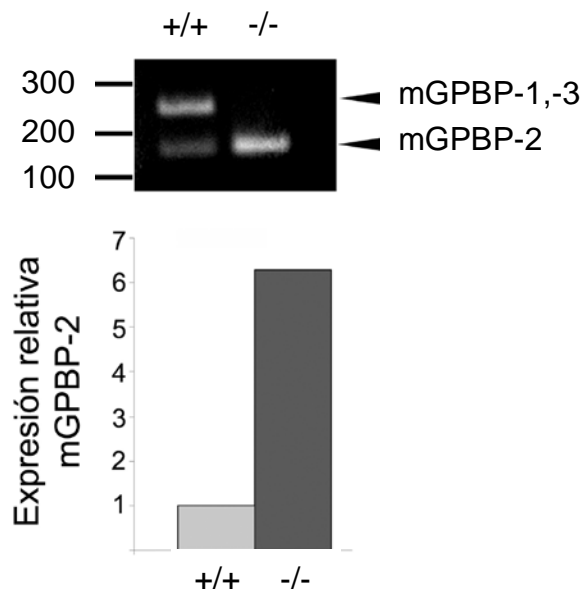


**FIG. 16. Genotipado de ratones  $gbp-1^{+/+}$ ,  $gbp-1^{+/-}$  y  $gbp-1^{-/-}$ .** **A**, Esquema de la ubicación de los lugares del gen *Col4a3bp* en los que hibridan los oligonucleótidos utilizados para genotipar. **B**, Productos de PCRs realizadas con los oligonucleótidos que se detallan (izquierda) sobre muestras de DNA de ratones  $gbp-1^{+/+}$  (+/+),  $gbp-1^{+/-}$  (+/-) y  $gbp-1^{-/-}$  (-/-). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. El fragmento comprendido entre ON-LoxP71F y ON-KOE11R en  $Gbp-1^{+/+}$  es demasiado grande para ser amplificado en las condiciones de PCR utilizadas.

### 3.4.1 Los mioblastos $gbp-1^{-/-}$ muestran dificultad para fusionarse y para organizar las miofibrillas.

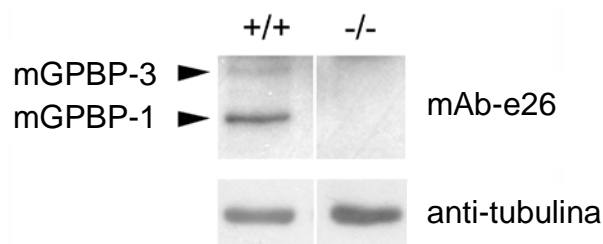
Se establecieron líneas celulares de mioblastos derivados de cuádriceps de ratones  $gbp-1^{-/-}$  y de ratones control ( $gbp-1^{+/+}$ ) mediante el método descrito previamente por Frock *et al.* (2006) que se detalla en el apartado Metodología y se compararon los niveles de expresión de mRNA de las isoformas de GPBP mediante RT-PCR convencional y cuantitativa (Fig. 17). Los mioblastos de ratones control expresaban tanto el mRNA para mGPBP-1,-3 como para mGPBP-2, mientras que como era de esperar en mioblastos  $gbp-1^{-/-}$  no se detectó expresión alguna del mRNA de mGPBP-1,-3 y la expresión del mRNA

de mGPBP-2 era equiparable a la de mGPBP-1,-3 en mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>*. La delección del exón 11 no disminuía la actividad transcripcional del gen *Col4a3bp*, de modo que toda la expresión del gen en ausencia del exón 11 iba dirigida a la síntesis de mGPBP-2.



**FIG. 17. Expresión comparativa de las isoformas de mGPBP en mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>*.** **A**, RNA total extraído de mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+) o *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) fue retrotranscrito y amplificado por PCR con oligonucleótidos que hibridaban en posiciones que flanquean el exón 11. Los productos de la PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y teñidos con bromuro de etidio. Con puntas de flecha se marcan los productos correspondientes a los mRNA indicados. **B**, El RNA en **A** fue analizado mediante RT-PCR cuantitativa para valorar la expresión relativa del mRNA de mGPBP-2.

Por otra parte, se analizaron mediante *Western blot* lisados de mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y *gpbp-1<sup>+/+</sup>*. El anticuerpo mAb-e26 detectó mGPBP-1 y -3 únicamente en los mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* confirmando la ausencia de estas proteínas en los mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (Fig. 18).



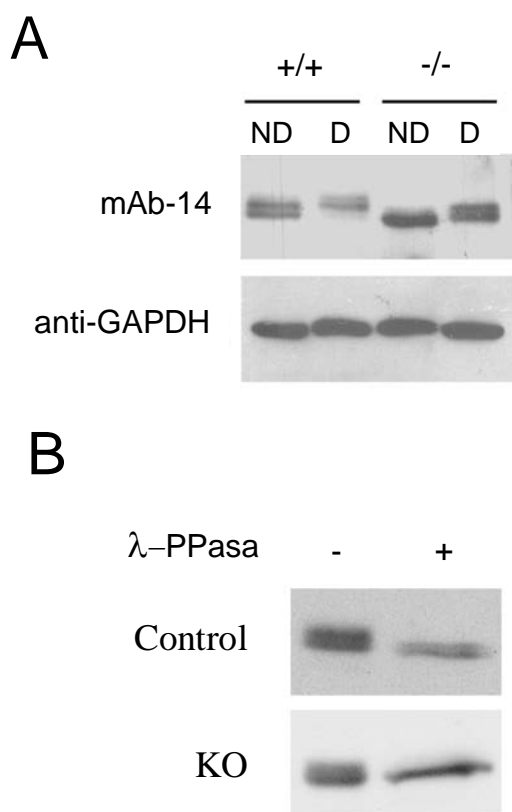
**FIG. 18. Los mioblastos de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* no expresan mGPBP-1, -3.** Cincuenta microgramos de lisados de mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+) o *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) fueron analizados por *Western blot* con los anticuerpos indicados. Las puntas de flecha señalan la ubicación de los polipéptidos indicados.

## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

Posteriormente, se diferenciaron mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y se estudió la expresión de proteínas mGPBP-1 y mGPBP-2 por *Western blot* con anticuerpos mAb-14 (Fig. 19). En cultivos control (*gpbp-1<sup>+/+</sup>* no diferenciados), los anticuerpos mAb-14 detectaron dos polipéptidos de 70-80 kDa correspondientes a mGPBP-1 y mGPBP-2 (Fig. 19A, +/+, ND). Sin embargo, cuando se diferenciaban, el polipéptido de menor tamaño desaparecía al tiempo que aparecía un nuevo polipéptido reactivo de tamaño superior a los anteriores (Fig. 19A, +/+, D). Por otra parte, en cultivos de mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* los anticuerpos mAb-14 detectaron un polipéptido principal que correspondía a mGPBP-2 y otro menos intenso de tamaño ligeramente superior (Fig. 19A, -/-, ND). Cuando estos cultivos se diferenciaban, el polipéptido de menor tamaño reducía su presencia mientras que se expresaba un nuevo polipéptido reactivo de tamaño superior (Fig. 19A, -/-, D). La multiplicidad de bandas detectadas por mAb-14 en cultivos de mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* diferenciados sólo podía deberse a modificaciones postraduccionales (p.ej. fosforilación) de mGPBP-2 asociadas a la miogénesis. En el caso de los mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>*, estas modificaciones postraduccionales podían también tener lugar al tiempo que se producía una disminución en la expresión de mGPBP-2 y un aumento en la de mGPBP-1. Dado que las proteínas humanas GPBP-1 y GPBP-2 tienen actividad proteínica y pueden autofosforilarse (Raya *et al.* 1999; Raya *et al.* 2000), y que al menos GPBP-2 puede ser fosforilada por otras cinasas (Fugmann *et al.* 2007), era plausible la hipótesis de que los cambios de tamaño aparente de los polipéptidos mGPBP observados en los procesos de diferenciación fuesen debidos, al menos en parte, a fosforilaciones. Para comprobar esta posibilidad, lisados de cultivos diferenciados fueron tratados con  $\lambda$ -fosfatasa y



posteriormente analizados mediante *Western blot* con anticuerpos mAb-14. El tratamiento con la fosfatasa reducía la  $M_r$  de los polipéptidos reactivos, indicando que durante el proceso de diferenciación muscular las proteínas GPBP son fosforiladas y confirmaba que los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* sólo se expresaban mGPBP-2 en sus mioblastos (Fig. 19B).

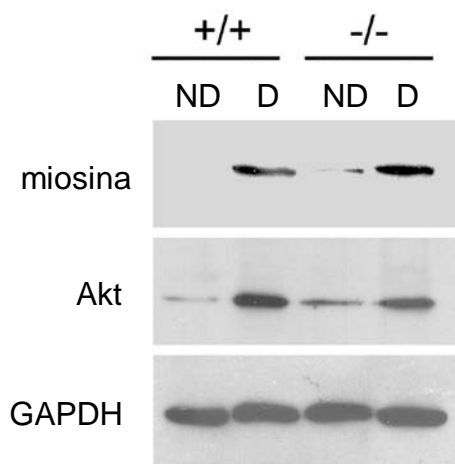


**FIG. 19. Fosforilación de las proteínas mGPBP durante la miogénesis. A,** Lisados de mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) no diferenciados (ND) y diferenciados durante cinco días (D) fueron analizados por *Western blot* con el anticuerpo mAb-14 o con un anticuerpo contra GAPDH. **B,** Lisados procedentes de cultivos de mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (Control) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (KO) diferenciados durante cinco días, fueron tratados (+) o no (-) con fosfatasa ( $\lambda$ -PPasa) y analizados como en A.

El análisis de los lisados de mioblastos diferenciados y no diferenciados permitió comprobar que la ausencia de mGPBP-1 en cultivos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* no alteraba de modo significativo la inducción de la expresión de la cadena pesada de la miosina muscular ni la inducción de la expresión de Akt, una proteína cinasa que participa en una ruta de señalización de supervivencia celular que

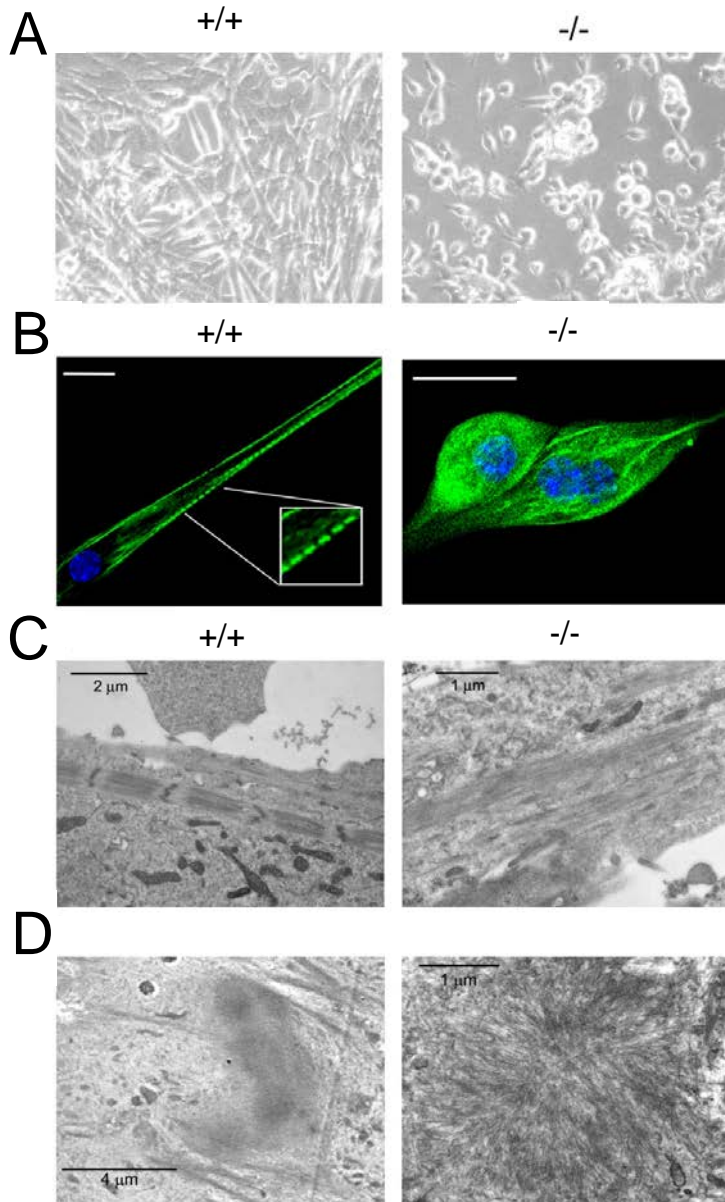
## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

se activa de modo característico en los procesos miogénicos, y cuya expresión aumenta en células C2C12 al diferenciarse (Fujio *et al.* 1999) (Fig. 20).



**FIG. 20. Los mioblastos *gbbp-1<sup>+/+</sup>* y *gbbp-1<sup>-/-</sup>* expresan marcadores de diferenciación.** Cantidades similares de extractos de mioblastos *gbbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+) y *gbbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) cultivados en presencia de suero (ND) o después de cinco días de diferenciación (D) fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos específicos contra las proteínas indicadas.

Los cultivos de mioblastos *gbbp-1<sup>+/+</sup>* y *gbbp-1<sup>-/-</sup>* en diferenciación fueron también analizados por técnicas microscópicas (Fig. 21). De este modo, se comprobó que para un mismo tiempo de diferenciación los mioblastos derivados de ratones *gbbp-1<sup>-/-</sup>* se fusionaban peor que sus controles, de modo que la generación de miotubos era más limitada (Fig. 21A). En estudios de microscopía confocal, se comprobó que mientras en cultivos *gbbp-1<sup>+/+</sup>* se observaba la formación de miofibrillas con estructura sarcomérica, en los cultivos *gbbp-1<sup>-/-</sup>* las miofibrillas formadas estaban escasamente estructuradas y la miosina se acumulaba frecuentemente en el citoplasma sin orden aparente (Fig. 21B). En estudios de microscopía electrónica (ME) se confirmó la deficiente organización de las miofibrillas en los cultivos *gbbp-1<sup>-/-</sup>* (Fig. 21C) y la aparición de cuerpos citoplasmáticos de material fibrilar que podían carecer de organización (Fig. 21D, izquierda) o presentar estructura radial (Fig. 21D, derecha).



**FIG. 21. Análisis comparativo del proceso de diferenciación en mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>*.** **A**, Cultivos de mioblastos *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) fueron diferenciados durante 5 días y observados por microscopía de contraste de fases. Amplificación: 100 x. **B**, Los cultivos usados en **A** fueron estudiados por microscopía confocal con anticuerpos contra miosina (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barras: 20  $\mu$ m. **C**, Los cultivos usados en **A** fueron analizados mediante ME. **D**, Detalle de los cuerpos citoplasmáticos observados en mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* diferenciados.

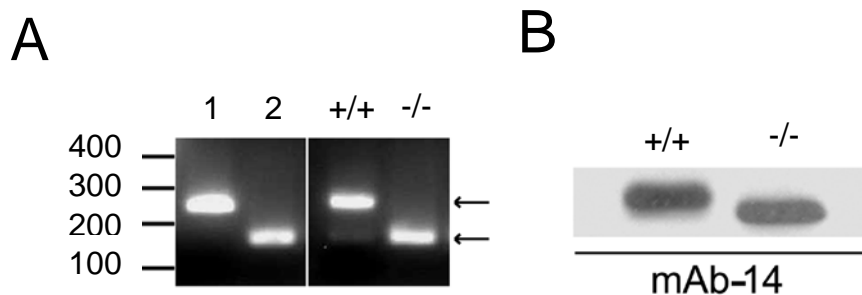
### 3.4.2 Caracterización bioquímica y morfológica del músculo estriado de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>*.

A pesar de la disminuída capacidad miofibrilogénica de los mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>*, los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* se desarrollaban con aparente normalidad, de modo que alcanzaban pesos y tamaños que no diferían de los alcanzados por ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* del mismo sexo y edad (datos no mostrados). Asimismo, los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* presentaban fertilidad inalterada y se reproducían entre ellos y con

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

ratones *gpbp-1<sup>+/-</sup>* con normalidad. Por otra parte, la falta de expresión de mGPBP-1 en ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* no afectó al tamaño y forma de los músculos de las patas traseras tales como sóleo, gastrocnemio, cuádriceps y tibial anterior (resultados no mostrados).

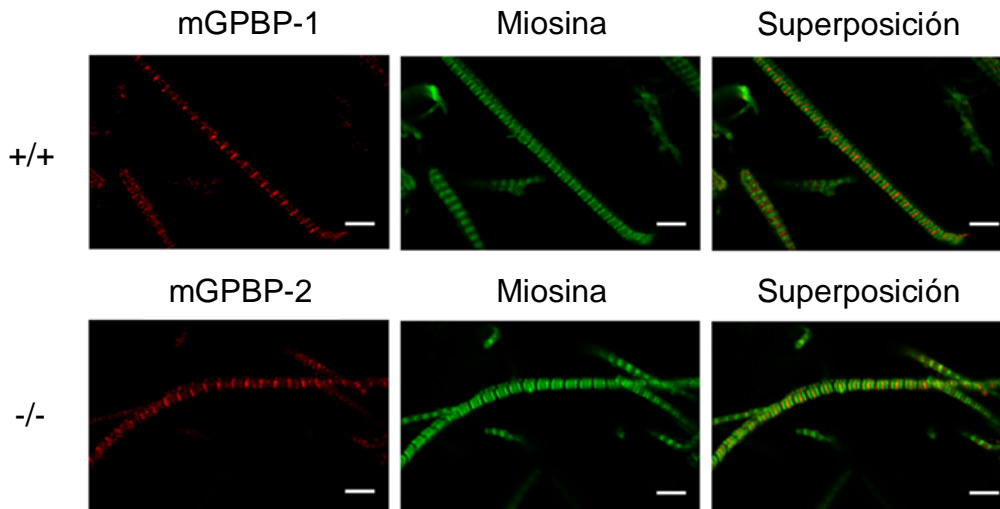
Por procedimientos de RT-PCR se analizaron los niveles de expresión de las distintas isoformas de mGPBP en los músculos de las patas traseras de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (Fig. 22A). Se comprobó que en el músculo de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* sólo se observaba expresión de mGPBP-2, a unos niveles que eran similares a los de mGPBP-1 en los ratones control. Mediante análisis de *Western blot* se comprobó que la ausencia de expresión de proteína mGPBP-1 en ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* era efectivamente sustituida por la de proteína mGPBP-2, distinguible de mGPBP-1 por su mayor movilidad electroforética (Fig. 22B).



**FIG. 22. Estudio de la expresión de isoformas de mGPBP en ratones *gpbp-1<sup>+/-</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>*.** **A**, El RNA del tejido muscular de las patas traseras de ratones *gpbp-1<sup>+/-</sup>* (+/+) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) fue sometido a RT-PCR con oligonucleótidos que hibridaban en los exones 10 y 12 de *Col4a3bp* en posiciones próximas al exón 11. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. En reacciones control (calles 1 y 2) se usaron la construcción pVAX-pCAGS-Stop-Gbp (calle 1), y pVAX-pCAGS-Stop-GbpD26, (calle 2) que contenían el cDNA de mGPBP-1 y -2, respectivamente. El tamaño de los productos generados por mGPBP-1 y mGPBP-2 en la PCR difería en los 76 pb del exón 11, y eran distinguibles en un gel de agarosa al 2%. Con flechas se señalan las posiciones de los productos principales de PCR generados por los mRNAs de mGPBP-1 (flecha superior) y mGPBP-2 (flecha inferior). **B**, Extractos de tejido muscular de las patas traseras de ratones *gpbp-1<sup>+/-</sup>* (+/+) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-) fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos mAb14. Las proteínas mGPBP-1 (+/+) y mGPBP-2 (-/-) se distinguen por su diferente movilidad electroforética.

Además de los análisis de expresión del gen *Col4a3bp*, se estudió la composición y la estructura del tejido muscular de ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y de las miofibrillas aisladas correspondientes mediante técnicas de histología, inmunohistoquímica, microscopía confocal y ME. Estos estudios no mostraron signos de distrofia ni anomalías estructurales en cuádriceps, sóleos ni gastrocnemio. El número de fibras regenerativas de menor diámetro y con núcleos centrales, considerados indicios de regeneración muscular, resultó ser escaso tanto en ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* como en sus controles *gpbp-1<sup>+/+</sup>*. Los ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* tampoco mostraron diferencias en la proporción de fibras musculares de tipo II (con miosina rápida) y de tipo I (con miosina lenta) en músculos sóleos, según se comprobó por técnicas inmunohistoquímicas con cortes transversales usando anticuerpos contra ambos tipos de miosina. Estudios de ME tampoco revelaron anomalías estructurales en las miofibrillas ni diferencias en cuanto número, tamaño, forma o agrupación de las mitocondrias (resultados no mostrados).

Posteriormente, se analizó la expresión de mGPBP-1 y mGPBP-2 en miofibrillas aisladas de ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* usando microscopía confocal (Fig. 23). En miofibrillas de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>*, la proteína mGPBP-2 ocupaba las mismas posiciones que la proteína mGPBP-1 en miofibrillas de ratones control *gpbp-1<sup>+/+</sup>*. Es decir, se situaba en el centro de la banda A (línea M) en co-localización con la miosina muscular.

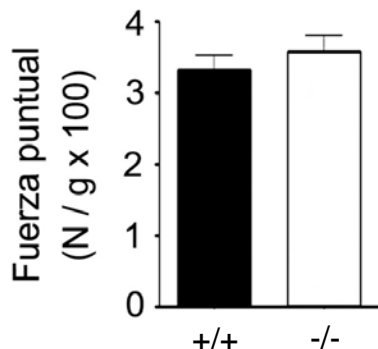


**FIG. 23. Las proteínas mGPBP-1 y mGPBP-2 se encuentran en la línea M de las miofibrillas de ratones *gpbp-1*<sup>+/+</sup> y *gpbp-1*<sup>-/-</sup>, respectivamente.** Miofibrillas aisladas a partir de músculos de las patas traseras de ratones *gpbp-1*<sup>+/+</sup> (+/+, n=4) y *gpbp-1*<sup>-/-</sup> (-/-, n=4) fueron analizadas por microscopía confocal con anticuerpos policlonales obtenidos en pollo contra proteínas GPBP (rojo), y con anticuerpos policlonales de conejo contra la cadena pesada de la miosina muscular (verde). La expresión miofibrilar de mGPBP-2 en ratones *gpbp-1*<sup>-/-</sup> no se distingue de la de mGPBP-1 en ratones *gpbp-1*<sup>+/+</sup>. Barras: 5 μm

Por otra parte, la estructura de las miofibrillas de ratones *gpbp-1*<sup>-/-</sup> no difería de la de ratones *gpbp-1*<sup>+/+</sup>, de modo que el análisis por microscopía confocal de la expresión y distribución de proteínas sarcoméricas como la miosina, la actinina (característica del disco Z) y la actina no permitió observar alteraciones en los ratones *gpbp-1*<sup>-/-</sup> (resultados no mostrados).

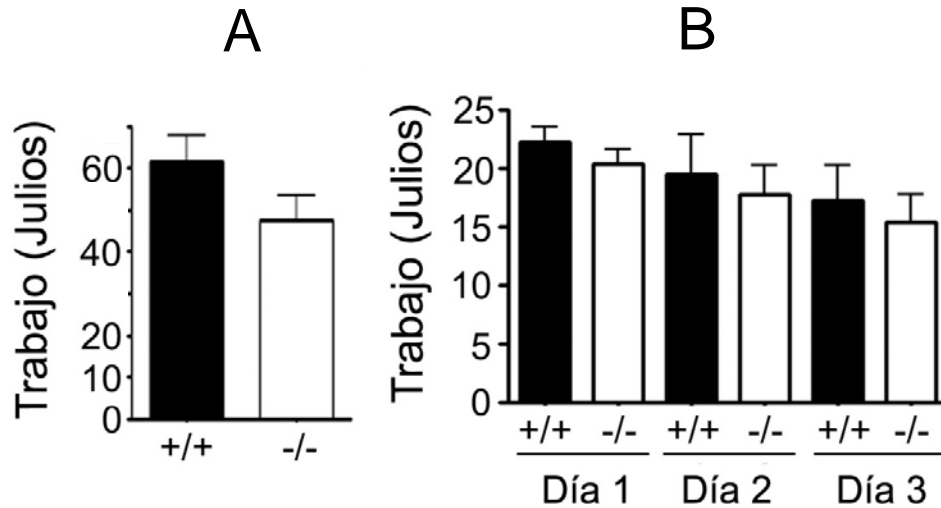
La ausencia de mGPBP-1 no altera la fuerza ni la resistencia física de los ratones *gpbp-1*<sup>-/-</sup>. Aunque la ausencia de mGPBP-1 no provocó alteraciones estructurales evidentes en músculos de ratones adultos, cabía la posibilidad de que la función muscular estuviese de algún modo alterada. Para comprobarlo, ratones *gpbp-1*<sup>-/-</sup> y sus controles *gpbp-1*<sup>+/+</sup> fueron sometidos a pruebas físicas de fuerza de sujeción (*grip strength*) y de fatiga. En las pruebas de fuerza de sujeción, los ratones *gpbp-1*<sup>-/-</sup> y *gpbp-1*<sup>+/+</sup> se comportaron de forma similar, de

modo que las escasas diferencias en el rendimiento carecían de significación estadística según el test t de Student (Fig. 24).



**FIG. 24. La ausencia de mGPBP-1 no altera la fuerza de sujeción de los ratones.** Ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+, n=7) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-, n= 9) fueron sometidos a pruebas de fuerza de sujeción. Han sido representados en diagrama de barras las medias de los experimentos en unidades de Newton/gramo de ratón x 100 junto con los errores estándar de media (EEM).

En los experimentos de resistencia a la fatiga (Fig. 25), los ratones fueron sometidos a una primera prueba en la que el trabajo desarrollado por los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* fue inferior al desarrollado por los ratones control *gpbp-1<sup>+/+</sup>*, aunque las diferencias carecían de significación estadística (Fig. 25A). Posteriormente, los ratones fueron sometidos durante tres días consecutivos a pruebas de esfuerzo adicionales en condiciones más exigentes, aunque tampoco en este caso hubo diferencias significativas entre los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y sus controles (Fig. 25B).



**FIG. 25. La ausencia de mGPBP-1 en los músculos no altera de forma significativa la resistencia física de los ratones. A,** Ratones *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (+/+, n= 7) y *gpbp-1<sup>-/-</sup>* (-/-, n= 9) fueron sometidos a una prueba de esfuerzo en una cinta sin fin. El trabajo desarrollado fue calculado y representado (media ± EEM). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de ratones con el test *t* de Student. **B,** Los animales usados en **A** fueron posteriormente sometidos a tres pruebas de esfuerzo adicionales en días sucesivos en condiciones más exigentes. El trabajo desarrollado ha sido calculado y representado como en **A**.

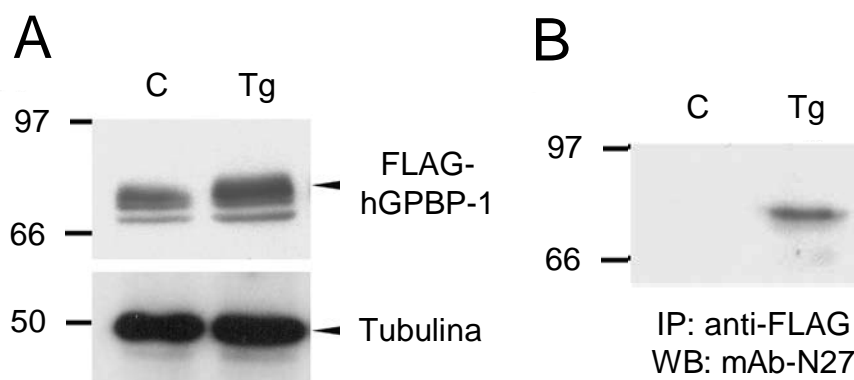
### 3.5 Caracterización de ratones transgénicos que expresan GPBP-1 humana (ratones Tg-hGPBP-1).

Para profundizar en el conocimiento del papel de mGPBP-1 en la miogénesis, se utilizó un modelo de ratón transgénico sobre fondo genético C57BL/6 (Tg-hGPBP-1), que expresaba de modo ubicuo la proteína humana (h) GPBP-1 fusionada al péptido FLAG (FLAG-hGPBP-1), y que habíamos previamente desarrollado y utilizado para otros propósitos (Revert *et al.* 2007). En adelante, se usará también el término hGPBP-1 para hacer referencia a la proteína FLAG-hGPBP-1 expresada en los ratones Tg-hGPBP-1.



### 3.5.1 La expresión de hGPBP-1 en los mioblastos de ratón Tg-hGPBP-1 facilita el ensamblaje del citoesqueleto miofibrilar durante la miogénesis.

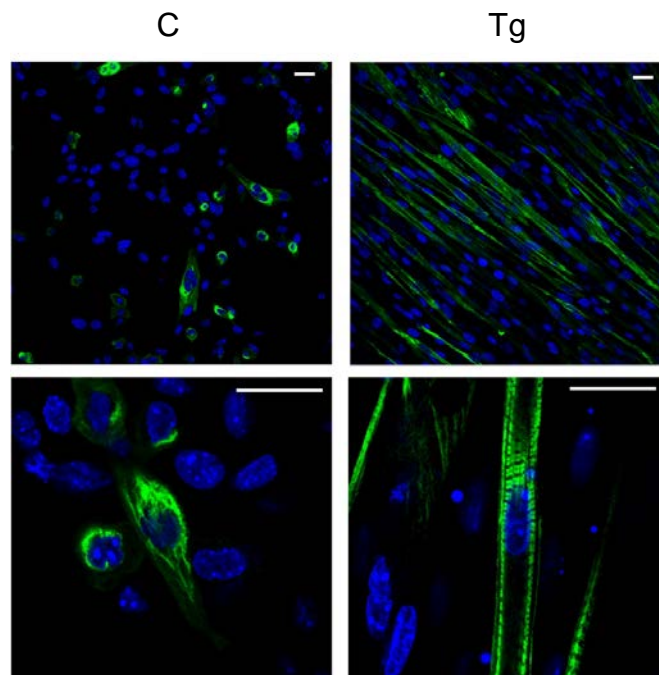
De modo similar a como se había hecho con ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y *gpbp-1<sup>+/+</sup>*, se derivaron líneas celulares de mioblastos a partir de músculo cuádriceps de ratones Tg-hGPBP-1 (Tg) y de sus controles no transgénicos C57BL/6 (C). Una vez inmortalizadas las líneas celulares, se analizó la expresión de GPBP por *Western blot* (Fig. 26) utilizando mAb-N27 (Miralem *et al.* 2010), anticuerpos que reconocen las proteínas GPBP-1,-2 y sus ortólogos murinas. Se comprobó un aumento de reactividad con anticuerpos contra GPBPs en lisados de mioblastos Tg-hGPBP-1 (Fig. 26A, Tg) que correspondía a la expresión de la proteína recombinante FLAG-hGPBP-1 como se comprobó por inmunoprecipitación con resina anti-FLAG y posterior análisis de los inmunoprecipitados por *Western blot* (Fig. 26B).



**FIG. 26. Caracterización de la expresión recombinante de hGPBP-1 en los mioblastos Tg-hGPBP-1.** **A**, Extractos de mioblastos no diferenciados procedentes de ratones Tg-hGPBP-1 (Tg) y C57BL/6 (C) fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos anti-GPBP mAb-N27 (parte superior) y con anticuerpos anti-tubulina (parte inferior). Las cabezas de flecha señalan la posición de las proteínas indicadas. **B**, Los extractos de **A** fueron extraídos con resina anti-FLAG (IP) y el material precipitado analizado por *Western blot* (WB) con anticuerpos mAb-N27.

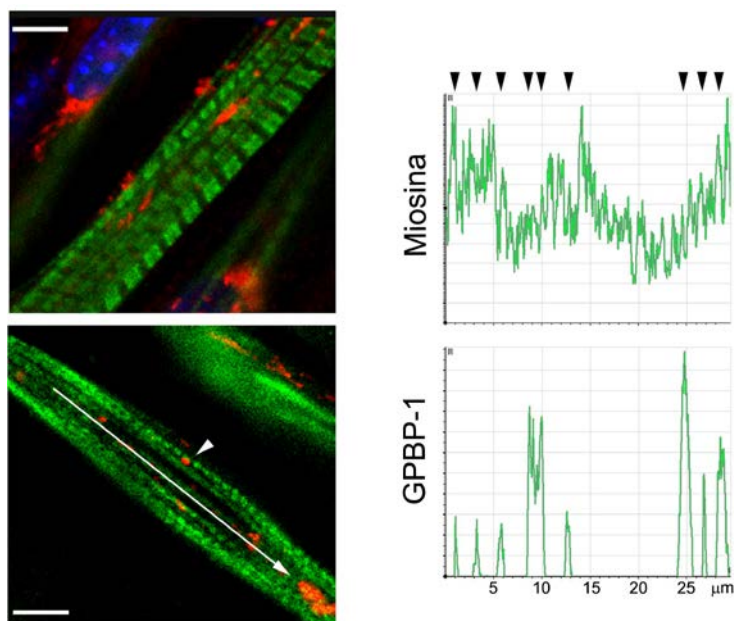
## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

Para estudiar el efecto de la expresión de hGPBP-1 sobre la capacidad miogénica, los mioblastos Tg-hGPBP-1 y control fueron diferenciados en paralelo. Los mioblastos Tg-hGPBP-1 evidenciaron mayor capacidad de fusión y miofibrillogénica que los mioblastos control (Fig. 27). Estos resultados eran consistentes con los observados con las líneas de mioblastos derivados de ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>*, carentes de mGPBP-1, cuya capacidad miogénica era inferior a la de sus controles *gpbp-1<sup>+/+</sup>* (Fig. 21). De este modo, tanto la formación de miotubos por fusión de mioblastos como la generación de miofibrillas se encontraba potenciada por la expresión de hGPBP-1.



**FIG. 27. La expresión de FLAG-hGPBP-1 potencia la miogénesis.** Mioblastos derivados de ratones Tg-hGPBP-1 (Tg) y de ratones control C57BL/6 (C) fueron cultivados en condiciones de diferenciación durante 2 días y analizados por microscopía confocal con anticuerpos monoclonales contra la miosina muscular (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Barras: 20  $\mu$ m

También se comprobó que en mioblastos Tg-hGPBP-1 diferenciados, GPBP-1 (incluyendo mGPBP-1 y hGPBP-1) se localizaba en espacios intermiofibrilares, y en ocasiones co-localizando con la banda A en las miofibrillas en formación (Fig. 28).



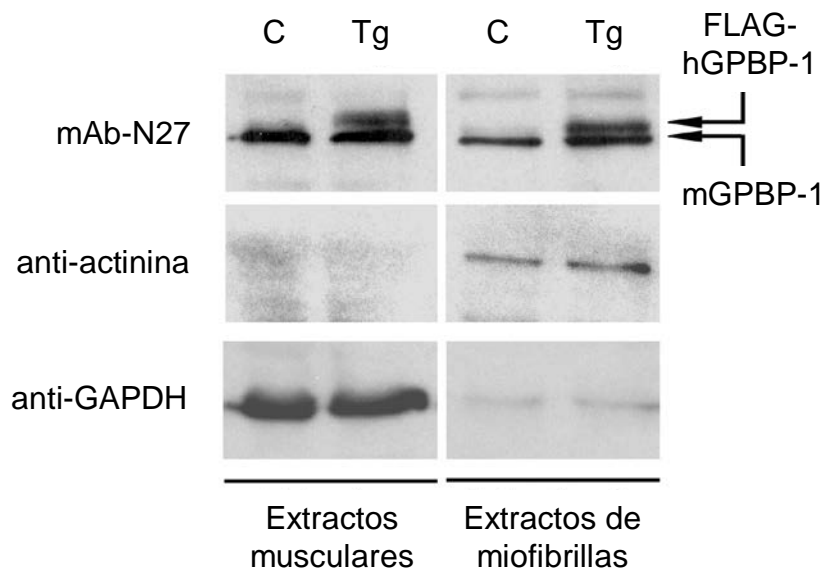
**FIG. 28. GPBP-1 se expresa en las proximidades de las miofibrillas en formación.** Mioblastos Tg-hGPBP-1 fueron cultivados en medio de diferenciación durante 2 días y procesados para ser observados por microscopía confocal con anticuerpos policlonales anti-GPBP obtenidos en conejo (rojo) y anticuerpos monoclonales contra la cadena pesada de la miosina muscular (verde). En la imagen inferior, la punta de flecha indica co-localización de GPBP-1 con la banda A de una miofibrilla. La flecha indica la región de la imagen cuyas distribuciones de fluorescencias roja (GPBP-1) y verde (miosina) se muestran en las gráficas de la derecha. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). Las puntas de flecha en la parte superior de las gráficas de la derecha indican puntos de co-localización de miosina y GPBP-1. Barras: 5  $\mu\text{m}$

### 3.5.2 Análisis bioquímicos y morfológicos del tejido muscular y las miofibrillas de los ratones Tg-hGPBP-1.

Para estudiar la expresión de proteínas GPBP en ratones Tg-hGPBP-1, se obtuvieron extractos proteicos tanto de músculos enteros como de miofibrillas aisladas que fueron analizados por *Western blot* (Fig. 29) con anticuerpos contra: 1) GPBP (mAb-N27); 2) actinina, una proteína exclusivamente

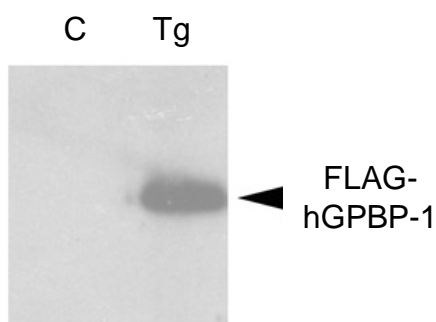
## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

miofibrilar; y 3) GAPDH, una proteína no miofibrilar. En los extractos de músculo, mAb-N27 reconoció una única banda de 77 kDa en ratones control (Fig. 29, C) y dos bandas muy próximas en ratones Tg-hGPBP-1 (Fig. 29, Tg) de las que la superior debía ser la proteína recombinante hGPBP-1 y la inferior la proteína endógena mGPBP-1. Con extractos de miofibrillas, los anticuerpos mAb-N27 mostraron un patrón de expresión de proteínas GPBP similar al de los extractos musculares, siendo parecida la intensidad de las bandas detectadas para idénticas cantidades de extractos. Por el contrario, la proteína sarcomérica actinina, exclusiva de los discos Z, se veía claramente enriquecida en extractos miofibrilares. Al mismo tiempo, la presencia de la enzima glicolítica GAPDH en extractos miofibrilares era muy limitada en comparación con lo observado en los extractos musculares. Todo esto indicaba que si bien mGPBP-1 y hGPBP-1 formaban parte de las miofibrillas, esta no era su único lugar de expresión en el tejido muscular.



**FIG. 29. GPBP-1 es una proteína presente en miofibrillas de ratón.** Extractos proteicos de músculo total y de miofibrillas (50 µg) de patas posteriores de ratones control C57BL/6 (C) y Tg-hGPBP-1 (Tg) fueron analizados por *Western blot* con los anticuerpos indicados. Con flechas se muestran las bandas correspondientes a la proteína endógena mGPBP-1 y a la proteína recombinante FLAG-hGPBP-1.

Finalmente, utilizando resina anti-FLAG-agarosa se procedió a inmunopurificar FLAG-hGPBP-1 a partir de extractos de miofibrillas procedentes de ratones Tg-hGPBP-1 (Fig. 30),

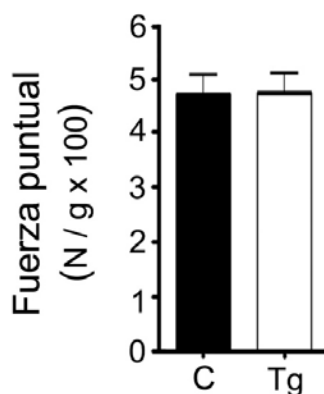


**FIG. 30. Inmunopurificación de la proteína recombinante FLAG-hGPBP-1 a partir de extractos de miofibrillas de ratones Tg-hGPBP-1.** Un miligramo de extracto de proteínas procedente de miofibrillas de ratón control C57BL/6 (C) y de ratón Tg-hGPBP-1 (Tg) fue sometido a inmunoprecipitación con resina anti-FLAG-agarosa y análisis por *Western blot* del material inmunoprecipitado con mAb-N27. Se indican la posición (cabeza de flecha) y la identidad del polipéptido reactivo aislado.

La expresión de hGPBP-1 no pudo ser asociada a cambios o alteraciones estructurales. Así, los estudios histológicos de músculos cuádriceps usando la tinción de HE no permitieron observar diferencias entre ratones Tg-hGPBP-1 y controles, y ni en unos ni en otros se advirtieron signos de distrofia. En estudios de inmunohistoquímica con cortes transversales de sóleos de ratones control y Tg-hGPBP-1, tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia de fibras de tipo I (con miosina muscular lenta) y de tipo II (con miosina muscular rápida). Por otra parte, el análisis por microscopía confocal de miofibrillas aisladas a partir de músculos de ratones controles y Tg-hGPBP-1 no revelaron la existencia de diferencias en la distribución de miosina, actinina y actina (no mostrado) entre ambas líneas de ratones.

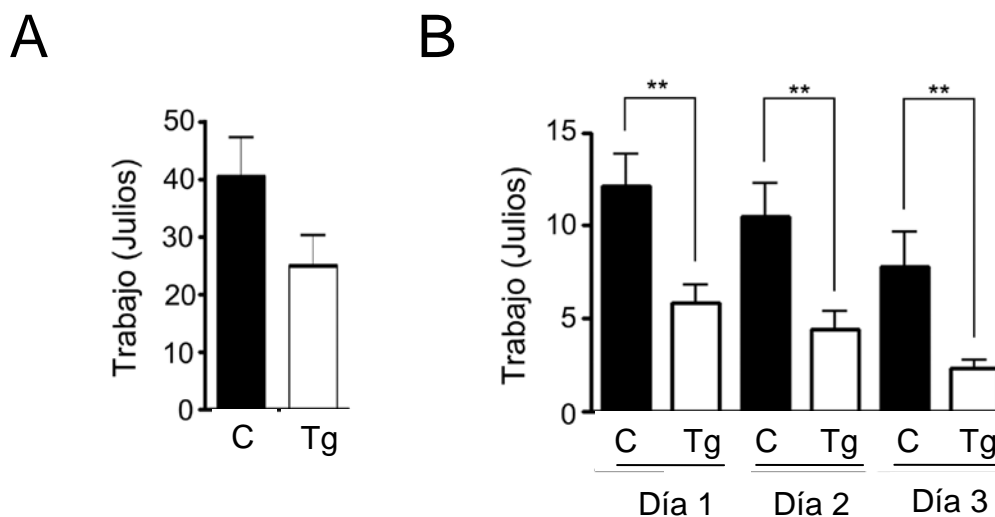
### 3.5.3 La expresión de hGPBP-1 disminuye la resistencia física de los ratones y promueve la aparición de agregados tubulares en el tejido muscular.

Finalmente, se sometieron ratones Tg-hGPBP-1 y sus controles a las mismas pruebas funcionales a las que habían sido sometidos los ratones *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y *gpbp-1<sup>+/+</sup>*. En la prueba de fuerza de sujeción, los resultados obtenidos con ratones Tg-hGPBP-1 no difirieron de los obtenidos con sus controles (Fig. 31).



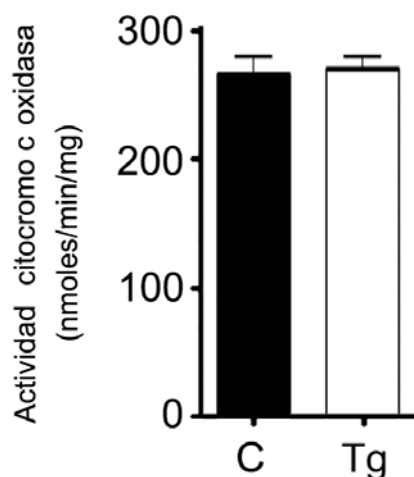
**FIG. 31. La expresión de hGPBP-1 en el ratón no altera su fuerza de sujeción.** Ratones Tg-hGPBP-1 (Tg, n=12) y sus controles C57BL/6 (C, n=8) fueron sometidos a pruebas de fuerza de sujeción. Se representan las medias de los ensayos realizados con los EEM, siendo las unidades Newton/gramo de ratón x 100.

En las pruebas de resistencia sobre una cinta sin fin, los ratones Tg-hGPBP-1 resultaron menos resistentes que sus controles y desarrollaron menos trabajo que éstos, aunque las diferencias no alcanzaban significación estadística según el test t de Student (Fig. 32A). Sin embargo, en pruebas realizadas en días consecutivos y en condiciones más exigentes, las diferencias entre ratones transgénicos y controles aumentaron progresivamente y llegaron a ser estadísticamente significativas (Fig. 32B).



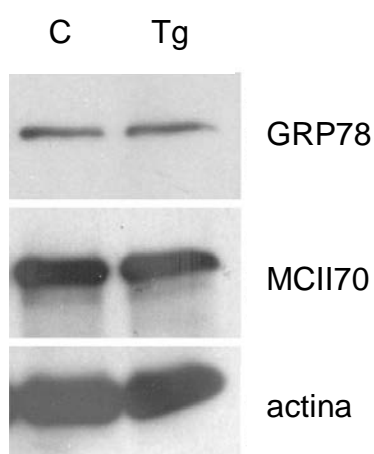
**FIG. 32. La expresión de hGPBP-1 en ratones disminuye su resistencia física.** **A**, Ratones Tg-hGPBP-1 (Tg, n= 12) y sus correspondientes controles C57BL/6 (C, n=8) fueron sometidos a un primer ensayo de resistencia en cinta sin fin. Se muestran las medias con los EEM del trabajo desarrollado por ambos grupos de ratones expresado en Julios. **B**, Un día después del primer ensayo, los ratones fueron sometidos a pruebas adicionales en días consecutivos y en condiciones progresivamente más exigentes. Los resultados se expresan como en el panel **A**. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas entre los dos grupos de ratones según el método de análisis estadístico t de Student ( $p < 0,01$ ).

Finalizadas las pruebas de resistencia a la fatiga y transcurridas 24 h, los ratones fueron sacrificados y muestras de su tejido muscular analizadas. La histología no desveló diferencias entre los ratones Tg-hGPBP-1 y controles. De este modo, las tinciones con HE no evidenciaron signos que pudieran explicar las diferencias de resistencia observadas (datos no mostrados). Del mismo modo las mitocondrias cardíacas de los ratones Tg-hGPBP-1 no mostraban una actividad citocromo c oxidasa reducida en comparación con mitocondrias control (Fig. 33), ni tampoco en mitocondrias aisladas de músculo esquelético (datos no mostrados).



**FIG. 33.** La actividad de la citocromo c oxidasa mitocondrial en los ratones Tg-hGPBP-1 y en sus controles son similares. Un día después de finalizarse las pruebas de fatiga, se aislaron mitocondrias cardíacas de ratones Tg-hGPBP-1 (Tg, n=2) y de sus controles (C, n=2) y se determinó la actividad citocromo c oxidasa. Se representan las medias con las desviaciones estándar de las medias de los resultados obtenidos.

Además, después del esfuerzo los ratones TG-hGPBP-1 y sus controles mostraron niveles similares de la proteína mitocondrial MCII70 (subunidad FP del complejo II mitocondrial de 70 kDa) y de GRP78 (un biomarcador de estrés de RE) en los músculos de las patas, según se comprobó por *Western blot* (Fig. 34). Esto indicaba que no había diferencias entre ambos tipos de ratones en cuanto a la cantidad de mitocondrias en los músculos de las patas (MCII70) y descartaba que la fatiga de los ratones Tg-hGPBP-1 estuviera mediada por un estrés de retículo.



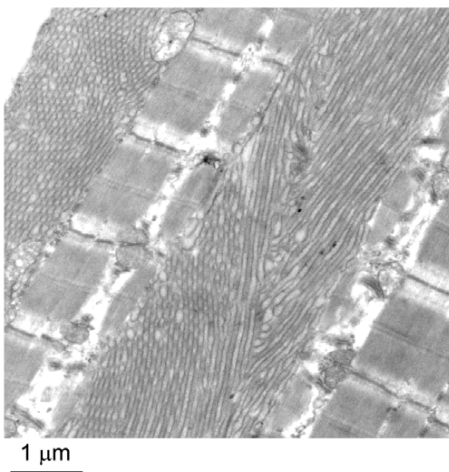
**FIG. 34.** La expresión de hGPBP-1 en ratones no altera la expresión de la proteína mitocondrial MCII70 ni del marcador de estrés de retículo endoplásmico GRP78. Cincuenta microgramos de extractos de proteína de músculos de extremidades de ratones control (C, n=2) y Tg-hGPBP-1 (Tg, n=2) fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos específicos contra GRP78, MCII70 o actina.

Muestras musculares analizadas mediante ME no evidenciaron diferencias entre ratones Tg-hGPBP-1 y sus controles en cuanto a estructura, tamaño,



número y distribución de las mitocondrias, ni revelaron anomalías estructurales en los sarcómeros (resultados no mostrados).

La única diferencia estructural que se observó entre el músculo esquelético de los ratones Tg-hGPBP-1 y sus controles fue la aparición de agregados tubulares en músculos de ratones Tg-hGPBP-1 después de los ensayos de fatiga (Fig. 35). Estos agregados son estructuras membranosas cuyo origen se sitúa en el retículo sarcoplásmico (RS) (Chevessier *et al.* 2005) y cuya formación ha sido asociada a alteraciones en la homeostasis del calcio (Salviati *et al.* 1985).



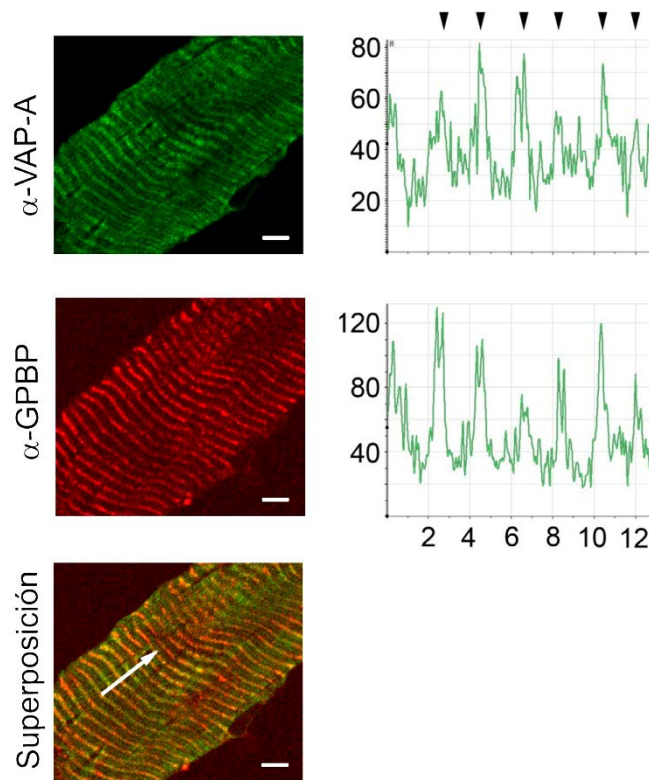
**FIG. 35. Los ratones Tg-hGPBP-1 desarrollan agregados tubulares.** Micrografía electrónica representativa de agregados tubulares formados en cuádriceps de ratón Tg-hGPBP-1 (n=2) después de realizar los ensayos de fatiga que no se encontraron en sus respectivos controles de la misma edad (n=2).

### 3.6 Proteínas del músculo esquelético que interaccionan con GPBP-1.

El patrón de localización estriado de las proteínas GPBP en cortes de tejido muscular y la presencia de mGPBP-1 en las miofibrillas de ratón, sugerían que GPBP-1 interaccionaba con proteínas miofibrilares o con estructuras próximas a las miofibrillas como el RS.

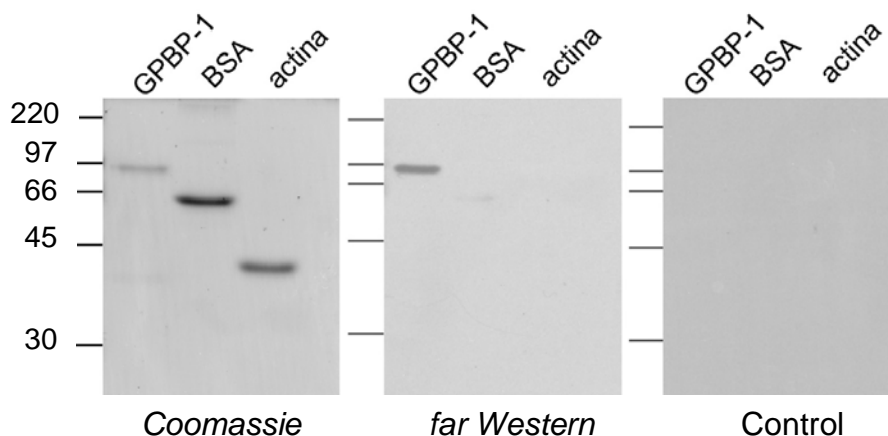
**3.6.1 VAP-A: Co-localización e interacción con GPBP-1.**

Anteriormente se había descrito la interacción de GPBP-2 con la proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico VAP-A (Kawano *et al.* 2006), que en tejido muscular se encuentra en el RS con un patrón de distribución estriado (Gkogkas *et al.* 2008). Mediante microscopía de inmunofluorescencia con cortes de tejido muscular de ratón, se pudo comprobar que mGPBP-1 co-localizaba con VAP-A, poniendo en evidencia que las dos proteínas co-localizan en la línea M (Fig. 36).



**FIG. 36. VAP-A y mGPBP-1 co-localizan en músculo esquelético de ratón.** Cortes de cuádriceps de ratón fueron analizados por microscopía confocal usando anticuerpos policlonales de cabra contra VAP-A y anticuerpos policlonales obtenidos en pollo contra GPBP. A la derecha se muestra la distribución de intensidades de fluorescencia para cada proteína a lo largo de la región marcada por la flecha en la imagen de superposición. Las cabezas de flecha de arriba indican puntos de co-localización de VAP-A y GPBP-1. Barras: 5  $\mu$ m

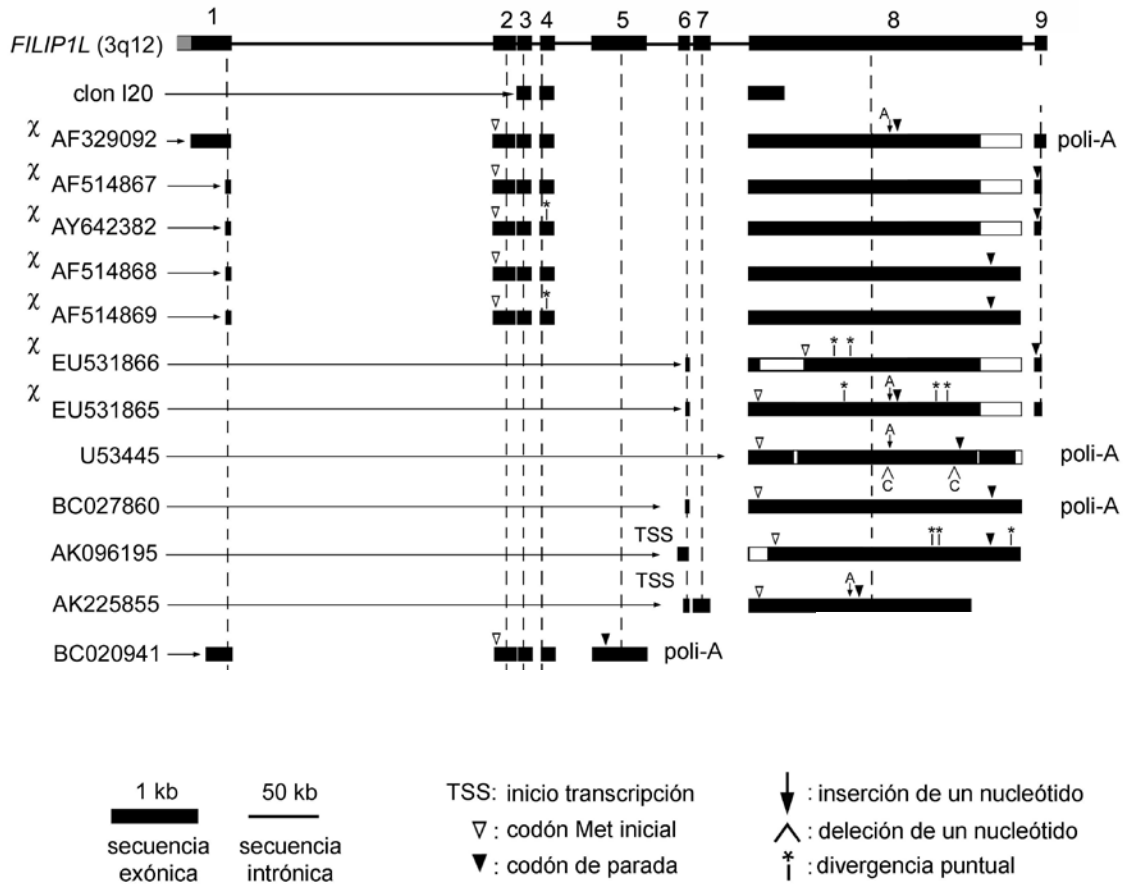
Por otra parte, mediante técnicas de *far Western* se comprobó que VAP-A interaccionaba de modo específico y directo con GPBP-1 (Fig. 37).



**FIG. 37. VAP-A se une específicamente a GBP.** GBP-1 producida en levadura (200 ng), BSA (600 ng) y actina (400 ng) fueron analizadas mediante SDS-PAGE. El gel fue teñido con azul de *Coomassie* (*Coomassie*) o transferido a una membrana de PVDF e incubado o bien con VAP-A purificada (1  $\mu$ g/mL) y con anticuerpos de cabra contra VAP-A (*far Western*), o bien con anticuerpos de cabra contra VAP-A (control). Ambas membranas fueron posteriormente incubadas con anticuerpos anti-IgG de cabra marcados con peroxidasa y reveladas con un sustrato quimioluminiscente de HRP.

### 3.6.2 *GBP-interacting proteins* (GIPs): isoformas de *FILIP1L* preferentemente expresadas en músculo estriado.

Para profundizar en el papel biológico de GBP-1 en el tejido muscular, utilizando la técnica de dos-híbridos en levadura, se aisló un cDNA de músculo esquelético humano de 800 pb (I-20) que codificaba un polipéptido que se unía fuertemente a GBP-1 (Revert-Ros *et al.* 2011). A partir de I-20, con técnicas estándar de hibridación de ácidos nucleicos y de PCR se realizó el clonado molecular de las proteínas GIP, polipéptidos de 90 y 130 kDa: GIP90 (GenBank accession AF329092), GIP130a (AF514867), GIP130b (AF514868), GIP130c (AF514869) y GIP130d (AY642382) (Revert-Ros *et al.* 2011). Las proteínas GIP son codificadas por el gen *FILIP1L*, situado en la región 3q12 del genoma humano, que genera una familia de al menos doce mRNAs (Fig. 38).



**FIG. 38. Representación de la estructura exón-intrón del gen *FILIP1L* y de la secuencia exónica presente en cada uno de los mRNAs generados por este gen humano.** Aparece también representado el cDNA I-20 aislado mediante la técnica de dos-híbridos en levadura. Con el símbolo  $\chi$  se han indicado las especies identificadas por nosotros. Con espacios huecos se han representado fragmentos exónicos ausentes en los mRNAs. Con el término poli-A se indican los mRNAs cuya cola de poli-adenosinas ha sido descrita.

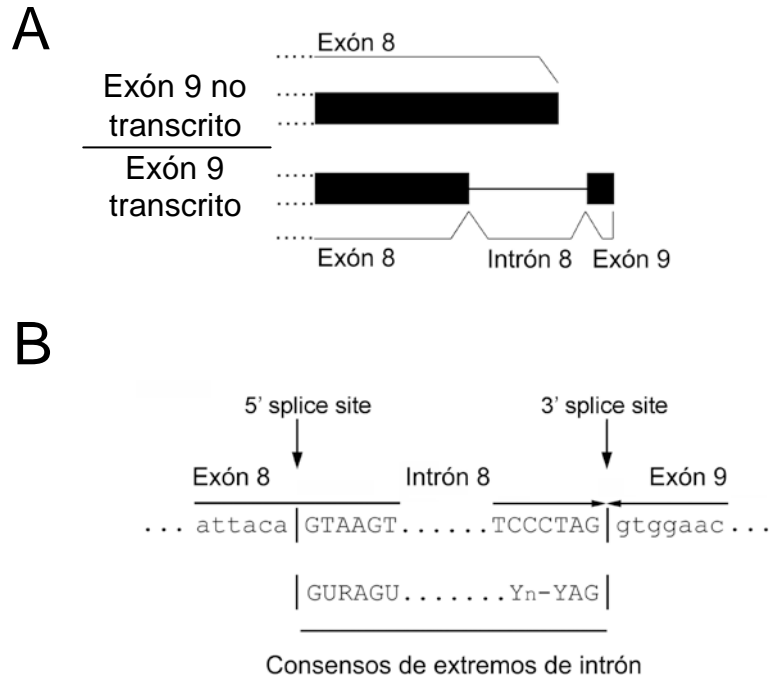
El análisis de los mRNAs generados por *FILIP1L* ha permitido poner en evidencia que este gen está sometido a un amplio programa de diversificación transcripcional. Este programa incluía el uso de al menos dos promotores alternativos: 1) un promotor distal (aguas arriba hacia 5') que generaba los mRNAs de las proteínas GIP (AF329092, AF514867, AF514868, AF514869 y AY642382) y de la isoforma BC020941, que tienen en común la presencia de los exones 1-4 y 2) un promotor proximal (aguas abajo hacia 3') que controlaba

la expresión de BC027860 y las isoformas BC027860 (U53445, AK096195, AK225855, EU531865, EU531866), todas ellas carentes de los exones 1-4. La existencia de al menos dos promotores se puso en evidencia porque las isoformas AK096195 y AK225855, tienen definido el sitio de inicio de transcripción (*transcription start site* o TSS) en el exón 6, y por lo tanto las isoformas con exones 1-4 tenían que generarse necesariamente a partir de otro promotor aguas arriba en la cadena de DNA. La existencia de un promotor proximal ha sido confirmada por otros autores (Burton *et al.* 2011). Además, el gen *FILIP1L* presenta polimorfismo de DNA, que afecta al nucleótido 503 de la pauta abierta de lectura de las proteínas GIP, y que impacta el sentido del codón 168 de las las mismas. Así, mientras GIP90, GIP130a y GIP130c tienen G<sup>503</sup> en su mRNA y R<sup>168</sup> en su estructura primaria, GIP130b y GIP130d presentan A<sup>503</sup> y H<sup>168</sup>, respectivamente, siendo la función biológica de este polimorfismo todavía desconocida (Revert-Ros 2004).

Por otra parte, se observó que un fenómeno de poliadenilación diferencial generaba mRNAs con extremos 3' alternativos localizados en los exones 5 (BC0200941), 8 (U53445 y BC027860) y 9 (AF329092). También se produce el fenómeno de empalme alternativo de exones internos, como se evidencia en AK225855, con un exón 7 ausente en todas las demás especies de mRNA. La inclusión del exón 9 como exón terminal (AF329092, AF514867, AY642382, EU531865 y EU531866) siempre lleva aparejada un acortamiento del exón 8, porque este aporta una secuencia interna de consenso de inicio de intrón (*5' splice site*) que resulta operativa cuando, y probablemente como consecuencia de un retardo en la poliadenilación del pre-mRNA, se transcribe

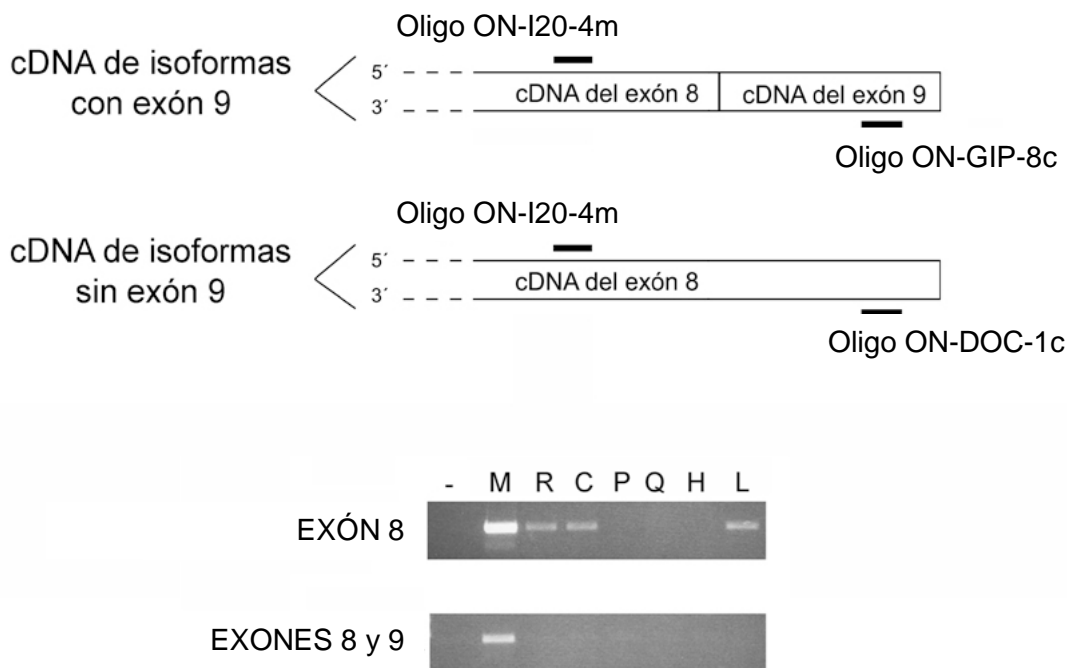
## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

el exón 9 que aporta un consenso de final de intrón (3' splice site), según se esquematiza en la Fig. 39.



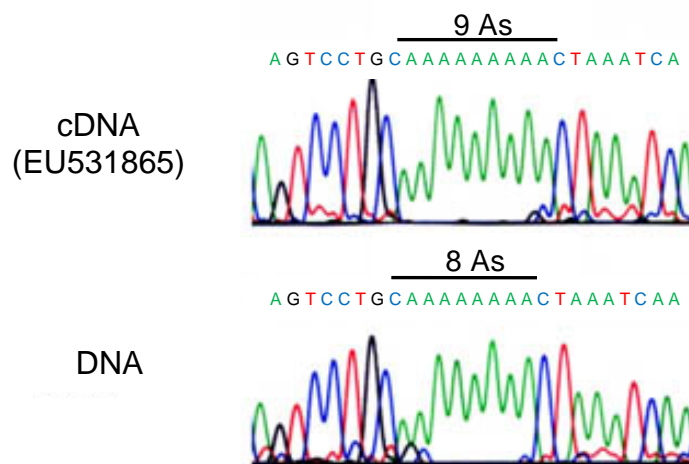
**FIG. 39. La poliadenilación retardada y consiguiente transcripción del exón 9 de *FILIP1L* produce un acortamiento del exón 8. A,** Esquema representativo del acortamiento que se produce en el exón 8 cuando el exón 9 es transcrito. **B,** Secuencia de DNA en las regiones indicadas del exón 8 y del límite entre el intrón 8 y el exón 9, alineada a los consensos de inicio y final de intrón, donde R representa una purina e Y una pirimidina.

La actividad del promotor distal de *FILIP1L* y la consiguiente transcripción de los exones 1-4 característicos de las proteínas GIP parece ser propia de músculo estriado (Revert-Ros *et al.* 2011). De modo análogo a lo que sucede con los exones 1-4, mediante técnicas de PCR sobre bibliotecas de cDNA de distintos tejidos humanos, hemos podido comprobar que el exón 9 tiene una expresión restringida, siendo únicamente notable su expresión en el músculo esquelético (Fig. 40).



**FIG. 40. El exón 9 de *FILIP1L* tiene expresión restringida.** Cantidades similares de bibliotecas de cDNA procedentes de distintos órganos o tejidos (Clontech) fueron analizadas mediante PCR con oligonucleótidos que amplifican el exón 8 completo (exón 8) o una región que comprende el exón 8 acortado y el exón 9 de *FILIP1L* (exón 9), respectivamente. Los distintos productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio y luz UV. M, músculo; R, riñón; C, cerebro; P, páncreas; Q, queratinocitos; H, hígado; L, linfocitos.

Uno de los fenómenos más llamativos que participan en la diversificación de los productos derivados de *FILIP1L* es la existencia de inserciones puntuales de nucleótidos sobre el pre-mRNA dentro del exón 8. En particular, las especies AF329092 (GIP90), U53445 y EU531865 presentan la inserción de una adenosina en una posición homóloga que conlleva un cambio en la pauta de lectura y detención prematura de la traducción. Hemos comprobado que el DNA del donante del que procede la especie de mRNA EU531865 carece de la adenosina correspondiente, lo que significa que la presencia de la adenosina en el mRNA tiene que deberse a una inserción post-transcripcional sobre el pre-mRNA, o lo que es lo mismo, a un fenómeno de edición de pre-mRNA (Fig. 41).



**FIG. 41. Secuencia de nucleótidos del cDNA de la especie EU531865 y del correspondiente DNA.** En el DNA hay 8 nucleótidos de adenina mientras que en la región homóloga del cDNA indicado hay 9. En los mRNAs U53445 y AF329092 también se ha identificado esta inserción.

Es importante señalar que a partir de la misma muestra biológica de la que procede EU531865 pudimos amplificar también AF514867, AF514868 y una secuencia equivalente a BC027860, ninguna de las cuales presentaba la correspondiente inserción nucleotídica, lo que ponía en evidencia que, dentro del mismo tejido, el fenómeno de la inserción no se producía en todas las especies de mRNA. Además de la inserción de adenosinas, los productos de *FILIP1L* también sufrían modificación química de bases nitrogenadas específicas como se observaba en EU531865, donde una timina era sustituida por una citosina y dos adeninas por guaninas, y de nuevo, estos cambios no se objetivaban en otros mRNAs de *FILIP1L* en la misma muestra biológica. Asimismo, en el mRNA EU531866 se producía un cambio de timina por citosina y otro de guanina por adenina. En todos estos casos el cambio se produce entre nucleótidos de purinas (A, G) o pirimidinas (T, C) datos no mostrados. Además de todo esto, también era llamativa la presencia de deleciones intra-exónicas dentro del exón 8. Estas deleciones, que no utilizan los consensos para intrones, han sido descritas en otras ocasiones (Zhang *et al.* 1999), y en el



caso de las especies de *FILIP1L* alcanzan una longitud de hasta 505 pb (EU531866).

### **3.7 Principales características de la estructura primaria de las proteínas GIP.**

Las estructuras primarias de las proteínas GIP conservan un dominio CortBP2 (*Cortactin Binding Protein 2*) y predicen características estructurales como superhélices, cremalleras de leucina y en algunos casos estructuras de poliprolina.

#### **3.7.1 El dominio CortBP2 y características estructurales de las isoformas derivadas del gen *FILIP1L* y de genes ortólogos.**

El dominio CortBP2, presente en GIP130a<sup>(3)</sup> y en otras siete proteínas relacionadas, se ha identificado y registrado recientemente (20-01-2010) en la base de datos *CDD* (*Conserved Domain Database*) del *NCBI* (pfam09727). En la Fig. 42 se muestra el alineamiento múltiple de las ocho secuencias que modelizan el dominio. Este dominio, cuya función se desconoce en la actualidad, se conserva en el extremo N terminal de todas las proteínas GIP y en proteínas parálogas y ortólogas (ver más adelante).

(3) De ahora en adelante, y a menos que se indique lo contrario, con el término GIP130 se hará referencia a la isoforma GIP130a

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

```

Q95QQ9 (C elegans)*          34 NLPEEQGVN.[1].FSSDELMKLLSFMEGEVQAREVDIDHLKRERTKILLSEA
GIP130 (H. sapiens)         57 HSGNGHQA.E.[1].LSRDDLLFLLSILEGELQARDEVIGILKAEKMDLALLEA
Q4SEP7 (T. nigroviridis)*   60 AGGREKGRD      LSRDDLIFFLLSILEGELQARDEVITVLRKADKLDVALLLEA
CortBP2 (C. aethiops)       26 AAKKEFDVD.[1].LSKSELRMLLSVMEGELEARDLVI EALRARKEVFIQER
CortBP2 (O. anatinus)       23 PAKKEFDVD.[1].LSKAEELRMLLSVMEGELEARDVVI EALRARKEVFIQER
FILIP1 (H. sapiens)         65 CERKTKKSL.[1].LSKEDLIQLLSIMEGELQARDEVIHMLKTEKTKPEVLEA
Q4SD24 (T. nigroviridis)*   39 EEEKRRCG.[1].LSKKDLLHLLGVMEGEVQAREDIIVLLKSDRTGADTLEA
CTTNBP2 (G. gallus)        22 AAKREFVD.[1].LSKPELRMLLSVMEGELEARDLVI EALRARKEVFIQER

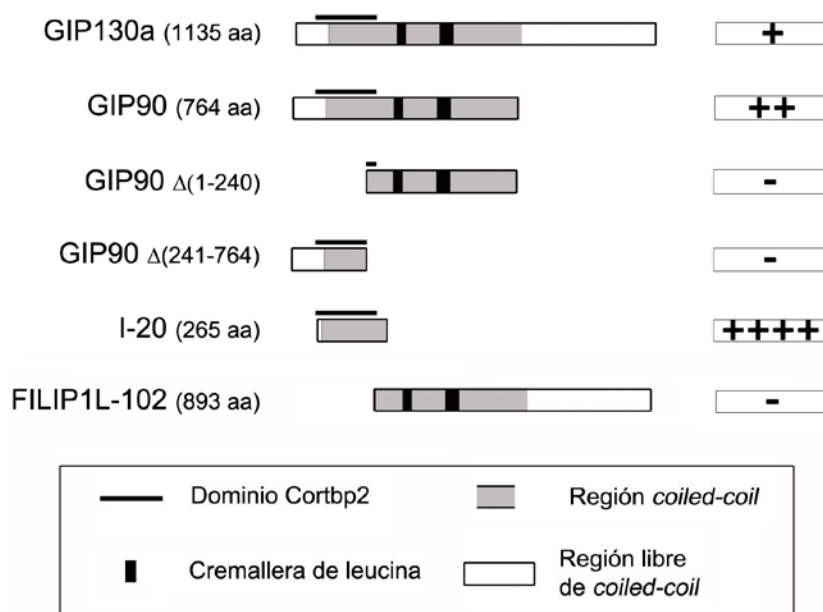
[1].YGLKLNNDPFAALRRDSAITG.[1].QIDEEKI.[3].YESQVDQLDKMMAVQKQSQRNAAVLLVALEKKQYK.[36].I
[1].YGFVTPKKVLEALQRDAFQAK.[1].TPWQEDI      YEKPMNELDKVVEKHKE SYRRILGQLL VAEKSRRO.[36].I
[1].YGFVTPQNVLQALQRDAVQGR.[1].DAFQEDI      YQKPMELDKLVEKQRETQGRMLQQLLAEARAHQR.[36].V
      YGRFNLNDPFLALQRDYEAGA.[1].DKEKKPV      CTNPLSILEAVMAHCKKMQERMSAQLAAAESRQKK      L
      YGRFNLNDPFLALQRDYEAGA.[1].EAEKKPV      CTNPLSILEAVMAHCRKMQERMSAQLAAAESRQKK      L
[1].YGSAEPEKVLRLVLRDAI LAQ.[1].KSIGEDV     YEKPISELDRLEEKQKETYRRMLEQLLLAEKCHRR.[36].L
[1].YGSVPIKPLQALQRDGLTA      GPQSQDV     YQGPMAELERLELKQKETYRRMLEQLLLAEKCHRR.[37].L
      YGRFNMSDPFLALQRDFEAGA.[1].EKERKPI      CMNPLSILEAVMAHCRKMQERMSAQLAAESENROKK      L

EFHIEEKRKAETIAKDKMEMTLGNEKKRHESIVLYLIQERKQM 229
DQEIKSQEKEQEKEKRVTTLKEELTKLKSFALMVVDEQQRI 249
DQERSHQEQKERENRREVAAALKEELTKLKSFALMLGQDRPRP 251
EMEKQLQALEQEHKLLAARLEEEERGKKNQVVLMLVKECKQL 181
EMEKSQLHV LQQEHRKLSARLEDEERGKKNQVVLMLVKECKQL 178
EQEKAYQARKEKENAKRLNKLRLDELVKLKSFALMLVDERQMH 257
EQEKAYQACRDRDHNRTLEKVR AELVKLKSFALMLVVEEHQLH 231
EIEKSQIQNLELEHKKLSARLEEEERGKKNKHI VMLVKECKQL 177

```

**FIG. 42. Alineamiento múltiple de las secuencias utilizadas para modelizar el dominio CortBP2.** Las proteínas utilizadas y la especie a la que pertenecen se detallan al inicio de cada secuencia. Los asteriscos indican proteínas sin nombre oficial en la base de datos del NCBI; se muestra en estos casos el acceso a la base de datos *Universal Protein Resource (UniProt)*. En números en verde se indica la posición del inicio y del final de cada secuencia en la estructura primaria de la proteína correspondiente. Entre corchetes se especifica el número de aminoácidos no alineados en el modelo. Se representan en rojo los aminoácidos más conservados en el conjunto de las proteínas que definen el dominio y en azul los menos conservados. Resaltan en fondo amarillo y subrayados los residuos correspondientes a los polipéptidos de GIP130 necesarios para la interacción con GPBP (Saus y Revert-Ros 2006). Números de acceso de las proteínas en el NCBI: Q95QQ9 (*C. elegans*), GI: 75019623; GIP130 (*H. sapiens*), GI: 162416295; Q4SEP7 (*T. nigroviridis*), GI: 82263993; CtnBP2 (*O. anatinus*), GI: 118572272; CtnNP2 (*C. aethiops gi*), 118572262; FILIP1 (*H. sapiens*), GI: 74750226; Q4SD24 (*T. nigroviridis*), GI: 82263423; CTTNBP2 (*G. gallus*), GI: 148727317.

Además de la presencia del dominio CortBP2, en las proteínas GIP se distinguía una región central que predecía una estructura super-helicoidal (*coiled-coil*), característica de proteínas estructurales, que incluye cremalleras de leucina. A ambos lados de esta región se sitúan dominios no super-helicoidales. El dominio CortBP2 de las proteínas GIP participaba en la interacción con GPBP-1, según se colige de estudios anteriores realizados mediante la técnica de dos-híbridos en levaduras (Fig. 43).



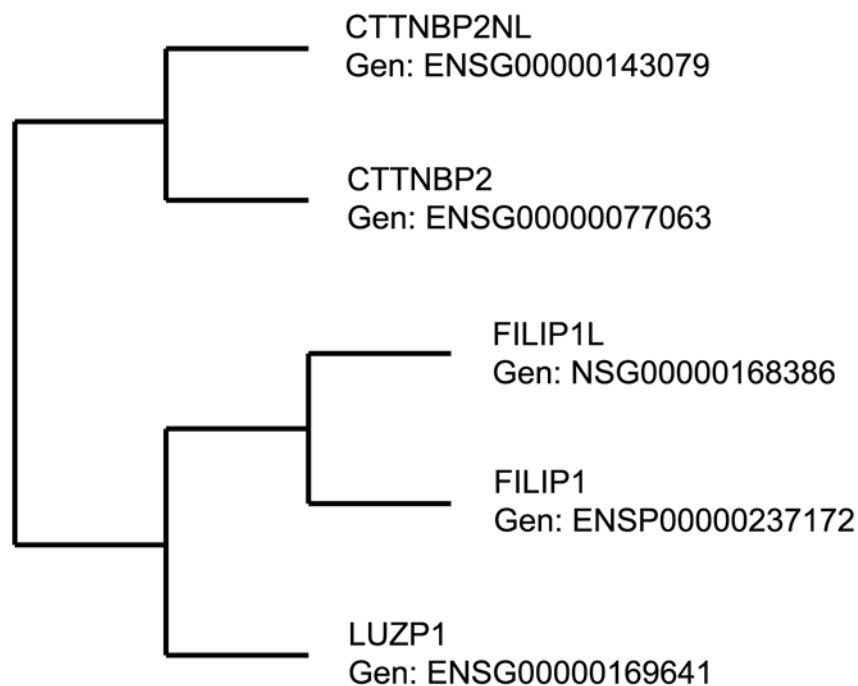
**FIG. 43. El dominio CortBP2 de las proteínas GIP participa en la interacción con GPBP-1.** Representación esquemática de los polipéptidos ensayados en la tesis doctoral de Revert-Ros (2004) sobre la que se resaltan los rasgos estructurales más relevantes (región *coiled-coil*, cremalleras de leucina y dominio CortBP2). A la derecha se representa con cruces (+) la capacidad de interacción con GPBP-1 en ensayos de dos híbridos en levadura. Los accesos a las secuencias de mRNA y cDNA de las isoformas completas representadas son: AF329092 (GIP90), AF514867 (GIP130) y BC027860 (FILIP1L-102).

GPBP-1 interaccionaba con las proteínas GIP, que contienen el dominio CortBP2, pero no una isoforma de 102 kDa (FILIP1L-102), que carece de este dominio (Revert-Ros 2004), poniendo en evidencia que la presencia de CortBP2 en el extremo N confería a estas proteínas el punto de reconocimiento principal para GPBP-1.

*FILIP1L* forma parte de un grupo de tres genes parálogos que también incluye *FILIP1* (*Filamin A Interacting Protein 1*) y *LUZP1* (*Leucine Zipper Protein 1*), que codifican las proteínas L-FILIP (Nagano *et al.* 2002) y LUZP1, respectivamente. Los tres genes se conservan en vertebrados. Sólo *FILIP1L* y *FILIP1* codifican proteínas con dominio CortBP2. En humanos, existe otro grupo independiente de genes parálogos con similitud con *FILIP1L*, compuesto

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

por los genes *Cortactin Binding Protein 2* (CTTNBP2) y *Cortactin Binding Protein 2 N terminal like* (CTTNBP2NL) que se conservan en cordados, y codifican las proteínas CTTNBP2 y la CTTNBP2NL, respectivamente, ambas con un dominio CortBP2. En la Fig. 44 se representa la historia evolutiva de los dos grupos de genes parálogos mencionados según el método de predicción de paralogía/ortología descrito por Vilella *et al.* (2009), que utiliza el servicio informático de la plataforma *Ensemble*.



**FIG. 44. Esquema representativo de la historia evolutiva del gen *FILIP1L* y los genes humanos relacionados.** Se detalla el número de acceso a la base de datos *Ensemble* de cada gen representado.

**3.7.1.1 El dominio CortBP2 es la región más conservada en las proteínas GIP, L-FILIP, CTTNBP2 y CTTBP2NL.**

Las estructuras primarias de las proteínas GIP, L-FILIP, CTTNBP2 y CTTNBP2NL presentan su mayor homología en el dominio CortBP2 (Fig. 45). Las funciones del dominio CortBP2 son hasta ahora desconocidas, pero hay dos hechos que sugieren cuales pueden ser: 1) En el dominio CortBP2 de las proteínas GIP o en regiones limítrofes del dominio se enmarcan los motivos necesarios para su interacción con GPBP-1 (Saus y Revert-Ros 2006). 2) Las proteínas L-FILIP, CTTNBP2 y CTTNBP2NL, que contiene el dominio, tienen funciones relacionadas con el citoesqueleto: L-FILIP se asocia al citoesqueleto de actina a través de la filamina A y regula la migración celular (Nagano *et al.* 2002), y CTTNBP2 y CTTNBP2NL se unen a complejos de miosina V y dineína que controlan la proliferación y la división celular (D'Ambrosio 2010). Por consiguiente, es posible que GPBP regule funciones celulares a través de la interacción con proteínas con dominios CortBP2 que estén asociadas al citoesqueleto.

# RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

	..... 10 .....	..... 20 .....	..... 30 .....	..... 40 .....	..... 50 .....
GIP130	MRSRGS DTEG SA-----	QKKFPRHTKG	HSFQGPKNMK	HRQQDKDSPS	
L-FILIP	MRSRNQGGES ASDGHISCPK	PSIIGNAGEK	SLSEDAKKKK	KSNRKEDDVM	
CTTNBP2	-----	-----	MATDGASCEP	DLSRAPEDAA	
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	1111000010	1100000000	0000000000	1212223112	1123113312
	..... 60 .....	..... 70 .....	..... 80 .....	..... 90 .....	..... 100 .....
GIP130	ESDVILPCPK AEKPHSGNGH	QAEDLSRDDL	LFLLSILEGE	LQARDEVI GI	
L-FILIP	ASGTVKRHLK TSGECERKTK	KSLELSKEDL	IQLLSIMEGE	LQAREDVIHM	
CTTNBP2	-----G AAAAAAKKEF	DVDTL SKSEL	RMLLSVMEGE	LEARDLVIEA	
CTTNBP2NL	-----	-----M	NLEKLSKPEL	LTLFSILEGE	LEARDLVIEA
	0100100002	3212121312	4444**847*	53*7*98***	*7**83**35
	..... 110 .....	..... 120 .....	..... 130 .....	..... 140 .....	..... 150 .....
GIP130	LKAEKMDLAL LEAQYGFVTP	KKVLEALQRD	AFQ--AKSTP	WQEDIYEKPM	
L-FILIP	LKTEKTKPEV LEAHYGSAEP	EKVLRLVLRD	AIL--AQEKS	IGEDVYEKPI	
CTTNBP2	LR-ARRKEVF IQERYGRFNL	NDPFLALQRD	YEA--GAGDK	EKKPVCTNPL	
CTTNBP2NL	LK-AQHRDTF IEERYGKYN I	SDPLMALQRD	FETLKEKNDG	EKQPVCTNPL	
	*805625235	8855**3353	454737*6**	4330045443	24659456*7
	..... 160 .....	..... 170 .....	..... 180 .....	..... 190 .....	..... 200 .....
GIP130	NELDKVVEKH KESYRRILGO	LLVAEKSRRQ	TILELEEEKR	KHKEYMEKSD	
L-FILIP	SELDRLLEEKQ KETYRRMLEQ	LLLAEKCHRR	TVYELENEKH	KHTDYMNKSD	
CTTNBP2	SILEAVMAHC KKMQERMSAQ	LAAAESRQKK	L-----	-----	
CTTNBP2NL	SILKVVMMKQC KNMQERMLSQ	LAAAESRHRK	VILDLEERQ	RHAQDTAEGD	
	74*5384552	*5456*764*	*55**63586	5423553532	3512121335
	..... 210 .....	..... 220 .....	..... 230 .....	..... 240 .....	..... 250 .....
GIP130	EFICLLEQEC ERLKKLIDQE	IKSQEKEQE	KEKRVTTLKE	ELTKLKS FAL	
L-FILIP	DFTNLLEQER ERLKKLLEQE	KAYQARKEKE	NAKRLNKLRD	ELVKLKS FAL	
CTTNBP2	-----	-----EME	KLQLQALEQE	HKKLAARLEE	ERGKNKQVVL
CTTNBP2NL	DVTYMLEKER ERLTQQLEFE	KSQVKKFEKE	QKKLSSQLEE	ERSRHKQLSS	
	3220455351	555232484*	5344443*7*	45*4444*68	*4383*6556
	..... 260 .....	..... 270 .....	..... 280 .....	..... 290 .....	..... 300 .....
GIP130	MVVDEQQRIT AQLTLQRQKI	QELTNAKET	HTKLALAEAR	VQEEEEQKATR	
L-FILIP	MLVDERQMH I EQLGLQSQKV	QDLTQKLR EE	EEKLKAITSK	SKEDRQKLLK	
CTTNBP2	MLVKECKQLS GKVIEEAQKL	EDVMAKLEE E	KKKTNELEEE	LSAEKRRSTE	
CTTNBP2NL	MLVLECKKAT NKAAEEGQKA	GELSIKLEKE	KSRVSKLEEE	LAAERKRGLQ	
	*8*3*37435	3753474**5	4785376676	5485436656	5458667355
	..... 310 .....	..... 320 .....	..... 330 .....	..... 340 .....	..... 350 .....
GIP130	LEKELQTQTT KFHQDQDTIM	AKLTNEDSQN	RQLQOKLAL	SRQIDELEET	
L-FILIP	LEVDFEHKAS RFSQEHEEMN	AKLANQESHN	RQLRLKLVGL	TQRIEELEET	
CTTNBP2	MEAQMEKQLS EFDTEREQLR	AKLNREEAHT	TDLKEEIDKM	RKMIEQLKRG	
CTTNBP2NL	TEAQVEKQLS EFDIEREQLR	AKLNREENRT	KTLKEEMESL	KKIVKDLEAS	
	5*46584747	6*43858574	**4688556	54*6477348	463966*745
	..... 360 .....	..... 370 .....	..... 380 .....	..... 390 .....	..... 400 .....
GIP130	NRS-----LR	KAEELQDIK	-----	-----	EKI
L-FILIP	NKN-----LQ	KAEELQELR	-----	-----	DKI
CTTNBP2	SDSKPSSLSP	RKTKDRRLVS	ISVGTEGTVT	RSVACQTDLV	TENADHMKKL
CTTNBP2NL	HQHS---SPN	EQLKPPVTVS	-----	-----	---KGT
	5450000153	6437634275	0000000000	0000000000	0000000565
	..... 410 .....	..... 420 .....	..... 430 .....	..... 440 .....	..... 450 .....
GIP130	-----	-----	-----	-----	-----
L-FILIP	-----	-----	-----	-----	-----
CTTNBP2	PLTMPVKPST	GSPLVSANAK	GSVCTSATMA	RPGIDRQASY	GDLIGASVPA
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000	0000000000
	..... 460 .....	..... 470 .....	..... 480 .....	..... 490 .....	..... 500 .....
GIP130	-----SKG	EYGNAG	-----	-----	-----
L-FILIP	-----AKG	ECGNSS	-----	-----	-----
CTTNBP2	FPPPSANKIE	ENGPST	GSTP	DPTSSTPPLP	SNAAPPTAQT
CTTNBP2NL	-----ATE	PLMLMS	-----	-----	-----
	0000000534	6152550000	0000000000	0000000000	0000000000

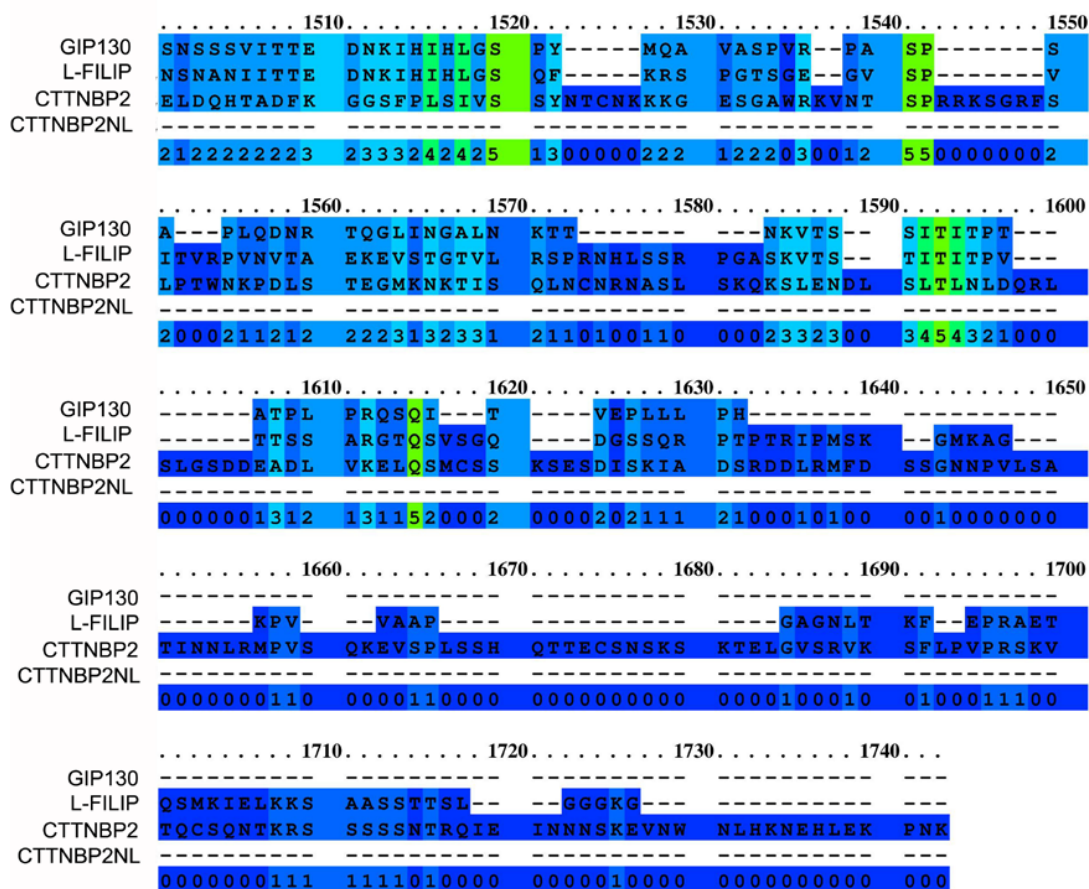
## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

	510	520	530	540	550
GIP130	-----IM	AEVEELRKR	V	-----	-----
L-FILIP	-----LM	AEVENLRKR	V	-----	-----
CTTNBP2	PPMHSLSHSPC	ANTSLSHPGLN	PRIQAARFRF	QGNANDPDQN	GNTTQSPFSR
CTTNBP2NL	-----VF	CQTESFPAER	T	-----	-----
	0000000000	0000000073	4668446373	4000000000	0000000000
	560	570	580	590	600
GIP130	-----DM	EGKDE	EL	IKMEEQ	-----
L-FILIP	-----EM	EGKDE	EI	TKTESQ	-----
CTTNBP2	DVSPTSRLDNL	VAKQLARN	TV	TQALSRTSP	QAGAPSRPGV
CTTNBP2NL	-----HG	SNIA	KM	TNTGLP	-----
	0000000044	4454200056	6542440000	0000000000	0000000000
	610	620	630	640	650
GIP130	--CRDLNK--	-----	RL	ERETLQSK	D
L-FILIP	--CRELRK--	-----	KL	QEEHHSK	E
CTTNBP2	FVGRSLSKTH	GVARVDRGNP	PPIPKKEL	GL	SQTPSPPHFQ
CTTNBP2NL	-----GPATP	-----	AY	SYAKTNGHCD	PEIQTTRILT
	0016343600	0000000000	0000000036	5343234506	3674656334
	660	670	680	690	700
GIP130	RIMALEKLE	-----DAFNK	S	-----KQECYSLK	CN
L-FILIP	RMSELEKLE	-----EAFSK	S	-----KSECTQLH	LN
CTTNBP2	SNTGAKVDNK	TVASTPSSLP	QGNRVINEEN	LPKSSSPQLP	PKPSIDLTV
CTTNBP2NL	AGNNVENQV	-----PPREK	-----	-----SVALAQEK	P
	5243574340	0000045336	3000000000	0074542753	2300784322
	710	720	730	740	750
GIP130	TTK	-----	-----	-----	-----
L-FILIP	LTK	-----	-----	-----	-----
CTTNBP2	PAGCAVSALA	TSQVGAWPAA	TPGLNQPACS	DSSLVIPTTI	AFCSSINPVS
CTTNBP2NL	P	-----	-----	-----	-----
	3320000000	0000000000	0048345524	0445354344	432*554446
	760	770	780	790	800
GIP130	F	-----	-----	-----	-----
L-FILIP	L	-----	-----	-----	-----
CTTNBP2	ASSCRPGASD	SLLVTASGWS	PSLTPLLMSG	GPAPLAGRPT	LLQAAAQGN
CTTNBP2NL	L	-----	-----	-----	-----
	4000000000	7642347306	4546444544	4533450000	4574333702
	810	820	830	840	850
GIP130	QAASSQLQVE	-----	-----	-----	-----
L-FILIP	DGLNKNFKVE	-----	-----	-----	-----
CTTNBP2	VTLLSMLLNE	EGLDINYSCE	DGHSALYSAA	KNGHTDCVRL	LLSAEAQVNA
CTTNBP2NL	HAARHKFQ	-----	-----	-----	-----
	2553436425	0000000000	0054543544	5515362365	3*63543465
	860	870	880	890	900
GIP130	-----KMY	SVTKE	RDDL	KNKLRKAE	EEK
L-FILIP	-----KVY	NLTRE	RDEL	IGKLRKSE	EEK
CTTNBP2	ADKNGFTPLC	AAAAQGHFEC	VELLISYDAN	INRAADGGQT	PLYLACKNGN
CTTNBP2NL	-----AAK	QLARNTVTQV	LSRFTSQQGP	IKPVSPN	SS
	0000000453	4565503365	4457385644	3500100000	4723334354
	910	920	930	940	950
GIP130	NRLQSLEAIE	-----	-----	-----	-----
L-FILIP	KRLDGIIEVE	-----	-----	-----	-----
CTTNBP2	KECIKLLLEA	GTNRSVKTTD	GWTPVHAADV	TGNVDSIKLL	MYHRIPAHGN
CTTNBP2NL	NTANPRGDTS	-----	-----	-----	-----
	6442352235	0000000000	0034333441	2114343523	5230000000
	960	970	980	990	1000
GIP130	-----	ENNKIKELSQ	EVERL	KLKLLK	DMKAI
L-FILIP	-----	EDNKIKELTL	EIERL	KKRLQ	QLEVVE
CTTNBP2	SFNEEESSESS	VFDLDGGEES	PEGISKPVVP	ADLINHANRE	GWTAAHIAAS
CTTNBP2NL	-----PT	IPRAERGNPP	PIPKKPLT	PSPSATPI	-----
	0000000000	4154344332	55324*3283	3324340000	0034444454

# RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

	1010	1020	1030	1040	1050
GIP130	E-YETLERRY ANE-----	RDK-AQFLSK ELEHVKMELA	KY-----KLA		
L-FILIP	E-YDQLEQKF RTE-----	QDK-ANFLSQ QLEEKHQIA	KN-----KAI		
CTTNBP2	KGFKNCLEIL CRHGGLEPER	RDKCNRTVHD VATDDCKHLL	ENLNALKIPL		
CTTNBP2NL	SLTTAEDLAS SCS-----SNT	VVANGKDVEL LLPTSS---	-----		
	5044334333	3250000000	4560453742	3643341242	3200000212
	1060	1070	1080	1090	1100
GIP130	EKTE-----	TSHEQ WLFKRLQEEE	AKSG-HLSRE	VDALKEKIHE	
L-FILIP	EKGE-----	VVSQEA ELRHRFRLEE	AKSR-DLKAE	VQALKEKIHE	
CTTNBP2	RISVGEIEPS	NYGSDDLECE	NTICALNIRK	QTSWDDFSKA	VSQALTNHFQ
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	3222000000	0000012212	0210232133	2250023322	5222223223
	1110	1120	1130	1140	1150
GIP130	YMATED--LI	CHLQGD-HSV	LQKKLNQQE-	-----	NRNRDLGRE-
L-FILIP	LMNKED--QL	SQLQVD-YSV	LQQRFMEEE-	-----	NKNKNMGQE-
CTTNBP2	AISSDGWWSL	EDVTCNNTTD	SNIGLSARSI	RSITLGNVPW	SVGQSFAQSP
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	1322320014	1132030132	2311312230	0000000000	3132223330
	1160	1170	1180	1190	1200
GIP130	IENLTKE---	LERYRHFS	K-----	SLRPSLN	GRRISDP---
L-FILIP	VLNLTKE---	LELSKRYS	R-----	ALRPSVN	GRRMVDV---
CTTNBP2	WDFMRKNKAE	HITVLLSGPQ	EGCLSSVTYA	SMPQLQMMQN	YLRLVEQYHN
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	1124253000	0022212113	2000000000	0002532215	1253231000
	1210	1220	1230	1240	1250
GIP130	-----	QVFSKEVQTE	AVDNEPPDYK	SLIPLERAVI	NG---QLYEE
L-FILIP	-----	PVTSTGVQTD	AVSGEAAEEE	TPAVFIRKSF	QENHIMSNL
CTTNBP2	VIFHGPEGSL	QDYIVHQLAL	CLKHRQMAAG	FSCEIVRAEV	DAGFSKEQLL
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	0000000000	2212112231	2321311211	1111225212	2100011112
	1260	1270	1280	1290	1300
GIP130	SENQDE----	DPNDEG	SVLSFKCSQS	TPCPVNRKLW	IPWMSKSE-G
L-FILIP	RQVGLK----	KPVERS	SVLDRYPPAA	NELTM-RKSW	IPWMRKRENG
CTTNBP2	DLFISSACLI	PVKQSPSKKK	IIIIILENLEK	SSLSELLRDF	LAPLENRSTE
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	1100120000	0000251221	2441110122	2122102313	4214223302
	1310	1320	1330	1340	1350
GIP130	HLQNGK----	-----	MQTKPNANF	VQPGDLVLSH	TPGQPLHIKV
L-FILIP	PSITQE----	-----	KGPRTNSSP	GHPGEVVLSP	KQGQPLHIRV
CTTNBP2	SPCTFQKNG	LSECYFHEN	CFLMGTIAKA	CLQGSDDLVO	QHFRWVQLRW
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	1103020000	0000000000	0101122320	0125213521	2123132431
	1360	1370	1380	1390	1400
GIP130	TPDHVQNTAT	LEITSPTTES	PHSYTSTAVI	PNCGTPKQRI	TILQNASITP
L-FILIP	TPDHENSTAT	LEITSPTSE-	EFFSSTTVI	PTLGNQKPRI	TIIPSPNVMP
CTTNBP2	DGEPMQGLLQ	RFLRRKVVNK	FKGQAPSPCD	PVCKIVDWAL	SVWRQLNSCL
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	2232132222	2242223230	0211223122	5122112024	3411213212
	1410	1420	1430	1440	1450
GIP130	VKSKTSTEDL	MNLEQGMS-P	IT--MATFAR	AQTPESCGSL	TPERTMSPIQ
L-FILIP	QKQK-SGDTT	LGPERAMS-P	VT--ITTFSR	EKTPESGRGA	FADRPTSPFIQ
CTTNBP2	ARLG-TPEAL	LGPKYFLSCP	VVPGHAQVTV	KWMSKLWNGV	IAPRVQEAI-
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	1312031312	4323114505	4300132222	2122320132	1225113251
	1460	1470	1480	1490	1500
GIP130	VLAVTGSASS	---PEQGRS	PEPTEISAKH	AIFRVSPDRQ	SSWQ-FORSN
L-FILIP	IMTVSTSAAP	---AEIAVS	PESEQEMPGR	TILKVTPEKQ	TVPT-FVRKY
CTTNBP2	LSRASVKRQP	GFGQTTAKRH	PSQGQAVVK	AALSILLNKA	VLHGCPPLPRA
CTTNBP2NL	-----	-----	-----	-----	-----
	3213313222	0000121122	5311312202	3232412232	2101011221

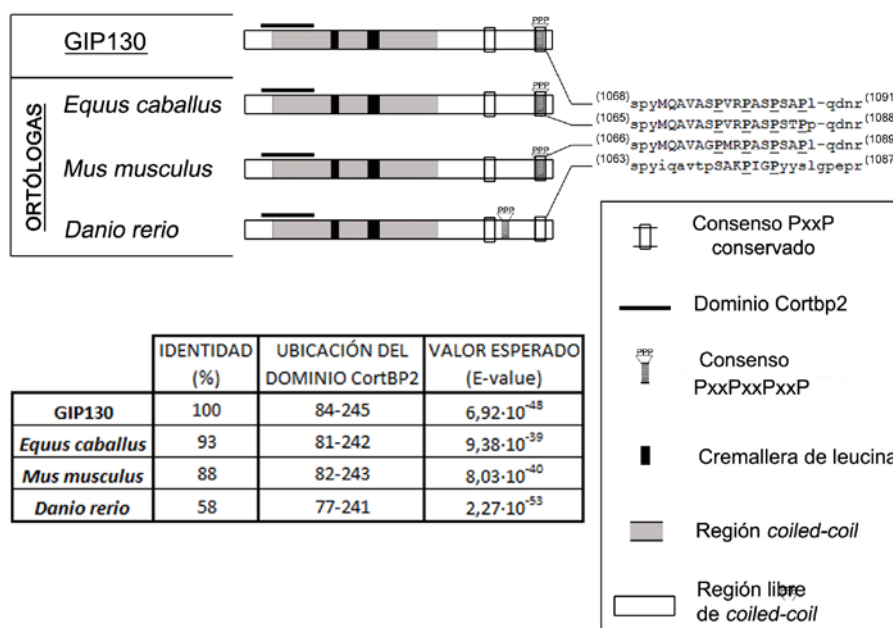




**FIG. 45. El dominio Cortbp2 es la región con mayor homología entre las proteínas parálogas de GIP130.** Alineamiento múltiple obtenido con el programa informático PRALINE de la estructura primaria de GIP130, FILIP1, CTTNBP2 y CTTNBP2NL (NP\_878913.2, NP\_056502.1, NP\_219499.1 y NP\_061174.1 respectivamente). El marco negro delimita el dominio CortBP2 en cada secuencia. La gradación de colores (más azul menos conservación y más rojo mayor conservación) y los números de la última fila indican el grado de conservación de cada residuo en una escala del 1 al 10. Los asteriscos indican identidad en las cuatro proteínas. Enmarcados en azul se indican los residuos de GIP130 necesarios para la interacción con GPBP.

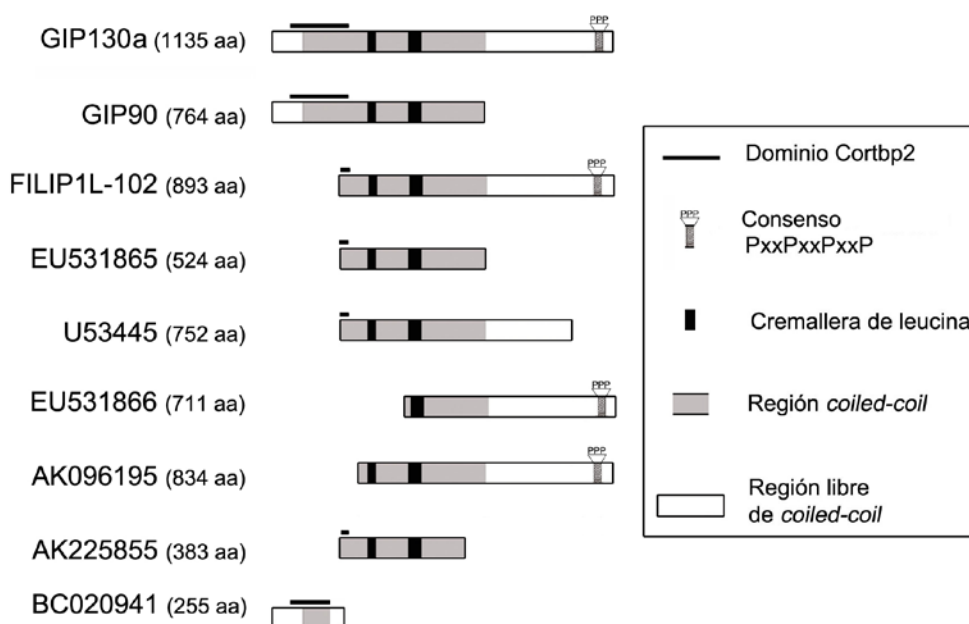
**3.7.2 Proteínas del gen *FILIP1L* y de genes parálogos conservan consensos PxxP en sus extremos carboxilos.**

Las proteínas GIP de 130 kDa también contienen regiones que predicen la existencia de hélices de poliprolina II (PPII) en el dominio no super-helicoidal C terminal, característico de los ligandos de dominios SH3. Dicha estructura viene definida por tres motivos PxxP en tándem (PxxPxxPxxP), donde “P” representa prolina y “x” cualquier residuo. Finalmente, el alineamiento pone en evidencia la presencia de un consenso PxxP en todas las proteínas ortólogas de GIP130, que se localiza en posición N terminal con respecto a la región PPII (Fig. 46).



**FIG. 46. Esquema comparativo de los rasgos estructurales conservados entre proteínas ortólogas de GIP130.** Arriba se destacan los rasgos estructurales de GIP130 y de las proteínas ortólogas indicadas: región superhelicoidal, cremalleras de leucina, dominio CortBP2, motivo PxxP y motivo PxxPxxPxxP. A la derecha del esquema se presenta el alineamiento de la región de GIP130 humano que contiene el motivo PxxPxxPxxP con las correspondientes regiones homólogas de las especies indicadas a la izquierda de la figura. Las secuencias que predicen motivos de unión a dominios SH3, según el programa ANCHOR, se muestran en mayúscula, y las prolinas subrayadas forman parte del consenso completo PxxPxxPxxP. Entre paréntesis, se indica el número del residuo en la secuencia de cada proteína. Las secuencias representadas son: NP\_878913.2 para GIP130 humana, NP\_001157368.1 para su proteína ortóloga de caballo, NP\_001035487.2 para la de ratón y NP\_001103956.1 para la de pez cebra. En la tabla se detalla el porcentaje de identidad respecto a la secuencia humana según el programa BLASTP (NCBI), la posición de los residuos inicial y final del dominio CortBP2 en cada proteína, y la probabilidad de que las homologías del dominio se deban al azar (E-value).

Los mecanismos de diversificación del gen *FILIP1L* humano permiten la expresión de proteínas que teniendo parte de la estructura primaria de las proteínas GIP130, carecen del dominio CortBP2 o de alguna otra región descrita. Así, destaca la ausencia del dominio CortBP2 en FILIP1L-102 (BC027860) y la ausencia de motivo PxxPxxPxxP en GIP90. En este último caso, la inserción de una adenosina en el mRNA de GIP130 produce un cambio de pauta de lectura y un codón prematuro de parada que impide la traducción del motivo PxxPxxPxxP (Fig. 47).

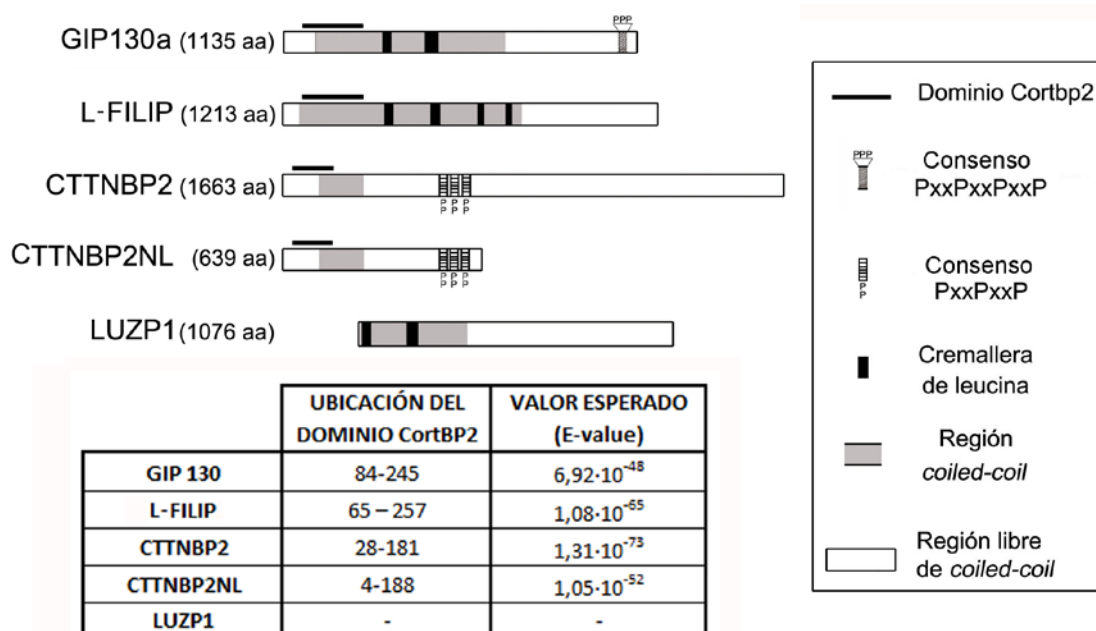


**FIG. 47. Esquema comparativo de los rasgos estructurales presentes en las isoformas FILIP1L.** A la izquierda del esquema de cada isoforma se detalla el nombre de la proteína o el número de acceso de su cDNA correspondiente. GIP130a deriva del número de acceso de Genbank AF514867, GIP90 de AF329092, y FILIP1L-102 de BC027860.

Las estructuras primarias de las proteínas CTTNBP2 y CTTNBP2NL no predicen cremalleras de leucina pero sí presentan consensos PxxPxxP. L-FILIP y LUZP1 predicen cremalleras de leucina y no contienen consensos PxxPxxP. En la Fig. 48 se esquematiza la ubicación del dominio CortBP2 y las

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

características estructurales más notables en isoformas representativas de los genes humanos *FILIP1*, *FILIP1L*, *LUZP1*, *CTTNBP2* y *CTTNBP2NL*.

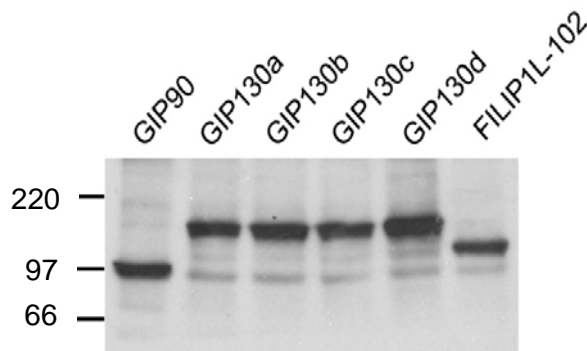


**FIG. 48. Esquema comparativo de los rasgos estructurales conservados entre GIP130 y proteínas parálogas.** La estructura primaria de las proteínas indicadas se encuentran en la base de datos del NCBI con los siguientes números de acceso: NP\_878913.2 para GIP130, NP\_056502.1 para FILIP1, NP\_219499.1 para CTTNBP2, NP\_061174.1 para CTTNBP2NL y NP\_361013.3 para LUZP1. En la tabla se detalla la posición de los residuos inicial y final del dominio CortBP2 en cada proteína y la probabilidad de que las homología del dominio se deban al azar (E-value).

### 3.8 Expresión recombinante de las isoformas principales del gen *FILIP1L*.

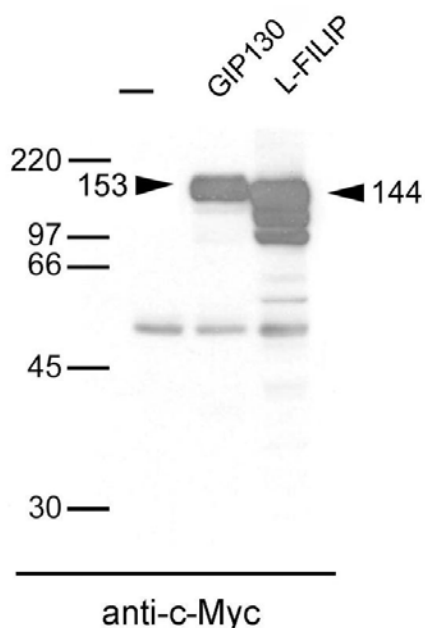
Para profundizar en el estudio, las proteínas producidas por *FILIP1L*: GIP90, GIP130 y FILIP1L-102 fueron expresadas de forma recombinante y caracterizadas mediante *Western blot* (Fig. 49). Se comprobó que los tamaños aparentes de GIP90, GIP130 y FILIP1L-102 eran de 97, 153 y 120 kDa, respectivamente, superiores a sus masas moleculares predichas (90, 130 y

102 kDa), lo que sugiere la presencia de modificaciones postraduccionales sobre todo en el caso de las proteínas GIP130, en los que la diferencia entre el valor esperado y el encontrado era de 23 kDa.



**FIG. 49. Expresión recombinante de isoformas producidas por el gen *FILIP1L*.** Células HeLa fueron transfectadas con construcciones que expresaban las proteínas indicadas con el epitopo c-Myc en posición N terminal. Las células transfectadas fueron lisadas y 50 µg de cada lisado fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos anti-c-Myc.

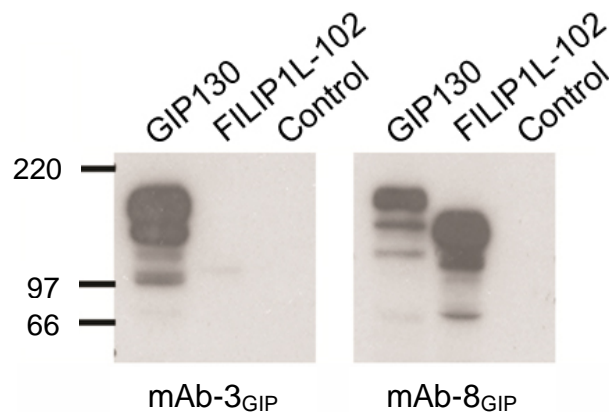
Por su parte, L-FILIP con una masa molecular teórica de 138 kDa, se expresaba en células HeLa como tres polipéptidos de los que el mayor tenía un tamaño aparente de 144 kDa, ligeramente inferior a los 153 kDa de las proteínas GIP130 (Fig. 50).



**FIG. 50. Análisis electroforético comparativo de L-FILIP y GIP130.** Células HeLa fueron transfectadas con construcciones del vector pRK5 que expresaban GIP130 o L-FILIP, o con el vector vacío (-). Las células transfectadas fueron lisadas y 50 µg de cada lisado analizados por *Western blot* con los anticuerpos indicados. Las cabezas de flecha y los números indican posición y tamaño en kDa de los polipéptidos mayoritarios correspondientes.

## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales específicos contra proteínas FILIP1L. Uno de ellos (mAb-8<sub>GIP</sub>) reconocía tanto las proteínas GIP como otras isoformas (FILIP1L-102), mientras que mAb-3<sub>GIP</sub> reconocía las proteínas GIP pero no FILIP1L-102. Esto significaba que el epítopo de mAb-3<sub>GIP</sub> se localiza en los 240 residuos N terminales de las proteínas GIP que no están presentes en FILIP1L-102 (Fig. 51).



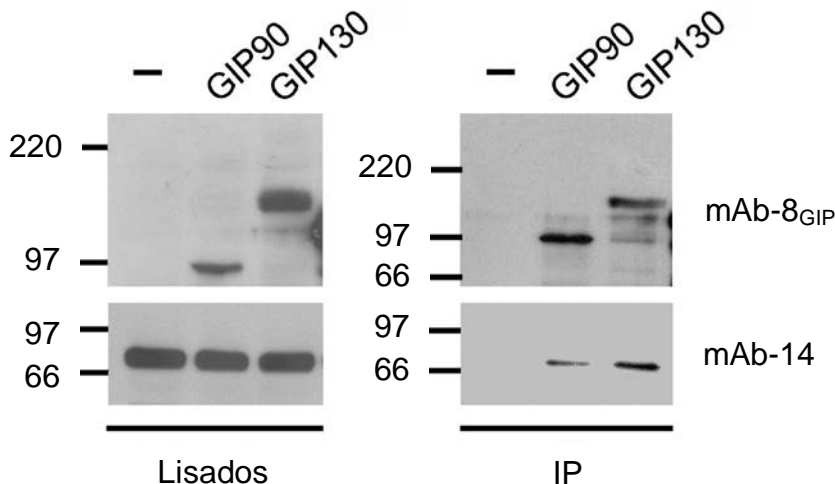
**FIG. 51. Anticuerpos monoclonales contra polipéptidos expresados por *FILIP1L*.** Células HEK 293 fueron transfectadas con construcciones de pRK5-c-Myc que expresaban las proteínas indicadas o con el vector vacío (control). Las células transfectadas fueron lisadas y 50 µg de cada lisado fueron analizados por *Western blot* con los anticuerpos indicados.

### **3.9 Interacción de GPBP-1 con proteínas de la familia FILIP1L.**

Anteriormente se había comprobado, por técnicas de dos híbridos en levadura, que GPBP-1 interaccionaba con GIP90 y GIP130 pero no con la isoforma FILIP1L-102 que carece de los 240 residuos N terminales de las proteínas GIP y del dominio CortBP2 (Fig. 43).

La capacidad de GIP130 y GIP90 para interaccionar con GPBP-1 fue confirmada mediante co-inmunoprecipitación a partir de lisados de células

HEK 293 que expresaban GPBP-1 (Fig. 52). Tanto GIP90 como GIP130 formaban complejos estables inmunoprecipitables con GPBP-1.



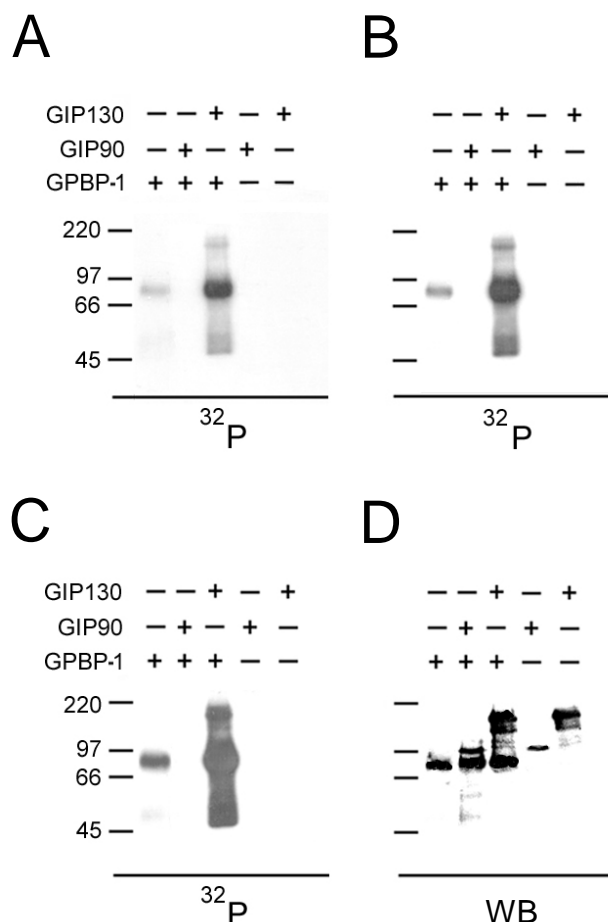
**FIG. 52. GPBP-1 interacciona con GIP90 y con GIP130 en células 293.** Una línea celular de HEK 293 que expresaba GPBP-1 por inducción con doxiciclina fue transfectada con las construcciones en pRK5-c-Myc que expresaban las proteínas indicadas o con el vector vacío (-). Veinticuatro horas tras la transfección, la expresión de GPBP-1 fue inducida con 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de doxiciclina durante otras 24 h y las células fueron lisadas. Cincuenta microgramos de cada lisado fueron analizados por *Western blot* con mAb-8<sub>GIP</sub> para detectar GIP90 y GIP130, o con mAb-14 para detectar GPBP-1. Al mismo tiempo, 1 mg de cada lisado fue sometido a inmunoprecipitación (IP) con resina anti-c-Myc-agarosa y el material precipitado fue analizado por *Western blot* del mismo modo.

### 3.9.1 Fosforilación de GIP130 y GIP90 por GPBP-1.

En estudios anteriores se demostró que GPBP-1 se une a GIP90 y lo fosforila (Revert-Ros 2004). Las proteínas entonces utilizadas se obtuvieron a partir de levaduras crecidas en medio ácido ( $\approx$  pH 3) debido a que el fermentador utilizado carecía de sistema automático de regulación de pH. En los nuevos ensayos de fosforilación, gracias a un sistema automático de regulación del pH del medio de cultivo, se pudo utilizar proteína recombinante producida en levaduras cultivadas a pH 5. En estas condiciones de producción el material recombinante resultante que representaba GIP90 no era susceptible de ser

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

fosforilado por GPBP-1, mientras que en las mismas condiciones experimentales GIP130 resultaba ser un buen sustrato. Además GIP90 inhibía potentemente la autofosforilación de GPBP-1, mientras que GIP130 la potenciaba. Estos resultados sugerían que la inserción de una adenosina en el mRNA de GIP130 es un mecanismo postrascricional que permite convertir un sustrato de GPBP (GIP130) en un polipéptido inhibidor (GIP90) (Fig. 53). Habida cuenta de que la interacción de GIP90 con GPBP es más fuerte y se produce a través de la misma región por la que interacciona GIP130 (Fig. 43), se espera que GIP90 desarrolle *in vivo* una actividad de dominante negativo.



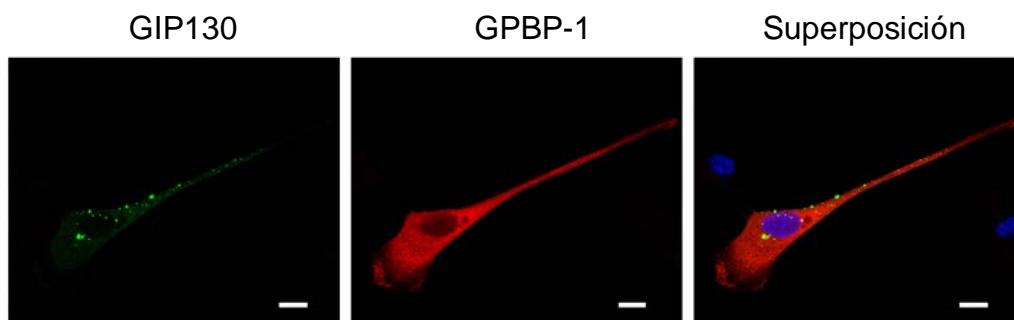
**FIG. 53. GIP90 y GIP130 se comportan de modo diferente en ensayos de fosforilación con GPBP-1.** Cantidades similares (200 ng) de las proteínas recombinantes indicadas que contenían la señal FLAG en posición N terminal fueron incubadas en presencia de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}]$  durante 2 h a 30 °C. Las mezclas fueron analizadas mediante SDS-PAGE y electrotransferencia a una membrana que fue expuesta durante distintos tiempos a un film de rayos X ( $^{32}\text{P}$ ) y teñida posteriormente con anticuerpos  $\alpha\text{-FLAG}$  (WB). En **A**, **B** y **C** se muestra el resultado de la autorradiografía a 3, 12 y 24 de exposición, y en **D** el resultado del *Western blot*.



### **3.10 Estudios de GPBP y GIP130 en mioblastos C2C12.**

Dado que las proteínas GIP y GPBP-1 son proteínas de notable expresión muscular, fueron estudiadas en células C2C12, un modelo murino de miogénesis adecuado para estudios de proteínas musculares (Yaffe y Saxel, 1977). Como modelo de proteína GIP usamos GIP130, ya que GIP90 demostró tener una expresión mucho más restringida que las proteínas GIP130 (datos no mostrados).

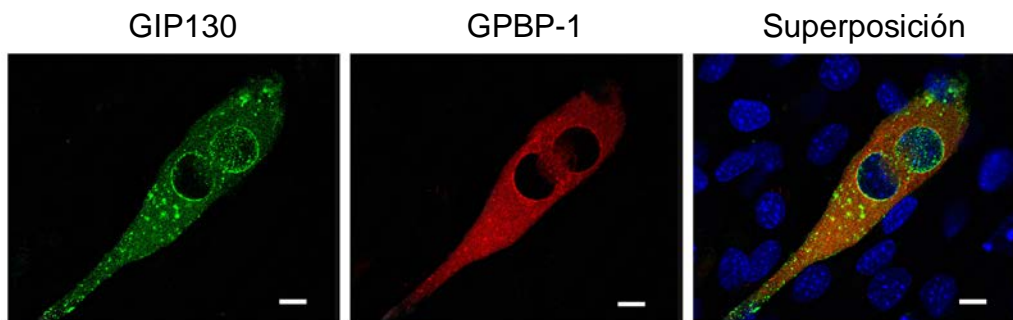
Células C2C12 fueron transfectadas con construcciones recombinantes para expresar FLAG-GPBP-1 y GIP130-EGFP, sometidas a distintos tiempos de diferenciación por privación de suero y analizadas por microscopía confocal. En células C2C12 sin diferenciar, GIP130 formaba gránulos dispersos en el citoplasma y en la proximidad de la membrana plasmática, mientras GPBP-1 presentaba una distribución más homogénea y amplia, pudiéndose encontrar en casi todo el citoplasma (Fig. 54).



**FIG. 54. Distribución de GIP130 y GPBP-1 en células C2C12 en crecimiento (sin diferenciar).** Células C2C12 fueron transfectadas con construcciones recombinantes que expresaban FLAG-GPBP-1 (rojo) y GIP130a-EGFP (verde) y analizadas por microscopía confocal con anticuerpos policlonales contra proteínas GPBP obtenidos en conejo. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI. Barras: 10  $\mu$ m

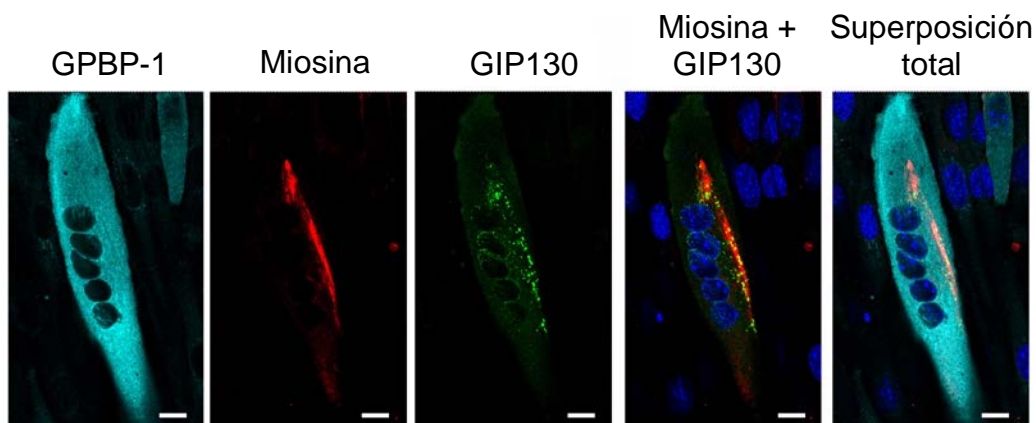
## **RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**

En mioblastos en diferenciación que aún no expresaban miosina muscular, GIP130 se podía observar disperso en el citoplasma o en acúmulos, y también de modo característico decorando la envoltura nuclear o en el interior de los núcleos de los miotubos en formación. Por su parte, GPBP-1 mantenía una amplia distribución por todo el citoplasma y también presentaba refuerzos perinucleares donde co-localizaba con GIP130 (Fig. 55).



**FIG. 55. Distribución de GIP130 y GPBP-1 en células C2C12 después de 1 día de diferenciación.** Células C2C12 fueron transfectadas con construcciones recombinantes que expresaban FLAG-GPBP-1 (rojo) y GIP130-EGFP (verde), sometidas a 1 día de diferenciación por privación de suero y analizadas como en la Fig. 54. Barras: 10  $\mu$ m

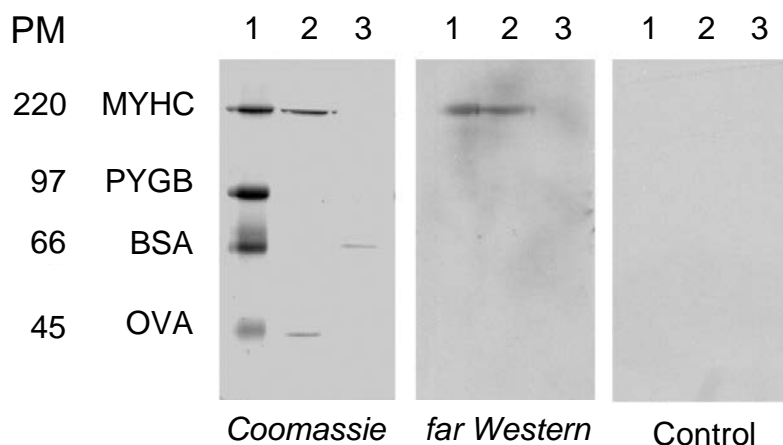
Avanzado el proceso de diferenciación e iniciada la expresión de miosina muscular y la formación de miofibrillas, GIP130 se desplazaba mayoritariamente a las miofibrillas en formación mientras GPBP-1 se mantenía ampliamente distribuido en el citoplasma (Fig. 56).



**FIG. 56. Distribución de GIP130 y GPBP en células C2C12 después de 3 días de diferenciación.** Células C2C12 fueron transfectadas con construcciones recombinantes que expresaban FLAG-GPBP-1 y GIP130-EGFP (verde), diferenciadas durante 3 días y analizadas por microscopía confocal con anticuerpos monoclonales anti-miosina muscular (cadena pesada) (rojo) y anticuerpos policlonales anti-GPBP obtenidos en conejo (cian). Barras: 10  $\mu$ m

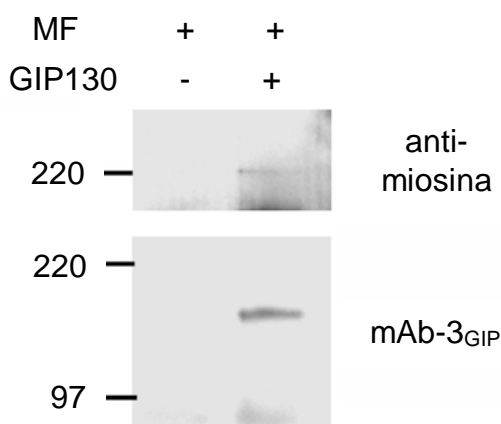
### **3.11 Interacción de GIP130 con la cadena pesada de la miosina *in vitro*.**

La co-localización de GIP130 con la miosina muscular en las miofibrillas en formación sugería una posible interacción entre GIP130 y la miosina. Usando extractos de miofibrillas de ratón y la técnica de *far Western*, se comprobó que GIP130 recombinante se unía a la cadena pesada de la miosina muscular. GIP130 también se unió a la cadena pesada de la miosina muscular de conejo, uno de los marcadores de peso molecular utilizado en el análisis electroforético. Ninguna otra proteína del extracto de miofibrillas de ratón ni ningún otro marcador del estándar de masas moleculares mostró afinidad por GIP130. Los resultados demostraron que GIP130 interacciona de forma directa y específica con la cadena pesada de la miosina muscular (Fig. 57).



**FIG. 57. GIP130 se une a la cadena pesada de miosina muscular.** Extractos de miofibrillas de ratón (2  $\mu$ g) (calle 2) y 200 ng de BSA (calle 3) fueron sometidos a SDS-PAGE, y las proteínas fueron teñidas con azul de *Coomassie* (*Coomassie*) o transferidas a una membrana de PVDF. La membrana se incubó con 1  $\mu$ g/mL de FLAG-GIP130, con anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub> y con anticuerpos anti-IgG de ratón-HRP (*far Western*), o sólo con anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub> y anti-IgG de ratón-HRP (Control). Como marcadores de peso molecular (PM) se usaron la cadena pesada de la miosina muscular de conejo (MYHC), la glucógeno fosforilasa (PYGB), la albúmina sérica bovina (BSA) y la ovoalbúmina (OVA) (calle 1). Los números a la izquierda de la imagen indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores utilizados.

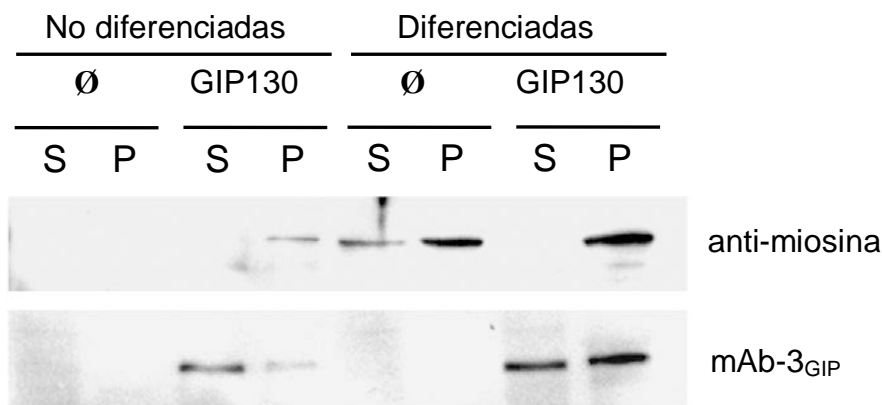
Por otra parte, la interacción GIP130-miosina se confirmó mediante inmunoprecipitación de miosina de ratón con proteína FLAG-GIP130 y resina anti-FLAG agarosa, a partir de extractos de miofibrillas (Fig. 58).



**FIG. 58. GIP130 co-inmunoprecipita con la miosina muscular.** Miofibrillas (MF) de ratón fueron resuspendidas en 8 M urea en TBS, renaturalizadas por diálisis frente a TBS en presencia (+) o ausencia (-) de 2  $\mu$ g/mL de FLAG-GIP130, y posteriormente inmunoprecipitadas con resina anti-FLAG-agarosa. Los inmunoprecipitados fueron analizados por *Western blot* con los anticuerpos indicados.

**3.12 GIP130 facilita el ensamblaje de miofibrillas en células C2C12 en diferenciación.**

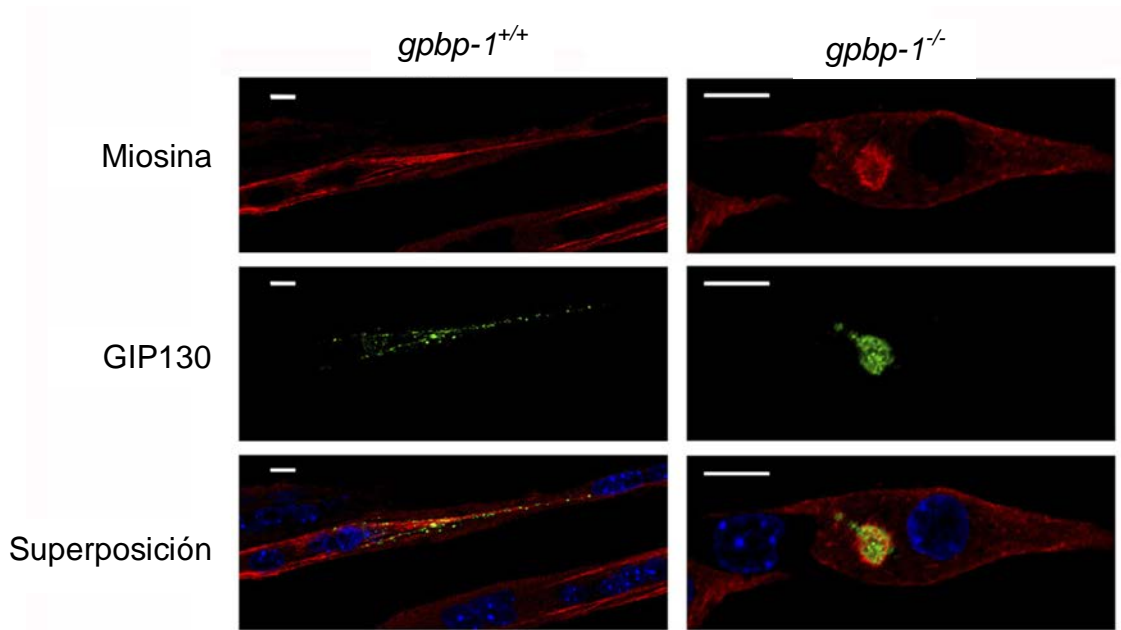
La interacción de GIP130 con miosina sugería que GIP130 podía influir en el proceso de ensamblaje de miofibrillas. Para estudiar esta hipótesis se generaron líneas celulares de C2C12 que expresaban constitutivamente la GIP130-EGFP. Estas células y células C2C12 control (C2C12) fueron diferenciadas y lisadas en una solución de baja concentración salina que permitía separar el citoesqueleto de las proteínas solubles por centrifugación (Fig. 59). Las fracciones soluble (S) e insoluble (P) fueron analizadas por *Western blot* con anticuerpos anti-miosina muscular y mAb-3<sub>GIP</sub>. En células sin diferenciar, GIP130-EGFP se distribuyó entre la fracción soluble y la insoluble, con mayor presencia entre las proteínas solubles. En células diferenciadas que expresaban miosina la proporción de GIP130-EGFP insoluble aumentó notablemente. En células control diferenciadas, parte de la miosina se encontraba en la fracción soluble, mientras que en células con GIP130-EGFP diferenciadas toda la miosina era insoluble. Estos resultados indicaban que GIP130-EGFP facilita el ensamblaje de la miosina muscular en estructuras insolubles de las que GIP130-EGFP también forma parte.



**FIG. 59. GIP130 facilita el ensamblaje de miosina en células diferenciadas.** Líneas celulares de C2C12 que expresaban GIP130-EGFP (GIP130) y células control (∅) fueron sometidas o no a diferenciación durante 3 días y lisadas en solución de baja concentración salina. Cantidades de proteína total (40 µg) de las fracciones solubles (S) y cantidades equivalente de las correspondientes fracciones insolubles (P) de cada lisado fueron separadas por centrifugación y analizadas por *Western blot* con los anticuerpos indicados.

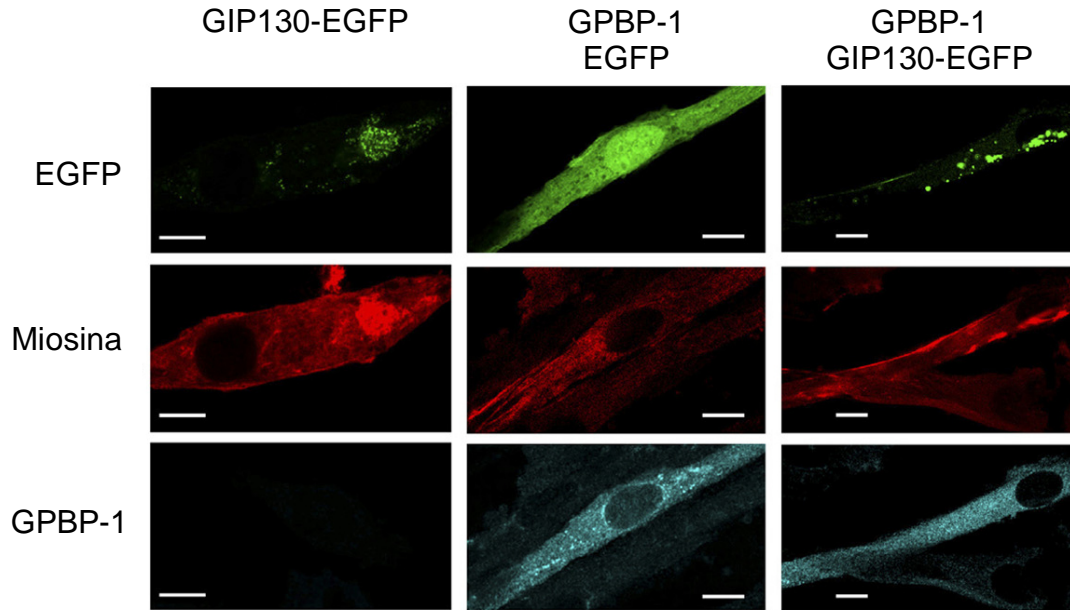
### 3.12.1 Influencia de GPBP-1 en la asociación de GIP130 con la miosina.

Al ser GIP130 sustrato de la cinasa GPBP-1, cabía la posibilidad de que GPBP-1 modulase la actividad de GIP130 y por tanto su asociación con la miosina. Para estudiarlo se expresó GIP130-EGFP en mioblastos *gbbp-1<sup>-/-</sup>* y *gbbp-1<sup>+/+</sup>* y los cultivos analizados por microscopía confocal tras diferenciación mediante privación de suero (Fig. 60). En mioblastos *gbbp-1<sup>+/+</sup>*, GIP130 co-localizaba con la miosina a lo largo de las miofibrillas en formación. Sin embargo, en los mioblastos *gbbp-1<sup>-/-</sup>* GIP130 no mostró distribución miofibrilar, sino que formaba acúmulos citosólicos en los que también había miosina. Esto indicaba que aunque GPBP-1 no es esencial para que GIP130 se asocie con la miosina, sí que es un factor crítico que determina el modo en que GIP130 dirige la organización supramolecular de la miosina.



**FIG. 60. GPBP-1 condiciona la co-distribución de GIP130 y miosina en mioblastos de ratón en diferenciación.** Mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>* y *gpbp-1<sup>+/+</sup>* fueron transfectados con una construcción que expresaba GIP130-EGFP recombinante (verde), diferenciados durante 3 días y analizados por microscopía confocal con anticuerpos monoclonales anti-miosina muscular (cadena pesada) (rojo). Barras: 10  $\mu$ m

La expresión recombinante de GPBP-1 permitió el rescate parcial de los mioblastos *gpbp-1<sup>-/-</sup>*, de modo que podía observarse la formación de miofibrillas rudimentarias, y co-localización lineal de GIP130 con miosina en la periferia de los miotubos (Fig. 61).



**FIG. 61. La expresión recombinante de GPBP-1 rescata parcialmente el fenotipo de mioblastos *gpbp-1*<sup>-/-</sup>.** Mioblastos *gpbp-1*<sup>-/-</sup> fueron transfectados con las construcciones recombinantes indicadas para expresar GIP130-EGFP, EGFP (verde) o GPBP-1 (cian), diferenciados durante 3 días y analizados por microscopía confocal con anticuerpos monoclonales anti-miosina muscular (cadena pesada) (rojo) y anticuerpos policlonales anti-GPBP obtenidos en conejo. Barras: 10µm.

### **3.13 Estudio de la expresión de las isoformas del gen de ratón *Filip1l* durante la miogénesis de mioblastos C2C12.**

La existencia de proteínas ortólogas a GIP130 en ratón había sido predicha mediante procedimientos informáticos (GenBank accession XR\_002318) pero no se había demostrado. Tomando como referencia la secuencia del mRNA predicho, se amplificó por RT-PCR a partir de células C2C12 un cDNA de secuencia muy similar (GenBank Accession EU704258), que constituye el ortólogo murino de los GIP130 humanos (mGIP130). La Fig. 62 muestra el alineamiento múltiple de las estructuras primarias de las proteínas GIP130 y FILIP1L-102 humanas con sus ortólogas murinas mGIP130 y mFILIP-102 (EU623548), respectivamente.



## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

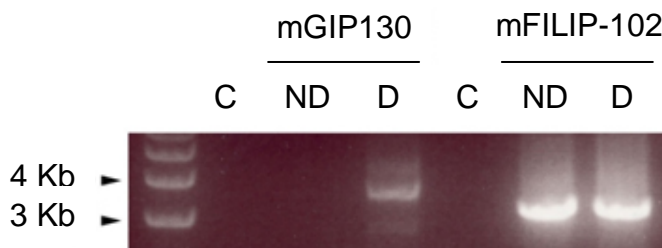
GIP130	MRSRGS DTEGSAQKKFPRHTKGHSFQGPKNMKHRQQDKDSPESDVILPCPKAEKPHSGN	60
FILIP1L-102	-----	
mGIP130	MRSRSSNAEGSAPKQIPRHSK--FQDSIQDMKHRTHKKDPSCSESEGVLP RPVSEKSHTGK	58
mFILIP1L-102	-----	
GIP130	GHQAEDLSRDDLLFLLSILEGELQARDEVIGILKAEKMDLALLEAQYGFVTPKKVLEALQ	120
FILIP1L-102	-----	
mGIP130	GHHTEDLSRDDLLFLLSILEGELQARDEVIGILRAEKIDLALLEAQYGFVTPKKVLEALQ	118
mFILIP1L-102	-----	
GIP130	RDAFQAKSTPWQEDIYEKPMNELDKVVEKHKESYRRILGQLLVAEKSRRTILELEEEKR	180
FILIP1L-102	-----	
mGIP130	RDAFQAKSAPWQEDIYEKPMNELDKVVEKHKESHRRILEQLLMVERSHRQTIMEMEEKR	178
mFILIP1L-102	-----	
GIP130	KHKEYMEKSDEFICLLEQE CERLKKLIDQEIKSQEEKEQEKEKRVTTLKEELTKLKS FAL	240
FILIP1L-102	-----	
mGIP130	KHKEYMKKSDEFINLLEQE CERLKKLIDQETASQEKEQEKEKRIKTLKEELTKLKS FAL	238
mFILIP1L-102	-----	
GIP130	MVVDEQQRLTAQLTLQRQKI QELT'NAKETHTKLALAEARVQEEEQKATRLEKELQTQTT	300
FILIP1L-102	MVVDEQQRLTAQLTLQRQKI QELT'NAKETHTKLALAEARVQEEEQKATRLEKELQTQTT	60
mGIP130	MVVDEQQRLTAQLALQRQKI QALTTSAKETQGKLALAEARAQEEEQKATRLEKELQTQTT	298
mFILIP1L-102	MVVDEQQRLTAQLALQRQKI QALTTSAKETQGKLALAEARAQEEEQKATRLEKELQTQTT *****:***** ** .****: ***** .*****	60
GIP130	KFHQDQDTIMAKLTNEDSQNRQLQKLAALSRQIDELEETNRSRLKAEELQDIKEKISK	360
FILIP1L-102	KFHQDQDTIMAKLTNEDSQNRQLQKLAALSRQIDELEETNRSRLKAEELQDIKEKISK	120
mGIP130	EFHQNDKIMAKLTNEDSQNRQLRQKLAALSRQIDELEETNRSRLKAEELQDIKDKINK	358
mFILIP1L-102	EFHQNDKIMAKLTNEDSQNRQLRQKLAALSRQIDELEETNRSRLKAEELQDIKDKINK :***:** .*****:*****:*****:*** .*	120
GIP130	GEYGNAGIMAEVEELRKRVLDMEGKDEELIKMEEQCRDLNKRLERETQSKDFKLEVEKL	420
FILIP1L-102	GEYGNAGIMAEVEELRKRVLDMEGKDEELIKMEEQCRDLNKRLERETQSKDFKLEVEKL	180
mGIP130	GEYNSGIMDEVDEL RKRVLDMEGKDEELIKMEEQCRDLNKRLEKETVQSKDFKLEV DKL	418
mFILIP1L-102	GEYNSGIMDEVDEL RKRVLDMEGKDEELIKMEEQCRDLNKRLEKETVQSKDFKLEV DKL *****:*** ** :*****:*****:***:*****:***	180
GIP130	SKRIMALEKLEDAFNKSKQECYSLKCNLEKERMTTKQLSQELES LKVRIKELEAIESRLE	480
FILIP1L-102	SKRIMALEKLEDAFNKSKQECYSLKCNLEKERMTTKQLSQELES LKVRIKELEAIESRLE	240
mGIP130	SVRITALEKLEDA LDKSKQECYSLKCNLEKEKMTTKQLSEELES LNARIKELEAIESRLE	478
mFILIP1L-102	SVRITALEKLEDA LDKSKQECYSLKCNLEKEKMTTKQLSEELES LNARIKELEAIESRLE * ** *****:*****:*****:*****:***** .*****	240
GIP130	KTEFTLKEDLTKLKT LTVMFVDERKTMSEK LKKTEDK LQAASSQLQVEQNKVTTVTEKLI	540
FILIP1L-102	KTEFTLKEDLTKLKT LTVMFVDERKTMSEK LKKTEDK LQAASSQLQVEQNKVTTVTEKLI	300
mGIP130	KTEITLKDDLTKLKT LTVMLVDERKTMSEK LKQTEDK LQSTTSQLQAEQNKVTTVTEKLI	538
mFILIP1L-102	KTEITLKDDLTKLKT LTVMLVDERKTMSEK LKQTEDK LQSTTSQLQAEQNKVTTVTEKLI ***:***:*****:*****:*****:***:*** .*****	300
GIP130	EETKRALKSKTDVEEKMYSVTKERDDLKNK LKAEEEKGNDLLSRV NMLKNR LQSLEAIEK	600
FILIP1L-102	EETKRALKSKTDVEEKMYSVTKERDDLKNK LKAEEEKGNDLLSRV NMLKNR LQSLEAIEK	360
mGIP130	EETKRALKSKTD AEEKMYSVTKERDDL RKNK LKAEEEKGHDLLSKVTILKNR LQSLEAIEK	598
mFILIP1L-102	EETKRALKSKTD AEEKMYSVTKERDDL RKNK LKAEEEKGHDLLSKVTILKNR LQSLEAIEK ***** .*****:*****:*****:***:*** .*****	360

## RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

GIP130	DFLKNKLNQDSGKSTTALHQENNIKELSQEVERLKLKDKMKAIEDDLMKTEDEYETLE	660
FILIP1L-102	DFLKNKLNQDSGKSTTALHQENNIKELSQEVERLKLKDKMKAIEDDLMKTEDEYETLE	420
mGIP130	DFVKNKLNQDSSKSTAALHQENNIKELSQEVENLKLKDKMKAIEDDLMKTEDEYETLE	658
mFILIP1L-102	DFVKNKLNQDSSKSTAALHQENNIKELSQEVENLKLKDKMKAIEDDLMKTEDEYETLE	420
	***:*****.***:*****.*****.*****.*****	
GIP130	RRYANERDKAQFLSKELEHVKMELAKYKLAEKTETSHEQWLFKRLQEEEAKSGHLSREVD	720
FILIP1L-102	RRYANERDKAQFLSKELEHVKMELAKYKLAEKTETSHEQWLFKRLQEEEAKSGHLSREVD	480
mGIP130	RRYANERDKAQFLSQELEHAKMELAKYKLAEKTESSHEQWLFRRQLQEEEAKSGHLSREVD	718
mFILIP1L-102	RRYANERDKAQFLSQELEHAKMELAKYKLAEKTESSHEQWLFRRQLQEEEAKSGHLSREVD	480
	*****:***.*****:*****:*****:*****	
GIP130	ALKEKIHEYMATEDLI CHLQGDHSLVQKKNQQENNRNLDGREIENLTKELEERYRHFSKS	780
FILIP1L-102	ALKEKIHEYMATEDLI CHLQGDHSLVQKKNQQENNRNLDGREIENLTKELEERYRHFSKS	540
mGIP130	ALKEKIHEYMATEDLI CHLQGDHSLVQKKNQQENNRNLDGREIENLTKELEERYRHFSKS	778
mFILIP1L-102	ALKEKIHEYMATEDLI CHLQGDHSLVQKKNQQENNRNLDGREIENLTKELEERYRHFSKS	540
	*****:*****:*****:*****:*****	
GIP130	LRPSLNGRRISDPQVFSKEVQTEAVDNEPPDYKSLIPLERAVINGQLYEESENQDEDPND	840
FILIP1L-102	LRPSLNGRRISDPQVFSKEVQTEAVDNEPPDYKSLIPLERAVINGQLYEESENQDEDPND	600
mGIP130	LRPSLNERRISDPQVFSKEVQTEAADSEPPDYKSLIPLERAVINGQFYEENEDQDDDPNE	838
mFILIP1L-102	LRPSLNERRISDPQVFSKEVQTEAADSEPPDYKSLIPLERAVINGQFYEENEDQDDDPNE	600
	***** *****.*****:***.***:***:	
GIP130	EGSVLSFKCSQSTPCPVNRKWLIPWMKSKEGHLQNGKMQTKPNANFVQPGDLVLSHTPGQ	900
FILIP1L-102	EGSVLSFKCSQSTPCPVNRKWLIPWMKSKEGHLQNGKMQTKPNANFVQPGDLVLSHTPGQ	660
mGIP130	EESVLSFRCSQSSSLPMNRKWLIPWMKSKEGHPQNGKIQTKSNGNFVQPGDLVLSHTPGQ	898
mFILIP1L-102	EESVLSFRCSQSSSLPMNRKWLIPWMKSKEGHPQNGKIQTKSNGNFVQPGDLVLSHTPGQ	660
	* *****:***:. * :***** *****:***.*****	
GIP130	PLHIKVTDPDHVQNTATLEITSPTTESPHSYTSTAVIPNCGTPKQRITILQNASITPVKSK	960
FILIP1L-102	PLHIKVTDPDHVQNTATLEITSPTTESPHSYTSTAVIPNCGTPKQRITILQNASITPVKSK	720
mGIP130	PLHIKVTDPDHIQNTATLEITSPTTESPHSYTSTAVIPNCGTPKQRITILQNASITPIKSK	958
mFILIP1L-102	PLHIKVTDPDHIQNTATLEITSPTTESPHSYTSTAVIPNCGTPKQRITILQNASITPIKSK	720
	*****:*****:*****:*****:*****:***	
GIP130	TSTEDLMNLEQGMSPITMATFARAQTPESCGSLTPERTMSPIQVLAVTGSASSPEQGRSP	1020
FILIP1L-102	TSTEDLMNLEQGMSPITMATFARAQTPESCGSLTPERTMSPIQVLAVTGSASSPEQGRSP	780
mGIP130	SSTESLMNLEQSMSPVTMATFARAQTPESCGSVTPERTMSPIQVLAMTGSASSPEQGCSP	1018
mFILIP1L-102	SSTESLMNLEQSMSPVTMATFARAQTPESCGSVTPERTMSPIQVLAMTGSASSPEQGCSP	780
	:***.*****.***:*****:*****:***.***** **	
GIP130	EPTEISAKHAIFRVSPDRQSSWQFQRSNSNSSSVITTEDNKIHIHLGSPYMQAVASVPRP	1080
FILIP1L-102	EPTEISAKHAIFRVSPDRQSSWQFQRSNSNSSSVITTEDNKIHIHLGSPYMQAVASVPRP	840
mGIP130	EPIEISAKHAIFRVSPDRQSSWQFQRSNSNSSSVITTEDNKIHIHLGSPYMQAVAGPMPRP	1078
mFILIP1L-102	EPIEISAKHAIFRVSPDRQSSWQFQRSNSNSSSVITTEDNKIHIHLGSPYMQAVAGPMPRP	840
	** *****:*****.***:***	
GIP130	ASPSAPLQDNRTQGLINGALNKTTNKVTSSITITPTATPLPRQSQITVEPLLLPH	1135
FILIP1L-102	ASPSAPLQDNRTQGLINGALNKTTNKVTSSITITPTATPLPRQSQITVSNIYN--	893
mGIP130	ASPSAPLQDNRTQGLTNGALNKTTNKVTSSITITPTATPLPRQSQITVSNIYN--	1131
mFILIP1L-102	ASPSAPLQDNRTQGLTNGALNKTTNKVTSSITITPTATPLPRQSQITVSNIYN--	893
	*****:*****:*****:*****:*****:	

**FIG. 62. Alineamiento de las estructuras primarias humanas de GIP130 y FILIP1L-102 y de sus respectivas proteínas ortólogas de ratón mGIP130 y mFILIP1L-102.** Los accesos a la base de datos de NCBI son NP\_878913.2; NP\_055705.2; NP\_001035487.2; NP\_001171342.1 respectivamente. Los asteriscos indican que los residuos alineados son idénticos.

Mediante PCR se comprobó que mGIP130 es característico de cultivos diferenciados de mioblastos, mientras que mFILIP1L-102 se expresaba tanto en cultivos diferenciados como no diferenciados, sin variar significativamente su nivel de expresión durante la miogénesis (Fig. 63).

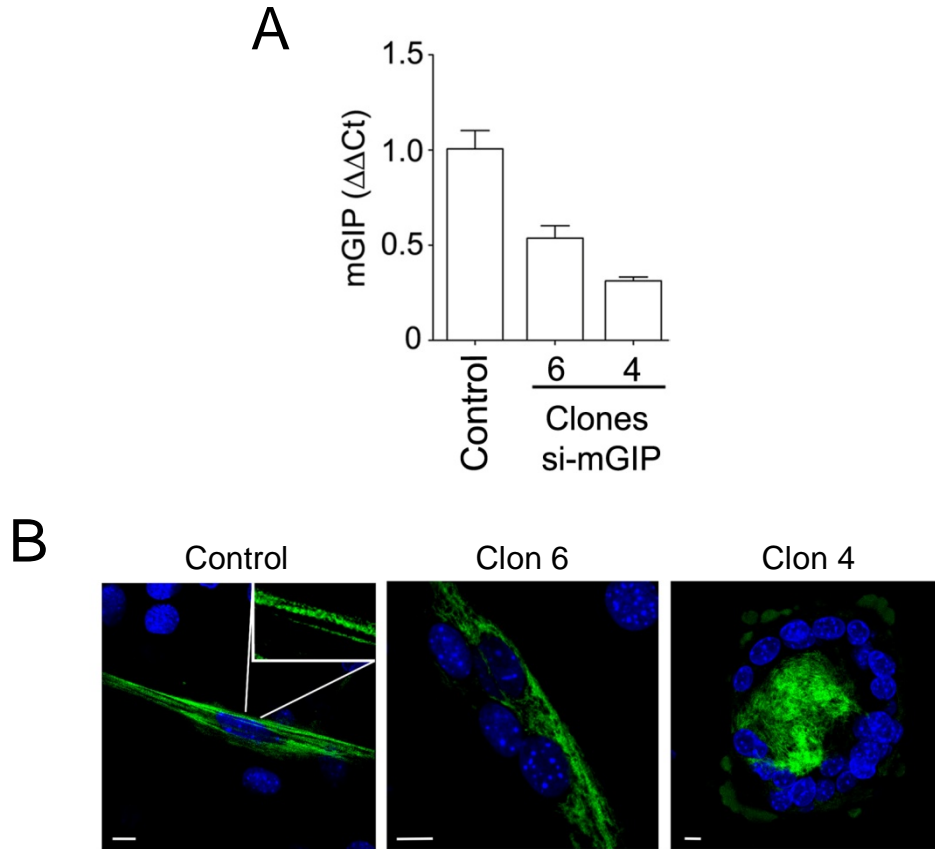


**FIG. 63. La expresión de mGIP130 se induce en la miogénesis.** Células C2C12 fueron diferenciadas durante 0 (ND) o 3 días (D) y su RNA fue analizado por RT-PCR con oligonucleótidos apropiados para amplificar los cDNAs indicados. Para cada pareja de oligonucleótidos se realizó una reacción control sin molde (C). Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en agarosa y se tiñieron con bromuro de etidio. Se indican los tamaños y la posición de los estándares de peso entre los que mueven los productos de PCR obtenidos.

### 3.14 La silenciamiento de mGIP130 en mioblastos C2C12 compromete la estructuración del citoesqueleto de miosina durante la miogénesis.

Para conocer la importancia de mGIP130 en la miofibrillogénesis se utilizó la técnica de RNA de interferencia en su versión de short-hairpin RNA (shRNA). Se transfectaron células C2C12 con una construcción recombinante que expresaba un silenciador de mGIP130 o con el vector vacío (pSilencer-hygro), junto con el vector pEGFP-N1 que expresaba la EGFP. Las células transfectadas fueron seleccionadas con un separador celular (*cell sorter*) por su fluorescencia, y se obtuvieron dos clones silenciados y un clon control, según se confirmó por RT-PCR cuantitativa (Fig. 64A). Tras tres días de diferenciación, en el clon control la miosina muscular formó miofibrillas

estructuradas, pero en los clones silenciados la miosina se acumuló con escasa organización (Fig. 64B).

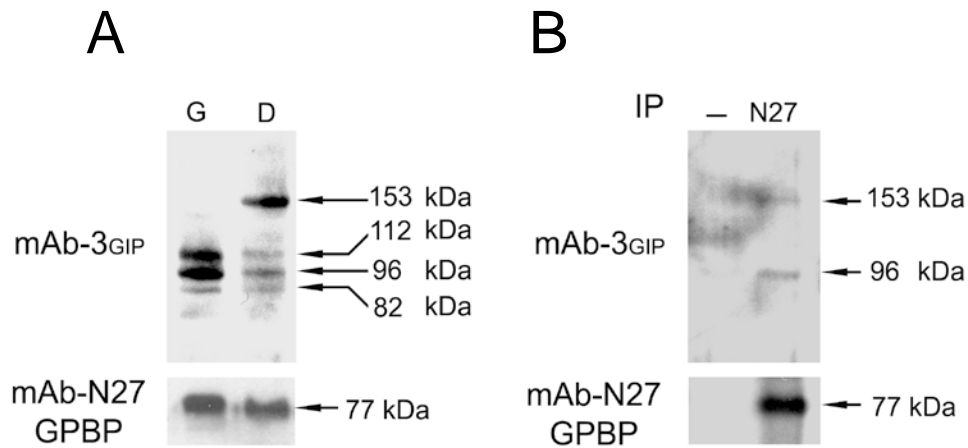


**FIG. 64. La silenciaci3n de mGIP130 en c3lulas C2C12 altera la miofibrilog3nesis.** **A**, Extractos de RNA de clones de C2C12 con expresi3n silenciada de mGIP130 (si-mGIP Clones 4 y 6) fueron analizados por RT-PCR cuantitativo para determinar la expresi3n relativa de mGIP130. Las barras indican la desviaci3n est3ndar. **B**, Los clones mostrados en **A** fueron sometidos a diferenciaci3n durante 3 d3as y analizados por microscop3a confocal con anticuerpos monoclonales anti-miosina muscular (cadena pesada) (verde). El DNA nuclear se visualiz3 con DAPI (azul). El detalle muestra la estriaci3n caracter3stica de la miosina miofibrilar en el clon control. Las im3genes de los clones 4 y 6 evidencian la desestructuraci3n el citoesqueleto miofibrilar. Barras: 10  $\mu\text{m}$

### 3.15 Las prote3nas mGIP130 y mGPBP co-inmunoprecipitan a partir de extractos de m3sculo de rat3n.

Extractos de prote3nas de diafragma y de m3sculo gastrocnemio de rat3n fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub>, espec3ficos de

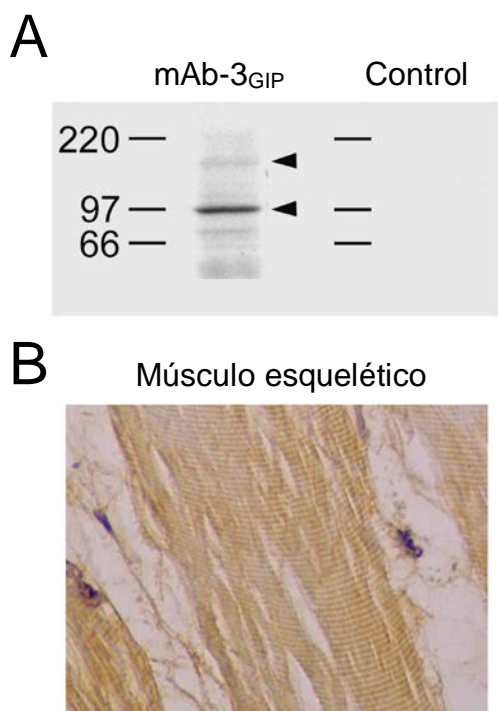
las proteínas GIP (Fig. 65). En los extractos de diafragma, estos anticuerpos detectaron una banda de 153 kDa y bandas minoritarias de 112, 96 y 86 kDa (Fig. 65A, mAb-3<sub>GIP</sub>, D). Los polipéptidos de 153 y 96 kDa eran de tamaño muy similar a los detectados por los mismos anticuerpos en células HeLa que expresaban GIP130 recombinante (Fig. 51). En extractos de músculo gastrocnemio los anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub> no detectaron el polipéptido de 153 kDa, pero sí los de 96 y 112 kDa, que eran más abundantes que en diafragma (Fig. 65A, mAb-3<sub>GIP</sub>, G). Este resultado sugería que las bandas de 96 y 112 kDa se generaban a expensas de la de 153 kDa, posiblemente por procesamiento proteolítico. Los extractos de diafragma y gastrocnemio fueron también analizados con anticuerpos anti-GPBP (mAb-N27). En ambos casos se observó una única banda de 77 kDa, correspondiente a mGPBP-1 según resultados previos de RT-PCR (resultados no mostrados). El nivel de expresión de mGPBP-1 en diafragma y gastrocnemio resultó ser similar (Fig. 65A, mAb-N27). El extracto de diafragma fue sometido a inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GPBP mAb-N27 y los inmunoprecipitados fueron analizados por *Western blot* (Fig. 65B). Los anticuerpos anti-GPBP mAb N27 precipitaron mGPBP-1 y también los polipéptidos de 96 y 153 kDa de mGIP130, lo que indicaba que mGIP130 interacciona con mGPBP-1 en el tejido muscular.



**FIG. 65. mGIP130 interacciona con mGPBP-1 en tejido muscular. A,** Cincuenta microgramos de extractos de músculo gastrocnemio (G) y de diafragma (D) de ratón C57BL/6 fueron analizados por *Western blot* con anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub> para detectar mGIP130, y con mAb-N27 para detectar mGPBP-1. **B,** Quinientos miligramos de extracto de diafragma de ratón fue inmunoprecipitado con (N27) o sin (-) cinco microgramos de mAb-N27 y con proteína A-sefarosa. Los inmunoprecipitados (IP) fueron analizados por *Western blot* como en **A**. Las flechas y números indican la posición y masa molecular en kDa de los polipeptidos reactivos identificados, respectivamente.

### **3.16 En el músculo esquelético humano se expresan isoformas GIP de diferente peso molecular que muestran un patrón de distribución estriado**

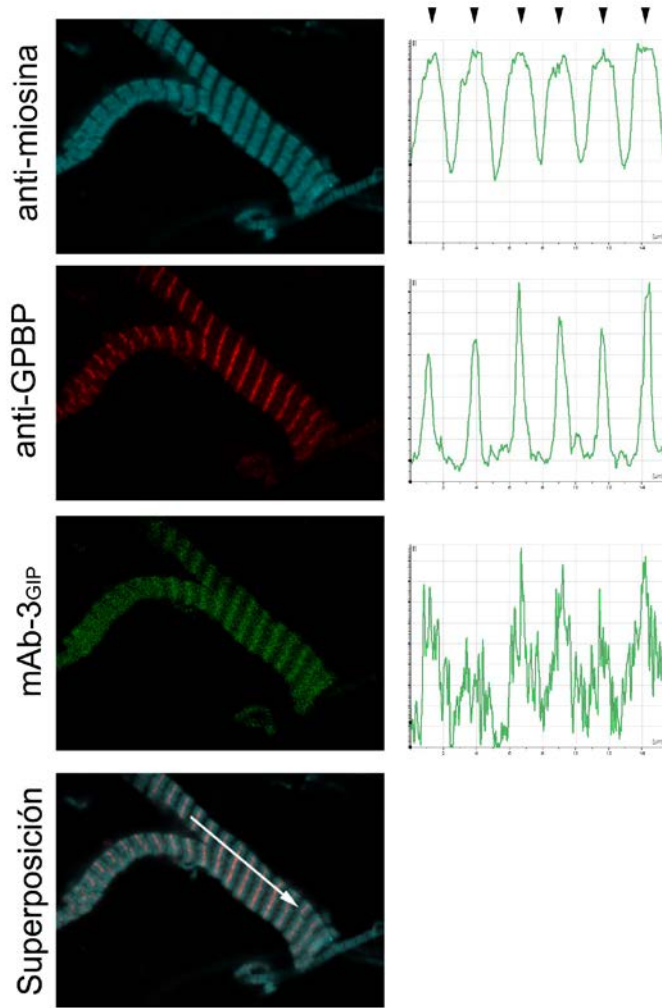
Extractos de tejido muscular humano fueron analizados por *Western blot* con mAb-3<sub>GIP</sub>, detectándose un polipéptido de unos 153 kDa, un polipéptido mayoritario de 96 kDa y otros polipéptidos relacionados de menor masa molecular (Fig. 66A). El mismo anticuerpo mAb-3<sub>GIP</sub> usado para técnicas de inmunohistoquímica con cortes de tejido de músculo esquelético humano reveló un patrón estriado (Fig. 66B), similar al obtenido anteriormente con anticuerpos anti-GPBP (Fig. 8B).



**FIG. 66. Expresión de proteínas GIP en músculo humano.** **A**, Cincuenta microgramos de extracto de músculo esquelético humano fueron analizados por *Western blot* con mAb-3<sub>GIP</sub> o con los anticuerpos secundarios (Control). **B**, Cortes de tejido muscular humano incluido en parafina fueron analizados con anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub> usando técnicas inmunohistoquímicas. Amplificación: 400 x

### 3.17 La miosina muscular y mGPBP-1 co-localizan con mGIP130 en miofibrillas de ratón

Para profundizar en el estudio de las proteínas GIP en músculo esquelético, se analizaron miofibrillas aisladas a partir de diafragma de ratón por microscopía confocal usando anticuerpos mAb-3<sub>GIP</sub>, así como anticuerpos específicos contra GPBP y contra miosina (Fig. 67). Se observó la presencia de mGIP130 en la banda A de las miofibrillas, que es la región en la que se localiza la miosina muscular. Como se había observado antes, mGPBP-1 se localizó de manera reforzada en la parte central de la banda A (línea M), pudiendo observarse co-localización de mGPBP-1 con mGIP130 y miosina en esta zona.



**FIG. 67. GIP130, mGPBP-1 y miosina co-localizan en la línea M de la zona H de las miofibrillas.** Miofibrillas aisladas a partir de diafragma de ratón fueron analizadas por microscopía confocal con anticuerpos policlonales de conejo contra miosina ( $\alpha$ -miosina), anticuerpos policlonales de pollo contra GPBP ( $\alpha$ -GPBP), y anticuerpos monoclonales de ratón contra GIP130 (mAb-3<sub>GIP</sub>). A la derecha se muestra la distribución de intensidades de fluorescencia para cada proteína a lo largo de la región marcada por la flecha en la imagen de superposición. Las cabezas de flecha de arriba indican puntos de triple co-localización de miosina, mGPBP-1 y GIP130.



# **CONCLUSIONES FINALES**



## 4 CONCLUSIONES FINALES

Para facilitar la exposición y comprensión de las conclusiones principales obviaremos cuando sea posible toda referencia a la especie (ratón o humano) y al modelo experimental utilizado. Las conclusiones principales son:

### 4.1 GPBP-1 es una proteína miofibrilar.

GPBP se expresa en músculo esquelético y se localiza en el interior de las fibras musculares mostrando un patrón de distribución estriado (Fig. 6). GPBP-1 es la isoforma principal de GPBP en las miofibrillas (Figs. 9 y 29) y se localiza principalmente en la banda A de los sarcómeros con refuerzo de la línea M de la zona H (Figs. 10 y 23).

### 4.2 Las proteínas GPBP son necesarias para la miogénesis.

La regulación negativa del gen de GPBP dificulta la fusión celular y la formación de estructuras miofibrilares y disminuye la expresión de miosina muscular (Fig. 15).

#### 4.2.1 GPBP-1 promueve la fusión celular y el ensamblado de miofibrillas durante la miogénesis.

Durante la miogénesis, GPBP-1 se acumula en el citosol (Fig. 14) a pesar de que la transcripción del gen correspondiente no aumenta (datos no mostrados).

## **CONCLUSIONES FINALES**

---

Esto se debe a que durante la miogénesis se inhiben los mecanismos de expresión alternativa del mRNA primario y de este modo, se abole tanto el inicio alternativo de la traducción que produce GPBP-3 como el empalme alternativo de exones que produce GPBP-2 (Figs. 12 y 13). En el primer caso se dificulta la exportación de GPBP-1 (Revert *et al.* 2008) y en el segundo se facilita su síntesis por aumentar la proporción del mRNA canónico frente al alternativo. Todo ello pone en evidencia que la célula ha instrumentalizado un sofisticado sistema de expresión alternativa para regular la exportación de GPBP-1. Finalmente, la acumulación de GPBP-1 dentro del citoplasma dirige la organización del citoesqueleto de actina y miosina en la fusión celular y la miofibrillogénesis. De acuerdo con ello, en células en cultivo (*ex vivo*) la reducción de los niveles de GPBP-1 inhibía estos procesos clave de la miogénesis a pesar de que se acompañaba de una acumulación de GPBP-2 (Fig. 19) y de que la expresión de miosina y señales de diferenciación permanecían virtualmente inalteradas (Figs. 20 y 21). Consistentemente y en el otro extremo, la expresión aumentada de GPBP-1 potenciaba la fusión celular y la formación de estructuras miofibrilares en un escenario de síntesis de miosina (Fig. 27) y presencia de señales miogénicas inalterado (Revert-Ros 2011).

### **4.3 *In vivo* la acumulación de GPBP-2 en el citoplasma suple la ausencia de GPBP-1.**

Los embriones de ratón modificados genéticamente que no expresan ninguna de las isoformas de GPBP interrumpen su desarrollo a los 11.5 días (Wang *et al.* 2009), cuando ya se ha iniciado la expresión de miosina en las somitas

(Cusella-De Angelis *et al.* 1992), pero cuando aún no aparecen en ellas miofibrillas maduras (Nakanishi *et al.* 2005). Sin embargo la eliminación selectiva de GPBP-1 no causa ningún fenotipo defectuoso (no mostrado), debido a que GPBP-2 es capaz de reemplazar a GPBP-1 en el animal entero (*in vivo*). De acuerdo con esta idea, la expresión de GPBP-2 en los músculos de animales deficitarios en GPBP-1 aumenta hasta alcanzar niveles similares a los de GPBP-1 en animales control (Fig. 22), y se distribuye como GPBP-1 en los sarcómeros (Fig. 23). Estos resultados sugieren la existencia de mecanismos pro-miogénicos que compensan la ausencia de GPBP-1 *in vivo* que no operan en el contexto más limitado de un cultivo celular. Se han descrito en la literatura casos similares. Por ejemplo, la obscurina es una proteína presente en la línea M del sarcómero cuya ausencia en ratones adultos no produce alteraciones en las miofibrillas ni en la función muscular (Lange *et al.* 2009), pero que es necesaria para el ensamblado de los filamentos gruesos en mioblastos en cultivo (Ackermann *et al.* 2009). Del mismo modo, la ALP (*actinin-associated LIM domain protein*) es necesaria para la diferenciación de mioblastos C2C12 pero su ausencia en ratones no altera la estructura ni la función muscular (Jo *et al.* 2001 y Pomiès *et al.* 2007).

#### **4.4 GPBP-1 interacciona con GIP130, una proteína del sarcómero que se une a la cadena pesada de la miosina muscular.**

GPBP-1 interacciona con las proteínas GIP, isoformas de *FILIP1L* que se expresan preferentemente en músculo estriado (Revert-Ros *et al.* 2011), y que presentan un alto grado de diversificación estructural (Figs. 38, 39, 41). Durante

## **CONCLUSIONES FINALES**

---

la miogénesis, la expresión de GIP130 aumenta (Fig. 63) y se distribuye formando gránulos dispersos en el citoplasma y en la proximidad de la membrana plasmática (Fig. 54). Al iniciarse la síntesis de miosina, GIP130 se redistribuye y pasa a acumularse en miofibrillas en formación donde co-localiza con la miosina (Fig. 56). En el músculo adulto GIP130 se encuentra en la banda A del sarcómero y en mayor medida en la línea M, donde co-localiza con GPBP-1 y con la miosina (Fig. 67).

### **4.5 El dominio CortBP2 y el motivo PxxPxxPxxP de GIP130 podrían ser los puntos de anclaje de GPBP-1 y miosina respectivamente.**

Las estructuras primarias de GIP130 y FILIP1L-102 contienen tres consensos PxxP consecutivos en su región C terminal, que conforman un motivo que predice una hélice de poliprolina tipo II (PPII) (Fig. 47). Estructuras PPII con una secuencia central PxxP pueden interactuar con proteínas con dominios SH3 (Li, 2005). El consenso PxxPxxPxxP diferencia GIP130 y FILIP1L-102 de GIP90, L-FILIP y LUZP1, que no contienen el consenso (Fig. 47 y 48).

La importancia del motivo PPII parece deducirse del hecho de que FILIP1L-102 muestra más capacidad de inhibición de la motilidad, angiogénesis y proliferación celular que mutantes de delección de la proteína sin el motivo PPII (Kwon *et al.* 2008 y Xie *et al.* 2011). La cadena pesada de la miosina muscular contiene un dominio *SH3-like* que podría mediar en la unión con GIP130. El hecho de que el consenso PxxPxxPxxP de GIP130 se haya conservado en

diferentes especies de mamíferos (Fig. 46) refuerza esta posibilidad y sugiere que el motivo es funcional.

Las proteínas GIP contienen además un dominio CortBP2 en su región N terminal, necesario para la interacción con GPBP-1, y que las diferencia de FILIP1L-102 que no contiene el dominio y no interaccionan con GPBP-1 (Fig. 43).

En conjunto estas observaciones sugieren que GPBP-1 se une a GIP130 a través del dominio CortBP2 y GIP130 se une a la cadena pesada de la miosina a través de su motivo PxxPxxPxxP.

#### **4.6 GPBP-1 interacciona con la proteína de membrana del retículo sarcoplásmico VAP-A y posiciona retículo sarcoplásmico y sarcómeros.**

Las proteínas VAPs (VAP-A y VAP-B) son proteínas integrales del retículo endoplásmico (RE) en células no musculares y del retículo sarcoplásmico (RS) en el músculo esquelético. VAP-A ocupa las regiones del RS próximas a la banda A de los sarcómeros, y VAP-B se localiza en otras regiones del RS (Gkogkas *et al.* 2008). GPBP-1 interacciona con VAP-A (Fig. 37) y ambas co-localizan en la banda A del sarcómero (Fig. 36).

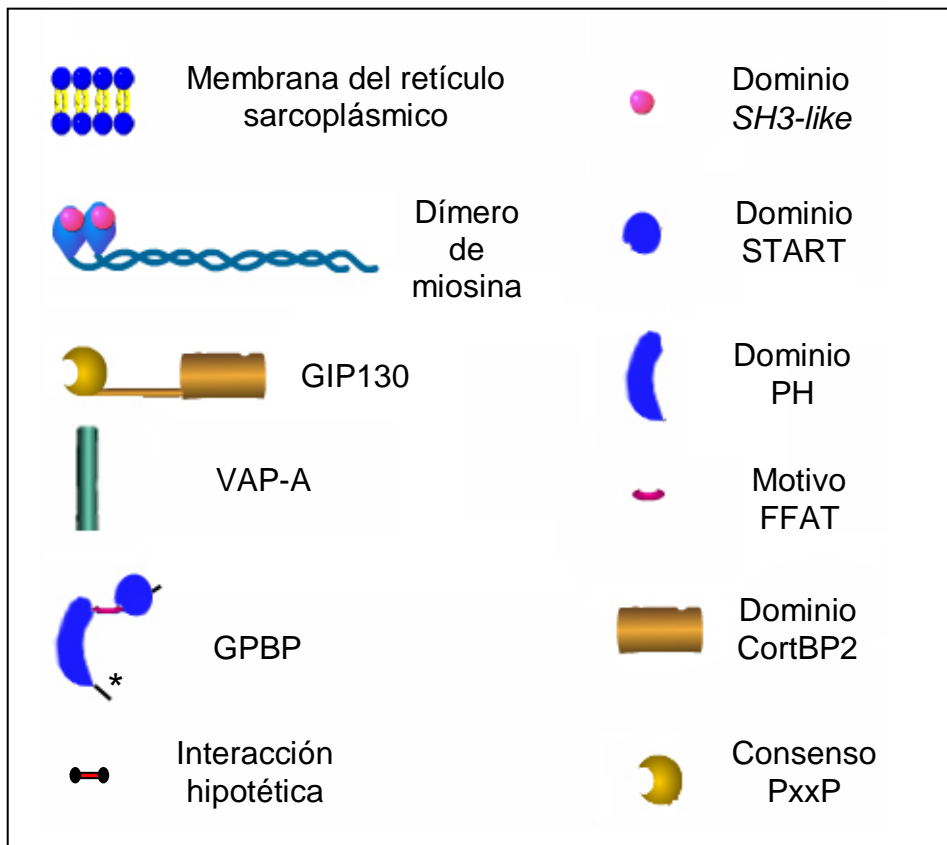
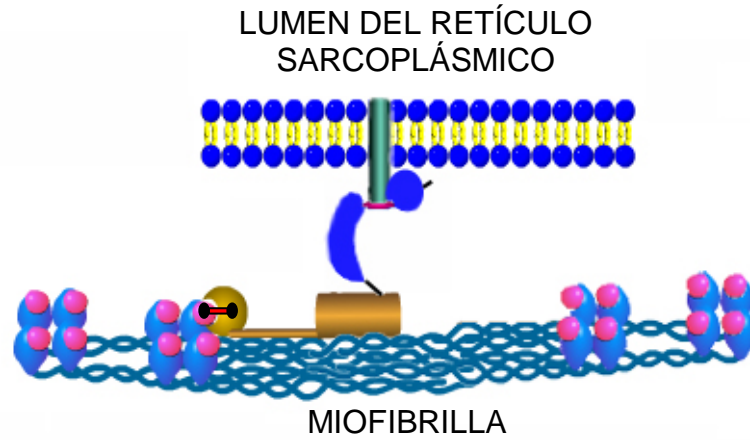
Hasta ahora no había estudios que asociasen GPBP con el citoesqueleto. Otros autores (Hanada *et al.* 2003; Hanada, 2006) han descrito GPBP-2 y

## **CONCLUSIONES FINALES**

---

GPBP-1 como proteínas transportadoras de ceramida y las han renombrado CERT (*Ceramide Transfer Protein*) y CERT<sub>L</sub> respectivamente. Estos autores consideran que el dominio PH de GPBP se une al fosfatidilinositol-4-fosfato del aparato de Golgi y su motivo FFAT a las proteínas VAP del RE, permitiendo que GPBP medie el transporte de ceramida entre los dos compartimentos. La interacción de GPBP-2 y VAP-A ha sido descrita por Kawano *et al.* (2006) y Saito *et al.* (2008). Otros autores han descrito que la expresión conjunta elevada de VAP y proteínas que como GPBP poseen un motivo FFAT (Nir2, Nir3 y ORP3), induce la formación de estructuras aberrantes del RE (Amarilio *et al.* 2005; Lehto *et al.* 2005). Por otra parte, Amarilio *et al.* (2005) han sugerido que Nir-3 sirve de “puente” entre VAP-B y los microtúbulos. De manera similar, hemos elaborado un modelo en el que GPBP-1 entrelaza VAP-A y las miofibrillas. VAP-A se integra en el RS y GIP130 en la miofibrilla, uniéndose al dominio *SH3-like* de la cadena pesada de la miosina a través del motivo PxxPxxPxxP de su extremo C terminal. GPBP-1 interacciona simultáneamente con VAP-A en el RS y con el dominio CortBP2 de GIP130 en la miofibrilla, y constituye así un puente molecular entre ambas estructuras. A continuación se representa un esquema del modelo.





\* Hemos puesto en evidencia mediante ensayos de dos híbridos en levadura que GBP-1 interacciona con GIP130 a través de su secuencia EKTAGKPILF en el extremo C terminal (Resultados no publicados).

## **CONCLUSIONES FINALES**

---

Se ha propuesto un modelo similar para la obscurina, una proteína de la línea M que interacciona con la proteína de unión a la miosina (MyBP-C) (Ackermann *et al.* 2009) y con el dominio citosólico de la ankirina-1, proteína integral de la membrana del RS (Bagnato *et al.* 2003; Kontrogianni-Konstantopoulos y Bloch, 2003; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.* 2004; Kontrogianni-Konstantopoulos *et al.* 2006).

A continuación queremos resaltar algunas consideraciones en relación con nuestro modelo: **1)** En el músculo esquelético GPBP-1 puede ser sustituida por GPBP-2, por lo que las interacciones del modelo son aplicables a ambas isoformas; **2)** El estado de fosforilación de GPBP regula la interacción con VAP-A (Kawano *et al.* 2006; Saito *et al.* 2008) y la expresión diferencial de GIP130 y GIP90 podría regular el estado de fosforilación de GPBP-1 ya que GIP130 potencia la autofosforilación de GPBP y GIP90 la inhibe (Fig. 53); **3)** La capacidad de GIP130 (Saus y Revert-Ros 2006) y de GPBP para autoagregarse (Raya *et al.* 2000) y las consecuencias que este proceso tiene en la fosforilación podrían influir en las interacciones del modelo.

### **4.7 GIP130 es el efector de GPBP-1 en la miofibrillogénesis.**

Esta conclusión se fundamenta en las siguientes observaciones: **1)** La expresión disminuida de GIP130 compromete la formación de estructuras miofibrilares maduras (Fig. 64); **2)** La ausencia de GPBP-1 no impide la formación de agregados GIP130-miosina, pero impide la formación de miofibrillas maduras (Fig. 60); **3)** En células deficitarias en GPBP-1, la

expresión recombinante de GPBP-1 previene la formación de acúmulos desordenados de miosina, aunque no es suficiente para la formación de miofibrillas (Fig. 61); y **4**) La expresión conjunta de GPBP-1 y GIP130 en estas células promueve el alineamiento y co-localización de la miosina con GIP130 en la periferia celular (Fig. 61), lugar donde se postula el inicio de la estructuración de las miofibrillas (Sanger *et al.* 2002; Pizon *et al.* 2005; Quach y Rando 2006).

#### **4.8 El puente molecular VAP-A-GPBP-1-GIP130-miosina es crítico en el alineamiento del RS con la maquinaria contráctil.**

Durante la miogénesis GPBP-1 se fosforila (Fig. 19). GIP130 regula positivamente la autofosforilación de GPBP-1 (Fig. 53). El nivel de fosforilación regula la unión de GPBP-2 a VAP-A y el tránsito de GPBP-2 entre el RE y el aparato de Golgi en el transporte de ceramida entre estos orgánulos (Hanada *et al.* 2003; Hanada, 2006). La unión de GPBP-1 a VAP-A regula la exportación de GPBP-1 al medio extracelular (Revert *et al.* 2008) en forma de proteína defosforilada (resultados no publicados). Concebiblemente, la ausencia de exportación de GPBP-1 durante la miogénesis (Henningesen *et al.* 2010) y el aumento de estado de fosforilación de la proteína intracelular durante la miogénesis (Fig. 19) sugieren que la forma que permanece unida a VAP-A en el músculo es la forma fosforilada de GPBP-1. En este escenario, la interacción con GIP130 representaría una señalización permanente de autofosforilación que garantizaría el alineamiento homeostático de RS y sarcómero para conciliar movilidad de  $Ca^{2+}$  y contracción muscular. Al mismo tiempo, el sistema

## **CONCLUSIONES FINALES**

---

parece que posee recursos para movilizar GPBP-1 y potencialmente liberarlo al compartimento extracelular en respuesta a señales específicas que podrían estar mediadas por GIP90. De acuerdo con esta línea de pensamiento las proteínas GIP que aparecen asociadas a GPBP-1 en músculo son GIP130 y su derivado GIP90 (Fig. 65) activador e inhibidor de la autofosforilación de GPBP-1 respectivamente.

Los ratones Tg-hGPBP-1 no muestran un fenotipo evidente pero son propensos a fatigarse, y desarrollan agregados tubulares (AT) en espacios intermiofibrilares tras ejercicio físico extenuante (Figs. 32 y 35). Los AT son estructuras membranosas aberrantes originadas a partir del RS que se han observado también en ratones *knockout* de caveolina (Schubert *et al.* 2007) y en otros modelos animales (Amthor *et al.* 2007) con escasa resistencia a la fatiga. En seres humanos los AT se asocian a numerosas miopatías como mialgias, rampas y glicogenosis tipo X, que también produce fatiga muscular (Alonso-Losada *et al.* 1998; Oh *et al.* 2006). Se ha postulado que los AT son estructuras que captan el exceso de  $Ca^{2+}$  en el citosol, y que podrían aparecer en respuesta a una homeostasis alterada del  $Ca^{2+}$  y estrés de retículo (Salviati *et al.* 1985; Chevessier *et al.* 2005). La alineación del RS con las miofibrillas influye en la eficacia de la liberación de  $Ca^{2+}$  (Takekura *et al.* 2001). Como posible causa de la formación de AT se ha propuesto recientemente la pérdida de anclaje del RS a la miofibrilla a partir de estudios con proteínas como la obscurina y la tropomodulina que establecen anclajes entre las miofibrillas y el RS (Schiaffino, 2012). La abolición de la expresión de la obscurina en *C. elegans* (Spooner *et al.* 2012) y de tropomodulina en ratones (Gokhin y

Fowler 2011) produce desestructuración del RS y alteración del movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  en los músculos. Concebiblemente, la formación de AT en ratones Tg-GPBP-1 después de esfuerzo físico extenuante podría indicar que como hemos propuesto, GPBP-1 participa en un puente molecular que estabiliza el alineamiento RS y miofibrilla, estableciendo anclajes entre ambas estructuras que garantizan la adecuada movilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  en la contracción muscular. La estabilidad del puente molecular dependerá necesariamente o de la mayor afinidad de VAP-A hacia el dímero GPBP-1-GIP130 o de la mayor afinidad de GIP130 por VAP-A-GPBP-1 o ambos en comparación con la afinidad de VAP-A o GIP130 por GPBP-1 libre. En condiciones de poca exigencia física la presencia de niveles elevados de GPBP-1 libre y la ligera distorsión que esta expresión elevada le imprimen a la estabilidad del puente molecular no tendría repercusiones ni funcionales (fatiga) ni estructurales (formación de AT). Estas manifestaciones sí que se pondrían de manifiesto después de un estrés físico donde la movilidad del  $\text{Ca}^{2+}$  se vería comprometida y se formarían AT.

#### **4.9 El papel de las proteínas GPBP y GIP en la organización del citoesqueleto en los miocitos abre nuevas vías de investigación.**

Los miocitos son células con un prominente citoesqueleto altamente especializado. En general se acepta que las interacciones que encontremos en la célula muscular tendrán un reflejo en las células no musculares. En este sentido, la expresión diferencial y mayormente coordinada de GPBP y GIP (Raya *et al.* 1999 y 2000; Revert-Ros *et al.* 2011) en el resto de los tejidos sugiere que estas dos familias de proteínas desempeñan un papel en la organización del citoesqueleto y en funciones relacionadas tales como

## **CONCLUSIONES FINALES**

---

migración y división celular. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos puesto de manifiesto que un inhibidor de la actividad cinasa de GPBP y también una expresión elevada de GIP130 inhiben la migración de células tumorales. Por otro lado, Todas las proteínas parálogas que presentan dominio CortBP2 (L-FILIP, CTTNBP2 y CTTNBP2NL) se han relacionado con el citoesqueleto de actina, y algunas se expresan específicamente en determinados tejidos. Interesantemente, CTTNBP2 se expresa preferentemente en el cerebro donde nuestros resultados indican que las proteínas GIP se expresan a niveles muy bajos, sugiriendo que quizás en el cerebro CTTNBP2 sustituye a GIP en su papel de regular la organización del citoesqueleto. Similarmente, CTTNBP2NL que se expresa preferentemente en la piel (Chen *et al.* 2012) podría ser la contrapartida de GIP en este tejido. Futuros estudios de interacción de GPBP con estas proteínas aportarán nuevos datos relacionados con su función biológica.

Finalmente, si comprobamos que el motivo PxxPxxPxxP de GIP130 y FILIP1L-102 se une al dominio *SH3-like* de la miosina muscular en los tejidos no musculares también lo podrían hacer con las miosinas no musculares de tipo II, que son similares a las musculares en estructura primaria y secundaria. GIP130 podría inhibir la migración celular en tejidos no musculares mediante interacción con miosinas no musculares, que a su vez se unen a la actina y participan en la migración celular (Vicente-Manzanares *et al.* 2009). Investigar la relación entre GIP130 y GPBP-1 con miosinas no musculares de tipo II puede desvelar claves sobre el control de la migración celular y sobre formas de modularla en condiciones patológicas.

# **BIBLIOGRAFÍA**





## 5 BIBLIOGRAFÍA

Ackermann, M. A. , Hu, L. Y. , Bowman, A. L. , Bloch, R. J. , Kontrogianni-Konstantopoulos, A. (2009). Obscurin interacts with a novel isoform of MyBP-C slow at the periphery of the sarcomeric M-band and regulates thick filament assembly. *Mol Biol Cell*. **20**, 2963-2978.

Alonso-Losada, G. , Cimas, I. , Pego, R. , La Torre, P. , Teijeira, S. , Navarro, C. (1998). Isolated progressive muscle weakness with tubular aggregates. *Clin Neuropathol*. **17**, 50-54.

Amarilio, R., Ramachandran, S., Sabanay, H., and Lev, S. (2005). Differential regulation of endoplasmic reticulum structure through VAP-Nir protein interaction. *J Biol Chem*. **280**, 5934-5944.

Amthor, H , Macharia, R. , Navarrete, R. , Schuelke, M. , Brown, S. C. , Otto, A. , Voit, T. , Muntoni, F. , Vrbóva, G. , Partridge, T. , Zammit, P. , Bunger, L. , Patel, K. (2007). Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**, 1835-1840.

Bagnato, P. , Barone, V. , Giacomello, E. , Rossi, D. , Sorrentino, V. (2003). Binding of an ankyrin-1 isoform to obscurin suggests a molecular link between the sarcoplasmic reticulum and myofibrils in striated muscles. *J Cell Biol*. **160**, 245-253.

Bassel-Duby, R. , Olson, E. N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem*. **75**, 19-37.

Bernal, D., Quinones, S., and Saus, J. (1993). The human mRNA encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced. *J Biol Chem*. **268**, 12090-12094.

Bornberg-Bauer, E. , Rivals, E. , Vingron, M. (1998). Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res*. **26**, 2740-2746.

Borza, D. B. , Netzer, K. O. , Leinonen, A. , Todd, P. , Cervera, J. , Saus, J. , Hudson, B. G. (2000). The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain. *J Biol Chem*. **275**, 6030-6037.

Borza, C. M. , Borza, D. B. , Pedchenko, V. , Saleem, M. A. , Mathieson, P. W. , Sado, Y. , Hudson, H. M. , Pozzi, A. , Saus, J. , Abrahamson, D. R. , *et al.* (2008). Human podocytes adhere to the KRGDS motif of the alpha3alpha4alpha5 collagen IV network. *J Am Soc Nephrol*. **19**, 677-684.

Burton, E. R. , Gaffar, A. , Lee, S. J. , Adeshuko, F. , Whitney, K. D. , Chung, J. Y. , Hewitt, S. M. , Huang, G. S. , Goldberg, G. L. , Libutti, S. K. , Kwon, M. (2011). Downregulation of Filamin A interacting protein 1-like is associated with promoter methylation and induces an invasive phenotype in ovarian cancer. *Mol*

*Cancer Res.* **9** (8):1126-38.

Calvete, J. J. , Revert, F. , Blanco, M. , Cervera, J. , Tarrega, C. , Sanz, L. , Revert-Ros, F. , Granero, F. , Perez-Paya, E. , Hudson, B. G. , *et al.* (2006). Conformational diversity of the Goodpasture antigen, the noncollagenous-1 domain of the alpha3 chain of collagen IV. *Proteomics*. **6**, (1) S237-244.

Chen, Y. K. , Chen, C. Y. , Hu, H. T. , Hsueh, Y. P. (2012). CTTNBP2, but not CTTNBP2NL, regulates dendritic spinogenesis and synaptic distribution of the striatin-PP2A complex. *Mol Biol Cell*. **23**, 4383-92.

Chevessier, F. , Bauché-Godard, S. , Leroy, J. P. , Koenig, J. , Paturneau-Jouas, M. , Eymard, B. , Hantai, D. , Verdière-Sahuqué, M. (2005). The origin of tubular aggregates in human myopathies. *J Pathol*. **207**, 313-23.

Clark, K. , Middelbeek, J. , Lasonder, E. , Dulyaninova, N. G. , Morrice, N. A. , Ryazanov, A. G. , Bresnick, A. R. , Figdor, C. G. , van Leeuwen, F. N. (2008). TRPM7 regulates myosin IIA filament stability and protein localization by heavy chain phosphorylation. *J Mol Biol* **378**, 790-803.

Craig, R. W. , Padrón, R. 2004. Libro de texto, Myology. Capítulo 7, sección II. Molecular structure of the sarcomere. Editores Engel, A. C. , y Franzini-Armstrong, C. Tercera edición, McGraw-Hill, Inc. Nueva York, 2004.

Cusella-De Angelis, M. G , Lyons, G. , Sonnino, C. , De Angelis, L. , Vivarelli, E. , Farmer, K. , Wright, W. E. , Molinaro, M. , Bouchè, M. , Buckingham, M. , Cossu, G. (1992). MyoD, myogenin independent differentiation of primordial myoblasts in mouse somites. *J Cell Biol*. **116**, 1243-55.

D'Ambrosio L. M. (2010). Investigating the higher-order protein interactions surrounding the stripak complex. Tesis doctoral. Universidad de Toronto.

Dosztányi, Z. , Meszaros, B. , Simon, I. (2009). ANCHOR: web server for predicting protein binding regions in disordered proteins. *Bioinformatics*. **25**, 2745-2746.

Frock, R. L. , Kudlow, B. A. , Evans, A. M. , Jameson, S. A. , Hauschka, S. D. , Kennedy, B.K. (2006). Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev*. **20**, 486-500.

Fugmann, T. , Hausser, A. , Schoffler, P. , Schmid, S. , Pfizenmaier, K. , Olayioye, M. A. (2007). Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein. *J Cell Biol*. **178**, 15-22.

Fujio, Y. , Guo, K. , Mano, T. , Mitsuuchi, Y. , Testa, J. R. , Walsh, K. (1999). Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol*. **19**, 5073-5082.

Gkogkas, C. , Middleton, S. , Kremer, A. M. , Wardrope, C. , Hannah,

M. , Gillingwater, T. H. , Skehel, P. (2008). VAPB interacts with and modulates the activity of ATF6. *Hum Mol Genet.* **17**, 1517-1526.

Gokhin, D. S. , Fowler, V, M. (2011). Cytoplasmic gamma-actin and tropomodulin isoforms link to the sarcoplasmic reticulum in skeletal muscle fibers. *J Cell Biol.* **194**, 105-20.

Goodpasture, E. W. (1919). The significance of certain pulmonary lesions in relation to the etiology of influenza. *Am J Med Sci.* **158**, 863-870.

Granero-Moltó, F. , Sarmah, S. , O'Rear, L. , Spagnoli, A. , Abrahamson, D. , Saus, J. , Hudson, B. G. , Knapik, E. W. (2008). Goodpasture antigen-binding protein and its spliced variant, ceramide transfer protein, have different functions in the modulation of apoptosis during zebrafish development. *J Biol Chem* **283**, 20495-20504.

Gunwar, S. , Ballester, F. , Noelken, M. E. , Sado, Y. , Ninomiya, Y. , Hudson, B. G. (1998). Glomerular basement membrane. Identification of a novel disulfide-cross-linked network of alpha3, alpha4, and alpha5 chains of type IV collagen and its implications for the pathogenesis of Alport syndrome. *J Biol Chem.* **273**, 8767-8775.

Guyton, A. C. , Hall, J. E. (2006). Textbook of Medical Physiology, W.B. , Saunders Co. , (11th Ed).

Hanada, K. , Kumagai, K. , Yasuda, S. , Miura, Y. , Kawano, M. , Fukasawa, M. , Nishijima, M. (2003). Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803-809.

Hanada K. (2006). Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramida. *Mol Cell Biochem.* **286**, 23-31.

Henningsen J., Rigbolt K. T., Blagoev B., Pedersen B. K., Kratchmarova I. (2010). Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation. *Mol. Cell. Proteomics.* **9**, 2482–2496.

Hostikka, S. L. , Tryggvason, K. (1988). The complete primary structure of the alpha 2 chain of human type IV collagen and comparison with the alpha 1(IV) chain. *J Biol Chem.* **263**, 19488-19493.

Hostikka, S. L. , Eddy, R. L. , Byers, M. G. , Hoyhtya, M. , Shows, T. B. , Tryggvason, K. (1990). Identification of a distinct type IV collagen alpha chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**, 1606-1610.

Hsu, S. M. , Raine, L. , Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* **29**,

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

577-580.

Hudson, B. G. , Tryggvason, K. , Sundaramoorthy, M. , Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med.* **348**, 2543-2556.

Jo, K. , Rutten, B. , Bunn, R. C. , Bredt, D. S. (2001). Actinin-associated LIM protein-deficient mice maintain normal development and structure of skeletal muscle. *Mol Cell Biol.* **21**, 1682-1687.

Kalluri, R. , Gattone, V. H. , 2nd, Noelken, M. E. , Hudson, B. G. (1994). The alpha 3 chain of type IV collagen induces autoimmune Goodpasture syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**, 6201-6205.

Kawano, M. , Kumagai, K. , Nishijima, M. , Hanada, K. (2006). Efficient trafficking of ceramide from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus requires a VAMP-associated protein-interacting FFAT motif of CERT. *J Biol Chem.* **281**, 30279-30288.

Kontrogianni-Konstantopoulos, A. , Bloch, R. J. (2003). The hydrophilic domain of small ankyrin-1 interacts with the two N-terminal immunoglobulin domains of titin. *J Biol Chem.* **278**, 3985-3991.

Kontrogianni-Konstantopoulos, A. , Catino, D. H. , Strong, J. C. , Randall, W. R. , Bloch, R. J. (2004). Obscurin regulates the organization of myosin into A bands. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C209-217.

Kontrogianni-Konstantopoulos, A. , Catino, D. H. , Strong, J. C. , Sutter, S. , Borisov, A. B. , Pumplun, D. W. , Russell, M. W. , Bloch, R. J. (2006). Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *FASEB J.* **20**, 2102-2111.

Kwon, M. , Hanna, E. , Lorang, D. , He, M. , Quick, J. S. , Adem, A. , Stevenson, C. , Chung, J. Y. , Hewitt, S. M. , Zudaire, E. , Esposito, D. , Cuttitta, F. , Libutti, S. K. (2008). Functional characterization of filamin A interacting protein 1-like, a novel candidate for antivasular cancer therapy. *Cancer Res.* **68**, 7332-7341.

Lange, S. , Ouyang, K. , Meyer, G. , Cui, L. , Cheng, H. , Lieber, R. L. , Chen, J. (2009). Obscurin determines the architecture of the longitudinal sarcoplasmic reticulum. *J Cell Sci.* **122**, 2640-2650.

Lehto, M. , Hynynen, R. , Karjalainen, K., Kuismanen, E. , Hyvarinen, K. , Olkkonen, V. M. (2005). Targeting of OSBP-related protein 3 (ORP3) to endoplasmic reticulum and plasma membrane is controlled by multiple determinants. *Exp Cell Res.* **310**, 445-462.

Leinonen, A. , Mariyama, M. , Mochizuki, T. , Tryggvason, K. , Reeders, S. T. (1994). Complete primary structure of the human type IV collagen alpha

4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains. *J Biol Chem.* **269**, 26172-26177.

Lerner, R. A. , Glasscock, R. J. , Dixon, F. J. (1967). The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis. *J Exp Med.* **126**, 989-1004.

Li, S. S. (2005). Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J.* **390**, 641-653.

Lupas, A. , Van Dyke, M. , Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science.* **252**, 1162-1164.

Mariyama, M. , Leinonen, A. , Mochizuki, T. , Tryggvason, K. , Reenders, S. T. (1994). Complete primary structure of the human alpha 3(IV) collagen chain. Coexpression of the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen chains in human tissues. *J Biol Chem.* **269**, 23013-23017.

McGrath M. J. , Cottle, D. L. , Nguyen, M. A. , Dyson, J. M. , Coghill, I. D. , Robinson, P. A. , Holdsworth, M. , Cowling, B. S. , Hardeman, E. C. , Mitchell, C. A. , Brown, S. (2006). Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem.* **281**, 7666-7683.

Miralem, T. , Gibbs, P. E. , Revert, F. , Saus, J. , Maines, M. D. (2010). Human biliverdin reductase suppresses Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) kinase activity: the reductase regulates tumor necrosis factor-alpha-NF-kappaB-dependent GPBP expression. *J Biol Chem.* **285**, 12551-12558.

Mok, S. C. , Wong, K. K. , Chan, R. K. , Lau, C. C. , Tsao, S. W. , Knapp, R. C. , Berkowitz, R. S. (1994). Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* **52**, 247-252.

Myers, J. C. , Jones, T. A. , Pohjolainen, E. R. , Kadri, A. S. , Goddard, A. D. , Sheer, D. , Solomon, E. , Pihlajaniemi, T. (1990). Molecular cloning of alpha 5(IV) collagen and assignment of the gene to the region of the X chromosome containing the Alport syndrome locus. *Am J Hum Genet.* **46**, 1024-1033.

Nagano, T. , Yoneda, T. , Hatanaka, Y. , Kubota, C. , Murakami, F. , Sato, M. (2002). Filamin A-interacting protein (FILIP) regulates cortical cell migration out of the ventricular zone. *Nat Cell Biol.* **4**, 495-501.

Nakanishi, K. , Sudo, T. , Morishima, N. (2005) Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol.* **169**, 555-60.

Netzer, K. O. , Leinonen, A. , Boutaud, A. , Borza, D. B. , Todd, P. , Gunwar, S. , Langeveld, J. P. , Hudson, B. G. (1999). The goodpasture autoantigen.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain. *J Biol Chem.* **274**, 11267-11274.

O'Connor, R. S. , Steeds, C. M. , Wiseman, R. W. , Pavlath, G.K. (2008). Phosphocreatine as an energy source for actin cytoskeletal rearrangements during myoblast fusion. *J Physiol.* **586**, 2841-2853.

Oh, S. J. , Park, K. S. , Ryan, H. F. , Jr. , Danon, M. J. , Lu, J. , Naini, A. B. , DiMauro, S. (2006). Exercise-induced cramp, myoglobinuria, and tubular aggregates in phosphoglycerate mutase deficiency. *Muscle Nerve.* **34**, 572-576.

Oohashi, T. , Sugimoto, M. , Mattei, M. G. , Ninomiya, Y. (1994). Identification of a new collagen IV chain, alpha 6(IV), by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem.* **269**, 7520-7526.

Pizon, V. , Gerbal, F. , Diaz, C. C. , Karsenti, E. (2005). Microtubule-dependent transport and organization of sarcomeric myosin during skeletal muscle differentiation. *EMBO J.* **24**, 3781-3792.

Pomiès, P. , Pashmforoush, M. , Vegezzi, C. , Chien, K. R. , Auffray, C. , Beckerle, M. C. (2007). The cytoskeleton-associated PDZ-LIM protein, ALP, acts on serum response factor activity to regulate muscle differentiation. *Mol Biol Cell.* **18**, 1723-1733.

Quach, N. L. , Rando, T. A. (2006). Focal adhesion kinase is essential for costamereogenesis in cultured skeletal muscle cells. *Dev Biol.* **293**, 38-52

Quinones, S. , Bernal, D. , Garcia-Sogo, M. , Elena, S. F. , Saus, J. (1992). Exon/intron structure of the human alpha 3(IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha 3(IV)NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction. *J Biol Chem.* **267**, 19780-19784.

Rao, R. P. , Yuan, C. , Allegood, J. C. , Rawat, S. S. , Edwards, M. B. , Wang, X. , Merrill, A. H. , Jr. , Acharya, U. , Acharya, J. K. (2007). Ceramide transfer protein function is essential for normal oxidative stress response and lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 11364-11369.

Raya, A. , Revert, F. , Navarro, S. , Saus, J. (1999). Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen. *J Biol Chem.* **274**, 12642-12649.

Raya, A. , Revert-Ros, F. , Martinez-Martinez, P. , Navarro, S. , Rosello, E. , Vieites, B. , Granero, F. , Forteza, J. , Saus, J. (2000). Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis. *J Biol Chem.* **275**, 40392-40399.

Revert, F. , Penades, J. R. , Plana, M. , Bernal, D. , Johansson, C. , Itarte, E. , Cervera, J. , Wieslander, J. , Quinones, S. , Saus, J. (1995). Phosphorylation

of the Goodpasture antigen by type A protein kinases. *J Biol Chem.* **270**, 13254-13261.

Revert, F. , Merino, R. , Monteagudo, C. , Macias, J. , Peydro, A. , Alcacer, J. , Muniesa, P. , Marquina, R. , Blanco, M. , Iglesias, M. , Revert-Ros F, Merino J, Saus, J. (2007). Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane. *Am J Pathol.* **171**, 1419-1430.

Revert, F. , Ventura, I. , Martinez-Martinez, P. , Granero-Molto, F. , Revert-Ros, F. , Macias, J. , Saus, J. (2008). Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms. *J Biol Chem.* **283**, 30246-30255.

Revert-Ros, F. J. (2004). GPBP-interacting proteins (GIP): una nueva familia de factores de transcripción con relevancia en autoinmunidad y cáncer. Tesis doctoral. Universitat de València.

Revert-Ros, F. , Lopez-Pascual, E. , Granero-Molto, F. , Macias, J. , Breyer, R. , Zent, R. , Hudson, B. G. , Saadeddin, A. , Revert, F. , Blasco, R. , *et al.* (2011). Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) directs myofibril formation: identification of intracellular downstream effector 130-kDa GPBP-interacting protein (GIP130). *J Biol Chem.* **286**, 35030-35043.

Saito, S. , Matsui, H. , Kawano, M. , Kumagai, K. , Tomishige, N. , Hanada, K. , Echigo, S. , Tamura, S. , Kobayashi, T. (2008). Protein phosphatase 2Cepsilon is an endoplasmic reticulum integral membrane protein that dephosphorylates the ceramide transport protein CERT to enhance its association with organelle membranes. *J Biol Chem.* **283**, 6584-6593.

Salviati, G. , Pierobon-Bormioli, S. , Betto, R. , Damiani, E. , Angelini, C. , Ringel, S. P. , Salvatori, S. , Margreth, A. (1985). Tubular aggregates: sarcoplasmic reticulum origin, calcium storage ability, and functional implications. *Muscle Nerve.* **8**, 299-306.

Sanger, J. W. , Chowrashi, P. , Shaner, N. C. , Spalhoff, S. , Wang, J. , Freeman, N. L. , Sanger, J. M. (2002). Myofibrillogenesis in skeletal muscle cells. *Clin Orthop Relat Res* **403**, S153-162.

Saus, J. , Wieslander, J. , Langeveld, J. P. , Quinones, S. , Hudson, B. G. (1988). Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem.* **263**, 13374-13380.

Saus, J. (2005). US Patent 6881547: Methods , Reagents to treat autoimmune diseases.

Saus, J. , Revert-Ros, F. (2006) US Patent 7147855: GIPs, a family of polypeptides with transcription factor activity that interact with Goodpasture antigen-binding protein.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

Schiaffino, S. (2012). Tubular aggregates in skeletal muscle: just a special type of protein aggregates?. *Neuromuscul. Disord.* **22**, 199-207.

Schubert, W. , Sotgia, F. , Cohen, A. W. , Capozza, F. , Bonuccelli, G. , Bruno, C. , Minetti, C. , Bonilla, E. , Dimauro, S. , Lisanti, M. P. (2007). Caveolin-1(-/-)- and caveolin-2(-/-)-deficient mice both display numerous skeletal muscle abnormalities, with tubular aggregate formation. *Am J Pathol.* **170**, 316-333.

Siebold, B. , Deutzmann, R. , Kuhn, K. (1988). The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross-linking domain of basement-membrane type IV collagen. *Eur J Biochem.* **176**, 617-24.

Soininen, R. , Haka-Risku, T. , Prockop, D. J. , Tryggvason, K. (1987). Complete primary structure of the alpha 1-chain of human basement membrane (type IV) collagen. *FEBS Lett.* **225**, 188-194.

Spooner, P. M. , Bonner, J. , Maricq, A. V. , Benian, G. M. , Norman, K. R. (2012). Large isoforms of UNC-89 (obscurin) are required for muscle cell architecture and optimal calcium release in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* **7**, e40182

Takekura, H. , Flucher, B. E. , Franzini-Armstrong, C. (2001). Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-Tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle. *Dev Biol.* **239**, 204-214.

Timpl, R. , Wiedemann, H. , van Delden, V. , Furthmayr, H. , Kuhn, K. (1981). A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem.* **120**, 203-211.

Vanacore R. , Ham A. J. , Voehler M. , Sanders C. R. , Conrads T. P. , Veenstra T. D. , Sharpless K. B. (2009). A sulfilimine bond identified in collagen IV. *Science.* **325** (5945),1230-4.

Vicente-Manzanares, M. , Ma, X. , Adelstein, R.S. , Horwitz, A. R. (2009). Non muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **10**, 778-790.

Vilella, A.J. , Severin, J. , Ureta-Vidal, A. , Heng, L. , Durbin, R. , Birney, E. (2009). EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res.* **19**, 327-335.

Wang, X. , Rao, R. P. , Kosakowska-Cholody, T. , Masood, M. A. , Southon, E. , Zhang, H. , Berthet, C. , Nagashim, K. , Veenstra, T.K. , Tessarollo, L. , Acharya U, Acharya JK. (2009). Mitochondrial degeneration and not apoptosis is the primary cause of embryonic lethality in ceramide transfer protein mutant mice. *J Cell Biol.* **184**, 143-158.

Wieslander, J. , Langeveld, J. , Butkowski, R. , Jodlowski, M. , Noelken, M. , Hudson, B. G. (1985). Physical and immunochemical studies of the



globular domain of type IV collagen. Cryptic properties of the Goodpasture antigen. *J Biol Chem.* **260**, 8564-8570.

Xie, C. , Gou, M. L. , Yi, T. , Deng, H. , Li, Z.Y. , Liu, P. , Qi, X. R. , He, X. , Wei, Y. , Zhao, X. (2011). Efficient Inhibition of Ovarian Cancer by Truncation Mutant of FILIP1L Gene Delivered by Novel Biodegradable Cationic Heparin-Polyethyleneimine Nanogels. *Hum Gene Ther.* **11**, 1413-1422.

Yaffe, D. , Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* **270**, 725-727.

Zhang T, Xiong H. , Kan L. X. , Zhang C. K. , Jiao X. F. , Fu G, Zhang Q. H. , Lu L. , Tong J. H. , Gu B. W. , Yu M. , Liu J. X. , Licht J. , Waxman S. , Zelent A. , Chen E. , Chen S. J. (1999). Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**,11422-11427.

Zhou, J. , Ding, M. , Zhao, Z. , Reeders, S. T. (1994). Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains. *J Biol Chem.* **269**, 13193-13199.