



Aplicación de técnicas de proteómica para el estudio de enfermedades neuromusculares

Carolina De La Torre Gómez

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE
PROTEÓMICA PARA EL ESTUDIO DE
ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES**

Carolina De La Torre Gómez

Tesis Doctoral

**APLICACIONES DE TÉCNICAS DE PROTEÓMICA PARA EL ESTUDIO DE
ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES**

Memoria presentada por Carolina De La Torre Gómez
Para optar al grado de Doctora en Inmunología en la Universitat de Barcelona.

Tesis realizada en el Servicio de Neurología y en el Laboratorio de Neurología
Experimental del Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Dirigida por el Dr. Eduard Gallardo Vigo

Tesis adscrita al Departamento de Inmunología de la Facultad de Biología, Universitat de
Barcelona.

Programa de Inmunología, biennio 2002-2004.

Dr. Eduard Gallardo
Director de Tesis

Dr. Jorge Lloberas
Tutor de Tesis

Carolina De La Torre Gómez
Doctoranda

"Puedes ser solamente una persona para el mundo, pero para una persona tú eres el mundo."

Gabriel García Márquez

*A mi Familia por ayudarme en el logro de mis objetivos
A mis hermanas por ser incondicionales, A Christian por el apoyo en los
momentos más difíciles y especialmente a mi hijo Matthias*

1. INDICE

1. INDICE.....	7
2. AGRADECIMIENTOS.....	11
3. RESUMEN.....	13
4. INTRODUCCIÓN.....	15
PROTEÓMICA	15
<i>Desafíos de la Proteómica.....</i>	16
<i>Objetivos de la Proteómica.....</i>	17
<i>Sistemas de control de calidad.....</i>	18
TECNOLOGÍAS DE LA PROTEÓMICA.....	21
<i>Metodología Para el Fraccionamiento de Proteínas.....</i>	21
<i>Métodos de Fraccionamiento</i>	22
Fraccionamiento subcelular	22
Electroforesis bidimensional	23
Adquisición de la imagen y análisis de geles bidimensionales	25
Cromatografía Líquida.....	25
ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	27
<i>Espectrómetro de masas.....</i>	28
Fuentes de ionización.....	29
MALDI	29
ESI	29
Analizadores de masas	31
Cuadrupolo (quadrupole, Q)	31
Tiempo de vuelo (time of flight, TOF)	32
Trampa iónica (ion trap, IT).....	33
Orbitrap.....	33
Detector de masas	34
<i>Estrategias para la identificación de proteínas</i>	35
a) Huella peptídica (peptide mass fingerprint, PMF).....	35
b) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	36
<i>Estrategias de Cuantificación Basadas en Espectrometría de masas.....</i>	37
APLICACIONES DE LA PROTEÓMICA EN BIOMEDICINA.....	41
<i>Identificación de Biomarcadores.....</i>	41
<i>Detección de Biomarcadores mediante técnicas de inmunoproteómica.....</i>	42
<i>Flujo de trabajo en proteómica: "Work Flow".....</i>	44

PROTEÓMICA CLÍNICA	47
<i>Enfermedades Neuromusculares</i>	47
Neuropatías adquiridas disímunes.....	48
Distrofias musculares	50
LGMD2A.....	50
Disferlinopatías	51
Distrofia facioescapulohumeral (FSHD)	52
Inflamación en las distrofias musculares.....	53
Escleromixedema	53
PROTEÓMICA EN LAS ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES	55
<i>Proteoma del Músculo</i>	55
Estudio proteómico de las modificaciones postraduccionales en el músculo esquelético.	58
Perfil Proteómico Mitocondrial en el Músculo Esquelético	59
<i>Antecedentes de la proteómica en Enfermedades Neuromusculares</i>	59
Análisis proteómico en las Disferlinopatías.....	60
Análisis proteómico en la distrofia de FSH	61
5. OBJETIVOS	63
6. INFORME DEL DIRECTOR DE TESIS DEL FACTOR DE IMPACTO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS	65
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
RESUMEN DE RESULTADOS.....	67
<i>Artículo I: “Steady Remission of Scleromyxedema Three Years After Autologous Stem Cell</i>	67
<i>Transplantation: An In Vivo and In Vitro Study”. Blood 2006 (108): 773-774</i>	67
<i>Artículo II: “Chronic sensorimotor polyradiculopathy with antibodies to P2: an electrophysiological</i>	
<i>and immunoproteomic analysis”. Muscle And Nerve 2008 38(1):933-8</i>	73
Discusión artículo 2	75
<i>Artículo III: “Proteomics Identification of Differentially Expressed Proteins in the Muscle of</i>	
<i>Dysferlin Myopathy Patients”. Proteomics Clinical Applications 2008 38(1):933-8</i>	81
Discusión artículo 3	84
8. DISCUSIÓN GLOBAL.....	93
9. CONCLUSIONES	95
10. REFERENCIAS	97
11. PUBLICACIONES	115
STEADY REMISSION OF SCLEROMYXEDEMA 3 YEARS AFTER AUTOLOGOUS STEM CELL TRANSPLANTATION: AN IN VIVO	
AND IN VITRO STUDY	115

CHRONIC SENSORIMOTOR POLYRADICULOPATHY WITH ANTIBODIES TO P2: AN ELECTROPHYSIOLOGICAL AND IMMUNOPROTEOMIC ANALYSIS	119
PROTEOMICS IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED PROTEINS IN THE MUSCLE OF DYSFERLIN MYOPATHY PATIENTS.....	127
12. ANEXO	143
MÉTODOS NO INCLUIDOS EN LOS ARTÍCULOS	143
FE DE ERRATA.....	144
OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE LA ESTANCIA PREDOCTORAL EN EL HOSPITAL DE SANT PAU, LABORATORIO DE NEUROLOGÍA EXPERIMENTAL.....	145
ABSENCE OF DYSFERLIN ALTERS MYOGENIN EXPRESSION AND DELAYS HUMAN MUSCLE DIFFERENTIATION “ <i>IN VITRO</i> ”	145
GENE EXPRESSION PROFILING IN LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY 2A	154
HUMAN APOLIPOPROTEIN A-II DETERMINES PLASMA TRIGLYCERIDES BY REGULATING LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY AND HIGH-DENSITY LIPOPROTEIN PROTEOME	171

2. AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar en estas líneas mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, comenzando por mi director de Tesis, el Dr. Eduard Gallardo, quien para mí es un verdadero amigo, gracias a su constante apoyo y dedicación en el desarrollo de este trabajo. A mis compañeros, en especial a Noemí de Luna por su apoyo en algunos momentos que fueron necesarios y por su generosidad al proporcionarme el primer modelo en el que basarme para comenzar a redactar esta Tesis, y a todos los compañeros que forman parte del laboratorio de Enfermedades Neuromusculares del Hospital de Sant Pau y particularmente destacar a la Dra Illa por aceptar que pudiera realizar este trabajo en su laboratorio.

Especialmente quiero agradecer a la Dra. Eliandre Oliveira (PCB), por su ayuda y colaboración en momentos puntuales del desarrollo de este trabajo experimental, a Maisa García, Gracias por aguantarme, por facilitarme los reactivos y equipos cuando los necesite. Del mismo modo, me gustaría expresar mi gratitud a los servicios de proteómica (Parc Científic de Barcelona, Laboratorio de proteómica del Vall de Hebron Hospital, Universidad Pompeu i Fabra) que ofrecieron su ayuda apoyo y sobre todo, por proporcionarme una buena base de conocimientos en mis inicios sobre muchas de las técnicas habitualmente empleadas en proteómica, por resolverme gran cantidad de dudas a lo largo de estos años.

A mis Amigos, por su afecto recibido, sin cuyo ánimo nunca habría llegado hasta aquí. Muchos de ellos han aportado su granito de arena en la revisión de este trabajo, con su cariño desde la cercanía y la distancia. Gracias por tantas cosas!

Viviana y Carlos no hay palabras que describan los buenos sentimientos hacia vosotros, vuestro apoyo y consejos que siempre me han enseñado a crecer personal y profesionalmente. Comalada eres única “grande por dentro como por fuera” te estimo mucho, Eva y Ester, incondicionales, en todos los momentos decisivos de mi vida en Barcelona, habéis estado allí presente dando los ánimos necesarios que me ayudaran a ver las cosas de manera objetiva.

No puedo quejarme a nivel de amigos, me considero una mujer afortunada en esta vida cuando digo amigos digo unos cuantos y de esos que cuentas en los momentos buenos y malos. En esta pequeña gran ciudad Barcelona he encontrado el lugar ideal para sentirme como en casa, como en mi tierra, hasta el punto que me siento parte de ella.

A mi familia, que a lo largo de mi vida me enseñaron que la educación era la clave del éxito. Mis hermanas, por su constante apoyo con el cuidado de mi pequeño Matthias para que yo fuera los fines de semana a escribir la tesis.

A ti Christian, que has sido quién ha estado ahí, día tras día, dándome las fuerzas para seguir adelante, especialmente en los momentos más difíciles (solo tú sabes que han sido unos cuantos). Gracias por ser ese apoyo que me ha mantenido en pie todo este tiempo. Es imposible que logre compensarte por todo lo que me has aportado, así que solo espero que podamos seguir el camino adelante para intentarlo cada nuevo día.

Nunca pensé encontrar la luz al final de túnel! Combinar ser madre, trabajo, y la realización de esta tesis no ha sido una tarea fácil.

3. RESUMEN

En la actualidad la proteómica es una de las herramientas más utilizadas en el estudio de diferentes patologías. Los avances en la proteómica incluyen la preparación de la muestra, la espectrometría de masas (MS) y el análisis de datos; convirtiendo esta tecnología en un método básico para la biomedicina.

La espectrometría de masas (MS) es la base de la proteómica, este campo ha evolucionado rápidamente en el desarrollo de análisis de proteínas tanto cualitativo como cuantitativo, los análisis de modificaciones post-traduccionales, la localización subcelular y las interacciones de proteínas. En este trabajo hemos aplicado diferentes técnicas de proteómica para abordar diferentes preguntas relacionadas con la patología de las enfermedades neuromusculares estudiadas:

- El uso de la electroforesis bidimensional (2D-E) como herramienta de estudio para identificar los cambios en la expresión proteica en una enfermedad durante su desarrollo clínico y tras una intervención terapéutica.
- Identificación de nuevos antígenos mediante el uso 2D-E y posterior “*western blot*”, con sueros de pacientes con neuropatías inmunomediadas.
- El uso de la 2D-E para el análisis cualitativo y cuantitativo de las diferentes distrofias musculares estudiadas.

4. INTRODUCCIÓN

Proteómica

La secuenciación del genoma de un alto número de especies ha conducido a lo que se llama la era de la post-genómica. En 1994, Wilkins introdujo el término de proteoma como equivalente lingüístico al concepto del genoma [1], el proteoma define el conjunto de proteínas que se expresan a partir de un genoma.

La Proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica el proteoma expresado en un organismo; en determinados momentos puntuales y bajo condiciones concretas establecidas, cómo en la enfermedad, en los factores ambientales y fisiológicos como la edad, el estrés, agentes tóxicos y/o fármacos [2-3]. Ésta también puede ser considerada como una caja de herramientas, dotada de un conjunto de técnicas e instrumentos con un alto poder de resolución. [4]. La ampliación de esta caja de herramientas no sólo requiere la optimización de las tecnologías actuales, sino también del desarrollo y evaluación de las mismas, con la finalidad de aplicar estas técnicas como análisis de rutina especialmente en el descubrimiento de biomarcadores.

La forma más adecuada para realizar el análisis y la caracterización del proteoma, dependerá de las adecuadas estrategias que se apliquen para la preparación de las muestras biológicas complejas y los métodos de análisis a utilizar que dependerán de la alta sensibilidad de los equipos. De esta forma, se alcanza a obtener la máxima resolución en los resultados; por lo tanto, las muestras deberán ser fraccionadas antes de la identificación de proteínas por espectrometría de masas [5].

Actualmente, la espectrometría de masas (MS) es una técnica indispensable para la caracterización del proteoma de manera reproducible, gracias a su velocidad, precisión y sensibilidad. [6] [7]. En el desarrollo de esta introducción, se presentan los retos y objetivos de la proteómica actual, la cual nos permite realizar análisis comparativo y cuantitativo de las proteínas, destacando tecnologías de separación para el fraccionamiento del proteoma y los principios básicos de la espectrometría de masas en la proteómica.

Desafíos de la Proteómica

El principal desafío de la biología molecular es revelar los mecanismos y el funcionamiento interno de las células. En esta búsqueda continua encontramos que las células están conformadas por amplias redes moleculares que forman interacciones dinámicas, las cuales determinan muchos procesos biológicos. La finalización del proyecto del genoma humano [8] [9], mostró que el genoma es mucho más simple de lo previsto inicialmente. Por lo tanto, los mecanismos subyacentes de la función celular son más complejos de lo imaginado y el estudio directo de los genes no puede establecer el papel de las proteínas en el funcionamiento de la célula y ampliar nuestra comprensión de cómo funcionan los sistemas biológicos. Sin embargo, el análisis de los organismos a nivel de proteína presenta una gran variedad de retos analíticos, muchos de los cuales todavía hay que superar.

Un proteoma típico puede contener decenas de miles de proteínas únicas, que están presentes en un amplio rango dinámico de concentración [10-11]. En los organismos eucariotas, como los humanos, que contienen alrededor de 20.000 a 25.000 genes, el “*splicing*” alternativo de los precursores de ARN obtenidos de la transcripción y la posterior traducción de las distintas isoformas de estas proteínas aumenta la complejidad de la muestra [12]. Si además, se combina con un gran número de modificaciones post-traduccionales (PTM) [13], el número de proteínas únicas que pueden comprender el proteoma de organismos complejos puede ser más de un millón [14].

En los últimos tiempos, uno de los principales obstáculos a los que se ha enfrentado la investigación proteómica es la dificultad que supone la identificación de todas las proteínas presentes dentro de una muestra biológica compleja. Esta dificultad se ve agravada por el limitado poder de resolución en la concentración de proteínas de menor rango dinámico [15]. Otros problemas están asociados a la evaluación de la enorme cantidad de información que genera esta tecnología, que complica la selección e interpretación de los datos potencialmente útiles entre todos los obtenidos.

Objetivos de la Proteómica

El objetivo general de la proteómica es analizar los proteomas y la variabilidad de estos en las diferentes células de un tejido, con el fin de resaltar las diferencias entre ellas. A nivel específico, uno de los principales objetivos de la proteómica es proporcionar información útil en el campo de la biomedicina acerca de los cambios en los perfiles de expresión proteica específicos y de los mecanismos asociados a estos en diferentes estadios celulares (sanos y enfermos), con una finalidad a largo plazo de desarrollar mejores métodos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Todos estos objetivos descritos anteriormente, no son fáciles de realizar ya que no tenemos aún toda la secuencia del proteoma humano completo; sólo conocemos una pequeña parte de las proteínas presentes en el cuerpo humano. Para la realización de estos objetivos será indispensable el desarrollo del "Proyecto Proteoma Humano" (HPP), que se basa en la caracterización de los 21.000 genes del genoma humano conocidos. La meta de este proyecto es generar mapas de proteínas basados en la estructura molecular del cuerpo humano.

Toda esta información proteica que generaría la realización de este mega-proyecto en el que participan varios países a nivel mundial, nos permitiría explicar la función biológica de las proteínas y cómo sus modificaciones se ven afectadas bajo diferentes condiciones celulares, el diagnóstico molecular, y los avances en el tratamiento de las enfermedades (<http://www.hupo.org/research/hpp/>).

Las áreas de estudio dentro de la proteómica son bastante diversas, Por ejemplo: la función de las proteínas, el estudio de las interacciones proteína-proteína, el papel de estas en las vías metabólicas y las vías de señalización, las cuales son importantes para comprender el papel que las proteínas llevan a cabo en sus procesos biológicos. [16] [17] [18].

El análisis estructural de las proteínas a través de cristalografía por rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN) [19] [20] [21], o la espectrometría de masas [22] [23] permite una visión de cómo el plegamiento de una proteína está relacionada con su función.

La identificación y la localización de las modificaciones postraduccionales (PTMs) son fundamentales para comprender la función de una proteína que pueden ser por ejemplo responsables de la regulación de vías de señalización [24] [25] [26].

Sistemas de control de calidad

Los sistemas de control de calidad son procedimientos necesarios, para validar la calidad de los resultados. La mayoría de los problemas encontrados en la proteómica están a nivel de la preparación y manipulación de las muestras, del fraccionamiento de estas, del análisis y evaluación de datos, por lo tanto todos estos procesos requieren una supervisión y la utilización adecuada de los flujos de trabajo que permitan garantizar la veracidad de los resultados obtenidos.

La comunidad de científicos que trabajan en el área de la proteómica, recientemente han empezado a introducir como parte de los análisis de rutina de proteómica el término “control de calidad” en las diferentes etapas de los flujos de trabajo utilizados en el análisis de una muestra. Los esfuerzos de control de calidad son actualmente específicos para los distintos laboratorios, lo cual da lugar a estrategias muy distintas para verificar el funcionamiento de la instrumentación y los pasos de análisis. Al mismo tiempo también encontramos entidades que están en la búsqueda de estrategias que estandaricen los procedimientos a seguir en el análisis del proteoma y sensibilizar a la comunidad científica de la importancia del control de calidad para obtener resultados que tengan cada vez una mayor validez.

Una de las entidades de las que hablamos anteriormente es la “*Fixing Proteomics Campaign*”, su función es evaluar la reproducibilidad, criterio que es fundamental en los experimentos en los que se utilicen técnicas de espectrometría de masas y electroforesis bidimensional (2D-E), esta organización puede conseguir este objetivo gracias a la participación activa de los laboratorios de investigación que pretenden unificar los protocolos disminuyendo así la variabilidad.

La “*ABRF*” “*The Association of Biomolecular Resource Facilities*”, es una sociedad internacional dedicada a promover el desarrollo de los avances biotecnológicos en los laboratorios de investigación. Ésta se compone por un número de aproximadamente 800

científicos que trabajan en los laboratorios de investigación biotecnológica. Estos miembros representan a más de 140 laboratorios de entidades gubernamentales, académicas, de investigación, industriales y comerciales. La “*ABRF*” promueve la educación y la promoción profesional de los científicos a través de la organización de conferencias, cursos y becas. Además patrocina estudios multicéntricos de investigación diseñados para ayudar a sus miembros a incorporar nuevas biotecnologías en los laboratorios.

La Organización del Proteoma Humano “*Human Proteome Organization*” (HUPO) ha construido recientemente una muestra de 20 proteínas equimolares, disponible como prueba de control de calidad de referencia que puede ser aplicada a todos los flujos de trabajo utilizados en la proteómica. De esta forma facilita información que permita evaluar el estado general de los instrumentos y del flujo de trabajo utilizado. A través de procesos comunitarios que apoyan el intercambio, la difusión y el reanálisis de conjuntos de datos, se ayudarán a establecer y promover mejores prácticas en áreas técnicas específicas.

Tecnologías de la proteómica

Las metodologías de análisis de las proteínas despiertan gran interés tanto para la investigación básica como para la más directamente biomédica. Durante los últimos años, las tecnologías de la proteómica han dado lugar a grandes avances en la investigación básica y clínica.

El impacto de estas tecnologías nos permite una comprensión más completa de los procesos celulares. Sin embargo a pesar de los grandes avances tecnológicos, seguimos encontrando grandes problemas. Por ejemplo, una mayor sensibilidad en la detección de proteínas a partir de mezclas complejas y de fácil acceso para ensayos rápidos y rentables, útiles para validar los marcadores prometedores.

Las tecnologías que se aplican en la proteómica van encaminadas a separar, identificar y caracterizar un gran conjunto de proteínas con el objetivo de conocer la abundancia de las mismas, su localización, modificación e interacciones entre diferentes proteínas.

No existen métodos o instrumentos que sean capaces de identificar y cuantificar los componentes de una muestra compleja de proteínas en una única manipulación. A continuación describiremos más detalladamente los métodos utilizados para el fraccionamiento de proteínas.

Metodología Para el Fraccionamiento de Proteínas

La mayoría de las muestras biológicas son mezclas complejas de proteínas, las cuales no pueden ser analizadas directamente por espectrometría de masas dada su complejidad, por lo tanto es necesario realizar un paso previo e importante de **“Fraccionamiento”**, permitiendo así incrementar el número de proteínas identificadas y a la vez favorezca la detección de aquellas presentes en menor cantidad. Actualmente las técnicas de proteómica combinan varias técnicas de separación de proteínas previo al análisis de MS, lo que permite ganar resolución en la identificación del proteoma. Los dos métodos más utilizados para el fraccionamiento de proteínas son la electroforesis bidimensional en gel (2D-PAGE) y cromatografía líquida multidimensional (MDLC),

siendo la cromatografía líquida con dos dimensiones (2DLC) la más popular. Durante la preparación de la muestra existen diferentes formas de prefraccionarla y así conseguir reducir la complejidad de esta. De esta manera utilizamos una parte aislada y caracterizada de los orgánulos u otras estructuras subcelulares de la muestra y no todo el extracto total de proteínas. [27-29]. A continuación se explica los diferentes métodos de fraccionamiento.

Métodos de Fraccionamiento

Fraccionamiento subcelular

Conocer la localización de las proteínas en la célula es un dato muy significativo que nos puede ayudar a explicar su funcionalidad. Por lo tanto, el análisis de las proteínas expresadas en los compartimentos subcelulares provee información referente a la funcionalidad de las proteínas, disminuyendo de esta manera la complejidad de la muestra.

Actualmente en la literatura encontramos numerosos métodos para el aislamiento y purificación de distintas estructuras subcelulares [27-29],[30-31], donde podemos encontrar una amplia gama de métodos que incluye la clásica centrifugación en gradiente de densidad y la purificación por afinidad mediante anticuerpos específicos para proteínas transmembrana de diferentes orgánulos. También se describen otros métodos comúnmente utilizados como las técnicas electroforéticas, entre ellas la electroforesis de flujo libre, la electroforesis en gradiente de densidad de alta resolución o la inmunoelectroforesis. Las identificaciones proteicas en estos estudios varían numéricamente desde diez hasta miles de proteínas identificadas, dependiendo del orgánulo u estructura subcelular de estudio y los métodos que se han utilizados para el análisis.

Electroforesis bidimensional

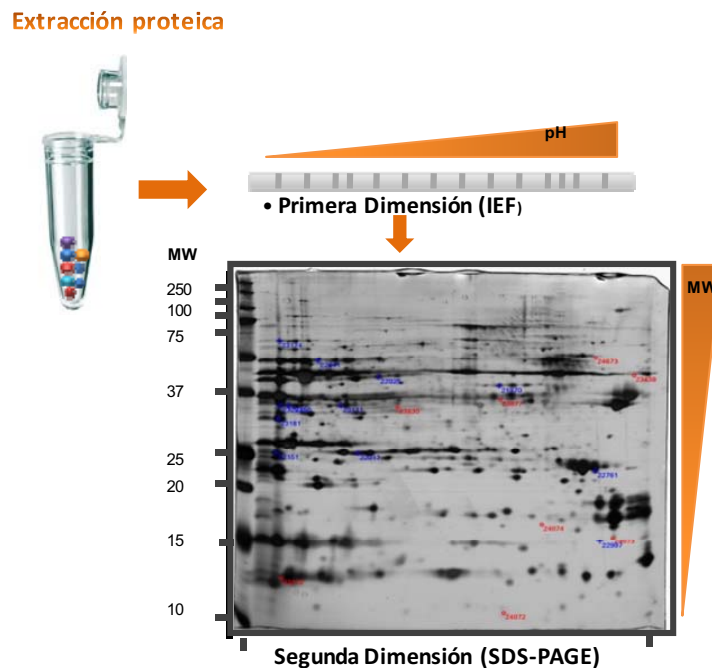
La electroforesis bidimensional es una técnica que fue desarrollada en los años 70 por Kenrick & Margolis [32] [33] y por O' Farrell [34]. Esta técnica de gran poder de resolución se caracteriza por la separación de mezclas complejas de proteínas. En primer lugar se realiza un isoelectroenfoque (IEF) donde las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoelectrico (pI). A continuación se lleva a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), donde las proteínas se separan en función de su masa molecular. La dirección del movimiento de las proteínas en esta segunda etapa electroforética es perpendicular a la primera, de manera que se obtiene un mapa de “manchas proteicas” que se distribuye en dos dimensiones.[35-36]. Su uso se generalizó a partir de los años 80, tras la invención de un método para generar gradientes de pH inmovilizados “*immobilized pH gradients*”, (IPG) [37]. Los IPG mejoraron la reproducibilidad entre geles y permitieron la creación de bases de datos de geles bidimensionales, disponibles hoy día en Internet [38].

En los últimos tiempos, el desarrollo de la electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE) ha mejorado mucho la capacidad de la 2-DE para realizar análisis comparativos. Se trata de una técnica basada en el marcaje fluorescentes de las proteínas previo a su separación, lo que le otorga una gran precisión en la cuantificación, que además permite la separación de varias muestras proteicas en un mismo gel [39], incrementando la reproducibilidad y la fiabilidad del análisis de expresión diferencial entre muestras.

La 2DE presenta varias ventajas que explican su notoriedad en los estudios proteómicos. Además se destaca el hecho de que permite realizar una visualización directa de los mapas proteicos del proteoma estudiado. Permitiendo una fácil identificación de isoformas proteicas y sus modificaciones posttraduccionales, así como la comparación con otros mapas proteicos existentes en las bases de datos.

Una vez que la segunda dimensión ha finalizado, las proteínas o “*spots*” deben ser visualizados, para ello existen varios métodos de tinción con diferentes características (sensibilidad, linealidad, homogeneidad y reproducibilidad). Entre los métodos de

tinción visibles tenemos (tinción con nitrato de plata, “colloidal blue”, “coomassie”, tinción negativa con zinc-imidazol), el método más sensible es la tinción de plata, pero el rango lineal es más amplio en las técnicas fluorescentes, y entre estas últimas tenemos (Sypro) para proteínas totales, [40] “PQ-Diamon” fosforiladas, “Emerald” glicossiladas. La aplicación de estos métodos es posterior al desarrollo de la 2-DE. También podemos utilizar métodos de detección inmunoquímica, considerando que la separación proteica se lleva a cabo en un gel de electroforesis y luego sean estas transferidas a un soporte o membrana, para luego ser identificadas mediante técnicas de inmunodetección o “blotting”. [41] [42].



Figure

Esquema de Electroforesis bidimensional:

La técnica de 2-DE está basada en la separación de una mezcla de proteínas en dos dimensiones. En la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico en una tira de poliacrilamida con un gradiente inmovilizado de pH. A continuación, la tira se coloca en la parte superior de un gel SDS-PAGE, y se separan las proteínas en base a su masa molecular (segunda dimensión).

Adquisición de la imagen y análisis de geles bidimensionales

Para un buen análisis de la imagen de los geles bidimensionales, es necesario que estos sean escaneados y guardados en alta resolución con la finalidad de obtener una imagen digital que permita llevar a cabo una serie de análisis como son la detección de los puntos (especies proteicas), eliminación del ruido de fondo, determinación de la intensidad de cada uno de los puntos, cuantificación y comparación del patrón de expresión de cada uno de los puntos generados en cada uno de los geles analizados. Obteniendo como resultado una comparación cualitativa de los perfiles de expresión de las proteínas y la identificación de los cambios en la expresión de estas, en cada una de las muestras estudiadas. La complejidad de los geles bidimensionales requiere el empleo de paquetes informáticos especializados para su análisis [43-44]

Cromatografía Líquida

En la actualidad el uso de la cromatografía como técnica de fraccionamiento ha aumentado su uso, dada su capacidad de superar algunas de las limitaciones de los métodos de fraccionamiento por electroforesis bidimensional (2DE), lo que permite abordar proteínas difíciles de analizar dada su estructura y composición, como las proteínas con puntos isoelectricos extremos (ácidos y básicos) y las proteínas hidrofóbicas, ya que dada su composición y escasa solubilidad están poco representadas en los mapas electroforéticos bidimensionales obtenidos hasta el momento.

Otras que son difíciles de analizar son las de baja abundancia que dada a su escasez no puedan apreciarse por la presencia de proteínas mayoritarias que opacan o se superponen ante estas, imposibilitando de este modo su fácil detección. Es por ello, que en los últimos años ha existido la tendencia a trabajar con los péptidos en vez de las proteínas tratando de solucionar las limitaciones señaladas.

La cromatografía líquida (*"Liquid Chromatography"*, LC) es una técnica de fraccionamiento que puede utilizarse para separar proteínas o péptidos según las

propiedades físicas y/o químicas de estos. Puede utilizarse como un paso de purificación previo o posterior a la 2-DE, o una alternativa a la misma.

Las técnicas de cromatografía 2 dimensiones (2D) tiene la ventaja que permite pueda ser utilizada en muchas combinaciones multidimensionales aumentado de esta manera la capacidad de generar los máximos niveles de resolución para las muestra de gran complejidad. La cromatografía multidimensional se lleva a cabo mediante la aplicación de sucesivos fraccionamientos, utilizando diferentes clases de columnas tales como: las de fase reversa (RP, “*Reverse Phase*”), las de exclusión molecular (SEC, “*Size Exclusion Chromatography*”), las de intercambio catiónico (SCX, “*Strong Cation Exchange*”) o aniónico (SAX, “*Strong Anion Exchange*”), y las de afinidad [45].

Las técnicas de cromatografía conectadas a equipos de espectrometría de masas en tándem, como la tecnología multidimensional de identificación de proteínas (“*Multidimensional Protein Identification Technology*”, *MudPIT*), superan a las técnicas basadas en gel, en rapidez, sensibilidad, reproducibilidad y aplicabilidad a diferentes muestras y condiciones [46-47]. Sin embargo, el mayor defecto de esta técnica es la carencia de información cuantitativa, aunque el desarrollo de técnicas de marcaje isotópico de proteínas, como ICAT (“*Isotope-coded affinity tag*”) e iTRAQ (“*Isotope tags for relative and absolute quantitation*”), está compensando esta desventaja [48-50]. La principal ventaja de más de estas técnicas de marcaje peptídico (iTRAQ ICAT, SILAC) y metabólicos es que se pueden analizar simultáneamente varias muestras, reduciendo así el tiempo necesario para el análisis de espectrometría de masas.

Los métodos de fraccionamiento como la “2DE y la cromatografía” presentan ventajas y desventajas, por ello el éxito de un buen análisis está directamente relacionado con la selección adecuada y cuidadosa del método a utilizar, el tipo de muestra y del estudio que se quiera realizar. El uso de cada uno de estos métodos de fraccionamiento no imposibilita el uso del otro ya que nos aportan resultados complementarios. [51-52]

Espectrometría de masas

Espectrometría de masas (MS) es una técnica valiosa cuyos inicios se remontan a los primeros días del siglo pasado. Entre las técnicas analíticas, MS tiene un lugar especial ya que mide con precisión el peso de una molécula y/o más exactamente su relación masa/carga (m/z).

En sus inicios, la MS no era aplicable a las proteínas, debido a la ausencia de técnicas suaves de ionización que permitieran realizar el paso de grandes biomoléculas a iones en fase gaseosa sin una fragmentación excesiva de las mismas, es decir, que no se volatilizaban [53]. A partir de la década de 1980 y en mayor escala en la década de 1990, la espectrometría de masa ha desempeñado un papel cada vez más importante en las ciencias biológicas, gracias al desarrollarlo de dos técnicas de ionización que permitieron realizar el análisis de proteínas y péptidos, entre otras biomoléculas por MS. La primera de ellas, se denomina MALDI por sus siglas en inglés “*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*” (desorción/ionización láser asistida por matriz) desarrollada por Karas y Hillenkamp en 1988(22) y la segunda de ellas es la ionización por electrospray “*electrospray ionization*” (ESI), desarrollada por Fenn y colaboradores. [54].

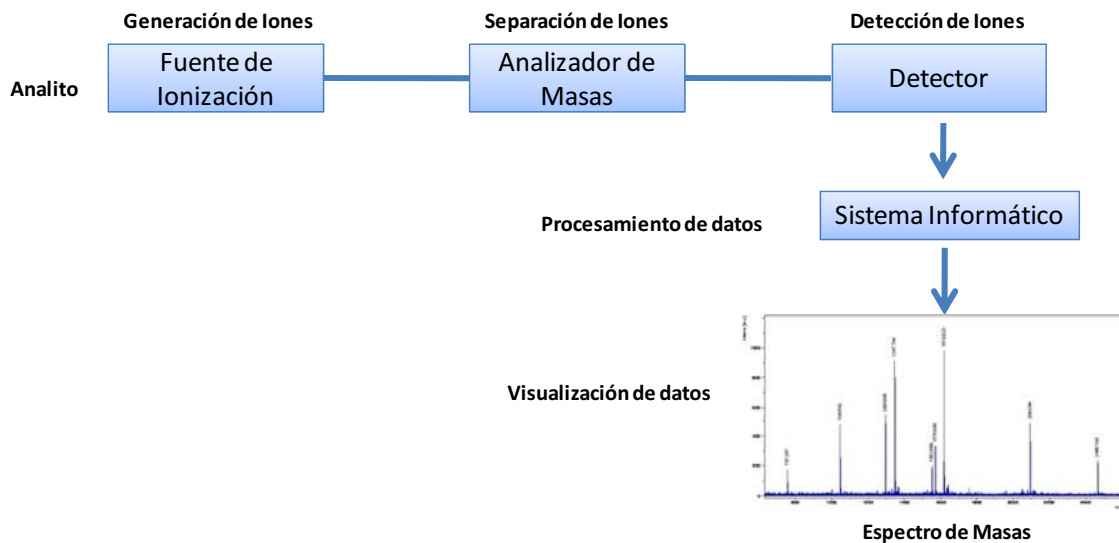
Los mayores avances para el estudio de las proteínas se han dado en la etapa de preparación de las muestras para la MS; un área importante para la viabilidad y la sensibilidad del análisis. A partir de 1993, se comienzan a publicar varios algoritmos, y programas informáticos, diseñados con el objetivo de permitir la correlación de los datos de espectrometría de masas obtenidos para una proteína y los obtenidos en las bases de datos, cada vez más amplias.

La MS ha evolucionado rápidamente convirtiéndose en un campo central de la genómica funcional. Este proceso se debe al desarrollo de las tecnologías en el área instrumental y de las herramientas de análisis [7]. . A continuación se describí algunos equipos instrumentales, como sus componentes y características.

Espectrómetro de masas

Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos, que en orden secuencial de acción en un análisis por MS serían: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector.

La fuente de ionización convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas, donde son separadas según su relación masa/carga y hace que lleguen al detector secuencialmente. Las señales captadas por el detector son integradas por un sistema informático que genera un gráfico denominado espectro de masas, donde se representan la abundancia (intensidad) de los iones en el eje de coordenadas y la masa / carga (m/z) en las abscisas, está permitirá la identificación del compuesto.



Figura

Esquema de las partes principales de los equipos de espectrometría de masas. Existen tres componentes esenciales: la fuente de ionización (MALDI o ESI), el analizador de masas (TOF, Q, IT o una combinación de los anteriores el caso espectrómetros en tándem o híbridos), el detector de iones. Las señales captadas por el detector son integradas en un sistema informático (externo al espectrómetro de masas) que generan los gráficos conocidos como espectrómetro de masas.

Fuentes de ionización

Es el elemento del espectrómetro que ioniza el material a ser analizado (el analito). Luego los iones son transportados por los campos magnéticos o eléctricos al analizador total. Las técnicas para la ionización han sido claves para determinar qué tipos de muestras se pueden analizar mediante espectrometría de masas. Las dos técnicas a menudo usadas para el análisis de líquidos y muestras sólidas son MALDI y el ESI.

MALDI

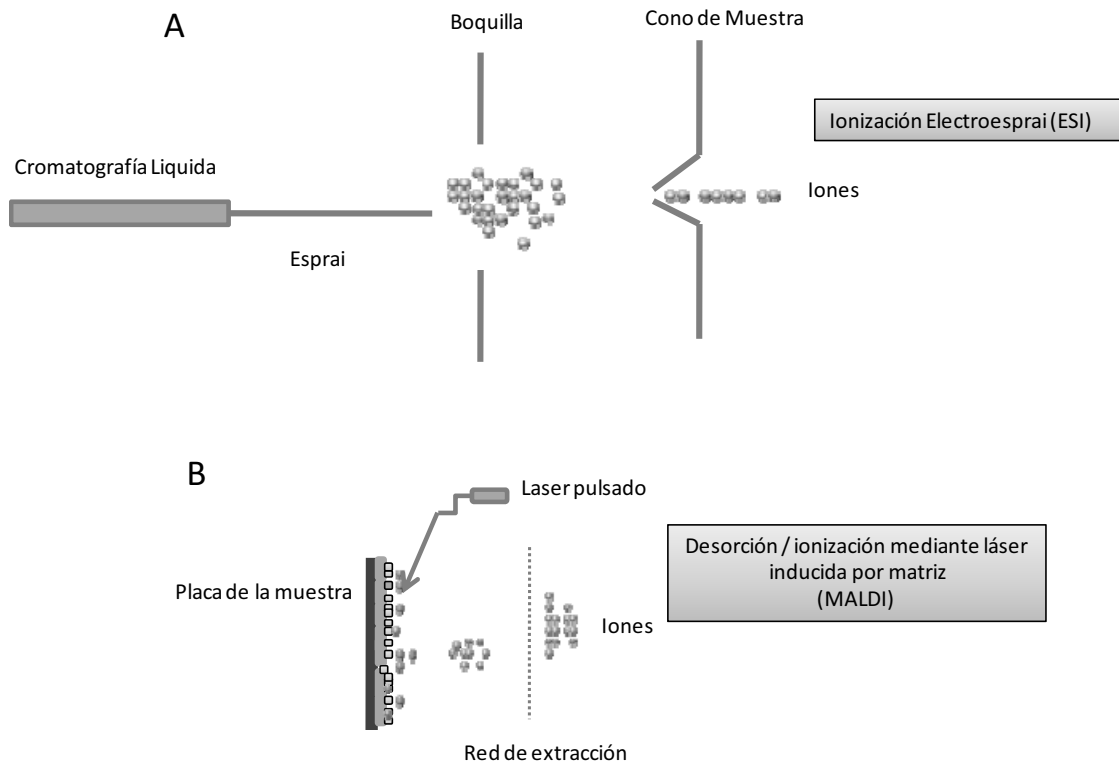
Desarrollado por Karas y Hillenkamp a finales de 1980, es uno de los dos métodos "ionización suave". El analito se mezcla con un compuesto aromático o matriz en presencia de un disolvente orgánico y se deposita en una superficie metálica. Al evaporarse el compuesto orgánico la matriz co-cristaliza junto con el analito. La placa metálica se introduce en la cámara de ionización del espectrómetro de masas, que se encuentra en alto vacío, y a continuación se incide con un pulso de un láser ultravioleta (UV) sobre ella. Los cristales absorben la energía del láser, algo que no haría el analito por sí solo, y se produce un importante aumento de energía en una superficie pequeña, lo que conlleva una rápida sublimación de la mezcla, dejando al analito ionizado y en fase gaseosa. La acción de un campo eléctrico (20-25kV) produce el movimiento de los iones del analito hacia el analizador de masas.

ESI

Desarrollado para su uso en muestras biológicas de espectrometría de masas por John Fenn. En este caso el analito es disuelto en un tampón volátil, a pH ácido, es llevado desde la salida de la columna HPLC a un fino capilar metálico que está sometido a un alto voltaje. Esto produce la salida de la disolución en forma de spray de gotas cargadas que contienen varios analitos. Las microgotas son sometidas a la acción de un corriente de gas a alta temperatura, lo que elimina el disolvente restante y deja a los analitos ionizados y en fase gaseosa, lo que provoca que sean acelerados por el campo eléctrico hacia el analizador de masas. La ionización por ESI permite acoplar métodos de electroforesis capilar y cromatografía líquida directamente al espectrómetro de masas, lo que es hoy en día muy utilizado para realizar la identificación a gran escala de

complejas mezclas de proteínas. La técnica MALDI se emplea para la identificación de mezclas de muy bajo número de proteínas, lo que limita su uso a la identificación de manchas proteicas de geles 2-DE o fracciones de baja complejidad procedentes de métodos multidimensionales de LC. Aún así sigue siendo una técnica complementaria al ESI por su gran sensibilidad y tolerancia a los contaminantes de la muestra

Figura



Los dos métodos más importantes de ionización de las moléculas para el análisis de espectrometría de masas. **(a)** Ionización por Electroesprai (ESI), donde el voltaje se aplica directamente a la fase móvil, siendo esta muy polar y en algunos experimentos proteómicos según la situación su aplicabilidad se usa a baja velocidad de flujo en las que se usan columnas con un diámetro muy estrecho.

(b) desorción / ionización mediante láser inducida por matriz (MALDI), esta es útil para aplicaciones en las que se desee una sola carga de los iones moleculares y no una continua introducción de la muestra. Un pulso de un láser hace que la muestra acidificada se lance desde el lugar de la matriz y donde se elaborará en el espectrómetro de masas por las placas de carga negativa.

Analizadores de masas

La identificación de proteínas como un marcador biológico durante el análisis de espectrometría de masas, se basa en parte a la exactitud de las masas, la resolución y la velocidad del análisis de espectrometría de masas utilizado en el experimento. En la actualidad en el mercado hay varios tipos de espectrómetros de masas y cada tipo de tiene sus ventajas y desventajas. El corazón de un espectrómetro de masas es el analizador de masas. Estos logran la separación de iones aprovechando las diferencias de comportamiento entre los dos iones de diferentes masas de carga (m/z) dentro de un campo eléctrica y/o magnético. Esto se puede lograr en de diferentes maneras y las diferentes estrategias han sacado a la luz una variedad de espectrómetros de masas comerciales con diferentes tipos de utilización. Estos incluyen: el cuadrupolo, la trampa de iones (2D y 3D), el tiempo de vuelo (TOF), y el alto rendimiento instrumentos como el Orbitrap.

Cuadrupolo (quadrupole, Q)

Es uno de los analizadores más utilizado en la espectrometría de masas en tándem, está compuesto por cuatro barras metálicas paralelas, separadas entre ellas, a las que se les aplica un potencial de corriente continua, y otro de radiofrecuencia (RF). Al aplicar un voltaje de RF variable, se permite que un determinado ión de m/z específica conserve su trayectoria y llegue al detector, mientras que todos los demás son desviados. De este modo se admite el paso de iones con distintas m/z , de forma sucesivo hacia el detector.

Un cuadrupolo puede actuar en otro modo, en el que todos los iones pasan a través de él sin que ninguno de ellos sea seleccionado de manera específica. Actualmente se suelen emplear hexápolos u óctapolos, aunque el analizador de masas sigue conservando su denominación de cuadrupolo. Además de emplearse para separar los iones, estos analizadores de masas también se emplean para producir la fragmentación en la MS en tándem, por un método denominado disociación inducida por colisión “*Collision-Induced Dissociation*”, (CID), en cuyo caso se conocen como cámaras o celdas de colisión.

Tiempo de vuelo (time of flight, TOF)

Es uno de los analizadores más sencillos, y más comunes en los laboratorios. El principio de los espectrómetros de tiempo de vuelo (*time of flight*) se basa en la relación entre la masa y la velocidad de los iones. Se mide el tiempo que necesitan los iones acelerados para recorrer una distancia (L), que depende de las características del instrumento, sin que los iones estén sometidos a un campo eléctrico y/o magnético

Las prestaciones del TOF son especialmente interesantes, sobre todo en cuanto a la resolución y la exactitud en la determinación de la masa ya que se consiguen valores inferiores a partes por millón. Se han incorporado algunos elementos en el instrumento como son unos espejos electrostáticos denominados «reflectrón» para aumentar la resolución y mejorar la separación de los haces de iones.

Los equipos MALDI-TOF son muy utilizados para el análisis de biomoléculas, hallando dentro sus principales ventajas:

- La rapidez de los análisis, actualmente algunos instrumentos comerciales pueden procesar cien muestras en menos de diez minutos.
- La determinación de las masas se puede realizar en un amplio intervalo, se pueden medir desde péptidos de pequeña masa hasta proteínas mayores de 100.000 Dalton (Da).
- Los espectros de masas que se obtienen son mucho más sencillos, debido a que la mayoría de los iones tienen una carga única, sólo un pequeño porcentaje es de doble carga y rara vez se observan iones de triple carga.

Las limitaciones del MALDI-TOF también existen y se pueden resumir en las siguientes:

- La Baja reproducibilidad debido a la dificultad para controlar los proceso de cristalización y producción de iones debido a la fuerte influencia del láser.
- La resolución relativamente baja para la determinación de las masas, debido a que la energía de las biomoléculas se dispersa durante el proceso de desorción, así como, la posible unión a la matriz y a la posible fragmentación de la biomolécula.

Trampa iónica (ion trap, IT)

Se trata un analizador de masas ampliamente utilizado. Este consta de un electrodo que constituye un anillo central y dos colectores, la separación de los iones se produce almacenando los iones en el espacio central y manipulando su movimiento en el tiempo en lugar de hacerlo en el espacio. El campo se crea aplicando un sistema de radiofrecuencias al anillo central. Los iones del analito procedentes de la fuente de ionización penetran a través de una rejilla en el electrodo colector y según su m/z y el campo aplicado, circulan en una órbita estable o se desestabilizan pasando al detector.

Los instrumentos de IT se caracterizan por tener una elevada sensibilidad y obtener una rápida adquisición de datos, sin embargo, los analizadores IT tienen una resolución limitada y una relativamente baja capacidad de atrapar iones, ello ha conducido al desarrollo del **analizador de trampa de iones lineal (LIT)** con elevada capacidad de atrapamiento de iones lo que ha mejorado el rango dinámico y la sensibilidad de esa técnica. El LIT ha desplazado al cuádruplo clásico. Actualmente los instrumentos LIT, disponen de elementos que les permiten mejorar la resolución.

Orbitrap

Es un tipo de espectrómetro de masas inventado por Alexander Makarov. Consiste en un electrodo exterior con forma de barril y un electrodo interior coaxial con forma de huso que forma un campo electrostático con distribución potencial cuadro-logarítmica. [55].

En un orbitrap, los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es balanceada por fuerzas centrífugas. Así los iones dan vueltas alrededor del electrodo central en anillos. Adicionalmente los iones también se mueven delante y detrás a través del eje del electrodo central. Así, los iones con una específica relación masa-carga se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central, la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente

proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga (m/z o m/q). La trampa puede ser utilizada como un analizador de masa.

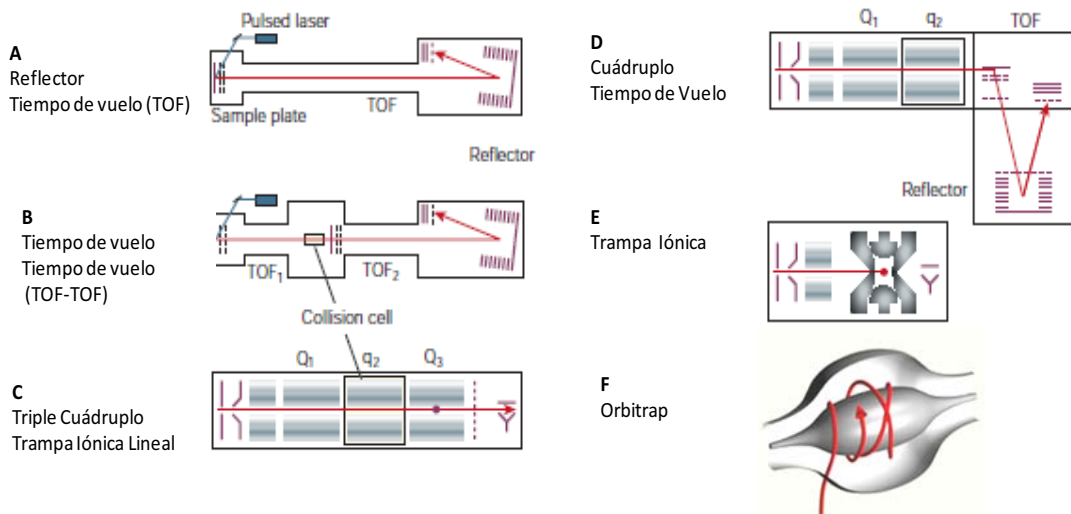


Figura 5. Tipos de espectrómetros de masas empleados en Proteómica. **a.** En los equipos MALDI-TOF los iones son acelerados y separados en un tubo de vuelo de acuerdo a sus diferentes velocidades. **b.** El MALDI-TOF-TOF incluye una celda de colisión entre dos tubos de vuelo. **c.** En el triple cuádruplo los iones son seleccionados en el primer cuádruplo (Q₁), fragmentados en la celda de colisión (Q₂) y sus fragmentos separados en el Q₃. En una trampa lineal, los iones son capturados en una sección cuádruple, representada por un punto rojo en Q₃. A continuación son sometidos a un campo de resonancia eléctrica y los fragmentos se escanean a su salida. **d.** El cuádruplo-TOF combina la parte frontal de un triple cuádruplo con un analizador de masas para los fragmentos peptídicos tipo TOF. **e.** La trampa iónica tridimensional funciona de manera similar a la lineal, reteniendo los iones peptídicos, fragmentando los de determinada m/z y escaneando los fragmentos a su salida para generar el espectro de masas. **f.** Orbitrap los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico entre los electrodos y quedan atrapados porque su atracción electrostática hacia el electrodo interior es balanceada por fuerzas centrífugas. Así los iones dan vueltas alrededor del electrodo central en anillos. Adicionalmente los iones también se mueven delante y detrás a través del eje del electrodo central. Así, los iones con una específica relación masa-carga se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central, la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-carga (m/z). Adaptado de: *Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 422(6928):198-207 (2003).*

Detector de masas

El elemento final del espectrómetro total es el detector. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ion pasa cerca o golpea una superficie. En

un instrumento de exploración la señal es producida en el detector durante la trayectoria de la misma (m/z) y producirá un espectro de masa, un expediente del m/z 's en el cual los iones están presentes. Típicamente, se utiliza un cierto tipo de multiplicador de electrones (electromultiplicador).

Estrategias para la identificación de proteínas

En la actualidad existen tres estrategias fundamentales para la identificación de proteínas mediante la espectrometría de masas:

La primera de las estrategias para la identificación de proteínas en las bases de datos se basa en que la digestión proteolítica de una proteína con una proteasa altamente específica, origina de manera reproducible un conjunto de péptidos que es característico para cada una de las proteínas. Por esta razón, es posible predecir mediante una digestión *in silico* el conjunto de péptidos que se debe generar mediante el tratamiento proteolítico específico de cada una de las proteínas almacenadas en las bases de datos de secuencias y por lo tanto se puede calcular teóricamente las masas moleculares de cada uno de los péptidos esperados.

La masa molecular de cada uno de los péptidos proteolíticos se puede determinar experimentalmente mediante ESI-MS/MS y MALDI-MS. La que explicaremos detalladamente a continuación.

a) Huella peptídica (peptide mass fingerprint, PMF)

Consiste en la identificación de una proteína mediante el empleo de las masas de los péptidos obtenidos tras digestión enzimática, que generalmente se realiza con tripsina. Cada proteína puede ser inequívocamente identificada por las masas de los péptidos que la forman, y eso constituye lo que denominamos huella peptídica. Este tipo de identificación se realiza para proteínas únicas o mezclas simples de proteínas, que pueden provenir de manchas proteicas de un gel 2-DE y bandas de geles unidimensionales o fracciones de LC de baja complejidad. Una vez obtenido el espectro en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (Figura 5), se utiliza un programa informático denominado motor de búsqueda que compara el espectro obtenido con los espectros teóricos de una base de datos que contiene las digestiones teóricas de todas las

proteínas descritas, y nos da un listado de las posibles proteínas ordenadas según su mayor correlación con el espectro, lo que se corresponde con un mayor valor de significación.

b) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Actualmente se emplean en la mayoría de los casos espectrómetros de masas con dos analizadores de masas en tándem para llevar a cabo identificación de proteínas. Se llama espectrometría de masas en tándem (MS/MS) al acoplamiento de dos espectrómetros de masas unidos por una cámara que generalmente, fragmenta las moléculas. Existen dos categorías principales de espectrómetros que permiten realizar experimentos MS/MS: espectrómetros en *tándem en el espacio y en el tiempo*. La definición anterior sólo es apropiada para MS en *tándem en el espacio*, que se hablara en detalle más adelante.

Estos equipos se consideran una de las herramientas más útiles para identificar compuestos en mezclas y determinar la estructura de sustancias desconocidas se utiliza especialmente en proteómica o para eliminar interferencias en métodos cuantitativos. Estos equipos permiten realizar la medición de (m/z) de los péptidos intactos en el primer analizador de masas y, tras una fragmentación de algunos de los péptidos en una cámara de colisión por CID, la medición de las m/z de los fragmentos de los mismos en el segundo analizador de masas. Esto permite realizar la identificación de la proteína con información adicional a la realizada por huella peptídica, ya que el espectro de fragmentación de un péptido es característico de cada péptido. Este espectro de fragmentación puede incluso permitir la secuenciación total o parcial del péptido. La obtención de la secuencia de aminoácidos de un péptido, utilizando exclusivamente los datos presentes en el espectro de fragmentación se conoce como secuenciación *de novo*.

Para realizar MS/MS de mezclas poco complejas se emplean los espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF-TOF, que permiten realizar las identificaciones de proteínas con mayor fiabilidad que en un MALDI-TOF. El resto de espectrómetros de masas en tándem tienen fuentes de ionización ESI y diferentes tipos de analizadores de masas. Las configuraciones más habituales hasta la fecha son: Q3, Q-TOF, IT, Q-Q-LIT, FT y Orbitrap. Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de fragmentación como alternativa a la CID en busca de una mejor secuenciación peptídica. Existen dos nuevos

métodos basados en la transferencia de electrones de los iones presentes en la cámara de colisión denominados disociación por captura de electrones (electron capture dissociation, ECD) y disociación por transferencia de electrones (electron transfer dissociation, ETD) [53]. A continuación les describiré brevemente la estrategia utilizada para la identificación de nuevas moléculas antigénicas.

Estrategias de Cuantificación Basadas en Espectrometría de masas

Era inevitable que después que la espectrometría de masas proporcionara información necesaria de la identificación de proteínas presentes en una muestra, la siguiente pregunta que se formularía el personal de investigación fuese relacionada con la cantidad en la que estas proteínas estaban presentes en las muestras analizadas. En la actualidad este interrogante no ha sido muy fácil de contestar, ya que la mayoría de las técnicas utilizadas para la cuantificación es muy compleja de desarrollar y está en proceso de estandarización. Existen múltiples maneras que han tratado de abordar esta cuestión, tanto para la cuantificación relativa como para la cuantificación absoluta de las proteínas [56].

La finalidad de los métodos utilizados para la cuantificación de proteínas mediante la espectrometría de masas es proporcionar una determinación exacta y fiable de la cantidad de un analito en una muestra real. La aplicación de estas técnicas presenta numerosas ventajas en el análisis cuantitativo, especialmente si se utiliza acoplada con métodos de separación de alta resolución.

Para que sea posible la determinación cuantitativa de los biomarcadores es necesario obtener medidas muy exactas de pequeñas variaciones en la intensidad de la señal analítica que proporciona el biomarcador, ya que se encuentra a bajos niveles de concentración y en matrices muy complejas por lo que se requiere trabajar con el número de muestras necesario para minimizar la posible divergencia de los resultados debidos a la manipulación de la muestra y a la influencia del método analítico. Es importante señalar que cuando se trabaja con métodos analíticos cuantitativos hay que validarlos en las condiciones rutinarias en las que se va a trabajar con ellos, ello conlleva una serie de estudios para determinar los parámetros de calidad como

precisión, exactitud, límite de cuantificación, intervalo lineal, especificidad y robustez [57].

La proteómica cuantitativa se caracteriza en dos tipos: Cuantificación absoluta y cuantificación relativa. La cuantificación absoluta determina los cambios en la expresión de la proteína en términos de una cantidad o concentración exacta (por ejemplo ng o nmoles por gramos de tejido, o ng o nmoles / plasma) de cada proteína presente; mientras que la cuantificación relativa determina la tendencia de la regulación de una proteína hacia arriba o hacia abajo, en este caso los resultados se expresan como aumento o disminuciones.

La decisión de utilizar estos dos tipos de cuantificación dependerá de si es necesario encontrar valores exactos de concentración o solo las diferencias entre ellos frente a diversos estadios o tratamientos. Cabe señalar que incluso la cuantificación absoluta es relativa en relación al control estándar interno utilizado [56].

En la actualidad los métodos de cuantificación por medio de la espectrometría de masas han ganado popularidad durante los últimos cinco años. En la mayoría de estos métodos se utilizan isotopos estables de etiquetado diferencial, que tienen una etiqueta de peso específico que pueda ser reconocido por un espectrómetro de masas y al mismo tiempo que proporcionan la base para la cuantificación. Estas etiquetas pueden ser introducidos en las proteínas o péptidos por medio de diversas técnicas; metabólicamente, por medios químicos, y enzimáticamente. Por el contrario, también existen los métodos de cuantificación sin etiqueta o *“label free”*. [58]. [59].

Entre los diferentes métodos más utilizados para la cuantificación de proteínas, las técnicas de marcaje isobárico, entre ellas están el (ICAT) *“Isotope-Coded Affinity Tags”*, este tipo de marcaje se lleva a cabo después de la extracción de proteínas al igual que el (iTRAQ) *“isobaric tags for relative and absolute quantitation”*, que consiste en el etiquetado de aminas libres con un reactivo isobárico y el por último el (SILAC) *“stable isotope labeling with aminoacid in cell culture”*. Este último es un marcaje metabólico que consiste en las células que crecen en los medios de cultivos enriquecidos con amino ácidos marcados [60].

Otra técnica de cuantificación muy utilizada actualmente es la denominada cuantificación libre de marcaje o “*label Free*” debido a que no requiere ningún marcaje, lo que minimiza el número de pasos en la preparación de la muestra. Evita la posible pérdida de péptidos cuantificables, el alto coste de los reactivos de marcaje y/o la síntesis de péptidos estándar marcados isotópicamente [56].

Para poder realizar una cuantificación adecuada, es necesario un paso previo de normalización de cada elución cromatográfica. Existen dos niveles en los que se puede llevar a cabo la normalización: se puede realizar una normalización técnica dirigida a compensar los cambios producidos entre carreras debido al sistema de LC-MS o una normalización a nivel de la muestra biológica. La primera se puede realizar añadiendo una proteína o, tras la digestión, una mezcla de péptidos marcados de concentración conocida con tiempos de retención cromatográfica también conocidos, y que cubran la mayor parte del gradiente. En la segunda, una proteína cuya expresión permanezca constante en los diferentes grupos y condiciones experimentales del estudio se utiliza como estándar interno.

Una de las técnicas más utilizadas en los últimos años para realizar cuantificaciones absolutas por espectrometría de masas de diversos tipos de moléculas, incluidas las proteínas, es la denominada monitorización por reacción simple “*simple reaction monitoring*”, (SRM) y monitorización por reacción múltiple “*multiple reaction monitoring*”, (MRM), cuando se cuantifican varias moléculas a la vez. Esta técnica requiere habitualmente del empleo de un espectrómetro de masas triple cuádruplo. El primer cuádruplo del equipo, Q₁, se emplea para seleccionar un ión precursor de masa conocida. Este ión pasa al Q₂, donde es fragmentado mediante CID. Los fragmentos resultantes son analizados en el Q₃, y las transiciones precursor-fragmento se emplean para cuantificar el péptido [61].

Aplicaciones de la Proteómica en Biomedicina

La expresión y caracterización de proteínas es un tema de particular e importante interés dentro del área de la investigación clínica y básica, como se ha explicado anteriormente. Además de las implicaciones directas en el desarrollo, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. [62] [63] [64].

El término “expresión proteica” implica el control de los cambios de proteínas a nivel de concentración, que se manifiestan como resultado de una consecuencia o casualidad, a un cambio del medio externo que rodea al organismo, en una etapa de crecimiento o lo más importante, en un estado de enfermedad. Mediante la proteómica podemos identificar y validar la expresión de proteínas que se correlacionan a los diferentes estadios fisiológicos del organismo y como tal, pueden ser útiles como indicadores del estado. Las proteínas que se pueden utilizar como marcadores de un estado determinado se denominan biomarcadores.

Identificación de Biomarcadores

El descubrimiento de biomarcadores consta de dos componentes principales:

- 1) El perfil diferencial del proteoma de posibles marcadores biológicos.
- 2) La validación de las moléculas biomarcadoras en una población con número de muestras abundante.

El proceso para la identificación de moléculas biomarcadores consta de 2 fases a tener en cuenta, la podemos apreciar en la figura 1.1 (ver más adelante). En la fase (I) implica el descubrimiento de biomarcadores, cuyo objetivo es crear una lista de posibles candidatos, estos se obtienen mediante el estudio exhaustivo del perfil integral del proteoma de controles sanos y de sujetos enfermos procedentes de un número de muestras relativamente pequeño. Una vez que la lista de posibles marcadores biológicos que se obtiene en la fase (I) o inicial de análisis, las proteínas candidatas se someten a un análisis más exhaustivo y riguroso sobre una población más amplia y en un mayor

rango de condiciones como estadio de una enfermedad, el sexo, la edad, etc. En esta etapa del análisis se emplean las estrategias específicas que se centran solo en las proteínas candidatas, ignorando el resto del proteoma, siendo esta la fase final o fase (II) y de validación [65] [66]. Estas etapas se someten al proceso de validación que ralentizan todo este proceso, pero el cual es necesario para poder asegurar la veracidad de los resultados.

Detección de Biomarcadores mediante técnicas de inmunoproteómica

La electroforesis bidimensional de alta resolución combinada con “*western-blotting*” con sueros de enfermos, seguido del análisis de espectrometría de masas es una herramienta muy útil para la detección de antígenos relacionados con enfermedades neuromusculares inmunocomprometidas que inducen la formación de anticuerpos en pacientes con poliradiculopatía. Esta estrategia se puede aplicar a otras enfermedades como las alergias, en la detección de nuevas moléculas antigénicas. Las ventajas de esta técnica es el gran campo de utilización de alguno/s de los antígenos inmunodominantes para el desarrollo de un método de diagnóstico para las poliradiculopatías de manera, rápido y específico y la posibilidad de identificación de nuevas dianas para el desarrollo de tratamientos adecuados y específicos contra este nuevo antígeno.

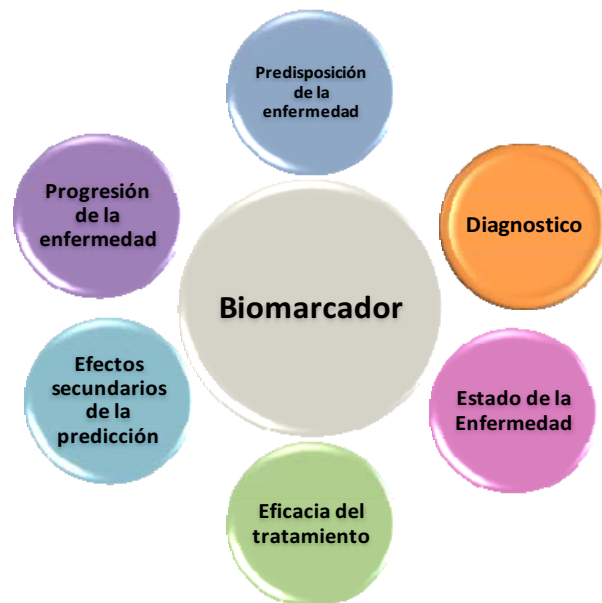


Figura 1 Esquema de la búsqueda de biomarcadores en diferentes estadios.

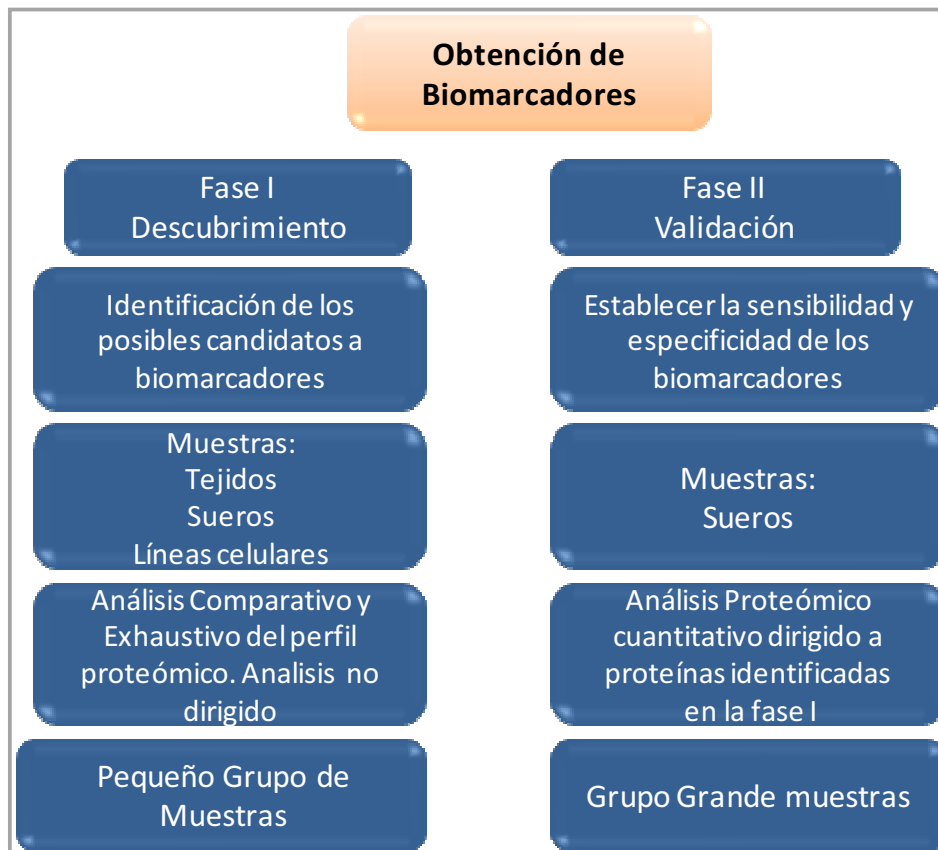


Figura 1.1 Diagrama de las fases seguidas en el descubrimiento de proteínas biomarcadores. El estadio temprano abarca un análisis exhaustivo y comparativo de células sanas y enfermas. Este estadio temprano se realiza con número reducido de muestras las cuales generan una lista de proteínas candidatas potencialmente biomarcadoras. Estas proteínas son sometidas a análisis específicos sobre un amplio número de muestras en el análisis tardío. La validación de estas proteínas constituye biomarcadores fiables para una enfermedad determinada, y se obtiene mediante un análisis estadístico de los datos de cuantificación

Flujo de trabajo en proteómica: “*Work Flow*”.

La mayoría de los esfuerzos para mejorar los métodos de análisis que se utilizan para el estudio de la expresión de proteínas encaminadas en la continua búsqueda de la realización de los objetivos de la proteómica. Para llevar a cabo estos estudios comparativos de perfiles de expresión proteica es necesario la utilización de un esquema o flujo de trabajo que nos facilite y organice el trabajo desde el inicio y nos muestre las mejores opciones para cada tipo de estudio y que determine la concentración de proteína en cada condición. Por ejemplo podemos comparar dos proteomas en condiciones diferentes por ejemplo, individuos “sanos” frente a individuos “enfermos” y el objetivo de este experimento es determinar el cambio en la expresión de proteínas entre los dos estados.

Para realizar este estudio se puede diseñar varios flujos de trabajo para llevar a cabo el objetivo principal del análisis del perfil de expresión proteica, sin embargo, en este caso aun no es claro cuál es la técnica más adecuada para el descubrimiento de proteínas candidatas de biomarcadores en diferentes condiciones patológicas. Los últimos avances técnicos y computacionales han hecho en gran medida el aumento de la identificación y cuantificación del estudio del proteoma. Las actuales estrategias utilizadas para los estudios de expresión proteica se basan en la espectrometría de masas y tienen un alto potencial para la identificación de cualquier proteína o proteoma de forma reproducible, precisa y cuantitativa. [67].

En el desarrollo de esta tesis hemos desarrollado dos flujos de trabajo para la identificación de biomarcadores de las enfermedades neuromusculares estudiadas. Hemos utilizado a la electroforesis bidimensional como herramienta básica para el desarrollo de nuestro estudio proteómico con muestras (controles sanos y pacientes enfermos). El otro flujo de trabajo utilizado para la identificación de nuevos antígenos está basado en la inmonoproteómica, mezclando la 2D-E para el fraccionamiento de proteínas seguido por la espectrometría de masas para la identificación de proteínas y la posterior validación de la proteína por técnicas de “*Elisa o Westerm blot*”

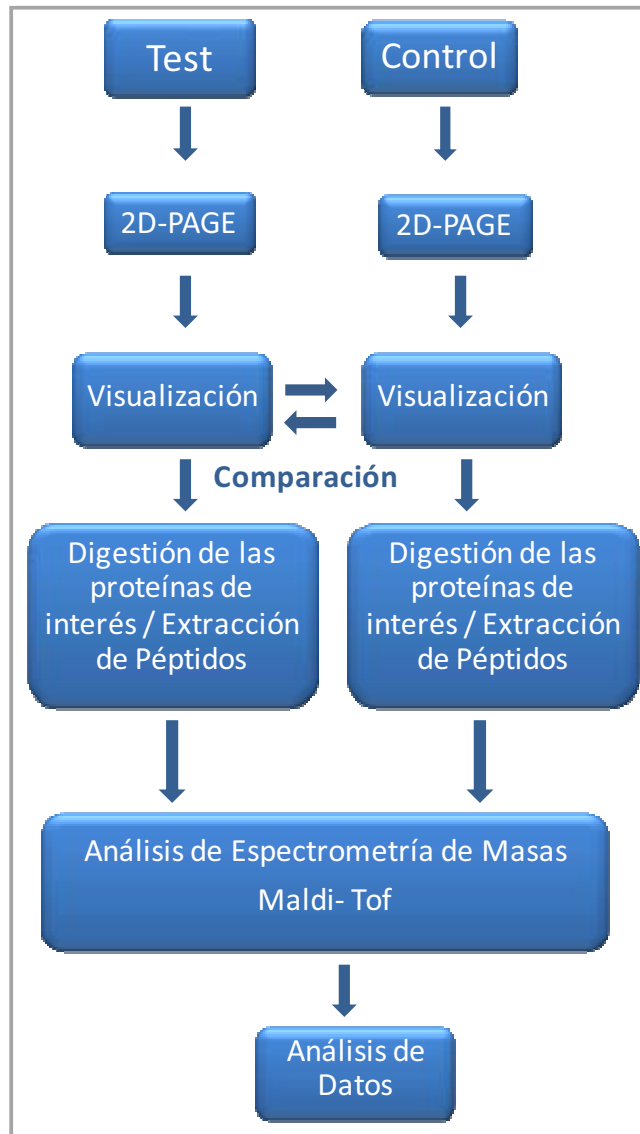


Figura (2A): Flujo de trabajo usado para el análisis de expresión de proteínas "A" y se basa en la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2DPAGE), cuyos detalles serán discutidos más adelante en el desarrollo de este trabajo. La visualización de las proteínas en el gel a través de diversos métodos de tinción se utiliza para comparar los perfiles proteicos de un control y una muestra de prueba. Las proteínas de interés son digeridas enzimáticamente y se extraen del gel para su posterior identificación con espectrometría de masas mediante técnica de "Maldi-Tof fingerprint (PMF)".

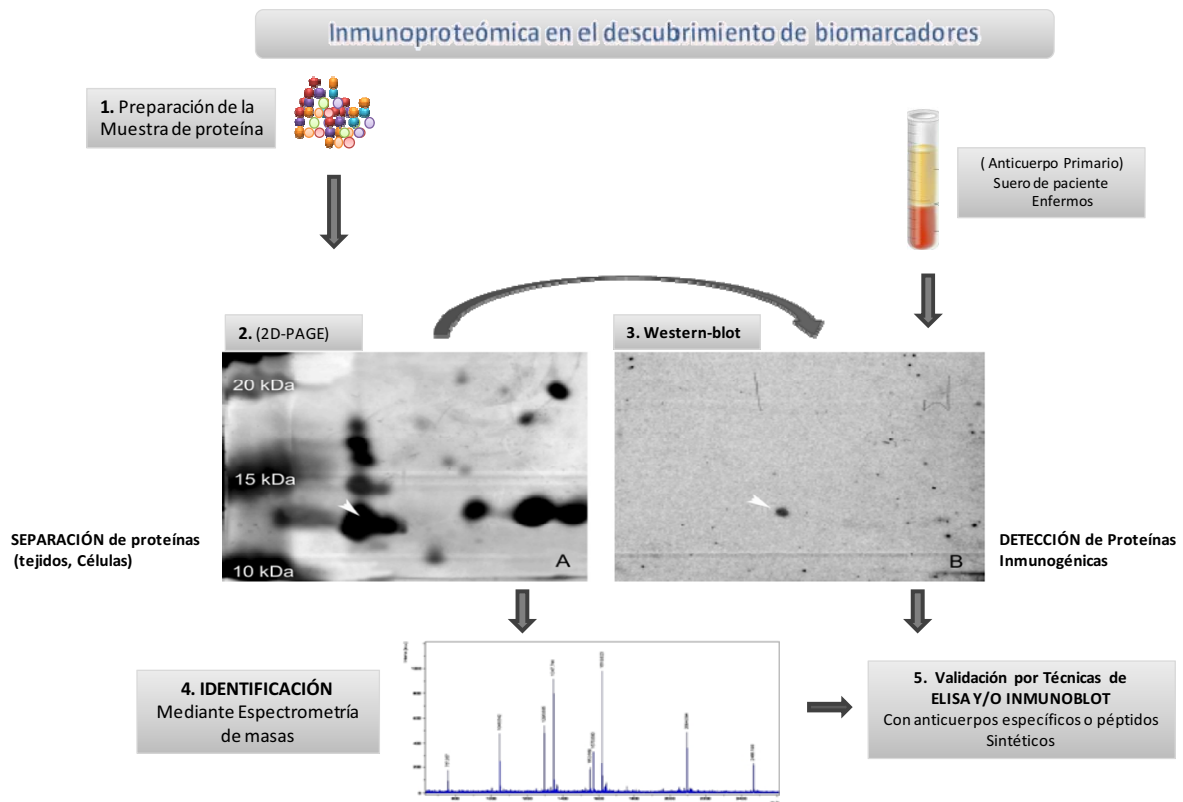


Figura: (2.B) Diagrama de flujo de la estrategia general para analizar la detección de nuevos antígenos "B", mediante técnicas de inmunoproteómica. Esta estrategia se basa en el uso de la electroforesis bidimensional 2D-E seguido de western – blotting y espectrometría de masas. Este flujo ha permitido la identificación de altos candidatos biomarcadores para producir un diagnostico precoz, pronostico, respuesta a tratamientos y/o seguimientos clínicos.

Proteómica Clínica

La proteómica clínica representa el uso de técnicas proteómicas al campo de la medicina y su aplicación ha permitido el descubrimiento de nuevos biomarcadores para el diagnóstico de enfermedades. El marco de esta tesis se desarrolla en las aplicaciones de estas técnicas, que facilitan los métodos de estudios para la identificación de moléculas dianas de las enfermedades Neuromusculares “raras” que tienen un impacto negativo en la calidad de vida del paciente. Hasta hace pocos años se desconocía la causa de estas enfermedades, razón por la cual son un grupo interesante a estudiar, para valorar e identificar todas las moléculas que participan en el desarrollo de la patología, para posteriormente identificar posibles intervenciones terapéuticas.

Enfermedades Neuromusculares

Las enfermedades neuromusculares (ENM) constituyen un grupo heterogéneo de patologías que pueden afectar desde la médula espinal, las raíces motoras y sensitivas, los nervios periféricos, la unión neuromuscular y los músculos. No existe ningún criterio específico a la hora de clasificar las enfermedades neuromusculares (ENM) ya que puede hacerse desde el punto de vista fisiopatológico, clínico o bien dar prioridad a otros conceptos como la forma de transmisión hereditaria (una clasificación exhaustiva de estas enfermedades neuromusculares ver (<http://neuromuscular.wustl.edu/>)). En la actualidad y gracias a los avances en genética molecular se tiende a una clasificación basada en los genes que presentan mutaciones.

El diagnóstico de estas enfermedades se basa en la exploración clínica, estudios neurofisiológicos, resonancia magnética nuclear (RMN) biopsia muscular o de nervio con la aplicación de distintas técnicas (inmunohistoquímica, Western-Blot, etc.), análisis metabólicos, determinación de autoanticuerpos en suero o líquido cefalorraquídeo. Su etiología es diversa e incluye desde enfermedades neurodegenerativas, hereditarias, metabólicas, inmunológicas y tóxicas. No existen en nuestro país más que algunos estudios epidemiológicos, de los que se derivaría que la prevalencia de patología crónica neurodegenerativa y /o hereditaria se situaría en unos

40.000 pacientes en el estado español (Guía de Enfermedades Neuromusculares, Federación española de Enfermedades Neuromusculares (ASEM)).

Las enfermedades Neuromusculares (ENM) constituyen un grave problema sanitario y social porque en un elevado porcentaje de casos producen invalidez por debilidad muscular progresiva y crónica. Estas enfermedades afectan tanto a personas adultas y ancianos como a jóvenes y niños y además de su efecto personal y familiar devastador tienen un elevadísimo coste económico. Algunas son poco frecuentes, como la Esclerosis Lateral Amiotrófica. Otras, como la Miastenia Gravis consideradas clásicamente como de afectación en jóvenes, han demostrado ser, con el envejecimiento de la población, mucho más frecuentes en los ancianos [68], lo que indica la necesidad de su identificación.

En esta tesis doctoral hemos utilizado técnicas de proteómica para abordar preguntas biológicas que incluyen distintos aspectos de la patogenia y respuesta al tratamiento de algunas de estas ENM. A continuación se realizara una breve descripción de las ENM que se han estudiado.

Neuropatías adquiridas disímunes

Estas enfermedades del sistema nervioso periférico constituyen un grupo heterogéneo, tanto desde el punto de vista clínico como muy probablemente fisiopatogénico, que engloba diferentes entidades. Su etiología es desconocida, aunque existen datos que sugieren una implicación de mecanismos de autoinmunidad, humoral y celular.

La hipótesis de una patogenia inmunomediada se basa en la idea de que el sistema inmune reconoce, de forma aberrante, antígenos propios como extraños. En el caso de las neuropatías disímunes esta respuesta va dirigida frente a diferentes antígenos del propio sistema nervioso periférico.

Se ha descrito la reactividad contra las proteínas P0, P2 y PMP22 de la mielina [69-70] la glicoproteína asociada de la mielina (MAG) [71] o, con mayor frecuencia, frente a distintas especificidades de gangliósidos [72]. La hipótesis se sustenta, además, en abundantes datos experimentales, *in vivo* e *in vitro*, utilizando tanto anticuerpos de

pacientes como modelos animales y lo más importante, en pacientes responden favorablemente a terapias inmunomoduladoras.

Las neuropatías adquiridas disímunes se han clasificado con relación al patrón de presentación clínica y las estructuras diana implicadas. En la práctica clínica, el diagnóstico se establece sobre la base de una caracterización fenotípica detallada y el patrón de alteraciones electrofisiológicas, que permite definir de manera más precisa las estructuras diana implicadas y el tipo de lesión

Desde un punto de vista clínico es útil su sistematización con respecto al tipo de afección funcional (motora, sensitiva, autonómica), la distribución del déficit (simétrico/asimétrico, proximal/distal, afección predominante de extremidades superiores o inferiores) y el curso temporal (agudo, subagudo o crónico).

Las posibles dianas implicadas en el proceso patogénico (mielina/axón/cuerpo neuronal) y el mecanismo de la lesión pueden ser definidas por el patrón electrofisiológico. El patrón de reactividad de autoanticuerpos en suero puede ser utilizado, en determinados casos, como una característica adicional para su definición. La presencia de autoanticuerpos dirigidos contra especificidades antigénicas definidas ha permitido establecer correlaciones clínico-inmunológicas precisas en determinados casos.

Una vez se ha llegado a un diagnóstico preciso que ha de permitir establecer una terapéutica inmunomoduladora o inmunosupresora, generalmente eficaz, el número de pacientes a los que es posible encontrar un patrón específico de reactividad inmunológica es bajo, especialmente en pacientes con neuropatía disímune crónica.

En esta tesis se ha utilizado la electroforesis bidimensional combinada con la técnica de Western-Blot como herramienta de cribaje de autoanticuerpos contra nuevas especificidades antigénicas en pacientes con polirradiculopatía crónica sensitivo-motora con banda monoclonal.

Distrofias musculares

Las distrofias musculares se definen como miopatías progresivas en las que la biopsia muscular muestra una sustitución de las fibras musculares por tejido conectivo y adiposo. El inicio de la enfermedad puede ser congénito o en la edad adulta.

Clásicamente, las distrofias musculares se han clasificado según la edad de inicio, el modo de herencia y el patrón de debilidad o según el patrón de músculos afectados. Así tendríamos las distrofias de cinturas, la distrofia facioescapulohumeral, la distrofia muscular oculofaríngea, las miopatías distales o la distrofia escapulo-peroneal. El patrón de herencia puede ser dominante, recesivo o ligado al X.

Las distrofias musculares pueden ser causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas del sarcolema, la membrana basal, sarcómero, proteínas estructurales del núcleo o enzimas. Algunas afectan el splicing de mRNA (ej. Distrofias miotónicas) y en otras el mecanismo no es del todo conocido (ej. Distrofia facioescapulohumeral o FSHD).

La electrofisiología y el examen histológico rutinario de la biopsia muscular normalmente no son suficientes para distinguir entre los distintos tipos de distrofia muscular. De hecho, aunque la exploración clínica es básica, para poder llegar al diagnóstico final es necesaria la RMN muscular, la biopsia muscular (histoquímica, inmunohistoquímica y Western-blot con anticuerpos específicos) y el estudio molecular del gen candidato [73]

LGMD2A

Antes de la clonación de CAPN3 o calpaína 3 [74], el gen que causa la distrofia de cinturas 2A (LGMD2A), todos los genes descritos responsables de las distrofias musculares con debilidad de cinturas correspondían a proteínas estructurales expresadas en el sarcolema. Esta familia de proteínas, el complejo distrofina-sarcoglicano (DSC), proporciona un vínculo entre el sarcoplasma, la membrana y la matriz extracelular del músculo que es estabilizado durante la contracción. En la mayoría de los casos, la LGMD2A comienza en la cintura pélvica, con problemas para correr, subir escaleras o levantarse de una silla. Los músculos de las extremidades inferiores son los más gravemente afectados, incluso en los pocos casos en los que la enfermedad se inició en la cintura escapular o ambos simultáneamente. Los aductores de la cadera y el glúteo

mayor son los primeros músculos afectados clínicamente y en menor grado, los flexores de la cadera y los músculos isquiotibiales también están involucrados. Los músculos faciales no se encuentran afectados lo que ayuda a distinguir la LGMD 2A de la FSHD.

La familia de proteínas estructurales, también denominada complejo distrofina/sarcoglicanos, proporciona un vínculo entre el sarcoplasma, y la matriz extracelular para estabilizar la membrana del músculo durante la contracción. Sin embargo, la calpaína-3 es una proteasa no lisosomal dependiente de Ca^{2+} y esto plantea la cuestión de cuál podría ser su función en el músculo esquelético. Hasta la fecha se han descrito más de 300 mutaciones patogénicas diferentes en todo el mundo, distribuidas a lo largo del gen. Se ha descrito que los pacientes con una mutación sin sentido desarrollan un fenotipo más leve que aquellos que llevan una mutación nula. Sin embargo, la cantidad de proteína no se correlaciona con la aparición de la enfermedad. Se ha propuesto un modelo molecular en el que calpaína-3 y disferlina junto con la caveolina-3 y las anexinas I y II formarían un complejo con un papel importante en la reparación del sarcolema [75]

Disferlinopatías

Las disferlinopatías incluyen una serie de fenotipos clínicos de inicio en la tercera década de la vida que comparten la presencia de mutaciones en el gen *DYSF* y, en consecuencia la ausencia o severa reducción de la proteína disferlina. El fenotipo clínico va desde la forma distal posterior descrita por Miyoshi, una forma de inicio en el compartimento distal anterior, una forma de debilidad de cinturas (LGMD2B) o una forma próximo-distal. Asimismo se han descrito casos de inicio muy tardío, formas congénitas o la existencia de portadores sintomáticos. El gen fue clonado en 1998 y desde entonces se ha hecho un gran esfuerzo para entender la función de esta proteína y el efecto de su ausencia en la distrofia muscular [76]. Como ocurre con la calpaína-3, el estudio detallado de la proteína disferlina mostró que ésta tampoco forma parte del DSC.

La disferlina parece tener un papel importante en el sellado de la membrana de la célula muscular tras una lesión [77], aunque podría tener otras funciones como por ejemplo a nivel de diferenciación muscular [78]. Esta proteína también se expresa en monocitos de sangre periférica [79] y se ha reportado que su ausencia en estas células provoca una

fagocitosis aumentada que podría tener también un papel en la progresión de la enfermedad [80].

Los niveles séricos de CK son significativamente elevados en estos pacientes y, de hecho, esta es una de las características de la enfermedad en la que éstos suelen llegar a > 10 , el límite superior de los valores normales [81]. Esta observación se debe probablemente al hecho de que la membrana del músculo no se repara correctamente tras la lesión y la CK se libera al medio.

A nivel de resonancia magnética (RMN) muscular, en pacientes con distrofia muscular de cinturas 2B (LGMD2B) se ha demostrado mediante estudios de proteómica un cambio de tipo de fibra de rápido a lento, un cambio de perfil de expresión proteica de proteínas relacionados con el metabolismo oxidativo y la remodelación muscular [82].

Distrofia facioescapulohumeral (FSHD)

La FSHD es la tercera distrofia muscular más común. Su nombre viene dado por la afectación característica de los músculos de la cara y de la zona proximal de las extremidades superiores. Las escapulas aladas son aparentes al mover los brazos hacia adelante. El deltoides está característicamente conservado en los estadios iniciales, y relativamente conservado respecto a otros músculos del hombro con la progresión de la enfermedad. La patogenia de la enfermedad a nivel molecular no se conoce con exactitud aunque parece que está causada por la delección de un subgrupo de unidades repetidas de la secuencia microsatélite D4Z4 en el subtelómero del cromosoma 4q. Estudios recientes aportan evidencias de que el gen DUX4, insertado por retrotransposición en la repetición D4Z4, se expresa en la línea germinal humana y que después es silenciado epigenéticamente en los tejidos somáticos. En la FSHD, la combinación de un silenciamiento ineficiente de la cromatina en la repetición D4Z4 y polimorfismos en los alelos permisivos de FSHD que estabilizan los mRNAs provenientes de la repetición, resultan en una expresión inapropiada de la proteína DUX4 en células musculares. La FSHD es por tanto el primer ejemplo de una enfermedad humana causada por la represión ineficiente de un retrotransposon situado en una zona de repeticiones en un microsatélite [83].

Inflamación en las distrofias musculares

Algunas distrofias musculares presentan infiltrados inflamatorios en la biopsia muscular. Entre éstas se encuentran las disferlinopatías [84], [85]. De hecho algunos pacientes son diagnosticados erróneamente de polimiositis. Además, los modelos murinos de disferlinopatía también presentan infiltrados inflamatorios [86]. También se ha descrito la presencia de inflamación en otras distrofias musculares tales como la FSHD o la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Por ejemplo, en la biopsia muscular de pacientes con FSHD se ha observado un número elevado de linfocitos B, una ratio elevada CD4/CD8 ratios en fibras necróticas e infiltrados perivasculares [87]. En pacientes con DMD, el estudio de la inflamación en músculo esquelético mostró que las células T se encontraban predominantemente en fibras necróticas y en algunas no necróticas de forma aislada [88]. Los pacientes con distrofia de cinturas tipo 2A pueden presentar infiltrados eosinofílicos en el músculo esquelético en la primera década de la vida [89]. Sin embargo, en las biopsias musculares de pacientes adultos ya no se observa inflamación.

Escleromixedema

El escleromixedema es una enfermedad caracterizada por una mucinosis dérmica primaria, proliferación de fibroblastos de la piel que se asocia frecuentemente a una gammapatía monoclonal. Hay numerosas manifestaciones sistémicas que incluyen afectación gastrointestinal, pulmonar o enfermedades neurológicas que conllevan un diagnóstico desfavorable [90]. La asociación de miopatías con escleromixedema se ha reportado previamente [91] [92]. La respuesta a distintos tratamientos sistémicos con agentes inmunosupresores y quimioterapia ha sido variable [90]. El melfalán se ha demostrado eficaz aunque una terapia prolongada puede tener efectos tóxicos [93]. El trasplante autólogo de células madre (TACM) después del tratamiento con dosis altas de melfalán se mostró efectivo en tres estudios previos aunque aproximadamente dos tercios de los pacientes presentaron brotes y tuvieron que ser tratados de nuevo [94] [95] [96].

Proteómica en las enfermedades Neuromusculares

Proteoma del Músculo

El músculo es el tejido más abundante del cuerpo humano es extremadamente heterogéneo y tiene una estructura contráctil integrada por varias proporciones de miosinas con cadenas ligeras y pesadas, lentas tipo 1 y rápidas tipo 2 (2A, 2X), actinas, complejos tropomiosinas, y troponina, y también proteínas metabólicas (enzimas que en muchos casos participan en los procesos implicados en la activación del acoplamiento transcripcional). El músculo se caracteriza por su amplia plasticidad, es decir, por la capacidad para ajustar el tamaño y las propiedades funcionales en respuesta a influencias endógenas y exógenas. Durante la última década, la proteómica se ha convertido en una técnica fundamental para la evaluación del tejido muscular a nivel molecular y la investigación de sus cambios funcionales [97-100].

Después de trabajos pioneros como el de Giometti y Anderson, sobre el proteoma del músculo humano, que también incluían modificaciones post traduccionales, la investigación en este campo se reanudó con un estudio de 2D-E en el que detectaron aproximadamente 500 puntos de proteínas pertenecientes al músculo vasto lateral de un grupo de sujetos sanos de Asia, de los cuales 124 puntos fueron identificados por MALDI-TOF MS y HPLC-ESI-MS/MS. Entre las proteínas identificadas encontraron proteínas miofibrilares y proteínas contráctiles, incluyendo la miosina isoforma 1 y 2 de la cadena ligera, actina, tropomiosin alpha y la troponina I y tres isoformas de la mioglobina, junto con un gran número de las enzimas implicadas en el metabolismo glucolítico y aeróbico.

De este trabajo se desprende que la amplia distribución de las proteínas detectadas por técnicas de 2D-E, puede ser enmascarada debido al alto rango dinámico del tejido muscular, debido a la presencia de proteínas muy abundantes (miosinas, actinas, tropomiosinas, etc.) que dificultan la detección de proteínas minoritarias. Por ellos es necesario realizar una etapa previa de fraccionamiento de las muestras que ayude a la identificación de estas proteínas. De hecho la distribución de las proteínas contráctiles en los mapas de 2D-E no fue homogénea, ya que se encontraron más en un rango de pH

ácido, mientras que un gran número de proteínas reguladoras se encuentran en la región alcalina del gel. Por otra parte a pesar del alto poder de separación de la técnica bidimensional, un gran número de proteínas contráctiles se caracterizan por su alto peso molecular (por ejemplo la titina, nebulina, MHC), moléculas hidrofóbicas y proteínas con un pI muy alcalino que son todas ellas difíciles de separar. Por el contrario, la tecnología de 2D-E presenta algunas ventajas para el análisis proteómico muscular, sobre todo por la capacidad de separación de las isoformas de las proteínas, que en muchos casos son importantes para comprender el funcionamiento del músculo esquelético. A la hora de analizar el proteoma del músculo esquelético hay dos puntos importantes a tener en cuenta:

1. La alta variabilidad en la composición de tejido (intra e interindividual, dentro de los músculos y las fibras).
2. La plasticidad del tejido muscular que puede influir en la reproducibilidad de la mayoría de los resultados experimentales.

Inicialmente la mayoría de los estudios de caracterización e identificación de proteínas musculares se llevó a cabo mediante técnicas de 2D-E. Debido a las limitaciones de esta técnica ha sido necesario combinar otras tecnologías alternativas, para ofrecer una visión global del proteoma del músculo. La combinación de HPLC y la espectrometría de masas han facilitado la caracterización de las proteínas del tejido muscular. En principio, esta tecnología puede superar las limitaciones impuestas por electroforesis la 2D-E. De hecho, la cromatografía líquida multidimensional acoplada a la espectrometría de masas es capaz de trabajar con el rango dinámico del proteoma del músculo. Además de la mejora en los equipos de HPLC y espectrometría de masas, la aparición y estandarización de nuevos protocolos para mejorar la extracción de proteína específicos para cada tipo de muestra (nuevos detergentes, técnicas de depleción de proteínas abundantes, técnicas de fraccionamiento de proteínas en muestras complejas, etc.) también favorecen la obtención de mejores resultados.

La principal desventaja de este método de análisis es que no visualizamos casi todas las isoformas de una proteína específica. En el año 2008, Hojlund et al. analizó el músculo humano vasto lateral mediante la combinación de técnicas de fraccionamiento previas a la digestión de proteínas, utilizando la técnica de electroforesis unidimensional obteniendo (20 a 24 bandas de gel) que posteriormente fueron digeridas con tripsina y

seguidamente por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-ESI MS / MS). Este esquema de trabajo se realizó en tres individuos sanos y permitió la identificación de un total de 954 proteínas diferentes que comprenden un gran número de moléculas contráctiles y la mayoría de las enzimas implicadas en las principales vías del metabolismo de la glucosa, los lípidos y una gran proporción de las enzimas mitocondriales. Sin embargo, sólo 446 moléculas eran comunes a todos los sujetos investigados, lo que confirma la gran variabilidad entre individuos que hemos mencionado anteriormente. La tasa de reproducibilidad de dos réplicas realizadas en la misma muestra era del 75%. Además, teniendo en cuenta que sólo las tres isoformas principales del MHC ya representaban el 42% del total de espectros, esta gran proporción probablemente dificultaba la identificación de proteínas menos abundantes que migraban al mismo peso molecular en el gel [101].

Una revisión de los estudios de proteómica en músculo realizados hasta el momento muestra una serie de resultados comunes: 1) enzimas involucradas en diferentes procesos biológicos y metabólicos, entre ellos enzimas relacionadas con la síntesis de ATP, con las vías glicolíticas, vías de metabolismo de ácido cítrico, en el transporte de ácidos grasos, metabolismo lipídico, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, 2) la homeostasis del calcio, 3) el aparato miofibrilar y 4) diferentes modificaciones postraduccionales como oxidación y fosforilación oxidativa. Curiosamente, las proteínas se agrupan en las principales vías conocidas que se encargan de la regulación de la homeostasis muscular, proporcionando una visión global funcional del proteoma del músculo [100].

Recientemente, en un estudio en el que los autores se plantearon analizar el proteoma de músculo esquelético de pacientes con miositis por cuerpos de inclusión (MCI) versus controles y se identificaron 2000 proteínas. Entre ellas, una lista de candidatos para las principales componentes estructurales del sarcómero. Muchas de ellas ya habían sido descritas en el trabajo de Hojlund ya mencionado anteriormente. [101]. En este trabajo, se compararon dos distintas tecnologías, por una parte el fraccionamiento de proteínas mediante geles de SDS seguido por la digestión de péptidos y por otra la separación de péptidos de 2D. Al parecer, el primero es más eficiente en términos de identificación de las proteínas que el segundo. De hecho, las proteínas del sarcómero se pierden en la separación 2D en la que el rango dinámico de la muestra es mayor de lo permitido por el espectrómetro de masas. Por el contrario, en la digestión de muestras a partir de geles SDS, las proteínas más abundantes se limitan a 2 o 3 bandas, lo cual aumenta la

detectabilidad de las proteínas menos abundantes. El trabajo presenta algunos puntos débiles. No se especifican los datos de los pacientes utilizados (patología, tiempo de progresión de la enfermedad, etc.). Tampoco se indica el músculo biopsiado, dato relevante ya que en nuestro laboratorio (manuscrito en preparación) hemos observado diferencias importantes en el perfil de proteínas específico para cada músculo. Por esta razón es importante utilizar el mismo músculo en todas las muestras para dar mayor robustez a los resultados. [102].

Estudio proteómico de las modificaciones postraduccionales en el músculo esquelético.

La fosforilación es un mecanismo de control clave para la regulación de la actividad de las enzimas y además juega un papel crucial en las vías de transducción de señales que regulan el metabolismo energético, el acoplamiento excitación-contracción, la función del sarcómero, el músculo balance de masa y la distribución del tipo de fibra en relación con esfuerzos mecánicos, los factores inflamatorios y las hormonas. Los cambios en el perfil de expresión de estas modificaciones postraduccionales representarían un problema importante que hay que afrontar en los estudios proteómicos sistemáticos y funcionales [103] [104] [105].

Se han realizado una serie de ensayos de fosforilación basados en hipótesis, de proteínas específicas que están presentes a lo largo de las vías de señalización; donde los anticuerpos reconocen fosfo-epítipo que estaban disponibles. Además, se realizó un enriquecimiento con Dióxido de Titanio (TiO₂), para valorar el fosfoproteoma y evaluar los péptidos fosforilados por (HPLC-ESI) MS / MS de músculos de voluntarios sanos [106]. En total, los autores identificaron 367 sitios de fosforilación (fosfo-tirosina, fosfo-serina, fosfo-treonina) en 144 de las proteínas en por lo menos 2 de cada 3 sujetos, Como resultado, después del enriquecimiento de fosfopéptido, ~ 35% de las proteínas identificadas eran fosfoproteínas. La mayoría de las fosfoproteínas detectadas estaban involucradas en la función del sarcómero, el acoplamiento excitación-contracción (Ca²⁺-ciclo), la glucólisis y el metabolismo del glucógeno.

De particular interés, se identificaron varios sitios de fosforilación en varias proteínas del sarcómero y Z-disco de las que se ha reportado su papel en la señalización y

trastornos musculares. Estos resultados facilitan posibles objetivos para la investigación de las vías de señalización dependientes de fosforilación en el músculo esquelético humano en condiciones fisiológicas y patológicas. En cualquier caso, es necesario profundizar más en estos estudios para comprender plenamente el significado funcional de estas modificaciones.

Perfil Proteómico Mitocondrial en el Músculo Esquelético

En un estudio novedoso realizado en el músculo esquelético de voluntarios sanos se reportó el primer perfil proteómico de las mitocondrias. Este análisis se realizó mediante la purificación de la fracción mitocondrial en el músculo esquelético y el posterior fraccionamiento de la muestra mediante el uso de la electroforesis de una sola dimensión, seguido por HPLC-ESI-MS/MS. En total se identificaron 823 proteínas, de las cuales, 388 podrían ser caracterizadas como proteínas mitocondriales utilizando “*Gene Ontology*” (GO), otras 99 fueron identificadas como proteínas mitocondriales según otra base de datos obteniendo un total de 487 (59% de proteínas detectadas) como proteínas mitocondriales [107] [108]. Estos resultados pueden ser de utilidad a la hora de establecer las bases fisiopatológicas de pacientes con enfermedades de probable alteración mitocondrial de los que no se ha podido identificar la base molecular.

Antecedentes de la proteómica en Enfermedades Neuromusculares

Los trastornos que afectan la función muscular consisten principalmente en un grupo de enfermedades raras con fenotipos heterogéneos, los llamados trastornos neuromusculares hereditarios (NMD), que han sido estudiados intensamente, tanto a nivel genético como fisiopatológico. Otras enfermedades que afectan la función muscular son la consecuencia de trastornos en los que el daño muscular no es consecuencia de trastornos inmunológicos o metabólicos tipo diabetes. Para poder monitorizar los posibles beneficios de una intervención terapéutica, es importante disponer de marcadores tanto clínicos sino también moleculares (inmunohistoquímica, “*Western-Blot*”, actividad enzimática, etc). Los que están disponibles en la actualidad no siempre son lo suficientemente sensibles como para detectar pequeños cambios en la progresión de la enfermedad. La proteómica, podría mejorar el diagnóstico y el

seguimiento de estas patologías mediante el control del nivel de marcadores específicos, de una forma más precisa. El desarrollo de modelos animales modificados genéticamente puede contribuir significativamente a la definición de algunos mecanismos fisiopatológicos de enfermedades neuromusculares, en particular del papel de los eventos secundarios que conducen a la debilidad muscular y la muerte prematura. Ambas herramientas utilizadas en el análisis de la enfermedad primaria o progresiva de los músculos, en diferentes etapas de su evolución, se está convirtiendo en un hecho factible. Esto evita algunos de los sesgos derivados de la variabilidad interindividual y de la disponibilidad de la muestra. [109].

Los modelos animales, pueden proporcionar biomarcadores fiables ocasionados por eventos secundarios que podrían ser con suerte aplicados al estudio de enfermedades neuromusculares. Estos modelos permiten tener un conocimiento definido a nivel genético y son fáciles al permitir ajustar variables como edad, sexo y controlar parámetros nutricionales y ambientales.

La correlación de los estudios realizados en modelos animales con muestras de pacientes. Permitiría identificar moléculas importantes que podrían ser útiles como candidatos a biomarcadores para el diagnóstico y la monitorización de terapias. En una última fase de este proceso estos candidatos deben ser validados en series amplias de pacientes.

Análisis proteómico en las Disferlinopatías

Para aclarar la fisiopatología de esta enfermedad neuromuscular, que afecta la integridad de la membrana del sarcolema, como ya hemos descrito anteriormente, se realizó el análisis proteómico diferencial de los músculos cuádriceps, en pacientes afectados por una disferlinopatía y en individuos sanos o sujetos control. Los autores mostraron que en los músculos de los pacientes afectados con disferlinopatía se observa un cambio en el tipo de fibra muscular de rápido a lento [82]. Este resultado no se correlacionó con la progresión de la enfermedad ni se describió un posible mecanismo que explicara este fenómeno.

También identificaron varias proteínas relacionadas con síntesis y plegamiento de proteínas, que se encontraban aumentadas en los pacientes con déficit de disferlina. Los

autores sugerían que estarían relacionadas con un aumento de la síntesis de proteínas necesaria para la regeneración del músculo [110]. En este mismo sentido, también observaron una desregulación de la cadena respiratoria, mientras que, las enzimas glicolíticas: α -enolasa y fosfogliceromutasa estaban disminuidas en estos pacientes. Este resultado apoyaría un sesgo hacia el metabolismo aeróbico.

Este trabajo en el que se estudió el mismo músculo (cuádriceps) en todos los pacientes, lo que es importante para evitar la variabilidad inherente a distintos músculos, no se tuvieron en cuenta otras distrofias musculares que eliminarían los cambios a nivel de expresión proteica comunes a procesos distrófico en general y no específicos de las disferlinopatías.

Análisis proteómico en la distrofia de FSH

Como ya se ha descrito anteriormente, a diferencia de lo que ocurre en otras distrofias musculares en las que el mecanismo molecular está bien definido, en la FSHD el defecto de esta patología no solo se vincula con una mutación en un procedimiento específico [111] [112].

Recientemente se ha publicado un estudio comparativo de expresión proteica con los músculos esqueléticos implicados en FSHD de controles sanos, músculos de pacientes con distrofia facioescapulohumeral (FSH) y músculos de pacientes afectados por la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Los autores observaron un aumento en la expresión de proteínas implicadas en la función mitocondrial y la protección contra el estrés oxidativo en pacientes con FSHD. Estos cambios fueron reproducibles y específicos para las biopsias musculares de todos los pacientes con FSHD, incluyendo los músculos clínicamente afectados [113].

Sin embargo, en otro estudio realizado utilizando la combinación de análisis proteómicos, de transcripción y de bioinformática en pacientes con FSHD, los autores sugieren que los defectos moleculares en las repeticiones en tándem en D4Z4 altera la expresión de genes, como MyoD, que participan activamente en la diferenciación y la regeneración, lo que produce un aumento de especies reactivas del oxígeno [114]. Los anteriores resultados sugieren que los factores decisivos en la progresión de la enfermedad podrían ser causados por las proteínas dependientes del factor de

transcripción MyoD y la diferenciación celular. Los resultados proteómicos indica que los reguladores del ciclo celular están reducidos, entre estos últimos, el producto génico (NEDD8). Siendo esta última una ubiquitina, que se modifica después de la traducción celular y se une covalentemente a la culina (Cul) que a su vez aumenta la actividad de ubiquitinación y desempeña un papel central en la diferenciación celular a través de los procesos de degradación de los reguladores del ciclo celular [115] y otra molécula que participa en la maduración de la ciclina es la “*Heat Shock Protein70*” (Hsp70) [116].

En estos trabajos no se tuvo en cuenta que la muestra se obtuviera del mismo músculo en todas las patologías estudiadas para dar mayor validez a los resultados obtenidos. EN uno de ellos [114] la distrofia estudiada (FSHD) no se compara con otras distrofias por lo que algunos de los datos no se pueden considerar específicos para esta distrofia. Por otra parte no se aportan datos sobre el tiempo de progresión de la enfermedad y la discusión de los resultados obtenidos en términos de proponer mecanismos patogénicos son escasos y se limitan a aportaciones básicamente descriptivas.

5. Objetivos

Objetivo principal: El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio del perfil de expresión proteico en las enfermedades neuromusculares estudiadas, la evaluación de las proteínas alteradas en estas enfermedades. Así como también la identificación de posibles nuevos biomarcadores específicos en ellas.

De este objetivo principal se derivan los siguientes objetivos:

1. Analizar el perfil de expresión proteica mediante electroforesis bidimensional de los fibroblastos de un paciente con escleromixedema antes y después del tratamiento con trasplante de médula ósea.
2. Evaluar la utilidad de la electroforesis dimensional combinada con técnica de “*Western-blot*” para detectar nuevos autoanticuerpos en pacientes con neuropatías de posible etiología inmunomediada.
3. Estudio comparativo del perfil de expresión proteica de músculo esquelético de pacientes con distintas distrofias musculares como herramienta para identificar proteínas diferencialmente expresadas específicas para cada una de ellas.

6. Informe del director de tesis del factor de impacto de los artículos publicados

El primer artículo de esta tesis se publicó en la revista *Blood*. Esta revista tiene un índice de impacto de 10,37 en el 2006 y en la actualidad tiene un impacto 10,55. Esta revista pertenece al primer decil del área de hematología.

El segundo artículo se publicó en la revista *Muscle and Nerve*. El impacto de la revista en 2008 era 2,73. En la actualidad es de 2,45 y pertenece al segundo cuartil del área de neurología.

El tercer artículo se publicó en *Proteomics Clinical Applications*. Esta revista es de muy reciente creación (2008) y no fue incluida en el ISI hasta 2010. Hasta ese momento sólo aparecían en PubMed aquellos trabajos de esta revista financiados por el National Institutes of Health (NIH). Aún así su impacto en 2009 era ya de 1,87 y en la actualidad (2010) se mantiene en 1,81. Estos datos indican no sólo el interés de la comunidad científica por esta revista que ya ha alcanzado casi 2 puntos en menos de tres años a través de las citas, sino también la calidad de los trabajos publicados, entre ellos el que se presenta en esta memoria.

7. Discusión de resultados

A continuación se realiza un breve resumen de los estudios que componen este trabajo, incluyendo la discusión global de los resultados obtenidos para cada uno de los estudios. Las versiones originales de los trabajos publicados se encuentran adjuntas en capítulos posteriores, siguiendo los requerimientos de la universidad.

Resumen de Resultados

Artículo I: “Steady Remission of Scleromyxedema Three Years After Autologous Stem Cell Transplantation: An In Vivo and In Vitro Study”. Blood 2006 (108): 773-774

Isabel Illa, Carolina de la Torre, Ricardo Rojas-Garcia, Antoni Altes, Rafael Blesa, Jordi Sierra, and Eduard Gallardo

El análisis proteómico de los fibroblastos de pacientes con escleromixedema antes y después de un trasplante de médula ósea puede ser útil para conocer mejor la patogenia de la enfermedad.

Se estudio un paciente varón de 66 años de edad fue remitido a nuestra unidad en Junio/02 por una debilidad muscular proximal de 6 meses de evolución rápidamente progresiva y con disfagia grave. El paciente presentaba un endurecimiento de la piel especialmente grave en los dedos, alrededor de la boca y la glabella. La inmunoelectroforesis del suero mostró un pico monoclonal IgG lambda. La biopsia de piel mostró proliferación de fibroblastos y aumento de los depósitos de mucina dérmica. El paciente fue diagnosticado de escleromixedema con compromiso sistémico.

En octubre de 2002, el paciente fue considerado para trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) porque no respondía al tratamiento consistente en esteroides, IgIV y quimioterapia con fludarabina más retinoide. Además, había perdido 10 kg de

peso por la severa disfagia que limitaba su dieta exclusivamente a líquidos. La movilización de HSC consistió en la administración de $10 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{células}$ madres (SC) de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Posteriormente, estos HSC fueron recolectados con una máquina de aféresis y criopreservados sin células T utilizando los métodos estándar. El régimen de acondicionamiento para el trasplante consistió en el régimen HAZ clásico de 6 días.

Las visitas de seguimiento mostraron una recuperación progresiva del estado funcional. Seis meses después del trasplante, la fuerza muscular y los recuentos hematológicos eran normales, y lo siguen siendo en la actualidad. El paciente refirió mejoras significativas en la disfagia y fue capaz de tragar normalmente ocho meses después del trasplante de médula ósea (TMO). Las lesiones de la piel y la rigidez desaparecieron y el aspirado de médula ósea fue negativo para la infiltración de células tumorales.

Es de destacar que el inmunofenotipo de sangre periférica y de la médula no evidenció células B clonales. Curiosamente, aunque la proteína monoclonal había disminuido en los análisis de sangre de hasta tres años después del TMO, seguía siendo detectable. En los tres trabajos previos en los que se reporta un trasplante de médula ósea en pacientes con escleromixedema (4-6), la mayoría de los pacientes respondió satisfactoriamente al melfalán como régimen de acondicionamiento seguido de TMO, aunque en varios casos, hubo recaídas y los pacientes tuvieron que ser tratados de nuevo con melfalán. Nuestro paciente recibió la combinación HAZ clásica durante la etapa de acondicionamiento, y permanece libre de recaída a los tres años.

La etiología de la escleromixedema sigue siendo desconocida. Los estudios de laboratorio utilizando cultivos primarios de fibroblastos sugieren que un factor del suero estimula la proliferación de fibroblastos (7). Feasel et. al sugiere en su artículo, que la eliminación de la banda monoclonal fue la causa de la mejora (4). Sin embargo, un trabajo anteriormente publicado no mostró la actividad estimulante en la proliferación de fibroblastos de fracción IgG aislada (8). Se realizó una biopsia de piel de nuestro paciente antes del TMO. Los ensayos in vitro realizados con los fibroblastos obtenidos de la biopsia demostraron una proliferación anormal de éstos, que no dependían de factores solubles o inmunoglobulinas ya que la tasa de crecimiento no variaba al incubar las células con la IgG purificada del suero del paciente o el suero deplecionado de IgG.

Después del TMO se realizó una segunda biopsia de piel para valorar el efecto del tratamiento sobre la proliferación de fibroblastos. Los resultados del cultivo de fibroblastos mostraron una normalización de la tasa de proliferación. Adicionalmente, se incubaron los fibroblastos obtenidos de la biopsia de piel realizada antes del tratamiento con BCNU, Ara-C o melfalán.

Los resultados de estos últimos experimentos replicaron los obtenidos con la biopsia de piel realizada después del tratamiento. Esto sugiere que la gammapatía monoclonal no es la principal causa de la proliferación de fibroblastos en esta enfermedad. Además, las paraproteinemias no son un elemento invariable de escleromixedema (9.11) y nuestro paciente se recuperó completamente, mientras que la gammapatía todavía estaba presente.

Para intentar profundizar un poco más en los mecanismos moleculares responsables de ese cambio tras el TMO realizamos geles bidimensionales con extractos de cultivos de fibroblastos antes y después del tratamiento in vivo y de los tratamientos in vitro. El análisis de los geles 2-D reveló varias proteínas diferencialmente expresadas entre los fibroblastos control y los del paciente antes y después del TMO. Identificamos proteínas claramente expresadas de forma diferencial en las distintas muestras estudiadas. Todas ellas estaban implicadas en proliferación celular. Encontramos que la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) estaba muy reducida (28 veces) en los fibroblastos antes de la terapia. Sin embargo, la expresión de la proteína alcanzaba los niveles normales en los fibroblastos después del trasplante. Hallazgos similares se observaron para Cu / Zn SOD1 (Figura 2).

La expresión de MnSOD se encuentra reducida en una amplia gama de células tumorales, así como en líneas celulares transformadas y postulándose como un nuevo tipo de gen supresor tumoral (12-15). Algún factor desconocido en escleromixedema podría provocar una hipometilación/hipermetilación aberrantes en los promotores de los diferentes genes implicados en la detención o activación de la proliferación celular. De hecho, algunos de los fármacos utilizados en la etapa de acondicionamiento previo al trasplante de médula ósea tienen un efecto sobre la metilación de los genes y pueden por tanto, modificar su expresión. También se encontró una regulación a la baja de la proteína Cu / Zn SOD1. Se ha demostrado que una regulación al alza de esta proteína

inhibe la proliferación celular (16), lo que puede explicar sus bajos niveles en los fibroblastos del paciente antes del trasplante. Además, la expresión de varias proteínas se redujo tanto en fibroblastos de control y en los fibroblastos del paciente después del tratamiento: stathmin (ausente), profilina I (ausente) y el factor inhibidor de macrófagos (MIF) (8,65 veces reducido). Todos ellos se sobreexpresaban en los fibroblastos antes del TMO, y todos ellos han sido previamente implicados en un incremento de la proliferación celular (17-19).

Es también de interés constatar que después del tratamiento, los fibroblastos del paciente proliferaban a un ritmo (856 ± 90 cpm) que era más similar a los controles (2853 ± 398 cpm) que a los fibroblastos pre-TMO (8879 ± 398 cpm). Además, las proteínas que se habían identificado como anormalmente expresadas pasaron a presentar niveles normales, es decir parecidos a los que se observan en fibroblastos control (ver figura).

Para demostrar aún más el papel de los fármacos utilizados en el tratamiento de acondicionamiento en nuestro caso, tratamos cultivos de fibroblastos del paciente antes del TMO con BCNU, ara-C y melfalán. Curiosamente, se observó una normalización de la proliferación de fibroblastos con todas las drogas utilizadas. Estos resultados se corroboraron con los resultados de electroforesis bidimensional, ya que el perfil de expresión proteica coincidía con el observado en fibroblastos control y los del paciente tras el TMO (figura).

Tres años después del tratamiento nuestro paciente está clínicamente asintomático y libre de recaída. Así, el régimen de acondicionamiento pre-TMO (BEAM), que incluye una combinación de fármacos hipo / hypermetilantes, puede ayudar a evitar las recaídas observadas en pacientes tratados únicamente con melfalán. En conclusión, nuestros resultados muestran que: 1) el régimen de acondicionamiento y trasplante de médula ósea utilizado en nuestro paciente puede producir una remisión permanente en casos de escleromixedema grave, 2) en los pacientes con escleromixedema se observa una proliferación aberrante de los fibroblastos cutáneos in vitro, y esto se puede revertir con fármacos quimioterapéuticos como BCNU, Ara-C y melfalán, 3) la gammapatía monoclonal, al menos en nuestro caso, no es responsable de la proliferación aberrante de los fibroblastos.

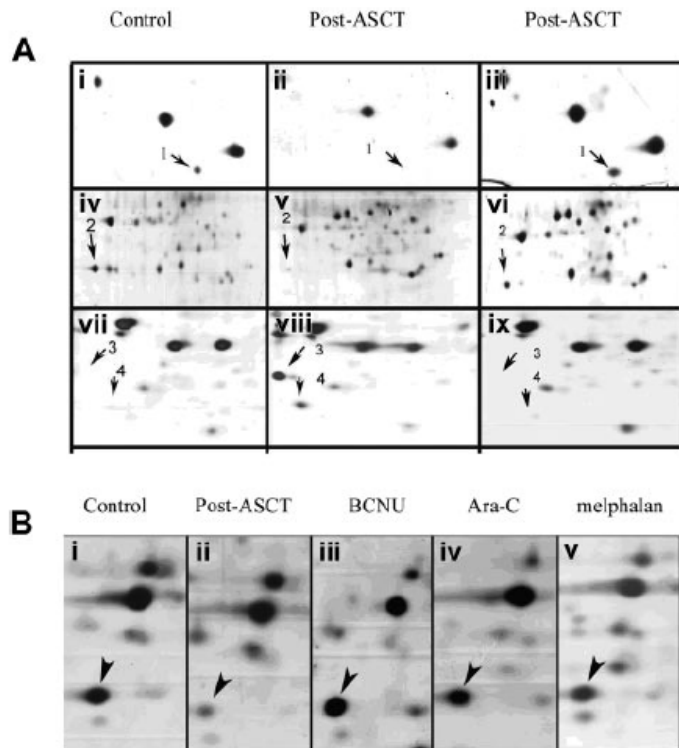


Figura 1. Expresión diferencial de proteínas asociadas con la proliferación celular mediante el análisis en 2D-E. (A) i, iv, vii) los fibroblastos de control, (ii, v, viii) los fibroblastos antes del tratamiento; (iii, vi, ix) fibroblastos después del tratamiento. Estas imágenes de los gels bidimensionales teñidos con plata nos permitieron visualizar el patrón de expresión proteica de los fibroblastos del paciente después del tratamiento se reflejaba el mismo perfil que en los fibroblastos control. Las flechas señalan las siguientes proteínas: (1) Cu/Zn SOD, (2) Mn SOD, (3) Profilin I; y el MIF (4). (B) El efecto del tratamiento de los fibroblastos del paciente con los diferentes medicamentos utilizados fue muy claro con la expresión de la proteína MnSOD. Todos los fármacos aumentaron la expresión de MnSOD en el paciente niveles similares a los de control de los fibroblastos. (i) Control de los fibroblastos, (ii) los fibroblastos de pacientes sin tratamiento, (iii-v) los fibroblastos de pacientes tratados con BCNU (iii), Ara-C (iv) o melfalán (v). Todas Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con un escáner de GS-800 (BioRad, Palo Alto, CA).

Artículo II: “Chronic sensorimotor polyradiculopathy with antibodies to P2: an electrophysiological and immunoproteomic analysis”. Muscle And Nerve 2008 38(1):933-8

Ricard Rojas-Garcia, Eduard Gallardo, Carolina de la Torre, Lara Sanvito, Isabel Illa

La utilización combinada de técnicas de electroforesis bidimensional y “*Western-Blot*” puede ser de utilidad para la identificación de nuevos antígenos diana en neuropatías inmunomediadas, como es el caso de la poliradiculopatía.

En este estudio se evaluó un paciente varón de 72 años de edad con marcada ataxia sensitiva y debilidad proximal. Los síntomas se iniciaron dos meses antes, con leve inestabilidad de la marcha, aparición de parestesias simétricas en las extremidades inferiores y alteración de la sensibilidad desde rodillas. Los síntomas empeoraron gradualmente causando dificultades para caminar. No refería otros síntomas neurológicos. El paciente había sido diagnosticado, cuatro años antes, de leucemia linfocítica crónica de células B. Los niveles séricos de IgM se encontraban elevados (1260mg/dL) y la inmunoelectroforesis demostró una gammapatía monoclonal IgM kappa. A la exploración neurológica el paciente presentaba de forma bilateral ataxia de la marcha y Romberg positivo. Únicamente se encontraba presente el reflejo muscular profundo tricípital bilateral. Al balance muscular se objetivó una debilidad simétrica leve (MRC 4/5) para la abducción de hombro y flexión de codo y cadera. Se objetivó una hipoestesia de predominio en las extremidades inferiores, principalmente en las modalidades de sensibilidad artrocinética y vibratoria. Había una alteración leve de la sensibilidad táctil y algésica. El paciente no presentaba alteraciones de pares craneales, nistagmo ni disartria. La concentración de proteína en el LCR fue de 155 mg/dL con un recuento celular de 5/mm³. La citología del LCR mostró ausencia de células malignas.

El paciente fue tratado con inmunoglobulina intravenosa (IgIV) (0,4 g / kg de peso) sin ningún beneficio. Cinco semanas más tarde se inició tratamiento con Prednisolona vía oral (1 mg / kg de peso). El paciente evolucionó a las 4 semanas con una deambulación normal. El estudio radiológico craneal y medular fue normal, la resonancia magnética descartó hipertrofia y captación de gadolinio de las raíces nerviosas. Las siguientes pruebas fueron normales o negativas: vitamina B12, ácido fólico, vitamina E, Borrelia

burgdoferi, VDRL y serología VIH, anti-Ro y anti-La. Los anticuerpos onconeurales, incluyendo anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, Anti-Ma2 y anti-CV2, fueron negativos. Los anticuerpos anti-gangliósidos Ig M e Ig G (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b) y los anticuerpos anti-sulfátidos se realizaron como se ha descrito anteriormente y fueron negativos. Los anticuerpos anti-MAG se determinaron mediante la EIA y también fueron negativos.

La electroforesis bidimensional seguida de Western-blot utilizando el suero del paciente demostró reactividad frente a una proteína (figura 1B). El análisis de espectrometría de masas identificó la proteína P2 de mielina del nervio periférico (P2) con un “score” de 244 en la base de datos de Mascot. Estos resultados se obtuvieron con extractos de proteínas de raíces humanas anterior y dorsal. La validación de estos resultados se realizó mediante técnicas de ELISA utilizando péptidos sintéticos de la proteína P2. El suero del paciente fue positivo para anticuerpos Ig M con un título de 1:800 frente a un péptido que corresponde a los aminoácidos 20-45 de la P2 (secuencia YMKALGVGLATRKLGNLAKPTVIISK). La caracterización de la cadena ligera mostró que era del tipo kappa igual que la paraproteína Ig M que tenía el paciente.

Aunque no hay datos de normalidad para esta prueba, el título se puede considerar alto. De hecho, en una serie de 30 pacientes con CIDP y 32 controles sanos (Sanvito et al, datos no publicados), sólo un paciente CIDP mostró reactividad IgM P220-45 con un título de 1:800, mientras que los otros dos pacientes positivos tenían un título de 1:200. No se detectaron anticuerpos Ig M o Ig G contra los otros seis péptidos de P2 analizados.

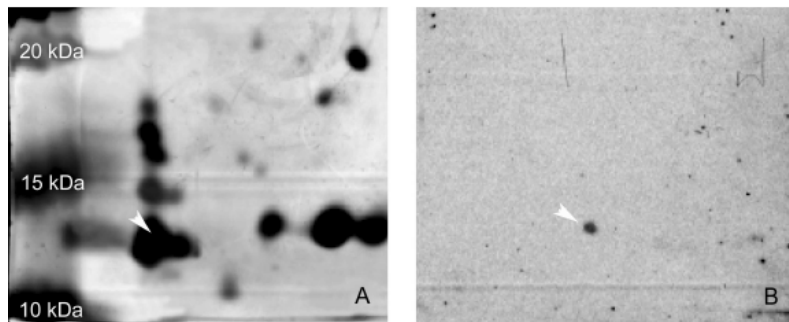


Figura 1. (A) Electroforesis bidimensional de extractos proteicos de raíz posterior humana, teñido con plata. (B) Western blot realizado en geles bidimensionales con suero del paciente y se observa una fuerte reactividad con la proteína P2 “*Mielin Protein 2*”

Discusión artículo 2

Se presenta un paciente con marcada ataxia sensitiva y debilidad proximal, con una clínica que orienta a una posible CIDP en el que los estudios electrofisiológicos mostraron anomalías en las respuestas tardías, sin embargo, no demostraron signos definitivos de desmielinización en los segmentos de los nervios periféricos. La combinación de los datos clínicos y electrofisiológicos sugieren afectación proximal de las raíces motoras y sensitivas como zona de lesión principal. Un enfoque inmunoproteómico permitió la identificación de la reactividad contra las proteínas de mielina periférica P2. La hiperproteíorraquia del LCR y la respuesta al tratamiento sugieren un mecanismo inmunológico en este caso. La presencia de una gammapatía monoclonal y la identificación de la reactividad contra la proteína P2 apoyan aún más el papel de la inmunidad de células B contra diferentes proteínas de la mielina, glicoproteína asociada (MAG) o los gangliósidos en esta neuropatía que se asemeja clínicamente CIDP.

Varias entidades clínicas definidas deben considerarse en el diagnóstico diferencial de nuestro paciente: La aparición subaguda y la presentación clínica con predominio de ataxia sensitiva de curso rápidamente progresivo, podría orientar el diagnóstico de neuropatía asociada a anticuerpos anti-Hu paraneoplásica (8,9) o ganglionopatía asociada al síndrome de Sjögren (10,11). Sin embargo, además de un inicio asimétrico común en estas dos entidades, los datos electrofisiológicos en ambas son de alteración grave y difusa de los estudios de conducción sensitiva, con una reducción marcada de la amplitud de los potenciales. Sin embargo, en nuestro caso los estudios de conducción sensitiva se mantuvieron normales durante el seguimiento.

La participación radicular en pacientes con linfoma puede presentarse como radiculopatía o polirradiculopatía en un nivel localizado. Dicha participación radicular se manifiesta por síntomas radiculares generalmente asimétricos de predominio distal (dolor, disestesias, parsetesias y déficit sensitivo y/o motor con distribución de la raíz afectada) 12. Los estudios electrofisiológicos pueden mostrar compromiso radicular localizado, con preservación de los potenciales de acción sensitivos, sin embargo la

evidencia de denervación aguda en los músculos paravertebrales es un hallazgo frecuente.

La radiculopatía linfomatosa o infiltrativa sólo puede ser definitivamente confirmada por biopsia. Sin embargo, ni la ausencia de lesiones con efecto masa o del realce con contraste Resonancia magnética, una presentación clínica simétrica, la denervación de los músculos paravertebrales, ni la citología negativa en el examen del líquido cefalorraquídeo excluyen esta posibilidad.

Además, en pacientes con gammapatía monoclonal IgM que se presentan con síntomas predominantemente sensitivos, se debe considerar el diagnóstico de neuropatía sensitiva atáxica crónica paraproteinémica (13) y neuropatía desmielinizante distal adquirida paraproteinémica (14).

La mayoría de los pacientes con gammapatía monoclonal IgM generalmente se presentan con características muy homogéneas. Clínica y electrofisiológicamente se caracteriza por una polineuropatía crónica, lentamente progresiva, distal, simétrica, de predominio sensitivo desmielinizante (14-16). Cuando esta se presenta, la debilidad es de predominio distal y se desarrolla más tarde. En más de la mitad de estos pacientes la IgM monoclonal reacciona contra la mielina asociada a glicoproteína (MAG) (14). Además de las diferencias clínicas y electrofisiológicas de nuestro paciente, no se detectaron anticuerpos anti-MAG.

Pocos pacientes con gammapatía monoclonal IgM se presentan con un cuadro clínico caracterizado por una neuropatía sensitiva atáxica crónica de curso progresivo o recurrente-remitente. Además, en muchos casos existe debilidad de los músculos oculomotores y afectación de la musculatura bulbar (13,17). El cuadro clínico fue descrito con precisión en una serie amplia (13). Todos los casos tienen anticuerpos séricos IgM que reaccionan con NeuAc (α 2-3) y NeuAc (α 2-8) conformado por disialosil-gangliósidos. En estos sueros también están presentes las “*crioaglutininas*”. Cuando todas estas características clínicas descritas anteriormente están presentes, se conoce con las siglas CANOMAD: neuropatía atáxica crónica, oftalmoplejía, paraproteína IgM, aglutininas frías y anticuerpos disialosil (18).

Nuestros pacientes pueden ser fácilmente diferenciados de esta neuropatía crónica sensitiva atáxica con paraproteinemia debido a la ausencia de afectación de los músculos óculomotores, los anticuerpos anti-gangliósidos, las aglutininas frías y la normalidad de los estudios de conducción sensitiva.

El cuadro clínico de debilidad proximal, además de la ataxia sensitiva grave se asemeja más a una variante de CIDP. Por lo tanto formas puras sensoriales de CIDP (19,20, 21,22) CIDP clásica, o incluso la recientemente descrita polirradiculopatía inmune sensitiva crónica 2 deben considerarse en el diagnóstico diferencial.

Los criterios para el diagnóstico de CIDP de la AAN reconocen que la presentación clínica puede ser exclusiva o predominantemente sensitiva (5), y los criterios recientemente publicados aceptan una presentación sensitiva pura como CIDP atípica (1,3).

Los estudios electrofisiológicos en el subgrupo de pacientes con neuropatía inflamatoria desmielinizante crónica adquirida y la disfunción sensitiva pura, pueden objetivar alteraciones exclusivamente en las conducciones nerviosas sensitivas 23. Sin embargo, es más común encontrar rasgos de desmielinización primaria afectando a nervios motores en consonancia con los cambios típicos electrofisiológicos de CIDP (19, 20,24), además de conducciones sensitivas alteradas. En otros casos, la afectación de nervios motores y la debilidad se desarrolla de forma tardía, por ejemplo en los casos que se presentan con síntomas sensitivos de forma inicial (21,22).

Los valores de la LMD y el VC en los estudios de conducción motora en nuestro paciente mostraron algunas alteraciones leves. Sin embargo, estos no estaban en el rango desmielinizante de acuerdo con los criterios AAN (reducción <80% del límite inferior de la normalidad de la VC, y prolongación > 125% del límite superior normalidad de DML). En nuestro paciente se objetivó que no había evidencia de desmielinización primaria definitiva en los segmentos distales de los nervios, de acuerdo con los criterios de la AAN para el diagnóstico de CIDP 5,25. Además, los estudios de conducción nerviosa sensitiva fueron normales y se mantuvieron así tras un año de seguimiento (tabla I).

En los pacientes que se presentan con ataxia sensorial pura o de forma predominante los estudios de conducción nerviosa sensitiva pueden ser normales en un número muy pequeño de pacientes (23, 26,27). Una lesión de los segmentos proximales de las raíces

nerviosas dorsales desmielinizante ha sido sugerida como la lesión causal en estos casos (23,26). En una serie de pacientes que se caracterizaban clínicamente por ataxia sensorial y normalidad de los estudios de conducción nerviosa sensitiva, los autores sugirieron que la lesión desmielinizante se localizaba en las raíces sensitivas proximales a los ganglios de la raíz dorsal. Similares pacientes fueron reportados por Sinnreich et al, en donde el patrón electrofisiológico de ausencia del reflejo H y la normalidad de los potenciales sensitivos en el estudio de conducción, en presencia de ataxia sensitiva, en nuestro caso sugiere el segmento proximal de las raíces sensitivas como zona de lesión. Sin embargo, además de la ataxia sensitiva la presencia de debilidad proximal simétrica en nuestro paciente, que en conjunto con los datos clínicos y electrofisiológicos sugiere que existe una afectación predominantemente proximal tanto sensitiva como motora. Se sospecha que la lesión de la raíz motora es por la presencia de anomalías en las conducciones motoras tales como y la presencia de ondas A, en ausencia de datos definitivos de lesión desmielinizante en segmentos distales de los nervios motores.

Las alteraciones aisladas de las ondas F con estudios de conducción motora normales en los segmentos distales del nervio motor han sido descritas en una etapa temprana de polineuropatías agudas adquiridas (28-31). Este patrón electrofisiológico se ha interpretado como una consecuencia de un bloqueo de la conducción en el segmento proximal del nervio (31-33). Sólo se han descrito casos anecdóticos que sugieren que la desmielinización puede limitarse a los segmentos proximales del nervio en las neuropatías crónicas adquiridas (2, 23, 24,26). En estos casos, los autores señalaron que la lesión se localiza próxima a los ganglios de la raíz dorsal sensitiva. Las características clínicas y electrofisiológicas de nuestro paciente sugieren una afectación predominante proximal tanto sensitiva como motora. Este patrón podría ser definido como una polirradiculopatía sensitivo motora crónica, pudiendo constituir un fenotipo ampliado de los pacientes definidos por Sinnreich 2 o una forma restringida de neuropatía inmunomediada adquirida crónica con afectación predominante de las raíces nerviosas. En estos casos la ausencia del reflejo H y las alteraciones de la onda F podrían indicar la presencia de lesión desmielinizante en segmentos proximales del nervio, que no se suelen detectar en estudios electrofisiológicos de rutina y de esta manera evitar la biopsia de nervio y ayudar a identificar a los pacientes que no se ajustan al patrón típico electrofisiológico en las neuropatías crónicas adquiridas y poder beneficiarse de tratamientos inmunomoduladores.

El análisis proteómico ha sido utilizado con éxito para identificar un antígeno diana en una enfermedad neuroinmunológica como la encefalopatía³⁴ de Hashimoto. El lugar exacto de sospecha de la lesión nos ha llevado a realizar 2-D electroforesis y Western Blot, con extractos de proteínas de las raíces anterior y dorsal. De esta forma hemos sido capaces de detectar la reactividad IgM pero no la reactividad de IgG a P2 en el suero del paciente. La IgM del paciente también reaccionó con el péptido sintético P220-45 mediante ELISA, pero no con otros péptidos, especialmente P240-65 y P260-85 que cubre la secuencia neuritogenic 58-81. La ausencia de reactividad de los otros péptidos podría ser debido a la pérdida de epítomos conformacionales de la proteína. El hecho de que los resultados de ELISA confirmaran nuestros hallazgos a través de La 2-D / Banco Mundial refuerza la utilidad de este método como una herramienta poderosa para un cribado de alto rendimiento de potenciales dianas antigénicas en pacientes con sospecha de neuropatía inmunomediada.

Se ha sugerido que proteínas de la mielina del nervio periférico como P2, junto con P0 y PMP22, podrían ser un objetivo del ataque inmune en polirradiculoneuropatías desmielinizantes adquiridas. Anticuerpos IgM anti-P2 de la especie bovina, también fueron encontrados en pacientes con CIDP³⁵. Recientemente se han encontrado una alta proporción de anticuerpos IgG contra P214-25, pero no P261-70, en los pacientes con SGB en el pico de la enfermedad (7).

Nuestros datos amplían el espectro en las neuropatías disímunes adquiridas y sugieren que la reactividad contra las proteínas de la mielina pueden estar relacionados con una implicación sobre todo radicular de una presentación clínica de ataxia sensitiva y alteración motora que se asemeja clínicamente CIDP. Estos datos también apoyan el papel de la inmunidad de células B contra diferentes proteínas de la mielina de la mielina glicoproteína asociada (MAG) o los gangliósidos en esta neuropatía. Nuestros resultados sugieren que una definición precisa clínica y electrofisiológica en combinación con 2-D electroforesis y “*Western Blot*”, podría ser un método útil para detectar antígenos neuronales en pacientes con neuropatías de IgM en la que no se identifica ninguna reacción antineural por otros métodos y puede ayudar a guiar la búsqueda de antígenos candidatos y definir la correlación clínico-inmunológica.

Artículo III: “Proteomics Identification of Differentially Expressed Proteins in the Muscle of Dysferlin Myopathy Patients”. Proteomics Clinical Applications 2008 38(1):933-8

Carolina De la Torre, Isabel Illa, Georgine Faulkner, Laura Soria, Rene Robles-Cedeño, Raul Dominguez-Perles, Noemí De Luna, Eduard Gallardo.

La aplicación de la proteómica como herramienta de estudio en el estudio del músculo esquelético de pacientes con distintas distrofias musculares puede ser de utilidad para identificar patrones de expresión proteica comunes a todas las distrofias musculares en contraposición a aquellos específicos para cada una de ellas. Los resultados pueden ser de utilidad para un mejor conocimiento de la patogenia de estas enfermedades y para la identificación de posibles dianas terapéuticas.

Mapas de alta resolución de biopsias de tríceps de pacientes con distintas distrofias musculares (FSHD, disferlinopatía y calpainopatía) y controles sanos fueron realizados. A partir de estos se detectaron alrededor de 1.500 puntos en cada gel (Fig. 1). Para determinar la variación biológica en la expresión de proteínas entre las distrofias musculares mencionadas y los controles sanos, se realizó un agrupamiento jerárquico que organizaba las proteínas por homologías, en el que se detectaron 200 proteínas que mostraban cambios más significativos utilizando el promedio de los niveles de expresión de cada una de ellas. Este análisis permitió identificar un patrón de expresión de proteínas específicas para las disferlinopatías (Fig. 2, Tabla 3) y distinguirlos de los cambios que parecen ser comunes a todas las formas de distrofia muscular estudiados (Tabla 2).

Las proteínas que se encontraron diferencialmente expresadas en disferlinopatías se agruparon de acuerdo a su función en el músculo esquelético.

Se observó a nivel de proteínas miofibrilares una expresión incrementada de miotilina (spot 22.091), proteína que participa en el ensamblaje y la estabilización del disco Z [15]. La proteína *ankyrin repeat 2* (Ankrd2) (punto 21,944, 21,970), también conocida

como *Arpp*; es una proteína sarcomérica que puede interactuar con otras proteínas sarcoméricas o con proteínas nucleares. La actinin-associated-LIM protein (ALP) (spot 22062, 23241,21984) pertenece a una familia de proteínas del citoesqueleto que se define por la presencia de un dominio N-terminal de PDZ (un módulo de interacción proteína-proteína) y un dominio LIM en el extremo C-terminal [16]. Todas estas proteínas están sobre expresadas en pacientes con LGMD2B junto con la “*myosin regulatory light chain 2*” (spot 21.940) y la troponina T1 lenta (punto 22,228). La sobreexpresión de myotilina, *Ankrd2* y ALP fue confirmado por Western blot (Fig. 3).

A nivel de las proteínas involucradas en el tipo de fibra muscular, se observó incremento en la expresión de diferentes formas fosforiladas de la troponina T lenta (puntos 7625, 7624, 7571, 6549), la tropomiosina 2 (beta) isoforma 1 (8636) y tropomiosina (8635). Por el contrario, hemos encontrado una expresión reducida de la cadena ligera de la proteína reguladora 2 de la miosina rápida (punto 8330, 8328) (Fig. 4, cuadro 4).

La inmunohistoquímica para la miosina rápida y lenta mostró un predominio de fibras tipo I en pacientes con disferlinopatía en comparación con los controles (Fig. 5 A), que aumentaba significativamente con la progresión de la enfermedad (rho de Spearman test, $p = 0,042$) (Fig. 5 B y C). Por el contrario, en pacientes con FSHD se observó un predominio de las fibras de tipo II que aumentaba con la progresión de la enfermedad con un coeficiente rho de -0.700 ($p = 0,188$), lo que indica una tendencia hacia la conversión de fibras tipo I a tipo II (Fig. 5 D).

En los pacientes con LGMD2A, también encontramos un predominio de fibras tipo I con la progresión de la enfermedad, como habían reportado previamente Fardeau y col. [17], aunque no fue tan marcada como en los pacientes con miopatía disferlina ($p = 0,125$) (Fig. 5E). En estos pacientes se observaron grupos de atrofia de fibras tipo II, mientras que las fibras tipo I mostraban un diámetro aumentado. De hecho, en el trabajo original de Fardeau y colaboradores, describían que el diámetro de las fibras de tipo II, aunque era normal en los pacientes menos afectados que tendían a disminuir en los más afectados [17].

Estos datos sugieren que como ocurre en la DMD, en la LGMD2A el predominio de fibras tipo I puede ser debido a una atrofia más importante de las fibras de tipo II (ver figura 5D). Por el contrario, en los pacientes con disferlinopatía no hemos encontrado cambios estadísticamente significativos en el diámetro de la fibra que pudiesen indicar una atrofia selectiva de las fibras de tipo II (Wilcoxon test, $p = 0.5$ y T-test $p = 0,263$).

Las proteínas relacionadas con el metabolismo energético de estos pacientes con disferlinopatía, se observó un aumento en la expresión de fosfopiruvato hidratasa (spot 23349), enzima involucrada en la glucólisis. También hemos encontrado un aumento de expresión de la anhidrasa carbónica III (punto 24 052) y de la proteína de unión a ácidos grasos "*fatty acid-binding protein*" (punto 22035), que participan en el metabolismo aeróbico y que se expresan principalmente en las fibras tipo I del músculo.

El estrés oxidativo en estos pacientes con disferlinopatía, se encuentra alterado, al detectarse: Un aumento en la expresión de la 6-fosfogluconolactonasa "*6-phosphogluconolactonasa*" (punto 22,148), una enzima de la vía fosfato pentosa que sirve para generar NADPH y prevenir así el estrés oxidativo. El análisis fosfoproteómico mostró un incremento en la expresión de diferentes formas fosforiladas de la chaperona de choque térmico beta 1 (HspB1) también conocida como "*Heat shock protein -beta 1*" (HSP27) (puntos 7563, 6547, 6545) en las biopsias musculares de pacientes con disferlinopatía.

El análisis mediante electroforesis bidimensional (punto 22,603) y la posterior confirmación por técnicas de "*Western Blot*" (Fig. 3), mostraron un modesto aumento de la expresión del inhibidor de la disociación de GDP (Rho-GDI) en pacientes con disferlinopatía. Esta proteína está implicada en la dinámica reorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto [18].

En los pacientes con disferlinopatía se encontró un aumento de la expresión de la proteína TRIM 72 (punto 21,949), que pertenece a la familia de proteínas que presentan un motivo tripartito (MIC). Esta proteína presenta tres dominios estructurales (ZNF-RING, ZNF-Bbox, RCPT SPRY), lo que sugeriría que puede participar en la regulación transcripcional, el crecimiento celular, diferenciación, apoptosis y ubiquitinación. (Fig. 4).

Discusión artículo 3

En este estudio hemos investigado el proteoma del músculo de los pacientes con disferlinopatía en comparación con el de pacientes con LGMD2A, FSHD y controles. Hemos identificado una serie de proteínas que se expresan diferencialmente en los músculos sin disferlina. También hemos encontrado proteínas que se expresan diferencialmente en las tres distrofias musculares, en comparación con controles sanos. Estas proteínas están probablemente implicadas en los procesos celulares que son comunes a la mayoría de distrofias musculares y que por tanto podrían enmascarar mecanismos específicos.

Hemos observado un incremento en la expresión de las proteínas correspondientes a las proteínas contráctiles específicas de fibras musculares tipo I (cadena ligera de la miosina reguladora 2, troponina T1 lenta, formas fosforiladas de la troponina T lenta), lo que sugiere un proceso de transición de fibras rápidas a lentas en estos pacientes. En un estudio en el que se compararon sólo pacientes con LGMD2B y controles observaron resultados similares [6]. Fanin y colaboradores observaron un predominio de fibras tipo I superior al 80% en pacientes con disferlinopatía y sugerían que o bien había una pérdida selectiva de fibras tipo II o bien un proceso de conversión a fibras tipo I sin concluir cuál era realmente el proceso [19].

El gen de la *Ankrd2*, que codifica para una proteína de unión a titina, se activa por estiramiento muscular, se asocia a músculos con fenotipo lento y es parte de una vía de señalización diferente a lo que se encuentra implicada en la hipertrofia muscular. Por otra parte, los mismos autores encontraron una disminución de expresión de *Ankrd2* en el músculo sóleo de rata desnervado, produciéndose un cambio hacia el fenotipo muscular rápido [20].

El aumento de los niveles de *Ankrd2* que hemos encontrado en pacientes con miopatía disferlina sugiere que efectivamente hay un cambio activo a fibras tipo I en lugar de una pérdida de las fibras de tipo II. Además, también encontramos un aumento de expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo oxidativo, tales como la anhidrasa

carbónica III, la proteína de unión a ácidos grasos, y fosfopiruvato hidratasa. Finalmente, también observamos una sobreexpresión de “*Heat Shock Protein 27*” (HSP 27) y miotilina. La conversión a fibras tipo I más resistentes a fatiga depende, entre otros factores, de la sobreexpresión de chaperonas (por ejemplo, HSP 27) para la estabilización de las proteínas miofibrilares durante el proceso de transición de fibra rápida a lenta. [21, 22].

Es bien sabido que las fibras musculares de tipo II son más susceptibles al fenómeno de contracción muscular que las de tipo I [23] ya que se contraen de forma fásica en ráfagas [24]. En ausencia de disferlina, las fibras de tipo II repararían de forma menos eficiente porque no podrían hacer frente a una rotura masiva del sarcolema. Es tentador proponer que el cambio a las fibras tipo I a principios de la enfermedad podría tener un efecto protector para el músculo esquelético y podría ralentizar la progresión de la disferlinopatía. De forma preventiva podría provocarse la conversión de fibras tipo II a tipo I. Así, se ha reportado que la estimulación crónica de baja frecuencia induce cambios en la expresión del proteoma que promueven un proceso de transición de fibras rápidas a lentas [22]. Asimismo, puede inducirse un aumento en el número de fibras tipo I utilizando agonistas específicos del receptor-delta del proliferador de peroxisomas activado [25].

En la DMD también hay un predominio de fibras tipo I, pero no parece estar relacionado con la progresión de la enfermedad como observamos en las disferlinopatías [26]. Los mismos autores encontraron que el diámetro medio de las fibras tipo 2 era significativamente mayor que el de las fibras tipo I. En un estudio anterior, los autores encontraron que en la DMD las fibras musculares rápidas se afectan de forma preferente y son las primeras en degenerar [27].

En un estudio realizado con biopsias de pacientes con FSHD, los autores realizaron electroforesis 2-D [8] y encontraron datos de una transición de un fenotipo glicolítico (tipo II) a un fenotipo muscular oxidativo (tipo I). Sin embargo, el recuento de fibras reveló que en la mayoría de los pacientes el porcentaje de cada tipo de fibra se acercaba al 50% de cada tipo y no se observaba correlación con la progresión de la enfermedad (de hecho el paciente más joven mostraba un mayor porcentaje de fibras tipo I). De hecho, aunque el número de pacientes es bajo, realizamos un test de “*Spearman Rho*”

con las biopsias musculares de nuestros pacientes y observamos que mientras que en la disferlinopatía existe una correlación entre el número de fibras tipo I y los años de progresión de la enfermedad (coeficiente de correlación = 0,829, $p = 0,042$), en los pacientes con FSDH el coeficiente fue de -0,700, lo que indica una tendencia hacia la conversión de tipo II.

Tampoco encontramos cambios estadísticamente significativos en el diámetro de la fibras que indicara una atrofia selectiva de las fibras de tipo II en pacientes con disferlinopatía (Wilcoxon test, $p = 0.5$ y T-test $p = 0,263$).

La conversión de un tipo de fibra a otro también puede observarse en otras condiciones fisiológicas. En los trastornos neurogénicos el cambio de un tipo a otro se debe a la nueva inervación de la fibra. Las fibras reinervadas forman grupos de fibras tanto de tipo I como de tipo II en la misma muestra. La agrupación de fibras musculares puede observarse tanto para las fibras rápidas como lentas y no depende sólo del propio músculo, sino también de la neurona motora que inerva una fibra muscular específica. Además, en las situaciones de desuso muscular, el cambio del tipo de fibra es normalmente de tipo I (contracción lenta) a tipo II (contracción rápida) [28]. Finalmente, los estudios relacionados con los cambios en los tipos de fibras musculares asociados a la edad proponen que, en general, se observa un predominio de fibras tipo I que podría ser debido a una pérdida o atrofia de las fibras de tipo II, pero no a una conversión del tipo de fibra [29].

El aumento de los niveles de miotilina en pacientes con disferlinopatía podría favorecer el ensamblaje, mantenimiento y / o la función del disco Z [30] durante la transición a fibras de tipo I. Sin embargo, el aumento en los niveles de miotilina puede ser también debido al hecho de que las fibras tipo I tienen un mayor número de discos Z que las fibras de tipo II [31].

También encontramos que el inhibidor de Rho-GD está aumentado en las disferlinopatías. De hecho la sobreexpresión de Rho GDI en la línea celular C2C12 (músculo murino) la diferenciación a miotubo esta afectaba con una reducción importante de los niveles de expresión de ARNm de miogenina [32]. De acuerdo con estos resultados, un estudio previo realizado en nuestro laboratorio mostraba que los

miotubos de pacientes con déficit de disferlina presentaban una diferenciación anómala y mostraban niveles muy bajos de miogenina [33]. Por el contrario, hemos encontrado una sobreexpresión de la proteína ALP. Se ha observado que, utilizando la tecnología de ARN antisentido, la alteración de la expresión de ALP afecta la expresión de miogenina y como consecuencia la diferenciación muscular. [34]. Nuestros resultados sugieren que tal vez la sobreexpresión de ALP en disferlinopatías representaría un intento de restaurar la diferenciación muscular y confirma que, incluso en el músculo esquelético adulto las proteínas implicadas en diferenciación muscular están desreguladas.

Por último, también hemos observado que la proteína Trim 72 está aumentada en disferlinopatías. Trim 72 pertenece al grupo de la familia de proteínas que tiene motivos tripartito (TRIM / GR), ésta específicamente tiene tres dominios estructurales, dominios de dedos de zinc en forma de anillo, un dedo de zinc de tipo “*B-box*” y B30 de dominio 2/SPRY. Trim 32 pertenece a la misma familia de proteínas y también se expresa en el músculo esquelético. Esta proteína se puede inducir en procesos de descarga y recarga muscular, asociados con las miofibrillas y es capaz de ubiquitinar la actina, lo que sugiere su probable participación en la remodelación de la proteína miofibrilares, especialmente durante la adaptación de los músculos [35]. Las mutaciones en Trim 32 se han asociado con la extremidad cinturón tipo de distrofia muscular 2H [36].

El alto grado de homología entre estas dos proteínas indica que ellos pueden compartir funciones similares, lo que sugiere que Trim 72 también puede participar en la remodelación del músculo esquelético debido a la conversión del tipo de fibra. Además, una actividad mayor en la ubiquitinación de proteínas mal plegadas por Trim 72 puede explicar el hecho de que en la mayoría de los pacientes con mutaciones en el gen de la disferlina, los niveles de expresión de la disferlina estén ausentes o sean muy reducidos. Sin embargo, en el momento de publicar nuestro artículo (año 2009) aparecieron los primeros artículos en los que se estudiaba de forma más detallada la función de la proteína Trim 72, también llamada MG53 o mitsugumina.

La translocación de vesículas intracelulares y la fusión de membranas dependiente de Ca^{2+} son pasos distintos implicados en la reparación de membrana después de un daño. MG53 iniciaría el ensamblaje de la maquinaria de reparación de membrana por un proceso dependiente de oxidación [117]. Los mismos autores demostraron que el

complejo molecular formado por MG53, disferlina, y caveolina-3 es esencial para la reparación de la membrana muscular dañada y constituiría una diana terapéutica para el tratamiento de distrofias musculares en las que esté comprometida la reparación de membrana[118]. Así pues, fuimos capaces de describir la sobreexpresión diferencial de esta proteína en las disferlinopatías mediante 2D-E seguida de MS incluso antes de que se conociera su función en reparación de membrana muscular.

Estos resultados junto a los descritos en nuestro trabajo sugieren que TRIM72 es necesaria para el transporte de disferlina a los sitios de lesión de las células durante la formación de parches de reparación. Por ello la sobreexpresión estaría para intentar compensar la ausencia de disferlina en estos pacientes, proteína implicada en la reparación del sarcolema.

Table 1. Patients information

PATIENTS	AGE	PROGRESSION OF DISEASE	MUTATION	MUSCLE	S/F	% FIBER SLOW
Control	35	0		Soleus	63/37	63
Control	23	0		Triceps	74/26	74
Control	47	0		Triceps	44/56	44
Control	38	0		Quadriceps	49/51	49
Control	43	0		Quadriceps	33/67	33
Control	36	0		Triceps	42/58	42
LGM2B	16	1	Homozygosis: PG1628 R	Triceps	59/41	59
LGM2B	76	45	Homozygosis: R959W	Triceps	84/16	84
LGM2B	49	5	Homozygosis: R1811	Triceps	76/24	76
LGM2B	30	2	Homozygosis: E1994RfsX3	Quadriceps	44/66	44
MM	54	12	Homozygosis: R1720L	Triceps	86/14	86
MM	63	6	Heterozygosis: Mut 1: E1732X Mut 2: R2000Q	Triceps	69/31	69
LGM2A	23	5	Homozygosis: 2362AG - TCATCT (exon 22)	Triceps	17/83	17
LGM2A	23	6	Heterozygosis: Mut 1: 2362AG - TCATCT Mut 2: 802-9G>A	Triceps	51/49	51
LGM2A	30	8	Heterozygosis: Mut 1: R448C Mut 2: Q564X	Quadriceps	42/58	42
LGM2A	46	28	Homozygosis: P.(Arg490Trp) exón 11	Soleus	47/53	47
LGM2A	51	9	Heterozygosis: Mut1: P.(Arg490Trp) exón 11 Mut2: P.(Glu622GlyfsX9)	Triceps	59/41	59
LGM2A	35	5	Heterozygosis: Mut1: Lys 487_Asn488delinsAsnHis exón 11 Mut2: C.1992+1G>T exón 17	Triceps	22/78	22
FSHD	42	22	Fragment deletion of 34 kb	Triceps	23/77	23
FSHD	40	20	Fragment deletion of 34 kb	Triceps	36/64	36
FSHD	62	8	Fragment deletion of 28 kb	Triceps	22/78	22
FSHD	35	7	Fragment deletion of 34 kb	Quadriceps	38/62	38
FSHD	20	3	Fragment deletion of 15 kb	Quadriceps	47/53	47

Tabla 1. Información general de los pacientes utilizados para el estudio de perfil de expresión proteica.

Table 2. Proteins equally expressed in all the muscular dystrophies studied. Mascot search scores are shown for the top match and, in parenthesis, for the highest ranked hit to a non-homologous protein. "Matched peptides" column shows the number of peptides matching to the top-match protein and, in parenthesis, the number of unmatched peptides in the spectra.

Spot N	Identification	# acces	Mascot Score	Matched Peptides	Sequence Coverage%	Function	Control	Dysferlin-/-
22669	Fructose -biphosphate aldolase	ALDOA_HUMAN	119	15 (59)	46.8		1	0.9
23349	Phosphopyruvate hydratase (EC 4.2.1.11) beta-Human	S06756	169	23 (65)	46.3	Energy Metabolism	1	0.8
22056	Hypothetical Protein, Similarity Heat Shock Protein	Q96C20_HUMAN	88	7 (45)	35.1		1	3.5
23352	Carbonic anhydrase III (EC 4.2.1.1)	CAH3_HUMAN	114	10 (47)	37.8		1	0.9
22522	Acyl-CoA dehydrogenase(EC 1.3.99.3)	DEHUCM	79	13 (59)	32.1	Metabolism Lipidis	1	0.9
22761	Myosin light chain 1, Skeletal muscle isoform (MLCF1)	MLE1_HUMAN	113	12 (41)	45.1		1	0.3
22784	Troponin T1, Skeletal, Slow	AAH22086	88	13 (46)	24.2		1	0.6
22054	Myosin regulatory light chain 2	Q96C20_HUMAN	91	8 (44)	52.1		1	1.2
23355	Myosin light polypeptide 3	MYL3_HUMAN	97	7 (48)	38.7		1	0.3
22016	Myosin light polypeptide 3	MYL3_HUMAN	120	12 (48)	57.7	Myofibrillar Proteins	1	1.4
22166	Actin alpha, skeletal muscle	A24904	129	16 (51)	45.6		1	0.7
22271	Actin alpha, skeletal muscle	A24904	102	10 (39)	42.7		1	0.6
22772	Actin gamma, smooth muscle	ATCHSM	81	7 (44)	26.3		1	0.3
23360	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Q5T8M7	61	5 (39)	13.5		1	0.3
22113-1	Alpha-crystallin chain B	CYHUAB	94	8 (52)	42.9		1	0.8
22000	Myosin alkali light chain, slow skeletal muscle	MOHUSA	80	6 (58)	28.8	Muscle development	1	0.3
21920	protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	JH0624	87	9 (50)	43.6	Repair	1	0.8

Tabla 2 Proteínas expresadas diferencialmente del musculo control pero expresadas igual en todas las distrofias musculares estudiadas.

Table 4. Phosphorylated proteins differentially expressed in the muscular dystrophies studied

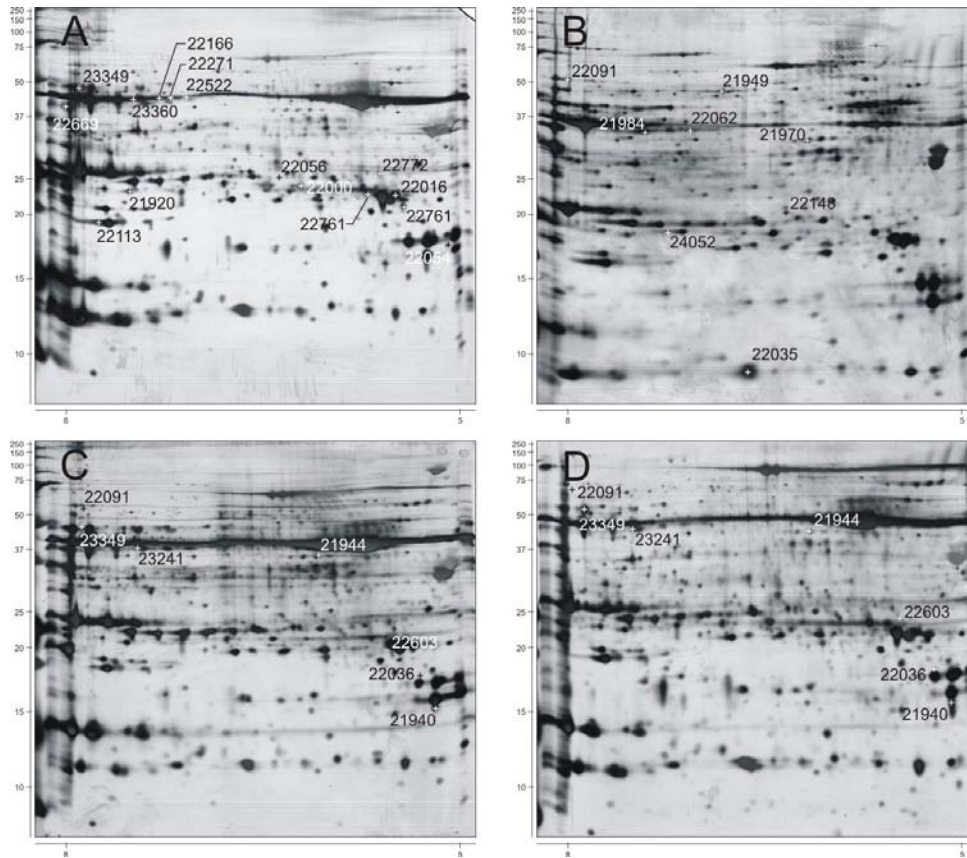
Spot N	Identification	# acces	Mascot Score	Matched Peptides	Sequence Coverage%	Fold Change			
						Control	Dysferlin -/-	Calpain -/-	FSHD
8636	Tropomyosin 2 (beta) Isoform 1	gi 339956	74	6 (19)	16	1	313.96	0.92	1.48
8635	Skeletal Muscle Tropomyosin	gi 42476296	84	6 (4)	18	1	210.45	0.92	1.48
8331	Myosin regulatory light chain 2 Isoform Fast	gi 28372499	97	8 (16)	55	1	4.57	7.76	18.52
8330	Human fast Skeletal Myosin light Chain 2	gi 34846	93	9 (20)	62	1	2.3	3.51	9.57
8328	Myosin regulatory light chain 2 Isoform Fast	MLRS_HUMAN	121	12 (13)	68	1	0.71	2.86	4.78
8326	slow Cardiac Regulatory Light Chain 2	gi 94981553	129	12 (19)	76	1	0.52	1.84	0.52
7625*	Troponin T , Slow skeletal Muscle (TnTs)	gi 339783	146	4	18	1	115.12	0.92	1.48
7624*	Troponin T , Slow skeletal Muscle (TnTs)	gi 339783	87	3	12	1	47	0.92	1.48
7571*	Troponin T , Slow skeletal Muscle (TnTs)	gi 339783	105	4	15	1	168.57	0.92	1.48
7566	Homeobox Protein TGIF2LX	TF2LY_HUMAN	63	3 (2)	20	1	1.83	0.01	0.02
7563	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1)	HSPB1_HUMAN	91	5 (8)	28	1	4.47	1.29	1.89
6549	Troponin T , Slow skeletal Muscle (TnTs)	TNNT1_HUMAN	78	5 (2)	17	1	60.43	0.92	1.48
6547	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1)	HSPB1_HUMAN	60	3 (3)	17	1	1.83	1.19	1.06
6545	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1)	HSPB1_HUMAN	88	5 (10)	28	1	4.32	0.35	1.85
6544A	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1) Mixture 1	HSPB1_HUMAN	165	10 (8)	32	1	0.69	1.94	1.15
6544B	NADH dehydrogenase ubiquinone NDUS3 Human Mixture 2	NDUS3_HUMAN	165	10 (8)	19	1	0.69	1.94	1.15

Tabla 3. Proteínas diferencialmente expresadas en pacientes con disferlinopatía

Table 3. Proteins differentially expressed in dysferlin myopathy. Mascot search scores are shown for the top match and, in parenthesis, for the highest ranked hit to a non-homologous protein. "Matched peptides" column shows the number of peptides matching to the top-match protein and, in parenthesis, the number of unmatched peptides in the spectra.

Spot N	Identification	# acces	Mascot Score	Matched Peptides	Sequence Coverage%	Function	Control	Dysferlin -/-
22148-A	6-phosphogluconolactonase	AAH14006	80	8 (29)	36.4	Energy Metabolism	1	1.6
21944	Ankyrin repeat domain 2 - Homo sapiens (Human).	Q3B778	121	11 (8)	26.1		1	2.6
21970	OTTHUMP0000059423 - Homo sapiens (Human).	Q5T458	120	9 (3)	26.1		1	2.68
22062	Actinin-associated LIM protein - Homo sapiens (Human).	O43590	134	10 (10)	36	Myofibrillar Proteins	1	4.4
23241	Actinin-associated LIM protein - Homo sapiens (Human).	O43590	85	7 (5)	22.8		1	1.75
21984	Actinin-associated LIM protein - Homo sapiens (Human).	O43590	111	12 (17)	38.5		1	1.8
22091	Myotilin (Titin -like protein)	Q9JBF9	74	10 (25)	21.9		1	3
22603	Rho-GDP-dissociation inhibitor Ly-GDI - human	A47742	91	12 (25)	69	Muscle Development	1	1.5
22029	transferrin precursor [validated] - human	TFHUP	258	36 (50)	48		1	3.1
23345	Fatty acid binding protein (holo form, human muscle) (m-fabp) - human	2HMB	104	7 (8)	49.6	Transport	1	8.56
22148-B	endoplasmic-reticulum-lumenal protein 28 - human	T09549	68	8 (21)	42.9		1	1.6
22228	Troponin T1, Skeletal , Slow	AAH22086	68	11 (15)	19.9		1	1
22036	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform (MLC-2)	MLRV_HUMAN	127	19 (38)	56	Contractile	1	1.1
21940	Myosin regulatory light chain 2	Q96A32	146	24 (62)	81.7		1	2
21949	Hypothetical protein FLJ16664/ TRIM72	Q6ZMU5	168	25 (44)	65.4	Ubiquitination	1	2.58

Tabla 4. Proteínas fosforiladas expresadas diferencialmente en las distrofias musculares estudiadas.



Leyenda de Figuras

Fig.1 Análisis proteómico comparativo mediante el uso de electroforesis bidimensional (2-D PAGE), a partir de extractos musculares del mismo músculo (tríceps) entre las distintas distrofias musculares. El isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas se realizó con tiras 17 cm tiras IPG, con un rango de pI de 4-7 . **(A)** Los músculos de controles sanos, **(B)** músculos de pacientes con disferlinopatía, **(C)** músculos de pacientes con distrofia muscular de FSH, **(D)** músculos de pacientes con calpainopatía. Después del análisis de imágenes de los geles los puntos de interés fueron identificados mediante espectrometría de masas. La numeración de los puntos se correlaciona con la lista de proteínas identificadas y que están presentes en la tabla 4.

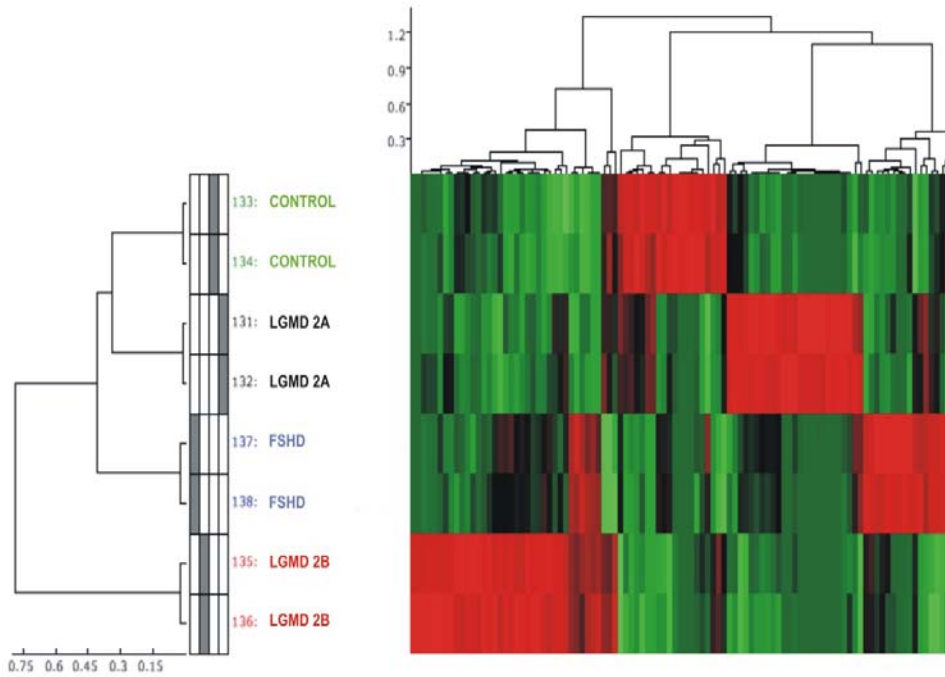


Fig 2. Análisis estadístico "Hierarchical Clustering" de agrupación jerárquica de las proteínas por homologías. Realizado en los los perfiles proteómicos de las distrofias musculares. La comparación de los perfiles proteómicos de las distintas distrofias musculares y controles sanos mostró un grupo de proteínas expresadas diferencialmente en LGMD2B. Se realizó la agrupación con los siguientes valores con el software Ludesi 2D intérprete (www.ludesi.com): extracción de proteínas método ANOVA, el número de proteínas-100, el promedio de volumen de 500 unidades, prueba de tipo tren-y-test.

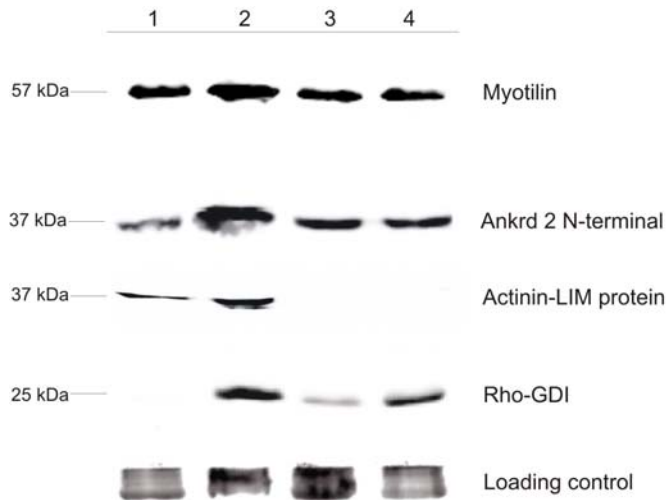


Fig 3. Validación de los patrones de expresión diferencial de proteínas observado por electroforesis bidimensional mediante "Western blot". En todas las muestra del homogenizado de músculo (tríceps) se cargo la misma concentración de proteínas (1) control, (2) LGMD2B, (3) FSHD, (4) LGMD2A.

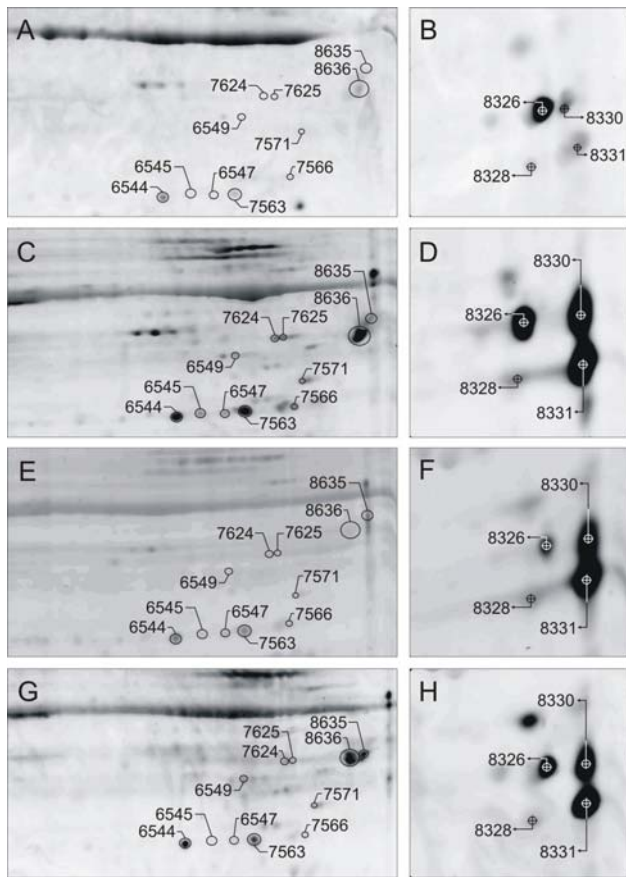


Fig. 4. Perfil de análisis comparativo de proteínas fosforiladas mediante técnicas de electroforesis bidimensional seguida de la tinción específica para proteínas fosforiladas (Pro-Q diamon). (AB) representante de geles 2-D de los controles sanos, (CD) LGMD2B, (EF) FSHDy (GH) LGMD2A. Los resultados se muestran en la tabla 3.

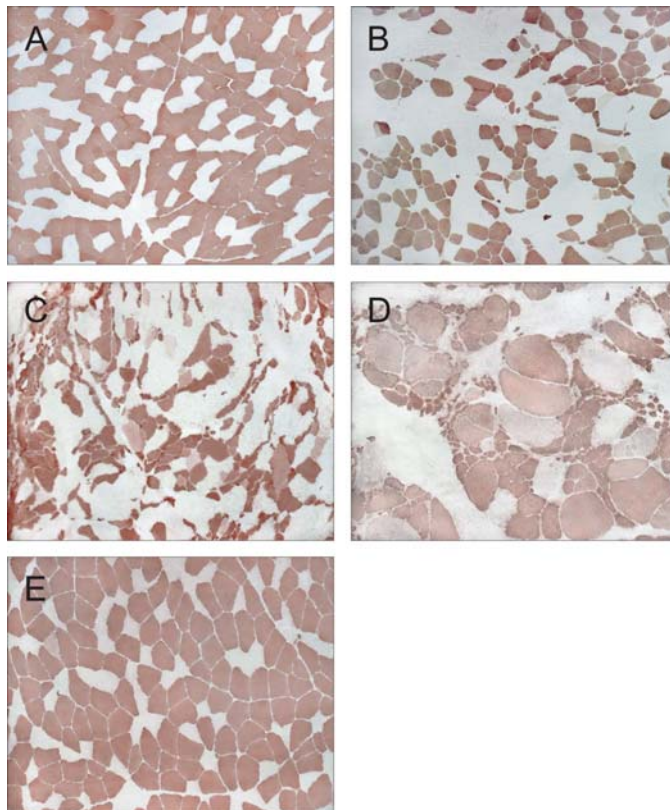


Fig. 5. Análisis inmunohistoquímico de las isoformas de la miosina rápidas y lentas de cadena ligera, en diferentes distrofias musculares. (A) de control sanos, (B) LGMD2B (22 años de evolución), (C) LGMD2B (5 progresión años), (D) FSHD (22 años de evolución) (E) LGMD2A (progresión de 5 años). El porcentaje de fibras lentas (la luz) es mayor en pacientes con LGMD2B (B y C) en comparación con el control (A) y FSH (D) y LGMD2A (E)

8. Discusión Global

El estudio de las enfermedades neuromusculares es complejo dada la gran variedad de estas patologías. Todas las herramientas que puedan implementarse para su estudio son un paso importante para poder abordar los mecanismos patogénicos involucrados en ellas. Esta tesis doctoral muestra como el estudio del perfil de expresión proteico mediante la aplicación de técnicas de proteómica tiene utilidad en el estudio de las enfermedades neuromusculares. Los resultados de este trabajo han aportado nuevos datos sobre la patogenia de estas enfermedades, su utilidad en el diagnóstico con la identificación de biomarcadores así como los cambios producidos en el proteoma tras una intervención terapéutica. Es importante tener en cuenta que este trabajo se ha realizado en su totalidad con muestras humanas. Este hecho de por sí ya importante tiene un valor añadido en este tipo de enfermedades clasificadas como raras por su baja frecuencia. A esto hemos de añadir que para dar robustez a los resultados se ha intentado trabajar siempre con muestras que fueran de pacientes de edades similares, del mismo sexo y en la medida de lo posible con una evolución de la enfermedad similar. Por tanto, la tarea de recolección de las muestras ha sido clave para obtener resultados interesantes en los trabajos que se recogen en esta tesis.

Desde el inicio de esta tesis la tecnología proteómica ha evolucionado de forma vertiginosa con la implementación de nuevas técnicas de cuantificación masiva de proteínas (ICAT, iTRAQ, SILAC, etc). Es por ello que algunas de las aproximaciones abordadas en esta tesis, en el día de hoy se realizarían de forma distinta, aunque no por ello restan en absoluto validez a lo que aquí se muestra. Por otra parte, la utilización de geles bidimensionales combinados con técnicas de Western-Blot sigue siendo utilizada en la actualidad tanto en nuestro laboratorio, para la identificación de nuevos autoantígenos en patología neuromuscular inmunomediada, como en otros laboratorios para la identificación, por ejemplo, de nuevos alérgenos.

9. Conclusiones

Artículo I

El aumento de la tasa de proliferación de los fibroblastos, de forma independiente al efecto de factores séricos, es clave en la patogenia del escleromixedema y puede ser revertida de manera prolongada, mediante el tratamiento con BEAM (BCNU, etopósido, citarabina (Ara-C) y melfalán) y un trasplante de células madres autólogas (ASCT).

Artículo II

El diagnóstico clínico y electrofisiológico preciso, en combinación con la electroforesis bidimensional y posterior “*Western blot*”, puede ser un método útil para detectar antígenos diana en pacientes con neuropatía periférica con banda monoclonal.

Artículo III

Nuestros resultados sugieren que en las disferlinopatías: 1) El músculo esquelético sufre un proceso activo de conversión de fibras a tipo I (contracción lenta) a lo largo de la progresión de la enfermedad que puede constituir un mecanismo de protección frente a las lesiones del sarcolema durante la contracción muscular y 2) Se observa una desregulación de la expresión de proteínas implicadas en las vías de diferenciación muscular.

10. Referencias

1. Simpson DC, Smith RD. Combining capillary electrophoresis with mass spectrometry for applications in proteomics. *Electrophoresis*. 2005;26(7-8):1291-305.
2. Issaq HJ, Conrads TP, Janini GM, Veenstra TD. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis*. 2002;23(17):3048-61.
3. Lubec G, Krapfenbauer K, Fountoulakis M. Proteomics in brain research: potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2003;69(3):193-211.
4. Lescuyer P, Hochstrasser D, Rabilloud T. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery? *J Proteome Res*. 2007;6(9):3371-6.
5. Righetti PG, Castagna A, Herbert B. Prefractionation techniques in proteome analysis. *Anal Chem*. 2001;73(11):320A-6A.
6. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
7. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:437-73.
8. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291(5507):1304-51.
9. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
10. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(11):845-67.
11. Abbott A. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. *Nature*. 1999;402(6763):715-20.
12. Graveley BR. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world. *Trends Genet*. 2001;17(2):100-7.
13. Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*. 2003;21(3):255-61.
14. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 2004;8(1):33-41.
15. Archakov AI, Ivanov YD, Lisitsa AV, Zgoda VG. AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*. 2007;7(1):4-9.

16. Marcotte EM, Pellegrini M, Ng HL, Rice DW, Yeates TO, Eisenberg D. Detecting protein function and protein-protein interactions from genome sequences. *Science*. 1999;285(5428):751-3.
17. Schwikowski B, Uetz P, Fields S. A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat Biotechnol*. 2000;18(12):1257-61.
18. Bork P. Comparative analysis of protein interaction networks. *Bioinformatics*. 2002;18 Suppl 2:S64.
19. Chou KC. Progress in protein structural class prediction and its impact to bioinformatics and proteomics. *Curr Protein Pept Sci*. 2005;6(5):423-36.
20. Yee AA, Savchenko A, Ignachenko A, Lukin J, Xu X, Skarina T et al. NMR and X-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins. *J Am Chem Soc*. 2005;127(47):16512-7.
21. Shin J, Lee W. Structural proteomics by NMR spectroscopy. *Expert Rev Proteomics*. 2008;5(4):589-601.
22. Benesch JL, Ruotolo BT, Simmons DA, Robinson CV. Protein complexes in the gas phase: technology for structural genomics and proteomics. *Chem Rev*. 2007;107(8):3544-67.
23. Downard KM. Ions of the interactome: the role of MS in the study of protein interactions in proteomics and structural biology. *Proteomics*. 2006;6(20):5374-84.
24. Sihlbom C, Davidsson P, Nilsson CL. Prefractionation of cerebrospinal fluid to enhance glycoprotein concentration prior to structural determination with FT-ICR mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2005;4(6):2294-301.
25. Meng F, Forbes AJ, Miller LM, Kelleher NL. Detection and localization of protein modifications by high resolution tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 2005;24(2):126-34.
26. Corthals GL, Aebersold R, Goodlett DR. Identification of phosphorylation sites using microimmobilized metal affinity chromatography. *Methods Enzymol*. 2005;405:66-81.
27. Pasquali C, Fialka I, Huber LA. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;722(1-2):89-102.
28. Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*. 2003;426(6966):570-4.

29. Josic D, Clifton JG, Kovac S, Hixson DC. Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies. *Curr Opin Mol Ther.* 2008;10(2):116-23.
30. Steel LF, Trotter MG, Nakajima PB, Mattu TS, Gonye G, Block T. Efficient and specific removal of albumin from human serum samples. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2(4):262-70.
31. Foster LJ, de Hoog CL, Zhang Y, Zhang Y, Xie X, Mootha VK et al. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell.* 2006;125(1):187-99.
32. Kenrick KG, Margolis J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal Biochem.* 1970;33(1):204-7.
33. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975;26(3):231-43.
34. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975;250(10):4007-21.
35. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 2000;21(6):1037-53.
36. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(17):9390-5.
37. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R et al. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods.* 1982;6(4):317-39.
38. Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 1988;9(9):531-46.
39. Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005;382(3):669-78.
40. Patton WF. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis.* 2000;21(6):1123-44.
41. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4.

42. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 1984;10(3-4):203-9.
43. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4(12):3665-85.
44. Palagi PM, Hernandez P, Walther D, Appel RD. Proteome informatics I: bioinformatics tools for processing experimental data. *Proteomics*. 2006;6(20):5435-44.
45. Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E. Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis*. 2005;26(2):297-319.
46. Griffin TJ, Goodlett DR, Aebersold R. Advances in proteome analysis by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol*. 2001;12(6):607-12.
47. Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther*. 2002;4(3):242-50.
48. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999;17(10):994-9.
49. Gan CS, Chong PK, Pham TK, Wright PC. Technical, experimental, and biological variations in isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ). *J Proteome Res*. 2007;6(2):821-7.
50. Wiese S, Reidegeld KA, Meyer HE, Warscheid B. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 2007;7(3):340-50.
51. Kim YH, Cho K, Yun SH, Kim JY, Kwon KH, Yoo JS et al. Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT 2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis. *Proteomics*. 2006;6(4):1301-18.
52. Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics*. 2003;3(5):616-26.
53. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.

54. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
55. Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem*. 2000;72(6):1156-62.
56. Elliott MH, Smith DS, Parker CE, Borchers C. Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom*. 2009;44(12):1637-60.
57. Staack RF, Varesio E, Hopfgartner G. The combination of liquid chromatography/tandem mass spectrometry and chip-based infusion for improved screening and characterization of drug metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19(5):618-26. doi:10.1002/rcm.1829.
58. Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem*. 2007;389(4):1017-31.
59. Ong SE, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*. 2005;1(5):252-62.
60. Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A et al. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(5):376-86.
61. Pan S, Aebersold R, Chen R, Rush J, Goodlett DR, McIntosh MW et al. Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J Proteome Res*. 2009;8(2):787-97.
62. Zhang B, VerBerkmoes NC, Langston MA, Uberbacher E, Hettich RL, Samatova NF. Detecting differential and correlated protein expression in label-free shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2006;5(11):2909-18.
63. Poon HF, Castegna A, Farr SA, Thongboonkerd V, Lynn BC, Banks WA et al. Quantitative proteomics analysis of specific protein expression and oxidative modification in aged senescence-accelerated-prone 8 mice brain. *Neuroscience*. 2004;126(4):915-26.
64. Mazzanti R, Solazzo M, Fantappie O, Elfering S, Pantaleo P, Bechi P et al. Differential expression proteomics of human colon cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290(6):G1329-38.
65. Yang X, Lazar IM. MRM screening/biomarker discovery with linear ion trap MS: a library of human cancer-specific peptides. *BMC Cancer*. 2009;9:96.

66. Metodieva G, Greenwood C, Alldridge L, Sauven P, Metodiev M. A peptide-centric approach to breast cancer biomarker discovery utilizing label-free multiple reaction monitoring mass spectrometry. *Proteomics Clin Appl.* 2009;3(1):78-82.
67. Ahrens CH, Brunner E, Qeli E, Basler K, Aebersold R. Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol.*11(11):789-801.
68. Aragonés JM, Bolibar I, Bonfill X, Bufill E, Mummany A, Alonso F et al. Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology.* 2003;60(6):1024-6.
69. Makowska A, Pritchard J, Sanvito L, Gregson N, Peakman M, Hayday A et al. Immune responses to myelin proteins in Guillain-Barre syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79(6):664-71. doi:jnnp.2007.123943 [pii] 10.1136/jnnp.2007.123943.
70. Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78(4):419-22. doi:jnnp.2006.106617 [pii] 10.1136/jnnp.2006.106617.
71. Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, Meucci N, Monaco S, Ferrari S et al. Frequency and clinical correlates of anti-neural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol.* 1994;36(3):416-24. doi:10.1002/ana.410360313.
72. Willison HJ, Yuki N. Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies. *Brain.* 2002;125(Pt 12):2591-625.
73. Amato AA, Griggs RC. Overview of the muscular dystrophies. *Handb Clin Neurol.*101:1-9.
74. Richard I, Beckmann JS. How neutral are synonymous codon mutations? *Nat Genet.* 1995;10(3):259. doi:10.1038/ng0795-259.
75. Gallardo E, Saenz A, Illa I. Limb-girdle muscular dystrophy 2A. *Handb Clin Neurol.* 2011;101:97-110.
76. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, Angelini C et al. Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1998;20(1):31-6.
77. Bansal D, Campbell KP. Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol.* 2004;14(4):206-13. doi:10.1016/j.tcb.2004.03.001 S0962892404000546 [pii].

78. de Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, de la Torre C, Rojas-Garcia R et al. Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem.* 2006;281(25):17092-8. doi:M601885200 [pii]10.1074/jbc.M601885200.
79. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, Brown Jr RH. A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol.* 2002;51(1):129-33.
80. Nagaraju K, Rawat R, Veszelovszky E, Thapliyal R, Kesari A, Sparks S et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol.* 2008;172(3):774-85. doi:S0002-9440(10)61839-1 [pii] 10.2353/ajpath.2008.070327.
81. Norwood F, de Visser M, Eymard B, Lochmuller H, Bushby K. EFNS guideline on diagnosis and management of limb girdle muscular dystrophies. *Eur J Neurol.* 2007;14(12):1305-12. doi:ENE1979 [pii] 10.1111/j.1468-1331.2007.01979.x.
82. De Palma S, Morandi L, Mariani E, Begum S, Cerretelli P, Wait R et al. Proteomic investigation of the molecular pathophysiology of dysferlinopathy. *Proteomics.* 2006;6(1):379-85.
83. Orrell RW. Facioscapulohumeral dystrophy and scapulooperoneal syndromes. *Handb Clin Neurol.*101:167-80.
84. Anderson LV, Davison K, Moss JA, Young C, Cullen MJ, Walsh J et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):855-61. doi:ddc087 [pii].
85. Gallardo E, Rojas-Garcia R, de Luna N, Pou A, Brown RH, Jr., Illa I. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology.* 2001;57(11):2136-8.
86. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, Ivanova S et al. Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet.* 1999;23(2):141-2. doi:10.1038/13770.
87. Arahata K, Ishihara T, Fukunaga H, Orimo S, Lee JH, Goto K et al. Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve.* 1995;2:S56-66.
88. Arahata K, Engel AG. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Ann Neurol.* 1988;23(2):168-73. doi:10.1002/ana.410230210.

89. Krahn M, Lopez de Munain A, Streichenberger N, Bernard R, Pecheux C, Testard H et al. CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann Neurol*. 2006;59(6):905-11. doi:10.1002/ana.20833.
90. Pomann JJ, Rudner EJ. Scleromyxedema revisited. *Int J Dermatol*. 2003;42(1):31-5.
91. Catala J, Lopez-Aldeguer J, Vilchez JJ, Chirivella M, Catala MT. [Scleromyxedema associated with myopathy]. *Rev Clin Esp*. 1993;193(3):119-21.
92. Berger JR, Dobbs MR, Terhune MH, Maragos WF. The neurologic complications of scleromyxedema. *Medicine (Baltimore)*. 2001;80(5):313-9.
93. Harris RB, Perry HO, Kyle RA, Winkelmann RK. Treatment of scleromyxedema with melphalan. *Arch Dermatol*. 1979;115(3):295-9.
94. Feasel AM, Donato ML, Duvic M. Complete remission of scleromyxedema following autologous stem cell transplantation. *Arch Dermatol*. 2001;137(8):1071-2.
95. Donato ML, Feasel AM, Weber DM, Prieto VG, Giralt SA, Champlin RE et al. Scleromyxedema: role of high-dose melphalan with autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2006;107(2):463-6.
96. Lacy MQ, Hogan WJ, Gertz MA, Dispenzieri A, Rajkumar SV, Hayman S et al. Successful treatment of scleromyxedema with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Arch Dermatol*. 2005;141(10):1277-82.
97. Buller AJ, Eccles JC, Eccles RM. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hind limb. *J Physiol*. 1960;150:399-416.
98. Pette D, Wimmer M, Nemeth P. Do enzyme activities vary along muscle fibres? *Histochemistry*. 1980;67(3):225-31.
99. Pette D. Historical Perspectives: plasticity of mammalian skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2001;90(3):1119-24.
100. Gelfi C, Vasso M, Cerretelli P. Diversity of human skeletal muscle in health and disease: contribution of proteomics. *J Proteomics*. 2011;74(6):774-95.
101. Hojlund K, Yi Z, Hwang H, Bowen B, Lefort N, Flynn CR et al. Characterization of the human skeletal muscle proteome by one-dimensional gel electrophoresis and HPLC-ESI-MS/MS. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(2):257-67.
102. Parker KC, Walsh RJ, Salajegheh M, Amato AA, Krastins B, Sarracino DA et al. Characterization of human skeletal muscle biopsy samples using shotgun proteomics. *J Proteome Res*. 2009;8(7):3265-77.
103. Frank D, Kuhn C, Katus HA, Frey N. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(6):446-68.

104. Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity. *Physiology (Bethesda)*. 2007;22:269-78.
105. Guttridge DC. Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004;7(4):443-50.
106. Hojlund K, Bowen BP, Hwang H, Flynn CR, Madireddy L, Geetha T et al. In vivo phosphoproteome of human skeletal muscle revealed by phosphopeptide enrichment and HPLC-ESI-MS/MS. *J Proteome Res*. 2009;8(11):4954-65.
107. Lefort N, Yi Z, Bowen B, Glancy B, De Filippis EA, Mapes R et al. Proteome profile of functional mitochondria from human skeletal muscle using one-dimensional gel electrophoresis and HPLC-ESI-MS/MS. *J Proteomics*. 2009;72(6):1046-60.
108. Zhao X, Leon IR, Bak S, Mogensen M, Wrzesinski K, Hojlund K et al. Phosphoproteome analysis of functional mitochondria isolated from resting human muscle reveals extensive phosphorylation of inner membrane protein complexes and enzymes. *Mol Cell Proteomics*. 10(1):M110 000299.
109. Doran P, Martin G, Dowling P, Jockusch H, Ohlendieck K. Proteome analysis of the dystrophin-deficient MDX diaphragm reveals a drastic increase in the heat shock protein α HSP. *Proteomics*. 2006;6(16):4610-21.
110. Cenacchi G, Fanin M, De Giorgi LB, Angelini C. Ultrastructural changes in dysferlinopathy support defective membrane repair mechanism. *J Clin Pathol*. 2005;58(2):190-5.
111. Lemmers RJ, van der Vliet PJ, Klooster R, Sacconi S, Camano P, Dauwerse JG et al. A unifying genetic model for facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Science*. 329(5999):1650-3.
112. van der Maarel SM, Tawil R, Tapscott SJ. Facioscapulohumeral muscular dystrophy and DUX4: breaking the silence. *Trends Mol Med*. 2011;17(5):252-8. doi:S1471-4914(11)00002-5 [pii] 10.1016/j.molmed.2011.01.001.
113. Laoudj-Chenivesse D, Carnac G, Bisbal C, Hugon G, Bouillot S, Desnuelle C et al. Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle. *J Mol Med (Berl)*. 2005;83(3):216-24.
114. Celegato B, Capitanio D, Pescatori M, Romualdi C, Pacchioni B, Cagnin S et al. Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics*. 2006;6(19):5303-21.

115. Saneyoshi T, Kume S, Amasaki Y, Mikoshiba K. The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature*. 2002;417(6886):295-9.
116. Hosoda T, Monzen K, Hiroi Y, Oka T, Takimoto E, Yazaki Y et al. A novel myocyte-specific gene Midori promotes the differentiation of P19CL6 cells into cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2001;276(38):35978-89.
117. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, Hwang M et al. MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol*. 2009;11(1):56-64.
118. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Pan Z, Nishi M, Komazaki S et al. MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells. *J Biol Chem*. 2009;284(5):3314-22.

Referencias (Artículo I)

1. Feasel AM, Donato ML, Duvic M. Complete remission of scleromyxedema following autologous stem cell transplantation. *Arch Dermatol*. 2001; 137:1071-1072.
2. Lacy MQ, Hogan WJ, Gertz MA, et al. Successful treatment of scleromyxedema with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Arch Dermatol*. 2005;141:1277-1282.
3. Donato ML, FeaselAM,Weber DM, et al. Scleromyxedema: role of high-dose melphalan with autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2006;107:463-466.
4. Ferrarini M, Helfrich DJ, Walker ER, Medsger TA Jr, Whiteside TL. Scleromyxedema serum increases proliferation but not the glycosaminoglycan synthesis of dermal fibroblasts. *J Rheumatol*. 1989;16:837-841.
5. Harper RA, Rispler J. Lichen myxedematosus serum stimulates human skin fibroblast proliferation. *Science*. 1978;199:545-547.
6. Safford SE, Oberley TD, UranoM, St Clair DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 1994;54:4261-4265.
7. Frank S, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J*. 2000;346: 719-728.

8. Rowlands DC, Williams A, Jones NA, et al. Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Lab Invest.* 1995;72:100-113.
9. Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1359:97-109.
10. Mitchell RA. Mechanisms and effectors of MIFdependent promotion of tumourigenesis. *Cell Signal.* 2004;16:13-19.

Referencias (Artículo II)

1. American Academy of Neurology. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Report from an Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology* 1991;41:617– 618.
2. Berger AR, Herskovitz S, Kaplan J. Late motor involvement in cases presenting as “chronic sensory demyelinating polyneuropathy.” *Muscle Nerve* 1995;18:440–444.
3. Camdessanche JP, Antoine JC, Honnorat J, Vial C, Petiot P, Convers P, et al. Paraneoplastic peripheral neuropathy associated with anti-Hu antibodies. A clinical and electrophysiological study of 20 patients. *Brain* 2002;125:166 –175.
4. Chin RL, Latov N, Sander HW, Hays AP, Croul SE, Magda P, et al. Sensory CIDP presenting as cryptogenic sensory polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2004;9:132–137.
5. Citak KA, Dickoff DJ, Simpson DM. Progressive sensory radiculopathy responsive to corticosteroid therapy. *Muscle Nerve* 1993;16:679–680.
6. Cocito D, Durelli L, Isoardo G. Different clinical, electrophysiological and immunological features of CIDP associated with paraproteinaemia. *Acta Neurol Scand* 2003;108:274 –280.
7. Cros D, Chiappa KH, Patel S, Gominak S. Acquired pure sensory demyelinating polyneuropathy: a chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy variant? *Ann Neurol* 1992;32:280.
8. Dalakas MC, Illa I, Gallardo E, Juarez C. Inclusion body myositis and paraproteinemia: incidence and immunopathologic correlations. *Ann Neurol* 1997;41:100 –104.

9. Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Balt)* 1992;71:59–72.
10. Fraser JL, Olney RK. The relative diagnostic sensitivity of different F-wave parameters in various polyneuropathies. *Muscle Nerve* 1992;15:912–918.
11. Griffin JW, Cornblath DR, Alexander E, Campbell J, Low PA, Bird S, et al. Ataxic sensory neuropathy and dorsal root ganglionitis associated with Sjogren's syndrome. *Ann Neurol* 1990;27:304–315.
12. Hughes RA, Bouche P, Cornblath DR, Evers E, Hadden RD, Hahn A, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2006;13:326–332.
13. Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, Fishman PH, Brady RO. Monoclonal IgM in a patient with paraproteinemic polyneuropathy binds to gangliosides containing disialosyl groups. *Ann Neurol* 1985;18:655–659.
14. Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006.
15. Katz JS, Saperstein DS, Gronseth G, Amato AA, Barohn RJ. Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy. *Neurology* 2000;54:615–620.
16. Kelly JJ, Karcher DS. Lymphoma and peripheral neuropathy: a clinical review. *Muscle Nerve* 2005;31:301–313.
17. Khalili-Shirazi A, Atkinson P, Gregson N, Hughes RA. Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre' syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1993;46:245–251.
18. Kiers L, Clouston P, Zuniga G, Cros D. Quantitative studies of F responses in Guillain-Barre' syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994;93:255–264.
19. Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, et al. Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barre' syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:191–195.

20. Malinow K, Yannakakis GD, Glusman SM, Edlow DW, Griffin J, Pestronk A, et al. Subacute sensory neuropathy secondary to dorsal root ganglionitis in primary Sjogren's syndrome. *Ann Neurol* 1986;20:535–537.
21. Mills KR, Murray NM. Proximal conduction block in early Guillain–Barre' syndrome. *Lancet* 1985;2:659.
22. Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, Meucci N, Monaco S, Ferrari S, et al. Frequency and clinical correlates of antineural IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol* 1994;36:416–424.
23. Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki T, Sato K, et al. Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett* 2002;528:197–202.
24. Oh SJ, Joy JL, Kuruoglu R. "Chronic sensory demyelinating neuropathy": chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting as a pure sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:677–680.
25. Ohkoshi N, Harada K, Nagata H, Yato M, Shoji S. Ataxic form of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: clinical features and pathological study of the sural nerves. *Eur Neurol* 2001;45:241–248.
26. Olney RK, Aminoff MJ. Electrodiagnostic features of the Guillain–Barre' syndrome: the relative sensitivity of different techniques. *Neurology* 1990;40:471–475.
27. Ropper AH, Wijdicks EF, Shahani BT. Electrodiagnostic abnormalities in 113 consecutive patients with Guillain–Barre' syndrome. *Arch Neurol* 1990;47:881–887.
28. Saperstein DS, Katz JS, Amato AA, Barohn RJ. Clinical spectrum of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Muscle Nerve* 2001;24:311–324.
29. Simmons Z, Tivakaran S. Acquired demyelinating polyneuropathy presenting as a pure clinical sensory syndrome. *Muscle Nerve* 1996;19:1174–1176.
30. Sinnreich M, Klein CJ, Daube JR, Engelstad J, Spinner RJ, Dyck PJ. Chronic immune sensory polyradiculopathy: a possibly treatable sensory ataxia. *Neurology* 2004;63:1662–1669.
31. Van den Bergh PY, Pieret F. Electrodiagnostic criteria for acute and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 2004;29:565–574.
32. van Dijk GW, Notermans NC, Franssen H, Wokke JH. Development of weakness in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and only sensory symptoms at presentation: a long-term follow-up study. *J Neurol* 1999;246: 1134–1139.

33. Willison HJ, O'Hanlon GM, Paterson G, Veitch J, Wilson G, Roberts M, et al. A somatically mutated human antiganglioside IgM antibody that induces experimental neuropathy in mice is encoded by the variable region heavy chain gene, V1-18. *J Clin Invest* 1996;97:1155-1164.
34. Willison HJ, Veitch J, Swan AV, Baumann N, Comi G, Gregson NA, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur J Neurol* 1999;6:71-77.
35. Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, Blumhardt LD, Busby M, Donaghy M, et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 2001;124:1968-1977.

Referencias (Artículo III)

- [1] Turk, R., Sterrenburg, E., van der Wees, C. G., de Meijer, E. J., et al., Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. *Faseb J* 2006, 20, 127-129.
- [2] Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., et al., Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 1998, 20, 31-36.
- [3] Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., et al., A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998, 20, 37-42.
- [4] Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., et al., Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 2001, 49, 130-134.
- [5] Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., et al., Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003, 423, 168-172.
- [6] De Palma, S., Morandi, L., Mariani, E., Begum, S., et al., Proteomic investigation of the molecular pathophysiology of dysferlinopathy. *Proteomics* 2006, 6, 379-385.
- [7] Laoudj-Chenivesse, D., Carnac, G., Bisbal, C., Hugon, G., et al., Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulohumeral muscular dystrophy muscle. *J Mol Med* 2005, 83, 216-224.

- [8] Celegato, B., Capitanio, D., Pescatori, M., Romualdi, C., et al., Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics* 2006, 6, 5303-5321.
- [9] Gallardo, E., Rojas-Garcia, R., de Luna, N., Pou, A., et al., Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 2001, 57, 2136-2138.
- [10] Anderson, L. V., Harrison, R. M., Pogue, R., Vafiadaki, E., et al., Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 2000, 10, 553-559.
- [11] Arahata, K., Ishihara, T., Fukunaga, H., Orimo, S., et al., Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve* 1995, 2, S56-66.
- [12] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996, 68, 850-858.
- [13] Rappsilber, J., Friesen, W. J., Paushkin, S., Dreyfuss, G., Mann, M., Detection of arginine dimethylated peptides by parallel precursor ion scanning mass spectrometry in positive ion mode. *Anal Chem* 2003, 75, 3107-3114.
- [14] Gallardo, E., de Andres, I., Illa, I., Cathepsins are upregulated by IFN-gamma/STAT1 in human muscle culture: a possible active factor in dermatomyositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001, 60, 847-855.
- [15] Salmikangas, P., van der Ven, P. F., Lalowski, M., Taivainen, A., et al., Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum Mol Genet* 2003, 12, 189-203.
- [16] Xia, H., Winokur, S. T., Kuo, W. L., Altherr, M. R., Bredt, D. S., Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. *J Cell Biol* 1997, 139, 507-515.
- [17] Fardeau, M., Hillaire, D., Mignard, C., Feingold, N., et al., Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996, 119 (Pt 1), 295-308.
- [18] Kim, Y., Chang, S., Modulation of actomyosin contractility by myosin light chain phosphorylation/dephosphorylation through Rho GTPases signaling specifies axon formation in neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 318, 579-587.

- [19] Fanin, M., Angelini, C., Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2002, 28, 461-470.
- [20] McKoy, G., Hou, Y., Yang, S. Y., Vega Avelaira, D., et al., Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J Appl Physiol* 2005, 98, 2337-2343; discussion 2320.
- [21] Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R., Scordilis, S. P., Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 2003, 178, 61-72.
- [22] Donoghue, P., Doran, P., Dowling, P., Ohlendieck, K., Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. *Biochim Biophys Acta* 2005, 1752, 166-176.
- [23] Vijayan, K., Thompson, J. L., Norenberg, K. M., Fitts, R. H., Riley, D. A., Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *J Appl Physiol* 2001, 90, 770-776.
- [24] Hennig, R., Lomo, T., Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 1985, 314, 164-166.
- [25] Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K., et al., Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2004, 2, e294.
- [26] Wang, J. F., Forst, J., Schroder, S., Schroder, J. M., Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 1999, 9, 150-158.
- [27] Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P., Blau, H. M., Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1988, 52, 503-513.
- [28] Dubowitz, V., *Muscle Biopsy. A Practical Approach*, Baillière Tindall, London 1985.
- [29] Thompson, L. V., Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. *Phys Ther* 1994, 74, 71-81.
- [30] von Nandelstadh, P., Gronholm, M., Moza, M., Lamberg, A., et al., Actin-organising properties of the muscular dystrophy protein myotilin. *Exp Cell Res* 2005, 310, 131-139.
- [31] Thornell, L. E., Carlsson, E., Kugelberg, E., Grove, B. K., Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am J Physiol* 1987, 253, C456-468.

- [32] Takano, H., Komuro, I., Oka, T., Shiojima, I., et al., The Rho family G proteins play a critical role in muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 1998, 18, 1580-1589.
- [33] de Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R., et al., Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem* 2006, 281, 17092-17098.
- [34] Pomies, P., Pashmforoush, M., Vegezzi, C., Chien, K. R., et al., The cytoskeleton-associated PDZ-LIM protein, ALP, acts on serum response factor activity to regulate muscle differentiation. *Mol Biol Cell* 2007, 18, 1723-1733.
- [35] Kudryashova, E., Kudryashov, D., Kramerova, I., Spencer, M. J., Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J Mol Biol* 2005, 354, 413-424.
- [36] Frosk, P., Weiler, T., Nylén, E., Sudha, T., et al., Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* 2002, 70, 663-672.

11. Publicaciones

Steady remission of scleromyxedema 3 years after autologous stem cell transplantation: an in vivo and in vitro study

Table 1. Histochemical analysis (NSE) and FISH of LTCs from 9 patients with MDS

Patient no.	MDS marker chromosome	% FISH false positive, Mean +3 SD	Long-term marrow cultures	
			% NSE ⁺ cells	% FISH ⁺ cells
1	5q-	3.8	0.9	0.5
2	5q-	3.8	0.0	2.3
3	5q-	3.8	0.5	4.1
4	-7	3.5	5.4	1.5
5	7q-	5.7	7.8	2.5
6	7q-	5.7	4.4	2.0
7	+8	2.1	0.4	6.5
8	+8	2.1	0.8	0.5
9	5q-	3.8	1.4	1.0
	-7	3.5	1.4	5.0

The cytogenetic marker specific for the MDS clone from each of 9 patients is listed together with the false-positive rate for the probe used to label that chromosome marker. Each of these background levels was determined with cells from 6 healthy individuals. The macrophage component of the LTC was estimated by the percentage of NSE-positive cells. A previous study showed that NSE is comparable to labeling with CD14 or CD45 for detecting the macrophage component of LTC.⁵ The data indicate that, with the exception of patient no. 7, the percentage of LTC cells derived from the MDS clone can be accounted for by the combination of macrophages and background levels of the FISH probe. In patient no. 7, we noted an unusual retention of myelocytes in the LTC, which explains the higher percentage of clonally marked cells.

this issue directly, we analyzed LTCs established from 9 patients with MDSs. LTCs were cultured for 6 to 9 weeks before cells were harvested and cytocentrifuged onto glass slides. The percentage of macrophages was determined by staining with NSE. FISH was then performed on duplicate slides to determine the percentage of clonally marked cells. In every case except 1, the percent of clonally marked cells in the LTCs did not exceed that which could be accounted for by the combination of macrophages and background levels for FISH (Table 1). In case no. 7, we noted an unusual retention of myelocytes in the LTC, which probably contributed to the increased percentage of clonally marked cells

noted in this patient. These data strongly suggest that stromal cells are not part of the malignant clone in MDSs and support our previous conclusion that stromal cells and hematopoietic cells are not derived from a common marrow-derived adult stem cell.

Aravind Ramakrishnan, Norihiro Awaya, Eileen Bryant, and Beverly Torok-Storb

Correspondence: Beverly Torok-Storb, Fred Hutchinson Cancer Research Center, 1100 Fairview Ave N, Seattle, WA 98109; e-mail: btorokst@fhcrc.org.

Supported in part by T32 CA09515 (AR), ROI HL62923, and ROI HL69144.

References

- Flores-Figueroa E, Arana-Trejo RM, Gutierrez-Espindola G, Perez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*. 2005;29:215-224.
- Soenen-Cornu V, Tourino C, Bonnet ML, et al. Mesenchymal cells generated from patients with myelodysplastic syndromes are devoid of chromosomal clonal markers and support short- and long-term hematopoiesis in vitro. *Oncogene*. 2005;24:2441-2448.
- Alvi S, Shafer A, Shetty V, et al. Successful establishment of long-term bone marrow cultures in 103 patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2001;25:941-954.
- Simmons PJ, Przepiora D, Thomas ED, Torok-Storb B. Host origin of marrow stromal cells following allogeneic bone marrow transplantation. *Nature*. 1987;328:429-432.
- Awaya N, Rupert K, Bryant E, Torok-Storb B. Failure of adult marrow-derived stem cells to generate marrow stroma after successful hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 2002;30:937-942.

To the editor:

Steady remission of scleromyxedema 3 years after autologous stem cell transplantation: an in vivo and in vitro study

We successfully treated a 66-year-old patient with life-threatening scleromyxedema and an immunoglobulin G (IgG) lambda monoclonal spike with the BEAM regimen (BCNU, etoposide, cytarabine [Ara-C], and melphalan) and autologous stem cell transplantation (ASCT). Six months later, he had fully recovered, and at 3 years he is still asymptomatic without any other treatment, while the IgG lambda monoclonal spike is still detectable.

ASCT following treatment with high-dose melphalan alone appeared effective in 3 previous reports,¹⁻³ although in several cases, skin lesions relapsed and had to be retreated with melphalan.

To understand the mechanisms involved in the impressive steady remission of our patient, we performed an in vitro study using the patient's fibroblasts before and after treatment. The assays demonstrated abnormal proliferation of fibroblasts before ASCT (8879 ± 398 [SD] counts per minute [cpm]) independently of soluble factors or immunoglobulins. Importantly, proliferation normalized to rates similar to that of

controls (2853 ± 398 cpm) in the fibroblasts from a skin biopsy after ASCT (856 ± 90 cpm). We also incubated pre-ASCT fibroblasts with the different conditioning drugs. The proliferation reversed, after a 4-week washout, from 18 844 cpm in the untreated cultures to 1118 cpm in cultures treated with BCNU, 584.8 cpm in cultures treated with Ara-C, and 1059 cpm in cultures treated with melphalan. Previous studies using fibroblast primary cultures suggested that a serum factor stimulates fibroblasts proliferation.⁴ It has been reported that elimination of the monoclonal band was the cause of the improvement,¹ although the isolated IgG fraction showed no stimulatory activity in a different study.⁵ Our patient recovered completely, although the gammopathy remains present.

We performed a 2-dimensional (2D) analysis (BioRad, Palo Alto, CA) using fibroblast extracts from all of the previously described conditions. The Ludesi-2D Interpreter software (Ludesi, Lund, Sweden) was used for image analysis, and selected spots were analyzed using a

matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF, Bruker Ultraflex, Bremen, Germany) mass spectrometer. We found several proteins that were differentially expressed between pre-ASCT and control fibroblasts. Proteins involved in growth suppression (Figure 1Aii,v,viii) were down-regulated (MnSOD,⁶ 28-fold decrease; Cu/Zn SOD,⁷ absent) in pre-ASCT fibroblasts, whereas those implicated in increased proliferation were up-regulated (stathmin,⁸ absent; profilin I,⁹ absent; and macrophage inhibitory factor,¹⁰ reduced 8.65-fold). After ASCT (Figure 1Aiii,vi,ix), all proteins that were abnormally down-regulated or up-regulated reached normal levels (ie, those observed in control fibroblasts) (Figure 1Aii,iv,vii). Interestingly, we also observed a reversal of the pre-ASCT fibroblasts' 2D protein expression profile with all the drugs tested (Figure 1B).

As our patient is clinically asymptomatic and relapse-free 3 years after treatment, we propose that the pre-ASCT conditioning regimen (BEAM), which includes a combination of hypo/hypermethylating drugs, may help to avoid the relapses observed in patients treated with melphalan alone. Our results show that (1) the conditioning regimen and ASCT used in our patient can produce a permanent remission in severe scleromyxedema; (2) fibroblasts proliferate aberrantly in vitro in patients with scleromyxedema, and this can be reversed with chemotherapeutic drugs such as BCNU, Ara-C, and melphalan; and (3) monoclonal gammopathy, at least in our patient, is not responsible for the fibroblast proliferation. In conclusion, a constitutive proliferation of fibroblasts, independent of serum factors, seems to be the key pathologic feature in scleromyxedema and can be steadily reversed with the BEAM regimen in severe cases.

Isabel Illa, Carolina de la Torre, Ricardo Rojas-Garcia, Antoni Altes, Rafael Blesa, Jordi Sierra, and Eduard Gallardo

Correspondence: Isabel Illa, Department of Neurology, Hospital de Sant Pau, Av St Antoni Ma Claret 167, 08025 Barcelona, Spain; e-mail: illa@santpau.es.

References

- Feasel AM, Donato ML, Duvic M. Complete remission of scleromyxedema following autologous stem cell transplantation. *Arch Dermatol*. 2001; 137:1071-1072.
- Lacy MQ, Hogan WJ, Gertz MA, et al. Successful treatment of scleromyxedema with autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Arch Dermatol*. 2005;141:1277-1282.
- Donato ML, Feasel AM, Weber DM, et al. Scleromyxedema: role of high-dose melphalan with autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2006;107:463-466.
- Ferrarini M, Helfrich DJ, Walker ER, Medsger TA Jr, Whiteside TL. Scleromyxedema serum increases proliferation but not the glycosaminoglycan synthesis of dermal fibroblasts. *J Rheumatol*. 1989;16:837-841.
- Harper RA, Rispler J. Lichen myxedematosus serum stimulates human skin fibroblast proliferation. *Science*. 1978;199:545-547.
- Safford SE, Oberley TD, Urano M, St Clair DK. Suppression of fibrosarcoma metastasis by elevated expression of manganese superoxide dismutase. *Cancer Res*. 1994;54:4261-4265.
- Frank S, Kampfer H, Podda M, Kaufmann R, Pfeilschifter J. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J*. 2000;346:719-728.
- Rowlands DC, Williams A, Jones NA, et al. Stathmin expression is a feature of proliferating cells of most, if not all, cell lineages. *Lab Invest*. 1995;72:100-113.
- Schluter K, Jockusch BM, Rothkegel M. Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1359:97-109.
- Mitchell RA. Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumorigenesis. *Cell Signal*. 2004;16:13-19.

To the editor:

Deferasirox versus deferoxamine

Capellini and colleagues¹ recently published the results of the first large, randomized phase 3 trial comparing deferoxamine (DFO) and deferasirox, a trial designed to demonstrate the efficacy of deferasirox in regularly transfused patients with β -thalassemia. The efficacy of a drug is its ability to produce a specific effect in a specific patient population. Effectiveness is a measure of efficacy in the "real world," outside the bounds of a randomized clinical trial; it explores compliance, generalizability, and external validity.² DFO is efficacious, but its effectiveness is limited mainly by poor compliance. It is anticipated that deferasirox, as a once-daily oral medication, might exhibit improved effectiveness over DFO.

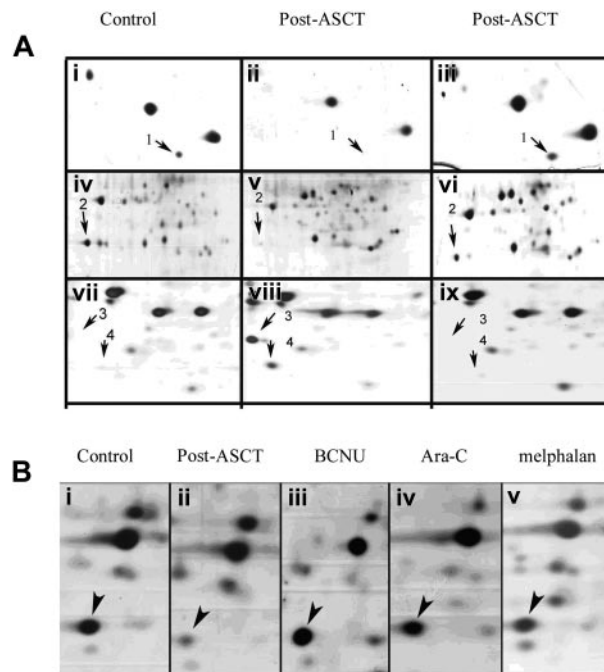


Figure 1. Differential expression of proteins associated with cell proliferation using 2D analysis. (Ai,iv,vii) Control fibroblasts; (ii,v,viii) pretreatment fibroblasts; (iii,vi,ix) posttreatment fibroblasts. These detailed pictures of the silver-stained gels demonstrate that protein expression pattern in the patient's fibroblasts after treatment mirrors that observed in control fibroblasts. Arrows identify the following proteins: (1) Cu/Zn SOD; (2) Mn SOD; (3) Profilin I; and (4) MIF. (B) Effect of the different drugs used in the conditioning procedure on the expression of MnSOD (arrowheads) in the patient fibroblasts. All drugs increased the expression of MnSOD in the patient to levels similar to control fibroblasts. (i) Control fibroblasts; (ii) patient fibroblasts untreated; (iii-v) patient fibroblasts treated with BCNU (iii), Ara-C (iv), or melphalan (v). All images were acquired with a GS-800 scanner (BioRad, Palo Alto, CA) and processed with Adobe Photoshop 7.0 (Barcelona, Spain).

**CHRONIC SENSORIMOTOR POLYRADICULOPATHY WITH ANTIBODIES
TO P2: AN ELECTROPHYSIOLOGICAL AND IMMUNOPROTEOMIC
ANALYSIS**

CASE REPORT

ABSTRACT: In this study we report a patient with chronic progressive sensory ataxia, proximal weakness, immunoglobulin M (IgM) monoclonal gammopathy, and elevated protein levels in the cerebrospinal fluid, who showed a good response to prednisone. Electrophysiological study disclosed abnormalities predominantly of late responses (F waves and H reflexes), with no evidence of demyelination in the peripheral nerves, suggesting motor and preganglionic sensory nerve roots as the site of the lesion. An immune-mediated pathogenesis was considered and, to identify possible target antigens, we performed bidimensional electrophoresis and a Western blot study. Based on the suspected lesion site, we used human anterior and posterior root extracts. We identified IgM reactivity against peripheral nerve myelin protein P2. Enzyme-linked immunosorbent assay confirmed IgM reactivity toward one synthetic peptide from P2. To our knowledge, reactivity against P2 has not been reported previously in a paraproteinemic neuropathy. Furthermore, we demonstrated that bidimensional electrophoresis and Western blot of the tissue involved, as determined by clinical and electrophysiological studies, may be useful to establish clinical-immunological correlations in paraproteinemic neuropathies.

Muscle Nerve 3X: 000–000, 2008

CHRONIC SENSORIMOTOR POLYRADICULOPATHY WITH ANTIBODIES TO P2: AN ELECTROPHYSIOLOGICAL AND IMMUNOPROTEOMIC ANALYSIS

RICARD ROJAS-GARCIA, MD,^{1,2} EDUARD GALLARDO, PhD,^{2,3} CAROLINA DE LA TORRE, BSc,^{2,3} LARA SANVITO, MD,⁴ and ISABEL ILLA, MD^{1,2}

¹ Neuromuscular Diseases Unit, Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Avenue Sant Antoni Maria Claret 167, Barcelona 08025, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red de Neurodegeneración (CIBERNED), Sevilla, Spain

³ Laboratory of Experimental Neurology, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ Department of Clinical Neuroscience, King's College London, Guy's Hospital, London, UK

Accepted XX February 2008

Chronic acquired demyelinating neuropathies may pose diagnostic challenges due to their clinical, electrophysiological, and immunopathological heterogeneity. In addition to classic chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP), several variants have been defined based on clinical features and electrophysiological data.²⁸ In some cases, the presence of specific immunoreactivity against target antigens in myelin sheath compo-

nents, and their association with stereotyped clinical phenotypes, should be useful for classification. Only certain variants of these chronic acquired neuropathies are considered distinct conditions and the only characteristic common to all variants seems to be their response to immunomodulating therapies.²⁸

One recent report described a series of patients with sensory ataxia and selective involvement of the sensory roots proximal to the dorsal root ganglia.³⁰ The condition, named chronic immune sensory polyradiculopathy, is considered an additional phenotype in the spectrum of chronic acquired neuropathies.¹² A possible immunopathogenesis was supported by pathological data showing inflammatory changes and also by the response to immunosuppressive treatment.

We describe a patient who presented with chronic, progressive sensory ataxia and proximal weakness. The presence of an elevated protein concentration in the cerebrospinal fluid (CSF) and a

Abbreviations: CHAPS, 3-[3-cholamidopropyl]dimecylammonio]-1-propanesulfonate; CIDP, chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy; CSF, cerebrospinal fluid; CV, conduction velocities; DML, distal motor latencies; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GBS, Guillain-Barré syndrome; Ig, immunoglobulin; IPG, immobilized pH gradient; MAG, myelin-associated glycoprotein; P2, myelin protein

Key words: IgM neuropathy; immunoproteomics; myelin protein P2; polyradiculopathy; sensory ataxia

Correspondence to: R. Rojas-Garcia; e-mail: rrojas@santpau.es

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 00 Month 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/mus.20999

monoclonal gammopathy, and the response to prednisone therapy, supported an immune pathogenesis. As clinical and electrophysiological features suggested sensory and motor roots as the predominant site of involvement, Western blot and electrophoresis were used to investigate possible reactivity against myelin target antigens in human spinal ventral and dorsal roots.

CASE REPORT

A 72-year-old man presented with marked sensory ataxia and proximal weakness. Symptoms had initially appeared 2 months earlier with mild unsteadiness of gait, symmetric onset of paresthesias in the lower limbs, and distal loss of sensation spreading proximally to below the knees. Symptoms gradually worsened, causing severe difficulties in walking. No other neurological symptoms were present. B-cell chronic lymphocytic leukemia had been diagnosed 4 years earlier. Immunoglobulin M (IgM) serum levels were elevated (1260 mg/dl) and immunoelectrophoresis showed an IgM-kappa monoclonal gammopathy. Neurological examination revealed severe gait ataxia and a positive Romberg's sign. The tendon reflexes were absent except for the triceps reflex. Mild symmetric weakness of shoulder abduction and of flexion of elbows and hips was observed (grade 4 on the Medical Research Council scale). Sensory loss was predominantly in the lower limbs, mainly affecting proprioceptive and kinesthetic sensations. Light touch and pinprick sensations were impaired only slightly. There were no cranial nerve abnormalities. Speech was normal. CSF protein concentration was 155 mg/dl and cell count was 5/mm³. Cytological analysis showed no malignant cells.

The patient was treated with intravenous immunoglobulin (0.4 g/kg), with no benefit. Oral prednisolone was given 5 weeks later (1 mg/kg) and ambulation returned to normal within 4 weeks.

The following tests were normal or negative: serum vitamin B₁₂ and folate and vitamin E level; *Borrelia burgdorferi*, Venereal Disease Research Laboratory, and human immunodeficiency virus serologies; and anti-Ro and anti-La antibody tests. Onconeural antibody assays, including anti-Hu, anti-Yo, anti-Ri, Anti-Ma2, and anti-CV2, were negative. IgM and IgG anti-ganglioside antibodies (GM1, GM2, GM3, GD1a, GD1b, GD3, GT1b, GQ1b) and anti-sulfatide antibodies were performed as previously described and were negative.³⁴ Anti-myelin-associated glycoprotein (anti-MAG) antibodies were determined by enzyme immune assay test following the manufacturer's instructions (Bühlmann Laborato-

ries AG, Allschwill, Switzerland) and were also negative. Thoracoabdominal computerized tomography scan was normal. Brain and spinal cord imaging was normal. Magnetic resonance imaging of the cauda equina did not show hypertrophic nerve roots or post-gadolinium enhancement.

Electrophysiologic Studies. Pre-treatment electrophysiological studies showed mild prolongation of distal motor latencies (DMLs) in the right ulnar and peroneal nerves, and mild slowing of conduction velocity (CV) in both peroneal nerves (Table 1). DML and CV values were not within the demyelinative range according to published criteria.¹ The other motor nerve conduction studies showed CV, DML, and response amplitude values within normal ranges. There was no evidence of temporal dispersion or conduction block in any of the nerves tested. Sensory nerve conduction studies were normal and remained normal at 1-year follow-up. Late responses showed a marked decrease in F-wave persistence in both peroneal and left tibial nerves. Minimal F-wave latency was prolonged in all tested nerves in the lower limbs, but only minimal F-wave latency of the left tibial nerve fulfilled criteria for primary demyeli-

TI

Table 1. Electrophysiological studies.

Motor nerve conduction studies	Normal	Right/left
DML (ms)		
Ulnar	<3.3	3.9/ND
Peroneal	<5.0	5.5/4.8
Tibial	<6.0	ND/6.0
CV (ms)		
Ulnar (below elbow–wrist)	>48	48/ND
Peroneal (below knee–ankle)	>42	39/39
Tibial (ankle–popliteal fossa)	>38	ND/38
Sensory nerve conduction studies		
CV (ms)		
Superficial peroneal	>39	41/ND
Sural	>38	42/44
Radial	>51	51/ND
SNAP amplitude (μV)		
Superficial peroneal	>6	10/ND
Sural	>5	14/13
Radial	>14	19/ND
F-waves		
Minimal latency (ms)		
Peroneal	<57	65.4/56.4
Tibial	<57	66.3/ 72.9
Persistence (%)		
Peroneal		20/20
Tibial		94/50

CMAP, compound muscle action potential; CV, conduction velocity; DML, distal motor latency; ND, not done; SNAP, sensory nerve action potential. Values outside of the normal range are indicated in italics. Values inside the demyelinating range are indicated in bold.

nation (>125% prolongation of the upper limit of normal).¹ Median and ulnar F-waves were present, with normal frequency and minimal latency. H-reflexes recorded from calf muscles by stimulation of the tibial nerves were not obtained. Needle examination showed slightly reduced interference patterns in quadriceps and biceps brachii muscles, with no evidence of acute denervation during rest in these muscles or in the paraspinal muscles.

Two-Dimensional Electrophoresis and Western Blot.

To investigate a possible reactivity against root antigens, we used two-dimensional electrophoresis of human dorsal and ventral roots combined with Western blot.

Protein Extracts. Human dorsal and ventral roots were solubilized in a buffer consisting of 7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl)dimecylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 0.8% (w/v) Pharmalyte at pH 3–10, 1% (w/v) dithiothreitol, protease inhibitors, and 0.001% bromphenol blue.

Two-Dimensional Gel Electrophoresis. Isoelectric focusing was performed with rehydrated immobilized pH gradient (IPG) strips using a Protean isoelectric focusing cell (Bio-Rad, Hercules, California) to 14,000 volts/hour. The equilibrated IPG strips were transferred to a Mini Protean electrophoresis cell (Bio-Rad) for the second dimension using sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were stained with silver.

Western Blot. Gel replicates were transferred to a nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer system (Bio-Rad) at 300 mA for 90 minutes. Membranes

were processed as previously described.⁸ Immunoreactive spots were visualized by an enhanced chemiluminescence system (Pierce, Rockford, Illinois). Spots of interest were detected in the silver-stained gel replicates, excised, and destained. Proteins were then digested in gel by overnight incubation at 38°C in a porcine trypsin solution. Protein was identified by matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry using an Ultraflex TOF-TOF instrument (Bruker Daltonics, Inc., Billerica, Massachusetts).

AQ: 1

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with P2 Synthetic Peptides.

Enzyme-linked immunoassay (ELISA) was performed using the method described by Inglis et al.,¹⁴ with some modifications. IgG and IgM antibodies against P2 were tested using a panel of seven overlapping synthetic peptides (Genosphere, Paris, France), representing the whole sequence of human P2. Serum was tested in triplicate at a dilution of 1:50 and positive samples were titrated at increasing dilutions. Absorbance values >0.1 after subtraction of the serum blank were considered positive. Light-chain typing was performed using secondary antibodies specific for IgM-kappa and -lambda chains at a 1:100 dilution.

RESULTS

Two-Dimensional Electrophoresis and Western Blot.

The patient's serum reacted strongly with one protein (Fig. 1B). Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight analysis identified the P2 of peripheral nerve myelin (P2) with a Mascot score of 244. Results obtained using protein extracts from

FI

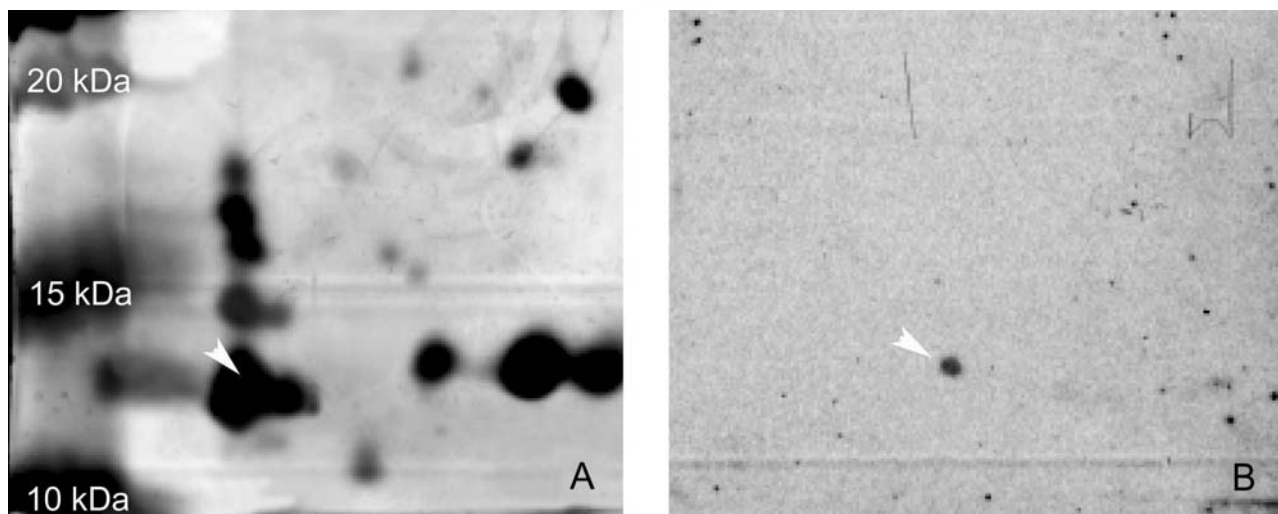


FIGURE 1. (A) Silver staining of the second dimension gel showing proteins from an extract of human dorsal root. (B) Western blot using patient's serum shows a specific reactivity to P2 protein (white arrowheads).

both anterior and dorsal human roots were the same.

ELISA with P2 Synthetic Peptides. The patient's serum was positive for IgM antibodies with a titer of 1:800 toward a peptide corresponding to amino acids 20–45 of P2 (sequence YMKALGVGLATRKLGN-LAKPTVIISK). Light-chain typing showed specific reactivity of the kappa light chain bearing the same specificity as the IgM paraprotein. Although no normative data are commonly available for this test, the titer can be considered high. Thus, in a series of 30 CIDP patients and 32 healthy controls (Sanvito et al., unpublished data), only one CIDP patient showed IgM reactivity to P220-45, with a titer of 1:800, whereas the other two positive patients had a titer of 1:200. There were no other IgM or IgG antibodies against the remaining six P2 peptides.

DISCUSSION

The combined clinical and electrophysiological data suggested proximal involvement of motor and sensory roots as the predominant site of the lesion in our patient. An immunoproteomic approach allowed the identification of reactivity against peripheral myelin protein P2. The elevated CSF protein level and response to treatment strongly suggested an immune-mediated mechanism in this case. The presence of a monoclonal gammopathy and identification of reactivity against P2 protein further supports the role of B-cell immunity against myelin proteins different from MAG or gangliosides in this neuropathy that clinically resembles CIDP.

Several clinical entities were considered in the differential diagnosis of our patient. The subacute onset and rapidly progressive clinical presentation with a predominant sensory ataxia suggested a diagnosis of anti-Hu-associated paraneoplastic neuropathy^{3,9} or ganglionopathy associated with Sjögren's syndrome.^{11,20} However, in addition to a common asymmetric onset, the electrophysiological hallmark in these two entities is a severe and diffuse alteration of sensory conduction studies, with responses that are either absent or markedly reduced in amplitude, whereas in our patient sensory nerve conduction studies remained normal.

Lymphoma patients may present with radiculopathy or polyradiculopathy at a localized spinal level. Radicular involvement is manifested by typically asymmetric root symptoms with predominant distal pain, dysesthesias, parasthesias, and sensorimotor deficits in the distribution of the affected root.¹⁶ Electrophysiological studies may show localized ra-

dicular involvement with sparing of distal sensory nerve action potentials, but evidence of acute denervation in the paraspinal muscles is a frequent finding. Lymphomatous or infiltrative radiculopathy can only be definitively excluded by biopsy. However, the absence of mass lesions or epidural enhancement on contrast magnetic resonance imaging, the symmetric clinical presentation, the lack of denervation in the paraspinal muscles, and the negative cytology on CSF examination, all fail to support this possibility.

In patients with monoclonal IgM gammopathy who present with predominantly sensory symptoms, the diagnosis of chronic sensory ataxic paraproteinemic neuropathy³⁵ and distal acquired demyelinating paraproteinemic neuropathy¹⁵ should be considered. The majority of patients with an IgM monoclonal gammopathy present with a homogeneous clinical and electrophysiological picture characterized by a chronic, slowly progressive, distal, symmetric, mainly sensory demyelinating polyneuropathy.^{6,15,22} When present, weakness is predominantly distal and develops later. In more than half of these patients, monoclonal IgM reacts against MAG.¹⁵ In addition to clinical and electrophysiological differences, no anti-MAG antibodies were detected in our patient.

A few patients with IgM gammopathy present with a clinical picture characterized by a chronic sensory ataxic neuropathy with a progressive or relapsing–remitting course. In addition, many cases have weakness affecting the oculomotor and bulbar muscles.^{13,35} All cases have serum IgM antibodies that react with NeuAc(α 2–8)NeuAc(α 2–3)-configured disialosyl gangliosides.³⁵ Cold agglutinins are also frequently present in serum. When present in their entirety, these clinical features have been described previously under the acronym CANOMAD: chronic ataxic neuropathy, ophthalmoplegia, IgM paraprotein, cold agglutinins, and disialosyl antibodies.³³ Our patient's condition can be easily differentiated from this chronic sensory ataxic paraproteinemic neuropathy because of the absence of oculomotor weakness, anti-ganglioside antibodies, and cold agglutinins, and normal sensory conduction studies.

The clinical picture of proximal weakness, in addition to severe sensory ataxia, resembles more a form of CIDP. Thus, pure sensory forms of CIDP,^{24,25} classic CIDP,^{2,32} or even the recently described chronic immune sensory polyradiculopathy,³⁰ should be considered in the differential diagnosis.

Published research criteria for the diagnosis of CIDP recognize that clinical presentation may be exclusively or predominantly sensory,¹ and recently published criteria recognize a pure sensory presentation as atypical CIDP.^{12,28} Electrophysiological

studies in the subgroup of patients with chronic acquired demyelinating neuropathies and pure sensory dysfunction may show abnormalities restricted to sensory fibers.⁷ However, they more commonly show evidence of primary demyelination affecting motor fibers, consistent with the typical electrophysiological changes of CIDP,^{24,25,29} in addition to abnormal sensory conduction studies. In other cases, late motor involvement and weakness develop in cases presenting with only sensory symptoms.^{2,32} Values of DML and motor CV in our patient showed mild abnormalities, but these were not in the demyelinating range (reduced <80% of lower normal limit of CV, prolonged >125% of upper limit of normal of DML). No evidence of primary demyelination was found in the distal segments of the nerves, according to published diagnostic criteria for CIDP.^{1,31} In addition, sensory nerve conduction studies were normal and remained normal after 1-year follow-up (Table 1).

Sensory nerve conduction studies may be normal in a small number of patients presenting with pure or predominant sensory ataxia.^{4,5,7} A demyelinating lesion of proximal segments of the dorsal roots has been suggested as the cause in these cases.^{5,7} In one series of patients with sensory ataxia and normal sensory nerve conduction studies,³⁰ the investigators suggested localized demyelinating involvement of sensory roots proximal to the dorsal root ganglia.

Similar to the patients reported by Sinnreich et al., the electrophysiological pattern of absent H-reflex and normal sensory nerve action potentials, in the presence of sensory ataxia, in our patient suggests the proximal segments of sensory roots as the site of the lesion. However, in addition to predominant sensory ataxia, symmetric proximal weakness was present. Predominant proximal radicular motor involvement was suspected because of the presence of abnormalities in late motor responses, such as decrease of F-wave persistence with prolonged minimum latencies in the absence of definitive demyelinating lesions in distal motor nerve segments.

Isolated abnormalities of F-waves with normal conduction studies in the distal motor nerve segments may occur early in the course of acute acquired polyneuropathies,^{10,18,19,26} and have been attributed to conduction block in proximal nerve segments.^{10,21,27} Only anecdotal cases suggesting that demyelination can be limited to proximal nerve segments in chronic acquired neuropathies have been reported.^{5,7,29,30} In these cases, the investigators stated that the lesion was localized proximal to the sensory dorsal root ganglia. The clinical and electrophysiological features of our patient suggest predominant proximal involvement

that was both sensory and motor. This chronic sensorimotor polyradiculopathy may constitute an expanded phenotype of the patients defined by Sinnreich et al.,³⁰ or a restricted form of chronic acquired immune-mediated neuropathy with predominant involvement of nerve roots. In such cases, absent H-reflexes and F-wave abnormalities may help to identify patients who do not conform to the typical electrophysiological pattern of chronic acquired neuropathies and may benefit from immune-modulating therapies.

Proteomic analysis has been successfully used to identify a target antigen in a neuroimmunological disease such as Hashimoto's encephalopathy.²³ The precise suspected site of the lesion prompted us to perform two-dimensional electrophoresis and Western blot using protein extracts from anterior and posterior roots. We were able to detect IgM but not IgG reactivity to P2 in the patient's serum. The patient's IgM also reacted with the synthetic peptide P2₂₀₋₄₅ using ELISA, but not with other peptides, especially P2₄₀₋₆₅ and P2₆₀₋₈₅, covering the neuritogenic sequence 58-81. The lack of reactivity for the other peptides could be due to loss of conformational epitopes of the protein. The fact that the ELISA results confirmed our findings using two-dimensional electrophoresis and Western blot reinforces the utility of our method as a powerful tool for a high-throughput screening of potential antigenic targets in patients with presumed immune-mediated neuropathy.

It has been suggested that peripheral nerve myelin proteins such as P2, along with P0 and PMP22, represent a target of the immune attack in acquired demyelinating polyradiculoneuropathies. IgM antibodies to bovine P2 have been found in CIDP patients.¹⁷ A high proportion of IgG antibodies against P2₁₄₋₂₅, but not P2₆₁₋₇₀, have recently been found in patients with Guillain-Barré syndrome (GBS) at the peak of their disease.¹⁴

Our data widen the spectrum of dysimmune-acquired neuropathies and suggest that reactivity against myelin proteins is related to predominantly radicular involvement with sensory-ataxic and motor clinical manifestations that resemble CIDP. Our data further support the role of B-cell immunity against myelin proteins other than MAG or gangliosides in this neuropathy. Our results suggest that precise clinical and electrophysiological definition in combination with two-dimensional electrophoresis and Western blot could be a useful method to detect neural antigens in patients with IgM neuropathies for whom no anti-neural reactivity has been identified by other methods. This approach may also help

to guide in the search of candidate antigens and define clinical-immunological correlations.

This work was supported by FIS 06/0427. The authors thank Dr. Alejandro Martínez-Domeño, Dr. Merce Martínez-Corral, and Dr. Jordi Diaz-Manera for clinical care of the patient and Noemi De Luna for technical assistance with bidimensional electrophoresis.

REFERENCES

- American Academy of Neurology. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). Report from an Ad Hoc Subcommittee of the American Academy of Neurology AIDS Task Force. *Neurology* 1991;41:617-618.
- Berger AR, Herskovitz S, Kaplan J. Late motor involvement in cases presenting as "chronic sensory demyelinating polyneuropathy." *Muscle Nerve* 1995;18:440-444.
- Camdessanche JP, Antoine JC, Honnorat J, Vial C, Petiot P, Convers P, et al. Paraneoplastic peripheral neuropathy associated with anti-Hu antibodies. A clinical and electrophysiological study of 20 patients. *Brain* 2002;125:166-175.
- Chin RL, Latov N, Sander HW, Hays AP, Croul SE, Magda P, et al. Sensory CIDP presenting as cryptogenic sensory polyneuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2004;9:132-137.
- Citak KA, Dickoff DJ, Simpson DM. Progressive sensory radiculopathy responsive to corticosteroid therapy. *Muscle Nerve* 1993;16:679-680.
- Cocito D, Durelli L, Isoardo G. Different clinical, electrophysiological and immunological features of CIDP associated with paraproteinaemia. *Acta Neurol Scand* 2003;108:274-280.
- Cros D, Chiappa KH, Patel S, Gominak S. Acquired pure sensory demyelinating polyneuropathy: a chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy variant? *Ann Neurol* 1992;32:280.
- Dalakas MC, Illa I, Gallardo E, Juarez C. Inclusion body myositis and paraproteinemia: incidence and immunopathologic correlations. *Ann Neurol* 1997;41:100-104.
- Dalmau J, Graus F, Rosenblum MK, Posner JB. Anti-Hu-associated paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuropathy. A clinical study of 71 patients. *Medicine (Balt)* 1992;71:59-72.
- Fraser JL, Olney RK. The relative diagnostic sensitivity of different F-wave parameters in various polyneuropathies. *Muscle Nerve* 1992;15:912-918.
- Griffin JW, Cornblath DR, Alexander E, Campbell J, Low PA, Bird S, et al. Ataxic sensory neuropathy and dorsal root ganglionitis associated with Sjogren's syndrome. *Ann Neurol* 1990;27:304-315.
- Hughes RA, Bouche P, Cornblath DR, Evers E, Hadden RD, Hahn A, et al. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2006;13:326-332.
- Ilyas AA, Quarles RH, Dalakas MC, Fishman PH, Brady RO. Monoclonal IgM in a patient with paraproteinemic polyneuropathy binds to gangliosides containing disialosyl groups. *Ann Neurol* 1985;18:655-659.
- Inglis HR, Csurhes PA, McCombe PA. Antibody responses to peptides of peripheral nerve myelin proteins P0 and P2 in patients with inflammatory demyelinating neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006.
- Katz JS, Saperstein DS, Gronseth G, Amato AA, Barohn RJ. Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy. *Neurology* 2000;54:615-620.
- Kelly JJ, Karcher DS. Lymphoma and peripheral neuropathy: a clinical review. *Muscle Nerve* 2005;31:301-313.
- Khalili-Shirazi A, Atkinson P, Gregson N, Hughes RA. Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1993;46:245-251.
- Kiers L, Clouston P, Zuniga G, Cros D. Quantitative studies of F responses in Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994;93:255-264.
- Kuwabara S, Ogawara K, Mizobuchi K, Koga M, Mori M, Hattori T, et al. Isolated absence of F waves and proximal axonal dysfunction in Guillain-Barré syndrome with antiganglioside antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000;68:191-195.
- Malinow K, Yannakakis GD, Glusman SM, Edlow DW, Griffin J, Pestronk A, et al. Subacute sensory neuronopathy secondary to dorsal root ganglionitis in primary Sjogren's syndrome. *Ann Neurol* 1986;20:535-537.
- Mills KR, Murray NM. Proximal conduction block in early Guillain-Barré syndrome. *Lancet* 1985;2:659.
- Nobile-Orazio E, Manfredini E, Carpo M, Meucci N, Monaco S, Ferrari S, et al. Frequency and clinical correlates of anti-neuronal IgM antibodies in neuropathy associated with IgM monoclonal gammopathy. *Ann Neurol* 1994;36:416-424.
- Ochi H, Horiuchi I, Araki N, Toda T, Araki T, Sato K, et al. Proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett* 2002;528:197-202.
- Oh SJ, Joy JL, Kuruoglu R. "Chronic sensory demyelinating neuropathy": chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting as a pure sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:677-680.
- Ohkoshi N, Harada K, Nagata H, Yato M, Shoji S. Ataxic form of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: clinical features and pathological study of the sural nerves. *Eur Neurol* 2001;45:241-248.
- Olney RK, Aminoff MJ. Electrodiagnostic features of the Guillain-Barré syndrome: the relative sensitivity of different techniques. *Neurology* 1990;40:471-475.
- Ropper AH, Wijdicks EF, Shahani BT. Electrodiagnostic abnormalities in 113 consecutive patients with Guillain-Barré syndrome. *Arch Neurol* 1990;47:881-887.
- Saperstein DS, Katz JS, Amato AA, Barohn RJ. Clinical spectrum of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Muscle Nerve* 2001;24:311-324.
- Simmons Z, Tivakaran S. Acquired demyelinating polyneuropathy presenting as a pure clinical sensory syndrome. *Muscle Nerve* 1996;19:1174-1176.
- Sinnreich M, Klein CJ, Daube JR, Engelstad J, Spinner RJ, Dyck PJ. Chronic immune sensory polyradiculopathy: a possibly treatable sensory ataxia. *Neurology* 2004;63:1662-1669.
- Van den Bergh PY, Pieret F. Electrodiagnostic criteria for acute and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 2004;29:565-574.
- van Dijk GW, Notermans NC, Franssen H, Wokke JH. Development of weakness in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and only sensory symptoms at presentation: a long-term follow-up study. *J Neurol* 1999;246:1134-1139.
- Willison HJ, O'Hanlon GM, Paterson G, Veitch J, Wilson G, Roberts M, et al. A somatically mutated human antiganglioside IgM antibody that induces experimental neuropathy in mice is encoded by the variable region heavy chain gene, V1-18. *J Clin Invest* 1996;97:1155-1164.
- Willison HJ, Veitch J, Swan AV, Baumann N, Comi G, Gregson NA, et al. Inter-laboratory validation of an ELISA for the determination of serum anti-ganglioside antibodies. *Eur J Neurol* 1999;6:71-77.
- Willison HJ, O'Leary CP, Veitch J, Blumhardt LD, Busby M, Donaghy M, et al. The clinical and laboratory features of chronic sensory ataxic neuropathy with anti-disialosyl IgM antibodies. *Brain* 2001;124:1968-1977.

AQ: 2

Proteomics identification of differentially expressed proteins in the muscle of dysferlin myopathy patients

RESEARCH ARTICLE

Proteomics identification of differentially expressed proteins in the muscle of dysferlin myopathy patients

Carolina De la Torre^{1,2}, Isabel Illa^{2,3}, Georgine Faulkner⁴, Laura Soria⁵, Rene Robles-Cedeño^{1,2}, Raul Dominguez-Perles^{1,2}, Noemí De Luna^{1,2} and Eduard Gallardo^{1,2}

¹ Laboratory of Experimental Neurology, Institut de Recerca HSCSP, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

³ Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁴ International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Muscle Molecular Biology, Trieste, Italy

⁵ Department of Traumatology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

The muscular dystrophies are a large and heterogeneous group of neuromuscular disorders that can be classified according to the mode of inheritance, the clinical phenotype and the molecular defect. To better understand the pathological mechanisms of dysferlin myopathy we compared the protein-expression pattern in the muscle biopsies of six patients with this disease with six patients with limb girdle muscular dystrophy 2A, five with facioscapulohumeral dystrophy and six normal control subjects. To investigate differences in the expression levels of skeletal muscle proteins we used 2-DE and MS. Western blot or immunohistochemistry confirmed relevant results. The study showed specific increase expression of proteins involved in fast-to-slow fiber type conversion (ankyrin repeat protein 2), type I predominance (phosphorylated forms of slow troponin T), sarcomere stabilization (actinin-associated LIM protein), protein ubiquitination (TRIM 72) and skeletal muscle differentiation (Rho-GDP-dissociation inhibitor ly-GDI) in dysferlin myopathy. As anticipated, we also found differential expression of proteins common to all the muscular dystrophies studied. This comparative proteomic analysis suggests that in dysferlin myopathy (i) the type I fiber predominance is an active process of fiber type conversion rather than a selective loss of type II fibers and (ii) the dysregulation of proteins involved in muscle differentiation further confirms the role of dysferlin in this process.

Received: April 8, 2008

Revised: July 17, 2008

Accepted: September 10, 2008



Keywords:

2-DE / Dysferlin / Facioscapulohumeral muscular dystrophy / Limb girdle muscular dystrophy 2A / Muscular dystrophies

Correspondence: Dr. Eduard Gallardo, Department of Neurology, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Universitat Autònoma de Barcelona, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025, Barcelona, Spain
E-mail: egallardo@santpau.cat
Fax: +34-9-3556-5602

Abbreviations: ALP, actinin-associated LIM protein; **ankrd2**, ankyrin repeat domain-containing protein 2; **DMD**, Duchenne muscular dystrophy; **FSHD**, facioscapulohumeral muscular dystrophy; **LGMD2A(B)**, limb girdle muscular dystrophy 2A(B); **MM**, Miyoshi myopathy; **Rho-GDI**, Rho-GDI-dissociation inhibitor ly-GDI; **TRIM72**, tripartite motif-containing protein 72

1 Introduction

With the recent advances in the analysis of gene expression in muscular dystrophies, attention has now turned to the proteomic analysis of these diseases and an increasing number of studies are using human samples and animal models with mutations in a variety of muscular dystrophy-associated genes. The pathological manifestations of the different muscular dystrophies at the histological level are similar. Dystrophic muscle tissue is characterized by central nuclei, myofiber degeneration, variability in muscle fiber size and subsequent formation of foci of fibrotic and adipose

tissue. However, these common manifestations are secondary to the different and specific primary defect [1].

Mutations in the dysferlin gene cause several phenotypes of muscular dystrophy [2–4]. The dysferlin protein has been involved in muscle membrane repair [5]. There is only one previous proteomic study of patients with limb girdle muscular dystrophy 2B (LGMD2B). The authors showed that a switch from fast to slow twitch type fiber together with a shift to oxidative metabolism occurs in the skeletal muscle of these patients when compared to muscle from healthy controls [6]. A comparative study of skeletal muscle protein expression between healthy controls, affected and unaffected muscle from patients with facioscapulohumeral dystrophy (FSHD), and Duchenne muscular dystrophy (DMD) has recently been published. The authors observed an increased expression of proteins involved in mitochondrial function and protection from oxidative stress in patients with FSHD. These changes were reproducible and specific for muscle biopsies from all FSHD patients, including clinically unaffected muscles [7]. However, in another study combining proteomic, transcriptional and bioinformatic analysis in FSHD, the authors suggested that molecular defects in the tandem repeat locus D4Z4 impair the expression of genes, such as MyoD, involved in muscle differentiation and in regeneration, leading to an increase of ROS [8].

In the present study, we used 2-D PAGE combined with MS to investigate differences in the expression levels of skeletal muscle proteins in patients with two different phenotypes of dysferlin myopathy [(limb girdle muscle dystrophy 2B (LGMD2B) and Miyoshi myopathy (MM)], limb girdle muscular dystrophy 2A (LGMD2A), facioscapulohumeral dystrophy (FSHD) and healthy controls. In Miyoshi myopathy, muscle weakness and atrophy start in the distal muscles of the legs whereas in LGMD2B, they start in the pelvic and shoulder girdle muscles. Presence of inflammatory infiltrates is observed in some cases [9]. We selected LGMD2A because it has been reported that dysferlin and calpain may have a functional interaction and that loss of dysferlin may affect calpain expression and vice versa [10]. LGMD2A is caused by mutations in the CAPN3 gene and muscle weakness usually begins in the pelvic girdle, with problems running, climbing stairs or getting up from a chair. Finally, we studied FSHD because, as reported for dysferlin myopathy [9], inflammation can be detected in muscle biopsies [11]. In FSHD muscle, weakness starts in the face, shoulder girdle and upper arms muscles. The molecular defect in FSHD consists of a deletion in the D4Z4 DNA region of 4q35.

The comparative study of these three muscular dystrophies was used to identify candidate proteins that are specifically involved in the pathophysiology of dysferlin myopathy. As expected, we identified some changes that appear to be common to all the muscular dystrophies analyzed. However, we also observed protein expression profiles that were specific for dysferlin myopathy. These findings can contribute to our understanding of the molecular mechanisms underlying these diseases.

2 Materials and methods

2.1 Sample preparation

We analyzed triceps muscle biopsies from patients with three different muscular dystrophies, dysferlin myopathy (4), LGMD2A (4), FSHD (3), genetically confirmed and 4 normal control subjects (Table 1). Mean age was similar in all groups. The samples were frozen and stored in liquid nitrogen. Muscle samples were homogenized in lysis buffer containing 8 M urea, 2% CHAPS, 40 mM DTT, 0.002% bromophenol blue, protease inhibitors cocktail (GE Healthcare), distilled or de-ionized water. The protein extracts were incubated for 30 min in ice and disrupted by ultrasonication. Muscle samples were centrifuged at $12\,000 \times g$ for 25 min at 4°C and supernatants were transferred into new microcentrifuge tubes and stored at –80°C for further analysis. The RC-DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA), was used to quantify protein concentration. The samples were precipitated and purified with the 2-D Clean-Up Kit following manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

2.2 2-DE

Analytical gels were made in triplicate for each patient, and 405 µg of protein was adjusted to a final volume of 310 µL in rehydration buffer (8 M Urea, 2% Chaps, 0.5% Ampholytes, 40 mM DTT, bromophenol blue trace) and 5 µL of reducing agent Destreak reagent (Amersham Biosciences) containing hydroxyethyl disulfide to prevent unspecific oxidation of proteins. After rehydration for at least 16 h, IPG strips (17 cm pH 5–8, linear IPG DryStrips, Bio-Rad) were focused on a Protean IEF cell system (Bio-Rad), following the manufacturer's instructions. The strips were incubated with equilibration buffer (6 M Urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glycerol, and 2% w/v and DTT) for 15 min. and equilibration buffer supplemented with 2.5% w/v iodoacetamide for an additional 15 min. After equilibration, the IPG gel was transferred onto a 12% polyacrylamide gel and SDS-PAGE was performed in a protean II Xi 2-D system (Bio-Rad) at 16 mA for 1 h and at 24 mA for an additional 6 h.

2.3 Visualization of proteins and image analysis

Gels were stained with silver solution and scanned using a GS-800 imaging densitometer. Gel replicates were stained with Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain (Invitrogen, Eugene, OR) and the images were acquired using a scanner Typhoon (Amersham Bioscience) This method selectively stains phosphoproteins in polyacrylamide gels. The scanned 2-DE images were sent to Ludesi Analysis Center (Sweden, <http://www.ludesi.com>) for image analysis using Ludesi's proprietary image analysis software. The protein spots were automatically detected, and the results were manually verified and edited where needed, with on average spots

Table 1. Patients Information

Patients	Age	Sex	Progression of disease	Mutation	Muscle	S/F	% Fiber slow
Control	35	F	0		Soleus	198/123	61
Control	23	M	0		Triceps	223/85	72
Control	47	F	0		Triceps	146/173	45.7
Control	38	M	0		Quadriceps	199/207	49
Control	43	F	0		Quadriceps	158/271	36
Control	36	F	0		Triceps	135/177	42
LGM2B	16	M	1	Homozygosis: PG1628 R	Triceps	179/125	58.8
LGM2B	76	F	45	Homozygosis: R959W	Triceps	175/36	82.9
LGM2B	49	F	5	Homozygosis: R1811	Triceps	164/51	76.2
LGM2B	30	F	2	Homozygosis: E1994RfsX3	Quadriceps	177/261	44
MM	54	M	22	Homozygosis: R1720L	Triceps	173/31	84
MM	63	M	6	Heterozygosis: Mut 1:E1732X Mut 2: R2000Q	Triceps	211/96	68.7
LGM2A	23	M	5	Homozygosis: 2362AG - TCATCT (exon 22)	Triceps	57/249	18.6
LGM2A	23	F	6	Heterozygosis: Mut 1: 2362AG -TCATCT Mut 2: 802-9G>A	Triceps	153/147	51
LGM2A	30	F	8	Heterozygosis: Mut 1: R448C Mut 2: Q564X	Quadriceps	126/176	41.1
LGM2A	46	M	28	Homozygosis: P.(Arg490Trp) exon 11	Soleus	142/159	47.1
LGM2A	51	F	9	Heterozygosis: Mut1: P.(Arg490Trp) exon 11 Mut2:P.(Glu622GlyfsX9)	Triceps	118/82	59
LGM2A	35	M	5	Heterozygosis: Mut1: Lys 487_Asn488delinsAsnHis exon 11 Mut2:C.1992+1G>T exon 17	Triceps	68/234	22.5
FSHD	42	M	22	Fragment deletion of 34 kb	Triceps	70/231	23.2
FSHD	40	M	20	Fragment deletion of 34 kb	Triceps	108/192	36.4
FSHD	62	F	8	Fragment deletion of 28 kb	Triceps	88/312	22
FSHD	35	M	7	Fragment deletion of 34 kb	Quadriceps	114/186	38
FSHD	20	F	3	Fragment deletion of 15 kb	Quadriceps	188/212	47

resolved by image analysis. The gels were automatically matched using all-to-all matching, avoiding introduction of bias caused by use of a reference gel. The matching was iteratively improved by optimization of matching parameters and manual editing. Integrated intensities were measured for each spot, background-corrected, and then normalized by mathematically minimizing the median expression difference between matched spots.

2.4 Statistical analysis and hierarchical clustering

The statistical analyses were performed using Ludesi RED-FIN (Sweden, <http://www.ludesi.com>). Normalized spot volumes were used. First, a volume filter was applied, removing spots with volume smaller than a threshold and then spots with a presence lower than a the threshold percentage were removed. The *p*-values were calculated using ANOVA and non-existing spots were estimated to have spot volume zero. Proteins with *p*-value lower than the threshold and fold change higher than the threshold were declared regulated. All spots declared regulated were manually verified to have been correctly detected, quantified, and matched in all gels.

Hierarchical clustering was performed using the software developed by Ludesi (www.ludesi.com). Briefly, the clusters were formed in an agglomerative way so that objects

which are similar are linked together first. When gels are the designated objects, those proteins have a similar expression are considered to belong to the same group. When the objects are proteins, those, which are co-regulated, are considered similar. Proteins up-regulated are shown in red and those down-regulated are shown in green.

2.5 Protein identification by MS

Protein spots of interest were excised from the gel using an automated Spot Picker (Amersham Bioscience), the samples were sent to a proteomics service for the identification of proteins (Dr. F. Canals, Proteomics Facility at IR-HUVH, Barcelona, Spain).

In-gel trypsin digestion was performed as described [12], using autolysis-stabilized trypsin (Promega, Madison, WI). Tryptic digests were purified using ZipTip microtiter plates (Millipore, Billerica, MA).

MALDI-MS analysis of tryptic peptides was performed on an Ultraflex TOF-TOF Instrument (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Samples were prepared using CHCA as matrix on anchor-chip targets (Bruker Daltonics). Calibration was performed in the external mode using a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). The spectra were processed using Flex Analysis 2.2 software (Bruker Daltonics).

Peak lists were generated using the signals in the m/z 800 to 4000 region, with an S/N threshold greater than 3. The SNAP algorithm included in the software was used to select the monoisotopic peaks from the isotopic distributions observed. After removing m/z values corresponding to usually observed matrix cluster ions, an internal statistical calibration was applied. Peaks corresponding to frequently seen keratin and trypsin autolysis peptides were then removed. The resulting final peak list was used for identification of the proteins by PMF. MASCOT 2.0 program (Matrix Science, London, UK) was used to search the MSDB database, 20050227 release (Imperial College, London), limiting the search to human proteins (130 630 sequences). Search parameters were as follows: trypsin cleavages excluding N-terminal to P, 1 or 2 missed cleavages allowed, carbamidomethylation set as fixed modification, methionine oxidation as variable modification, mass tolerance less than 50 ppm, monoisotopic mass values. Criteria for positive identification were a significant MASCOT probability score (score >64, $p < 0.05$), together with an intensity coverage of the spectra higher than 60% (unless more than one protein was identified at a single spot) (Tables 1 and 2). When several isoforms of a protein appeared in the database, we reported

the one that matched the maximum number of peptides in the mass spectrum and the match was considered in terms of putative function. When the set of matched peptides did not allow distinguishing between different isoforms one of them was given in the Table as example, and the accession numbers of the other isoforms matching the same set of peptides are shown in Supporting Information for Tables 1 and 2.

Phosphorylated proteins (Table 4) were identified in a different core facility (Dr. C. Chiva, Proteomics Facility University Pompeu Fabra, Barcelona Spain). Protein spots from silver-stained gels were excised from the gel using an automated Spot Picker (Amersham Biosciences), and in-gel digested in a 96-well ZipPlate placed in a Multiscreen vacuum manifold (Millipore). Proteins were reduced, alkylated, and digested with sequence grade trypsin (Promega). Peptides were eluted with 15–25 μ L of 0.1% TFA in 50% ACN. Of tryptic digest, 2.5 μ L was deposited onto Mass·Spec·Turbo 192 type 1 peptide chips pre-spotted with CHCA (Qiagen, Valencia, CA) and left for 3 min for peptide adsorption. Then, each spot was washed for 5 s with 1 μ L of finishing solution (Qiagen) and left until dry. MALDI-TOF MS was performed in a Voyager DE-STR instrument

Table 2. Proteins equally expressed in all the muscular dystrophies studied

Spot no.	Identification	Accession no.	MASCOT score	Matched peptides	Sequence coverage %	Function	Control	Dysferlin -/
22669	Fructose -biphosphate aldolase	ALDOA_HUMAN	119	15 (59)	46.8		1	0.9
23349	Phosphopyruvate hydratase (EC 4.2.1.11) beta-human	S06756	169	23 (65)	46.3	Energy meta- bolism	1	0.8
22056	Hypothetical protein, similarity heat shock protein	Q96C20_HUMAN	88	7 (45)	35.1		1	3.5
23352	Carbonic anhydrase III (EC 4.2.1.1)	CAH3_HUMAN	114	10 (47)	37.8		1	0.9
22522	Acyl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.3)	DEHUCM	79	13 (59)	32.1	Metabolism lipids	1	0.9
22761	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform (MLCF1)	MLE1_HUMAN	113	12 (41)	45.1		1	0.3
22784	Troponin T1, skeletal, slow	AAH22086	88	13 (46)	24.2		1	0.6
22054	Myosin regulatory light chain 2	Q96C20_HUMAN	91	8 (44)	52.1		1	1.2
23355	Myosin light polypeptide 3	MYL3_HUMAN	97	7 (48)	38.7		1	0.3
22016	Myosin light polypeptide 3	MYL3_HUMAN	120	12 (48)	57.7	Myofibrillar proteins	1	1.4
22166	Actin alpha, skeletal muscle	A24904	129	16 (51)	45.6		1	0.7
22271	Actin alpha, skeletal muscle	A24904	102	10 (39)	42.7		1	0.6
22772	Actin gamma, smooth muscle	ATCHSM	81	7 (44)	26.3		1	0.3
23360	Actin, alpha 1, skeletal muscle	Q5T8M7	61	5 (39)	13.5		1	0.3
22113-1	Alpha-crystallin chain B	CYHUAB	94	8 (52)	42.9		1	0.8
22000	Myosin alkali light chain, slow skeletal muscle	MOHUSA	80	6 (58)	28.8	Muscle devel- opment	1	0.3
21920	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	JH0624	87	9 (50)	43.6	Repair	1	0.8

MASCOT search scores are shown for the top match protein. "Matched peptides" column shows the number of peptides matching to the top-match protein and, in parentheses, the number of unmatched peptides in the spectra.

Shaded rows are meant to separate different protein function groups.

Table 3. Proteins differentially expressed in dysferlin myopathy

Spot no.	Identification	Accession no.	MASCOT score	Matched peptides	Sequence coverage%	Function	Control	Dysferlin -/-
22148-A	6-Phosphogluconolactonase	AAH14006	80	8 (29)	36.4	Energy metabolism	1	1.6
21944	Ankyrin repeat domain 2. – <i>Homo sapiens</i> (human).	Q3B778	121	11 (8)	26.1		1	2.6
21970	OTTHUMP00000059423. – <i>Homo sapiens</i> (human).	Q5T458	120	9 (3)	26.1		1	2.68
22062	Actinin-associated LIM protein. – <i>Homo sapiens</i> (human).	Q43590	134	10 (10)	36	Myofibrillar proteins	1	4.4
23241	Actinin-associated LIM protein. – <i>Homo sapiens</i> (human).	Q43590	85	7 (5)	22.8		1	1.75
21984	Actinin-associated LIM protein. – <i>Homo sapiens</i> (human).	Q43590	111	12 (17)	38.5		1	1.8
22091	Myotilin (Titin-like protein)	Q9UBF9	74	10 (25)	21.9		1	3
22603	Rho-GDP-dissociation inhibitor Ly-GDI - human	A47742	91	12 (25)	69	Muscle development	1	1.5
22029	Transferrin precursor [validated] – human	TFHUP	258	36 (50)	48		1	3.1
23345	Fatty acid binding protein (holo form, human muscle) (m-fabp)-human	2HMB	104	7 (8)	49.6	Transport	1	8.56
22148-B	Endoplasmic-reticulum-luminal protein 28 – human	T09549	68	8 (21)	42.9		1	1.6
22228	Troponin T1, Skeletal, Slow	AAH22086	68	11 (15)	19.9		1	1
22036	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform (MLC-2)	MLRV_HUMAN	127	19 (38)	56	Contractile	1	1.1
21949	Hypothetical protein FLJ16664/ TRIM72	Q6ZMU5	168	25 (44)	65.4	Ubiquitination	1	2.58

MASCOT search scores are shown for the top match protein. “Matched peptides” column shows the number of peptides matching to the top-match protein and, in parentheses, the number of unmatched peptides in the spectra. Shaded rows are meant to separate different protein function groups.

(Applied Biosystems, Foster City, CA) using a 337-nm nitrogen laser and operating in the reflector mode, with an accelerating voltage of 20 kV. Samples were analyzed in the m/z 800–3000 range and were calibrated externally using a standard peptide mixture (Sequazyme Peptide Mass Standards kit, Applied Biosystems). Peptides from trypsin autolysis were used for the internal calibration.

Peak lists were generated using the moverz software (Knexus edition, Proteometrics). Monoisotopic peaks with $S/N > 3$ were selected and common contaminants were eliminated using the Peak Erazor software (v 2.0.1).

Protein identification from MALDI-TOF results was done with the online MASCOT search engine (MatrixScience) using human proteins available in the NCBI non-redundant database 20070609 (192 928 sequences) or in the Swiss-Prot database v53.1 (16 703 sequences). The following parameters were used for database searches: one missed cleavage allowed, peptide tolerance was limited to 50 ppm, fixed modifications were carbamidomethylation of cysteine, variable modifications oxidation of methionine, and criteria for acceptance of peptides with a score greater than

55 for spots (6549, 7566, 6545, 8328, 7563, 6547, 6544) or 65 for spots (8326, 8635, 8330, 8331); a threshold of $p < 0.05$ was considered significant (Table 3).

For NanoLC-MS/MS analysis, samples were run on a Q-Star Pulsar (Applied Biosystems) instrument fitted with a nano-ESI source, previous nanoLC separation in an Ultimate II system (LCPackings). Prior to LC-MS analysis, tryptic peptide mixtures were desalted and concentrated on RP-C18 Stage tips (Proxeon Biosystems, San Mateo, CA) as described [13]. Peptides were separated in an RP Atlantis dC18 NanoEase Column, 75 $\mu\text{m} \times 150$ mm (Waters), using a linear 5–50% ACN gradient into 0.1% formic acid over 30 min. An electrospray voltage of 2400 V was used. For LC MS/MS analysis samples were directly injected and analyzed in the information-dependent acquisition (IDA) mode.

Peak list was generated from the raw data using the Analyst QS 1.1 software with the MASCOT script 1.6 b21. MS/MS data were centroided and de-isotoped and only precursor charge states +2, +3 and +4 were considered.

Protein identification from nanoLC-MS/MS results was done with a resident MASCOT server (MatrixScience) v2.1

using human proteins available in the NCBI non-redundant database downloaded from ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/db/FASTA/nr.gz on March 30th 2007 (191 591 sequences). The following parameters were used for database searches: one missed cleavage allowed, plus Cys carbamidomethylation as fixed and Met oxidation and deamidation as variable modifications selected, respectively. MS tolerance was set at 0.25 Da and MS/MS tolerance at 0.20 Da. Protein scores were derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits. The protein score is the sum of the ion score of all the non-duplicate peptides. The score threshold to achieve $p < 0.05$ is set by MASCOT algorithm with an expect cut-off of 20, and is based on the size of the database used in the search. As for PMF, when peptides matched to multiple members of a protein family, we selected the higher database score and sequence coverage. Wherein there was more than one accession number for the same peptide, the match was considered in terms of putative function.

2.6 Western blot analysis

For semi-quantitative validation of the expression levels of selected proteins, Western blot analysis was performed using standard techniques and equipment (Bio-Rad). Crude homogenates were prepared from muscle biopsies from the patients and controls indicated in Table 1 and equal amounts (60–80 μg) were subjected to SDS-PAGE. The proteins were transferred onto an NC membrane (1.5 h, 300 mA). Ponceau Red S staining of the membrane was carried out to confirm the efficiency of the transfer and equal loading. Finally, membranes were probed with the following antibodies: myotilin (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK), Rho-GDI, actinin LIM protein (Abcam, Cambridge, UK) and a mAb produced in mice to the N-terminal domain of Ankrd2 protein. IRDye[®]800 conjugate goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary antibodies (Licor) were used at a 1:15 000 dilution in blocking buffer. After development, membranes were briefly washed in PBS containing 0.1% Tween20. Fluorescence bands corresponding to the expected molecular weight bands were acquired on an Odyssey Infrared Imaging System (Licor). Data analysis was performed using Odyssey application software, version 2.1 (Licor).

2.7 Immunohistochemistry

For immunohistochemical analysis, we used frozen sections from muscle biopsies of muscular dystrophies (six patients with dysferlinopathy, six patients with LGMD2A, and five patients with FSHD). In all patients, the muscle biopsies were taken from the triceps.

Frozen sections from human skeletal muscle were processed for immunohistochemistry. Each sample was first investigated using hematoxylin and eosin staining to identify muscle architecture. Serial 10- μm sections were fixed in acetone. After incubation with hydrogen peroxide and then a blocking solution containing 2% BSA, 10% normal human

serum, and 3% normal goat serum, the slides were further incubated overnight with a primary monoclonal antibody, to light chain slow, fast and developmental myosin (Novocastra). A secondary antibody, peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) was applied for 1 h at room temperature. The sections were developed using a diaminobenzidine solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA) following the manufacturer's instructions [14].

2.8 Fiber counting, fiber diameter measurement and statistical analysis

We used slides stained with fast myosin from dysferlin myopathy patients to count the number of fibers of each type (see Table 1). Two hundred to 400 fibers were measured in each case. Results were analyzed using a Wilcoxon test and a *t*-test.

We also measured the fiber diameter of fast and slow fibers using the software Axiovision 3.1 (Zeiss, Hallbergmoos, Germany). Results were analyzed using the Spearman's rank correlation coefficient.

3 Results

We constructed high-resolution maps from the triceps biopsies of different dystrophies and healthy controls and detected about 1500 spots in each gel (Fig. 1). To determine the biological variation in protein expression between the muscular dystrophies mentioned and healthy controls, we performed a hierarchical clustering on the 200 most significant proteins using the average protein expression levels. The clustering analysis allowed us to identify a protein-expression pattern specific for dysferlinopathies (Fig. 2, Table 3) and to sort out changes that appear to be common to all the forms of muscular dystrophy studied (Table 2). We have grouped the proteins differentially expressed in dysferlinopathies according to their function in skeletal muscle.

3.1 Myofibrillar proteins

We found up-regulation of myotilin (spot 22091), which is involved in the assembly and stabilization of the Z-disc [15]. Ankyrin repeat protein 2 (Ankrd2) (spot 21944, 21970), also known as Arpp, is a sarcomeric protein that can interact with other sarcomeric and nuclear proteins. Actinin-associated-LIM protein (ALP) (spot 22062, 23241, 21984) belongs to a family of cytoskeletal proteins defined by the presence of an N-terminal PDZ domain (a protein-protein interaction module) and one C-terminal LIM domains [16]. All these proteins were up-regulated in patients with LGMD2B together with myosin regulatory light chain 2 (spot 21940), troponin T1 slow (spot 22228) and ventricular /cardiac muscle isoform (spot 22036). The increased expression of myotilin, Ankrd2 and ALP was confirmed by Western blot analysis (Fig. 3).

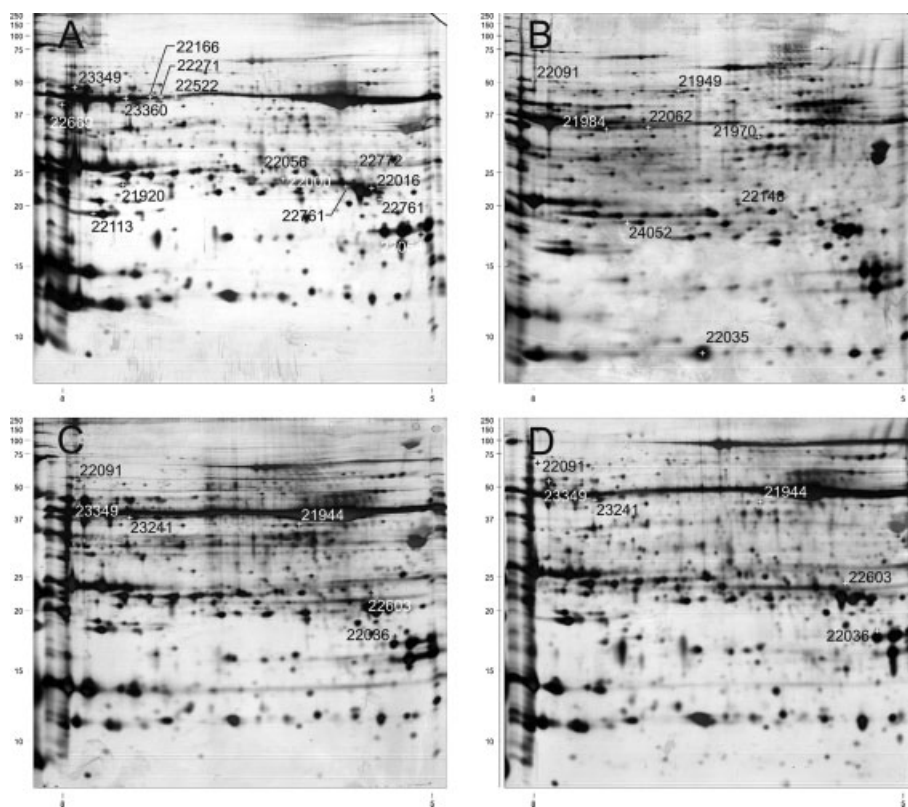


Figure 1. Proteomic comparison of muscle extracts of the same muscle (triceps) between different muscular dystrophies, by 2-D PAGE analysis. IEF was performed using 17-cm IPG strips from 4–7 pI range (A) healthy control, (B) dysferlinopathy, (C) FSHD (D) calpainopathy. Spots of interests were identified by MS. The numbering of spots correlates to the listing of identified proteins in Table 4.

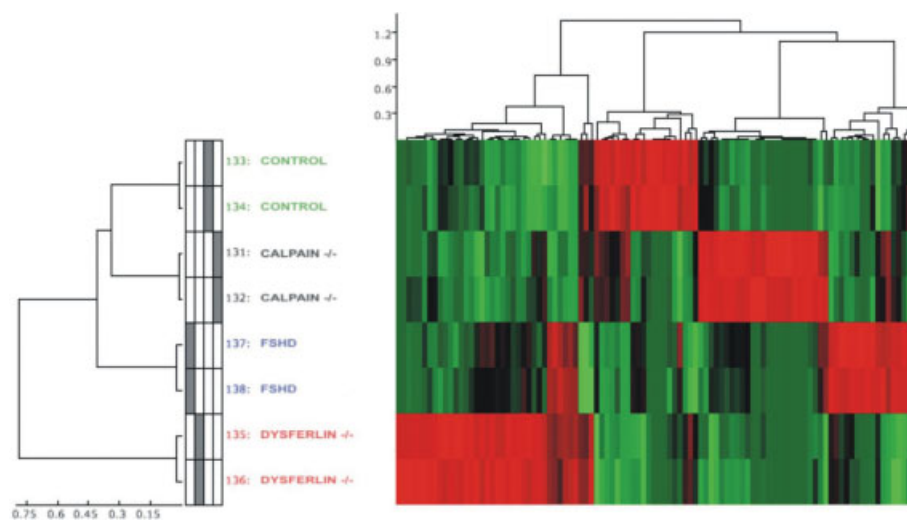


Figure 2. Unsupervised hierarchical clustering of the proteomic profiles of muscular dystrophies. The comparison of the proteomic profiles of different muscular dystrophies and healthy controls showed a group of proteins differentially expressed in LGMD2B. We performed the clustering with the following settings using the software Ludesi 2D Interpreter (www.ludesi.com): protein extraction method- ANOVA, number of proteins-100, average volume-500 units, test type- train-and-test.

3.2 Proteins involved in muscle fiber type

We observed an increased expression of different phosphorylated forms of troponin T slow (spots 7625, 7624, 7571, 6549), tropomyosin 2 (beta) isoform 1(8636) and skeletal muscle tropomyosin (8635). In contrast, we found a reduced expression of myosin fast regulatory light chain 2 isoform (spot 8330, 8328) (Fig. 4, Table 4).

Immunohistochemistry for fast and slow myosin showed a predominance of type I fibers in patients with dysferlin myopathy compared to controls (Fig. 5A) that increased significantly with the progression of the disease (Spearman rho test $p = 0.042$) (Figs. 5B and C). Conversely, in patients with FSHD we observed predominance of type II fibers that increased with the progression of the disease with a rho coefficient of -0.700 ($p = 0.188$), indicating a tendency to

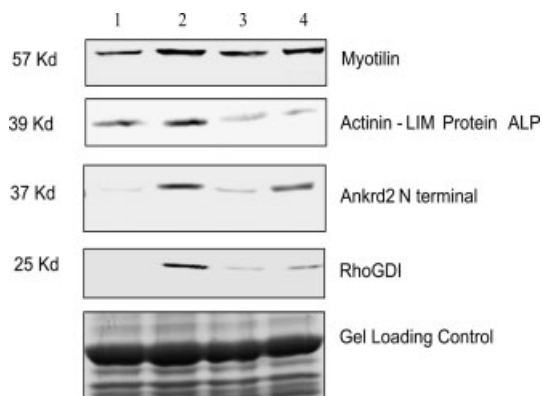


Figure 3. Independent validation of the differential expression patterns observed by 2-DE using Western blot. Equal amounts of triceps homogenate were analyzed from: (1) control, (2) LGMD2B, (3) LGMD2A, (4) FSHD.

wards type II conversion (Fig. 5E). In patients with LGMD2A, we also found a predominance of type I fibers with the progression of the disease, as reported by Fardeau and colleagues [17], although it was not as marked as in patients with dysferlin myopathy ($p = 0.125$) (Fig. 5D). In these patients, we observed groups of atrophic type II fibers whereas type I fibers were enlarged. In fact, in the original report by Fardeau *et al.* [17], the authors found that the diameter of type II fibers, although normal in the less affected patient tended to be slightly decreased in the more affected ones. These data suggest that as in DMD, in LGMD2A the predominance of type I fibers could be due to a more prominent atrophy of type II fibers (see Fig. 5D). We have not found statistically significant changes in fiber diameter that could indicate a selective atrophy of type II fibers in patients with dysferlin myopathy (Wilcoxon test $p = 0.5$ and t -test $p = 0.263$).

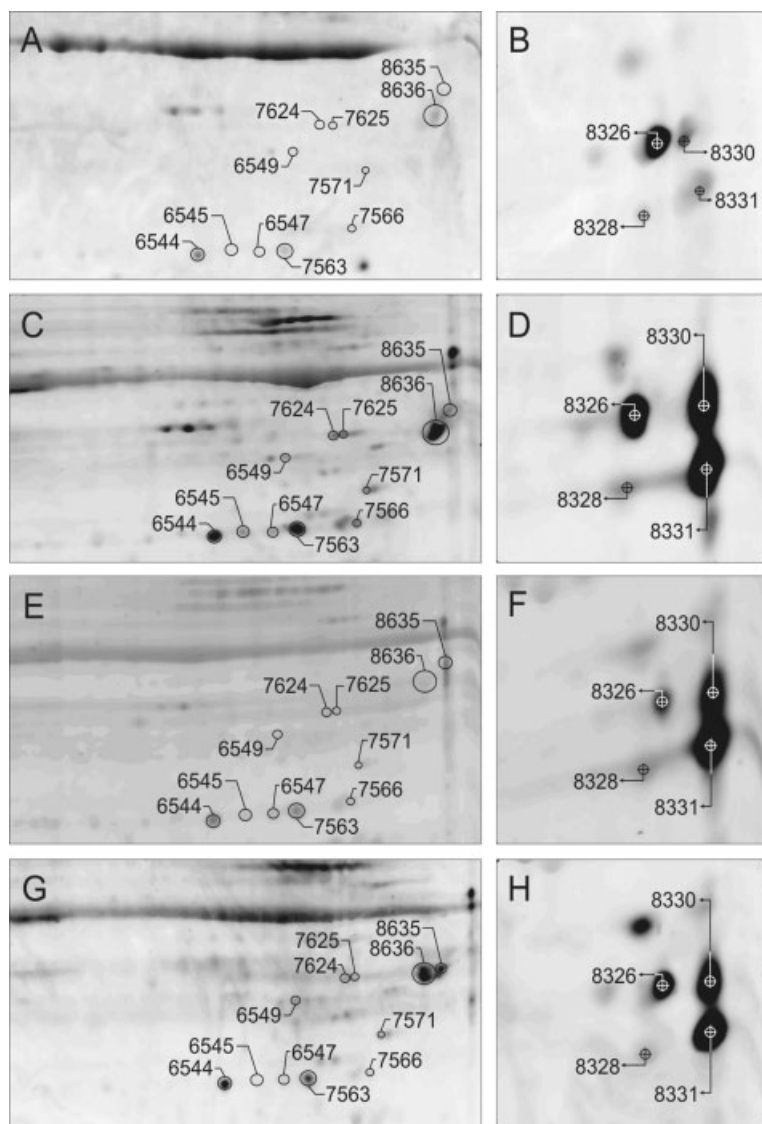


Figure 4. Comparison of protein phosphorylation profiles based on Pro-Q Diamond staining intensity. (A, B) Representative 2-D gels of healthy controls, (C, D) LGMD2B, (E, F) FSHD and (G, H) LGMD2A. Results are shown in Table 4.

Table 4. Phosphorylated proteins differentially expressed in the muscular dystrophies studied

Spot no.	Identification	Accession no.	MASCOT score	Matched peptides	Sequence coverage %	Control	Dysferlin -/-	Calpain -/-	FSHD
8636	Tropomyosin 2 (beta) Isoform 1	gi 339956	74	6	16	1	313.96	0.92	1.48
8635	Skeletal Muscle Tropomyosin	gi 42476296	84	6	18	1	210.45	0.92	1.48
8331	Myosin regulatory light chain 2 Isoform Fast	gi 28372499	97	8	55	1	4.57	7.76	18.52
8330	Human fast Skeletal Myosin light Chain 2	gi 34846	93	9	62	1	2.3	3.51	9.57
8328	Myosin regulatory light chain 2 Isoform Fast	MLRS_Human	121	12	68	1	0.71	2.86	4.78
8326	slow Cardiac Regulatory Light Chain 2	gi 94981553	129	12	76	1	0.52	1.84	0.52
7625*	Troponin T, Slow skeletal Muscle (TnTs)	gi 339783	146	4	18	1	115.12	0.92	1.48
7624*	Troponin T, Slow skeletal Muscle (TnTs)	gi 339783	87	3	12	1	47	0.92	1.48
7571*	Troponin T, Slow skeletal Muscle (TnTs)	gi 339783	105	4	15	1	168.57	0.92	1.48
7566	Homeobox Protein TGIF2LX	TF2LY_HUMAN	63	3	20	1	1.83	0.01	0.02
7563	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1)	HSPB1_HUMAN	91	5	28	1	4.47	1.29	1.89
6549	Troponin T, Slow skeletal Muscle (TnTs)	TNNT1_HUMAN	78	5	17	1	60.43	0.92	1.48
6547	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1)	HSPB1_HUMAN	60	3	17	1	1.83	1.19	1.06
6545	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1)	HSPB1_HUMAN	88	5	28	1	4.32	0.35	1.85
6544 A	Heat Shock Protein beta 1 (HsPB1) Mixture 1	HSPB1_HUMAN	165	10	32	1	0.69	1.94	1.15
6544 B	NADH dehydrogenase ubiquinone NDUS3 Human_ Mixture 2	NDUS3_HUMAN	165	10	19	1	0.69	1.94	1.15

3.3 Energy metabolism

In patients with dysferlin myopathy, we identified increased expression of phosphopyruvate hydratase (spot 23349) that is involved in glycolysis. We also found up-regulation of carbonic anhydrase III (spot 24052) and fatty acid-binding protein (spot 22035), which participate in aerobic metabolism and are expressed mainly in type I muscle fibers.

3.4 Oxidative stress

We detected increased levels of 6-phosphogluconolactonase (spot 22148) in dysferlin myopathy, an enzyme of the pentose phosphate pathway that serves to generate NADPH to prevent oxidative stress.

Phosphoproteomic analysis identified an increased expression of different phosphorylated forms of the chaperone heat shock protein beta 1 (HspB1) also known as HSP27 (spots 7563, 6547, 6545) in the muscle biopsies of patients with dysferlin myopathy.

3.5 Muscle development

We also noted both by proteomic analysis (spot 22603) and Western blot (Fig. 3), a modest up-regulation of Rho-GDI (GDP dissociation inhibitor) in patients with dysferlin myopathy. This protein is implicated in the dynamic rearrangements of cytoskeletal actin filaments [18].

3.6 Protein unfolding/misfolding and ubiquitination

TRIM 72 protein (spot 21949) that belongs to the tripartite motif (TRIM) family of proteins was up-regulated in patients with dysferlin myopathy. This protein bears three structural domains Znf-RING, Znf-Bbox, SPRY rcpt, suggesting that it can participate in transcriptional regulation, cell growth, differentiation, apoptosis and ubiquitination.

4 Discussion

In this study, we have investigated the muscle proteome of patients with dysferlin myopathy in comparison with LGMD2A, FSHD and controls. We have identified a number of proteins that are differentially expressed in muscles without dysferlin. We have also found proteins that are differentially expressed in the three muscular dystrophies when compared with healthy controls. These proteins are probably involved in cellular processes shared by the majority of dystrophic processes and could mask specific processes.

We observed an increased expression of proteins corresponding to contractile proteins specific for type I muscle fibers (myosin regulatory light chain 2, troponin T1 slow, phosphorylated forms of troponin T slow), suggesting a fast-to-slow fiber transition process in these patients. Similar results were recently reported in a study in which LGMD2B patients were compared only to control samples [6]. Fanin and colleagues [19] observed a type I fiber predominance

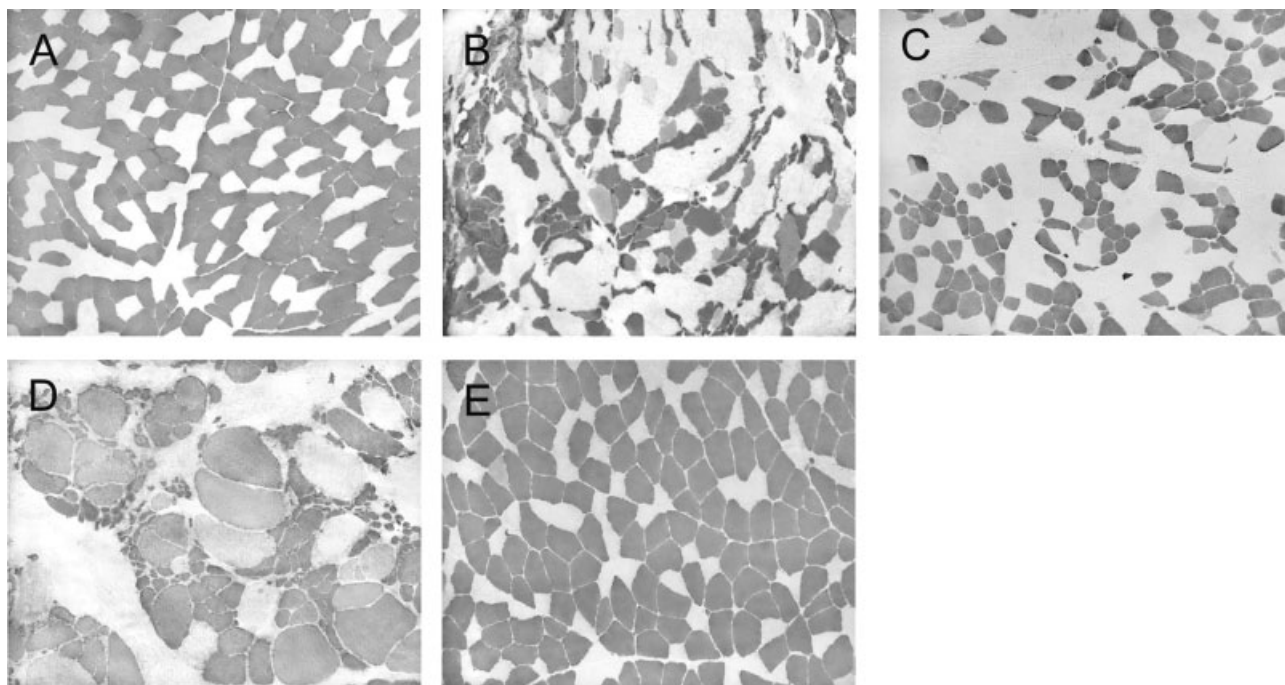


Figure 5. Immunohistochemical analysis using an antibody specific for myosin light chain fast isoforms in different muscular dystrophies. (A) Healthy control, (B) LGMD2B (22 years progression), (C) LGMD2B (5 years progression), (D) LGMD2A (22 years progression) (E) FSHD (5 years progression). The percentage of slow fibers (light) is higher in patients with LGMD2B (B and C) in comparison with control (A) and LGMD2A (D) and FSHD (E).

exceeding 80% in dysferlin myopathy patients and suggested that there was either a selective loss of type II fibers or a conversion process. *Ankrd2*, a titin-binding protein, is a stretch-activated gene associated with slow muscle phenotype and is part of a signaling pathway different to that involved in muscle hypertrophy. Furthermore, the same authors found a decreased expression of *Ankrd2* in denervated rat soleus muscle, producing a shift toward the fast muscle phenotype [20]. The increased levels of *Ankrd2* that we found in dysferlin myopathy patients suggest that there is indeed an active switch to type I fibers rather than a loss of type II fibers. Additionally, we also found up-regulation of enzymes involved in oxidative metabolism such as carbonic anhydrase III, fatty acid-binding protein, and phosphopyruvate hydratase. Finally, we also found up-regulation of HSP 27 and myotilin. The conversion into fatigue-resistant type I fibers depends, among other factors, on the up-regulation of chaperone proteins (*e.g.* HSP 27) for stabilizing myofibrillar proteins during the fast-to-slow transition process [21, 22].

It is well established that type II muscle fibers are more susceptible to stretch than type I [23] and they contract phasically in bursts [24]. In the absence of dysferlin, type II fibers could repair even less efficiently because they could not cope with a massive disruption of the sarcolemma. It is tempting to propose that a switch to type I fibers early in the disease could be protective for skeletal muscle and may slow down the progression of dysferlin myopathy. In this way, it has been reported that chronic low-frequency stimulation of skeletal

muscle induces changes in proteome expression that promote a fast-to-slow transition process [22]. Along the same lines, an increase in the number of type I fibers can be induced by specific targeting of an activated form of peroxisome proliferator-activated receptor- δ using specific agonists [25].

In DMD, there is also a type I predominance but it does not seem related to the progression of the disease as we observed in dysferlin myopathy [26]. In addition, the same authors found that the mean diameter of type 2 fibers was markedly larger than that of type I fibers. In a previous paper, the authors found that in DMD fast muscle fibers are preferentially affected and are the first to degenerate [27].

In a recent study in FSHD, the authors performed 2-DE of muscle biopsies [8] and found a transition from fast-glycolytic to slow-oxidative muscle phenotype. However, fiber type counting revealed that in the majority of patients the percentage of each fiber type was close to 50% of each type and there was no correlation with the progression of the disease (the younger patient showed the highest percentage of type I fibers). Indeed, although the number of patients is low, we performed a Spearman Rho test in our muscle biopsies and observed that whereas in dysferlin myopathy there is a correlation between the number of type I fibers and the years of progression of the disease (correlation coefficient = 0.829; $p = 0.042$), in FSDH patients the coefficient was -0.700 , indicating a tendency towards type II conversion.

We have not found statistically significant changes in fiber diameter that could indicate a selective atrophy of type

II fibers in patients with dysferlin myopathy (Wilcoxon test $p = 0.5$ and t -test $p = 0.263$).

Muscle fiber type switch can be also observed in some physiological conditions. In neurogenic disorders, the change from one type to the other is due to new innervation of the fiber. The reinnervated fibers form groups of type I and type II, both in the same sample. Grouping of myofibers can be observed for fast or slow types and does not depend only on the muscle itself but also on the motor neuron that innervates a specific muscle fiber. In addition, in the situations of muscle disuse, fiber type switch is usually from type I (slow twitch) to type II (fast twitch) [28]. Finally, the studies on age-related changes in muscle fiber types propose that in general a type I predominance can be observed but it is probably due to a loss or atrophy of type II fibers but not to a fiber type conversion [29].

The increased levels of myotilin in dysferlin myopathy patients could probably help the proper assembly, maintenance and/or function of the Z-disc [30] during the switch to slow fiber type. However, the increase in myotilin levels could be also due to the fact that type I fibers have broader Z-discs than type II fibers [31].

In addition to the fast-to-slow conversion, we also found that Rho-GD Inhibitor is up-regulated in dysferlin myopathy. Over expression of Rho GDI in the C2C12 cell line impaired their differentiation into myotubes and the levels of myogenin mRNA were highly reduced [32]. In agreement with these findings, we have recently reported that dysferlin-deficient myotubes differentiate poorly and show very low levels of myogenin [33]. Conversely, we have found an up-regulation of the protein ALP. In a recent report using antisense RNA technology, the authors demonstrated that disruption of ALP expression affects the expression of myogenin, impairing muscle differentiation [34]. Our results suggest that ALP maybe up-regulated in dysferlin myopathy in an attempt to restore proper muscle differentiation and confirm that even in adult skeletal muscle the mechanisms of differentiation are impaired.

Finally, we have also noted that Trim 72 is up-regulated in dysferlin myopathy. Trim 72 belongs to the tripartite motif (TRIM/RBCC) family of proteins, which have three structural domains, a RING-type zinc finger, a B-box-type zinc finger, and B30 2/SPRY domain. Trim 32 belongs to the same family of proteins and is expressed in skeletal muscle. It can be induced upon muscle unloading and reloading, associates with myofibrils and is able to ubiquitinate actin, suggesting its likely participation in myofibrillar protein turnover, especially during muscle adaptation [35]. Mutations in Trim 32 have been associated with limb girdle muscular dystrophy type 2H [36]. The high homology between these two proteins indicates that they may share similar functions, suggesting that Trim 72 may also participate in skeletal muscle remodeling due to fiber type conversion. Additionally, an increased ubiquitination activity of misfolded proteins by Trim 72 may also explain the fact that in the majority of our patients with mutations in the dysferlin gene, the

expression levels of dysferlin protein are absent or highly reduced.

Further studies using 2-D electrophoresis will be done to find other proteins that may have a role in the pathogenesis of dysferlin myopathies.

In conclusion, our results suggest that in dysferlin myopathy (i) there is an active process of fiber type conversion along the progression of the disease that may have therapeutic implications in early stages of the disease and (ii) the expression of proteins involved in muscle differentiation pathways is dysregulated.

This work was supported by research grant PI060455, from the Fondo Investigación Sanitaria, Instituto Carlos III, Spain. We would like to thank Carolyn Newey for editorial support, Dr. I. Gich for his help with the statistical analysis, the Department of Traumatology of our hospital for providing samples from healthy controls and Francesc Canals (Proteomics Facility, Hospital Vall d'Hebrón) and Cristina Chiva (Proteomics Facility, Universitat Pompeu Fabra) for assistance in protein identification.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Turk, R., Sterrenburg, E., van der Wees, C. G., de Meijer, E. J. *et al.*, Common pathological mechanisms in mouse models for muscular dystrophies. *FASEB J.* 2006, 20, 127–129.
- [2] Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C. *et al.*, Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1998, 20, 31–36.
- [3] Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S. *et al.*, A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 1998, 20, 37–42.
- [4] Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A. *et al.*, Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann. Neurol.* 2001, 49, 130–134.
- [5] Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S. *et al.*, Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 2003, 423, 168–172.
- [6] De Palma, S., Morandi, L., Mariani, E., Begum, S. *et al.*, Proteomic investigation of the molecular pathophysiology of dysferlinopathy. *Proteomics* 2006, 6, 379–385.
- [7] Laoudj-Chenivresse, D., Carnac, G., Bisbal, C., Hugon, G. *et al.*, Increased levels of adenine nucleotide translocator 1 protein and response to oxidative stress are early events in facioscapulothoracic muscular dystrophy muscle. *J. Mol. Med.* 2005, 83, 216–224.
- [8] Celegato, B., Capitanio, D., Pescatori, M., Romualdi, C. *et al.*, Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fiber differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics* 2006, 6, 5303–5321.

- [9] Gallardo, E., Rojas-Garcia, R., de Luna, N., Pou, A. *et al.*, Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 2001, *57*, 2136–2138.
- [10] Anderson, L. V., Harrison, R. M., Pogue, R., Vafiadaki, E. *et al.*, Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul. Disord.* 2000, *10*, 553–559.
- [11] Arahata, K., Ishihara, T., Fukunaga, H., Orimo, S. *et al.*, Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve* 1995, *2*, S56–66.
- [12] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 1996, *68*, 850–858.
- [13] Rappsilber, J., Friesen, W. J., Paushkin, S., Dreyfuss, G., Mann, M., Detection of arginine dimethylated peptides by parallel precursor ion scanning mass spectrometry in positive ion mode. *Anal. Chem.* 2003, *75*, 3107–3114.
- [14] Gallardo, E., de Andres, I., Illa, I., Cathepsins are upregulated by IFN-gamma/STAT1 in human muscle culture: a possible active factor in dermatomyositis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001, *60*, 847–855.
- [15] Salmikangas, P., van der Ven, P. F., Lalowski, M., Taivainen, A. *et al.*, Myotilin, the limb-girdle muscular dystrophy 1A (LGMD1A) protein, cross-links actin filaments and controls sarcomere assembly. *Hum. Mol. Genet.* 2003, *12*, 189–203.
- [16] Xia, H., Winokur, S. T., Kuo, W. L., Altherr, M. R., Bredt, D. S., Actinin-associated LIM protein: identification of a domain interaction between PDZ and spectrin-like repeat motifs. *J. Cell. Biol.* 1997, *139*, 507–515.
- [17] Fardeau, M., Hillaire, D., Mignard, C., Feingold, N. *et al.*, Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. Clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the Reunion Island. *Brain* 1996, *119*, 295–308.
- [18] Kim, Y., Chang, S., Modulation of actomyosin contractility by myosin light chain phosphorylation/dephosphorylation through Rho GTPases signaling specifies axon formation in neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, *318*, 579–587.
- [19] Fanin, M., Angelini, C., Muscle pathology in dysferlin deficiency. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2002, *28*, 461–470.
- [20] McKoy, G., Hou, Y., Yang, S. Y., Vega Avelaira, D. *et al.*, Expression of Ankrd2 in fast and slow muscles and its response to stretch are consistent with a role in slow muscle function. *J. Appl. Physiol.* 2005, *98*, 2337–2343; discussion 2320.
- [21] Thompson, H. S., Maynard, E. B., Morales, E. R., Scordilis, S. P., Exercise-induced HSP27, HSP70 and MAPK responses in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 2003, *178*, 61–72.
- [22] Donoghue, P., Doran, P., Dowling, P., Ohlendieck, K., Differential expression of the fast skeletal muscle proteome following chronic low-frequency stimulation. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, *1752*, 166–176.
- [23] Vijayan, K., Thompson, J. L., Norenberg, K. M., Fitts, R. H., Riley, D. A., Fiber-type susceptibility to eccentric contraction-induced damage of hindlimb-unloaded rat AL muscles. *J. Appl. Physiol.* 2001, *90*, 770–776.
- [24] Hennig, R., Lomo, T., Firing patterns of motor units in normal rats. *Nature* 1985, *314*, 164–166.
- [25] Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K. *et al.*, Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR-delta. *PLoS Biol.* 2004, *2*, e294.
- [26] Wang, J. F., Forst, J., Schroder, S., Schroder, J. M., Correlation of muscle fiber type measurements with clinical and molecular genetic data in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 1999, *9*, 150–158.
- [27] Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P., Blau, H. M., Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1988, *52*, 503–513.
- [28] Dubowitz, V., *Muscle Biopsy. A Practical Approach*, Baillière Tindall, London 1985.
- [29] Thompson, L. V., Effects of age and training on skeletal muscle physiology and performance. *Phys. Ther.* 1994, *74*, 71–81.
- [30] von Nandelstadh, P., Gronholm, M., Moza, M., Lamberg, A. *et al.*, Actin-organising properties of the muscular dystrophy protein myotilin. *Exp. Cell. Res.* 2005, *310*, 131–139.
- [31] Thornell, L. E., Carlsson, E., Kugelberg, E., Grove, B. K., Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am. J. Physiol.* 1987, *253*, C456–468.
- [32] Takano, H., Komuro, I., Oka, T., Shiojima, I. *et al.*, The Rho family G proteins play a critical role in muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 1998, *18*, 1580–1589.
- [33] de Luna, N., Gallardo, E., Soriano, M., Dominguez-Perles, R. *et al.*, Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation “in vitro”. *J. Biol. Chem.* 2006, *281*, 17092–17098.
- [34] Pomies, P., Pashmforoush, M., Vegezzi, C., Chien, K. R. *et al.*, The cytoskeleton-associated PDZ-LIM protein, ALP, acts on serum response factor activity to regulate muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell* 2007, *18*, 1723–1733.
- [35] Kudryashova, E., Kudryashov, D., Kramerova, I., Spencer, M. J., Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J. Mol. Biol.* 2005, *354*, 413–424.
- [36] Frosk, P., Weiler, T., Nysten, E., Sudha, T. *et al.*, Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2002, *70*, 663–672.

12. Anexo

Métodos no incluidos en los artículos

Ensayo de proliferación de fibroblastos

Los cultivos celulares primarios de fibroblastos se obtuvieron de explantes de biopsia de piel de pacientes con escleromixedema y controles. El medio de cultivo utilizado para el cultivo de fibroblastos contiene MEM (Gibco), suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal inactivado, 2mM L- glutamina, 100U/ml de penicilina y 100ug/ml de estreptomycin. Para los ensayos de proliferación celular, los fibroblastos de piel normal (A) y los de escleromixedema (B) fueron cultivados en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células / pocillo en medio MEM suplementado con 10% de suero humano inactivado o suero humano normal. Después de 48h de incubación, se añadió 1μCi de timidina ^3H /pocillo durante 18 horas. Los fibroblastos se despegaron con tripsina-EDTA, y la radioactividad se leyó en un contador de centelleo (Packard).

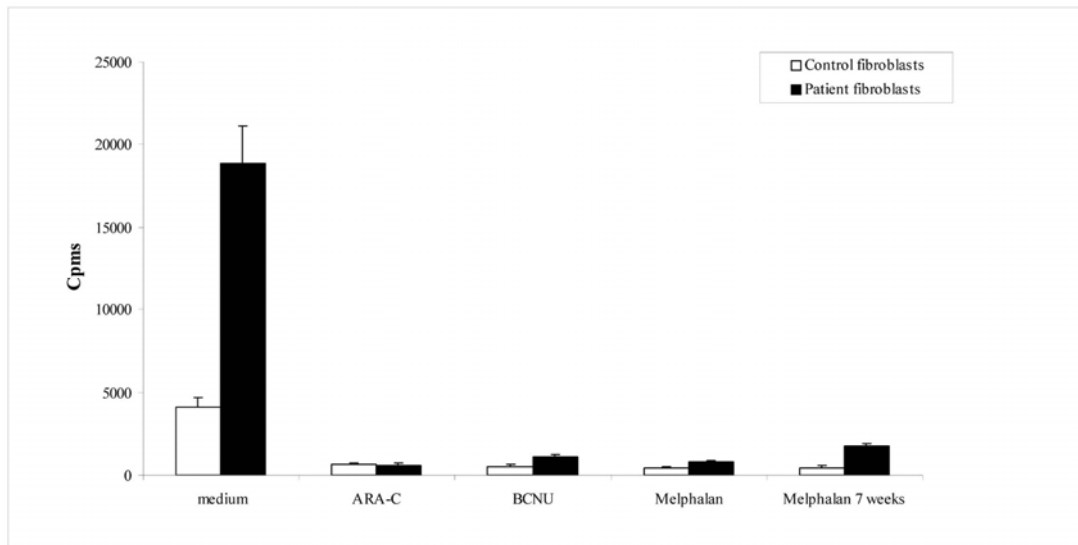


Figura artículo 1

Proliferación de los fibroblastos controles y fibroblastos del paciente con los diferentes tratamientos quimioterapéuticos. Observamos un aumento de la proliferación en los fibroblastos del paciente en condiciones normales de cultivo, cuando estas fibroblastos son tratados con las diferentes tratamientos se aprecia que el índice de proliferación después de un periodo de 24 horas se estabiliza a los niveles normales.

Fe de errata

En la figura 1A del artículo 1 publicado en la revista Blood en el apartado A (ii, v, viii) donde se indica Post-ASCT debería aparecer Pre-ASCT. Asimismo, en la figura 1B (ii) donde se indica Post-ASCT debería también aparecer Pre-ASCT. Sin embargo, en el pie de figura estos datos están indicados correctamente.

Otros artículos publicados durante la estancia predoctoral en el Hospital de Sant Pau, Laboratorio de Neurología Experimental.

Absence of Dysferlin Alters Myogenin Expression and Delays Human Muscle Differentiation “*in Vitro*”

Absence of Dysferlin Alters Myogenin Expression and Delays Human Muscle Differentiation “*in Vitro*”*

Received for publication, February 27, 2006, and in revised form, April 11, 2006. Published, JBC Papers in Press, April 11, 2006, DOI 10.1074/jbc.M601885200

Noemí de Luna[‡], Eduard Gallardo[‡], Mario Soriano[§], Raúl Dominguez-Perles[‡], Carolina de la Torre[‡], Ricardo Rojas-García[‡], Jose M. García-Verdugo[§], and Isabel Illa^{‡,1}

From the [‡]Servei de Neurologia i Laboratori de Neurologia Experimental, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, 08025 Barcelona, Spain and the [§]Centro de Investigaciones Príncipe Felipe and Instituto Cavanilles, Universidad de Valencia, 46980 Valencia, Spain

Mutations in dysferlin cause a type of muscular dystrophy known as dysferlinopathy. Dysferlin may be involved in muscle repair and differentiation. We compared normal human skeletal muscle cultures expressing dysferlin with muscle cultures from dysferlinopathy patients. We quantified the fusion index of myoblasts as a measure of muscle development and conducted optic and electronic microscopy, immunofluorescence, Western blot, flow cytometry, and real-time PCR at different developmental stages. Short interference RNA was used to corroborate the results obtained in dysferlin-deficient cultures. A luciferase reporter assay was performed to study myogenin activity in dysferlin-deficient cultures. Myoblasts fusion was consistently delayed as compared with controls whereas the proliferation rate did not change. Electron microscopy showed that control cultured cells at 10 days were fusiform, whereas dysferlin-deficient cells were star-shaped and large. After 15 days the normal multinucleated appearance and structured myofibrils were not present in dysferlin-deficient cells. Strikingly, myogenin was not detected in myotubes from dysferlin-deficient cultures using Western blot, and mRNA analysis showed low levels ($p < 0.05$) compared with controls. Flow cytometry and immunofluorescence also showed reduced levels of myogenin in dysferlin-deficient cultures. When the dysferlin gene was knocked down (~80%), myogenin mRNA leveled down to ~70%. MyoD and desmin mRNA levels in controls and dysferlin-deficient cultures were similar. The reporter luciferase assay demonstrated a low myogenin activity in dysferlin-deficient cultures. These results point to a functional link between dysferlin and myogenin, and both proteins may share a new signaling pathway involved in differentiation of skeletal muscle *in vitro*.

Dysferlin is a 230-kDa protein located at the cell membrane of muscle cells. Mutations in the dysferlin gene cause a heterogeneous group of muscular dystrophies named dysferlinopathies (1–4).

The homology of dysferlin with *fer-1* of *Caenorhabditis elegans* suggests a role for this protein in the fusion of intracellular vesicles with the sarcolemma (5). Dysferlin has recently been reported to be implicated in skeletal muscle membrane repair (6, 7). Studies performed using the mouse cell line C2C12 showed that dysferlin was expressed at low levels in myoblasts and at high levels in mature myotubes (8). In a previous study, in normal primary human muscle cultures, we reported that both

dysferlin mRNA and protein expression were higher in multinucleated myotubes than at the myoblast stage, suggesting dysferlin plays a role in muscle differentiation (9).

The myogenic regulatory factors (MRFs)² contain a conserved sequence-specific DNA binding domain and a helix-loop-helix motif required for heterodimerization. Two groups of MRFs are expressed in a temporally distinct pattern. Primary MRFs (MyoD and Myf-5) are required for myogenic determination, whereas the secondary MRFs (myogenin and MRF-4) are needed downstream of MyoD and Myf-5 as differentiation factors (10). Null mutations in the myogenin gene cause a severe reduction of skeletal muscle mass, showing that myogenin is essential for muscle development *in vivo* (11). Mutations in MyoD, Myf-5, and MRF-4 do not lead to morphological abnormalities of skeletal muscle (12–14).

In this study, we analyzed human skeletal muscle cultures from dysferlinopathy patients and normal controls at different developmental stages. Morphological changes and differences in the expression of the MRFs, MyoD as a proliferation muscle marker and myogenin as a differentiation marker, were studied using different methods.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Primary Human Skeletal Muscle Cultures—Muscle biopsies from three normal controls (Dysf^{+/+}) and from three sex and age-matched dysferlinopathy patients (Dysf^{-/-}) with total absence of the protein in Western blot (W-B) and immunohistochemical analysis were used for this study. All muscle biopsies were taken from triceps muscle.

Human muscle biopsies were minced and cultured in a monolayer according to the method described by Dr. Askanas (15). Briefly, the culture medium for the myoblast stage contains 75% Dulbecco's minimal essential medium (Invitrogen) and 25% M199 medium (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10 μ g/ml insulin, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 0.25 μ g/ml fungizone, 10 ng/ml epidermal growth factor, and 25 ng/ml fibroblast growth factor.

To obtain highly purified myoblasts, primary cultures were sorted for the early surface marker CD56 by immunomagnetic selection. Each 10⁷ cells were mixed with 20 μ l of CD56-coated microbeads (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and incubated at 6–12 °C for 15 min. Unbound microbeads were removed by washing cells in excess PBS buffer followed by centrifugation at 300 \times g for 10 min. The cell pellet was resuspended in PBS buffer to a concentration of 2 \times 10⁸ cells/ml before separation on a midiMACS cell separator (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany).

* This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI 02/0388 and PI 03/1387) and from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF 03/9240). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Neurology, Hospital de Sant Pau, C/Pare Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-2919382; Fax: 34-93-5565602; E-mail: illa@ santpau.es.

² The abbreviations used are: MRF, myogenic regulatory factor; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; FI, fusion index; EM, electron microscopy; W-B, Western blot; M.F.I., mean fluorescence index; siRNA, short interfering RNA; TK, thymidine kinase; RER, rough endoplasmic reticulum.

CD56-positive cells were seeded at 2000 cells/cm² using the culture medium for the myoblast stage containing 15% of FBS and without growth factors to avoid interference with the results. At day 10, when the myoblasts started to fuse, the medium was substituted with one containing 2% of FBS. The medium was changed twice a week, and the muscle cultures were examined to confirm confluent growth of myoblasts or myotubes. Each condition was performed in duplicate.

We measured the fusion index (FI) at each stage (5, 10, and 15 days) by calculating the mean percentage of nuclei in myotubes in respect to the total number of nuclei (myoblasts + myotubes) found in five randomly chosen areas. A cell number count was conducted to the analyze culture growth rate at each stage.

Electron Microscopy (EM)—Dysf^{+/+} and Dysf^{-/-} myoblasts were seeded at 2000 cells/cm² in a Lab-Tek chamber slides of 4 wells (Nalge Nunc International, Naperville, IL) and were fixed in 3.5% glutaraldehyde for 30 min at 37 °C. Cells were postfixed in 1% OsO₄ for 30 min at room temperature and stained in 2% uranyl acetate in the dark for 1 h at 4 °C. Finally, cells were rinsed in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2), dehydrated in ethanol, and infiltrated overnight in Araldite (Durcupan, Fluka, Buchs SG, Switzerland). Following polymerization, embedded cultures were detached from the chamber slide and glued to Araldite blocks. Serial semi-thin (2 μm) sections were cut with a diamond knife and mounted onto slides and stained with 1% toluidine blue. Semi-thin sections were glued (Super Glue) to Araldite blocks and detached from the glass slide by repeated freezing (in liquid nitrogen) and thawing. Ultrathin (0.05 μm) sections were prepared with an Ultracut UC-6 (Leica, Heidelberg, Germany), stained with lead citrate, and photographed on a Jeol 1010 CX electron microscope.

Immunofluorescence—Cells cultured on glass coverslips were fixed in acetone:methanol (1:1), and immunofluorescence of human skeletal muscle culture was performed as described previously (16). Briefly, after 30 min in blocking solution, the samples were incubated overnight with a monoclonal antibody anti-desmin, anti-dysferlin (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK), and anti-myogenin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), followed by 45 min with biotinylated horse anti-mouse IgG (5 μg/ml) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). The samples were rinsed with phosphate-buffered saline and incubated with avidin-fluorescein (1 μg/ml) (Vector Laboratories Inc.). Coverslips were then mounted in a glycerol medium containing polyvinyl alcohol (Fluoprep, BioMerieux, Marcy L'Étoile, France). As a negative control, sections were processed using either an isotype-matched monoclonal antibody to an unrelated antigen (monoclonal mouse anti-cytomegalovirus) or without a primary antibody but using the same secondary antibody. The nuclei were dyed with ethidium bromide. Finally, the samples were examined using an Axioscop 2 plus photomicroscope equipped with epifluorescence optics (Carl Zeiss Microscope, Munich, Germany).

Western Blot—Cell samples corresponding to each day analyzed (days 5, 10, and 15) were scraped from the human muscle culture dish and quickly weighed and homogenized twice for 15 s in 19 volumes of treatment buffer containing 0.125 mol/liter Tris/HCl buffer, pH 6.4, 10% glycerol, 4% SDS, 4 mol/liter urea, 10% mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue (final pH of treatment buffer was 6.8) as described previously (17). The samples were placed in boiling water for 3 min and centrifuged at 9500 × g for another 3 min before 30 μl aliquots of the supernatants (equivalent to ~200 μg of non-collagen protein) were applied to each lane. Unspecific binding sites on the blots were blocked by incubation in 5% low fat dried milk powder in a phosphate buffer saline. The primary mouse monoclonal

antibody was then added. Peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (Dako P260, Glostrup, Denmark) was applied at a 1:300 dilution when using anti-dysferlin antibody (Novocastra) and at a 1:10,000 dilution when using anti-β-actin (Sigma, Steinheim, Germany) as a primary antibody. When anti-myogenin antibody (BD Biosciences) was used as a primary antibody, the secondary antibody was a horse anti-mouse labeled to biotin (Vector Laboratories, Inc.). Immunoreactive bands were visualized by an enhanced chemiluminescence system (Pierce). Since myogenin and β-actin have a similar molecular mass (34 and 42 kDa, respectively), the membrane was first incubated with myogenin. After development, membranes were briefly washed with PBS and incubated for 15 min with Restore Western blot stripping buffer (Pierce) to eliminate bound myogenin antibody. Membranes were then incubated with the antibody anti-β-actin, as indicated above.

Flow Cytometry—One-color flow cytometry was performed for the detection of human myogenin. Monoclonal primary antibody anti human myogenin (clone D-10, mouse IgG3, Santa Cruz Biotechnology Inc.) and an IgG isotype control were used to stain myotubes from both normal controls and dysferlinopathy patients. Cells were trypsinized, fixed with cold 4% formaldehyde in PBS for 1 h at 4 °C, and permeabilized with 0.4% Triton-X-100 for 15 min at 37 °C. Positive signals were detected by adding fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cambridgeshire, UK). Cells were finally acquired and analyzed in a FACScan cytometer (BD Biosciences). Expression levels of myogenin were referred to as mean fluorescence index (M.F.I.).

RNA Extraction and Real-time PCR—RNA from muscle cultures at the three stages (days 5, 10, and 15) was extracted using Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc., Houston, TX) following the manufacturer's instructions. Total RNA (0.2 μg) of muscle cultures at each stage was reverse transcribed into cDNA using TaqMan reverse transcriptase (Applied Biosystems, Inc.).

Quantification of the mRNA coding for dysferlin, desmin, MyoD, myogenin, and 18S as internal standard was performed using TaqMan Universal Master Mix technology (Applied Biosystems). Quantitative PCR was performed in a total reaction volume of 20 μl per well. The primers used for real time PCR were designed by Applied Biosystems: dysferlin, Hs 00243339_ml; MyoD, Hs 00159528_ml, myogenin Hs 00231167_ml, desmin Hs 00157258_ml, and 18S, Hs 99999901_s1 (Applied Biosystems). The comparative C_T method (ΔΔC_T) for relative quantification of gene expression was used. As long as the target and normalizer (18S) have similar dynamic ranges, this method is the most practical. The calculations for the quantification start with differentiating (ΔC_T) between the target C_T values and the normalizer: ΔC_T = C_T(target) - C_T(normalizer). The ΔC_T value was calculated for each sample. A pool of myoblast Dysf^{+/+} was used as a reference (base line). The comparative ΔΔC_T calculates the difference between sample ΔC_T value and the base-line ΔC_T. Finally, the comparative expression level was obtained transforming the logarithmic values to absolute values using 2^{-ΔΔC_T}. The "t" test was used for statistical analysis.

RNA Interference Dysferlin Knockdown—The oligonucleotides for the construction of a short interfering RNA (siRNA) were designed following the manufacturer's instructions for the Silencer siRNA construction kit (Ambion, Austin, TX). The sense and antisense siRNA oligonucleotide templates for dysferlin were: 5'-AAGAAGAGAACA-CAAAGTCATCCCTGTCTC-3' and 5'-AAGATGACTTTGGTTCTCTTCCCTGTCTC-3'. The luciferase gene was used as a negative control, and the oligonucleotide templates used to create the double-stranded

Myogenin Expression in Dysferlinopathy

RNA were: 5'-AACTTGGCAAGTATACGGTTGCCTGTCTC-3' and 5'-ACAACCGTATACTTGGCAAGCCTGTCTC-3'. The siRNA triggers degradation of homologous mRNA by the formation of double-stranded RNA. 25,000 cells/cm² were transfected with siRNA/siPORT Amine (Ambion) at a concentration of 20 nM/6 μ l. The appropriate transfection agent was determined previously, demonstrating that the amine siPORT transfection agent (Ambion) provided a stronger silencing effect as compared with the lipid siPORT transfection agent (Ambion) in these cells. Muscle cultures were incubated with siRNAs mix and the transfection agent alone and analyzed at 24, 48, and 72 h.

Construction of Luciferase Reporter Gene Plasmids—We used RNA from control myotubes as a template to amplify a 329-bp fragment containing an E-box (CAGCTG), which is recognized by myogenin. An retrotranscriptase PCR reaction using a previously described primer pair (18) that appended unique BglII and NheI sites on the 5'- and 3'-ends was performed. The amplified sequence was digested using BglII and NheI restriction enzymes (Promega, Madison, WI) and cloned in frame into a pGL3-basic luciferase vector (Promega) opened with the same set of enzymes. The ligation reaction was performed using T4 DNA ligase (Promega). The correct open reading frame and the orientation of the cloned fragment were confirmed by DNA sequencing. The plasmid pGL3-basic containing the E-box recognized by myogenin was purified using endotoxin-free Maxi-prep (Qiagen, Valencia, CA).

Transient Transfection—Myoblasts from *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} were seeded at 5000 cells/cm² in 24-well plates 1 day before the transfection. Cells were transfected with 0.5 μ g of DNA using FuGENE 6 (Roche Diagnostics) at a ratio of 1:6. As internal control for each transfection, cells were co-transfected with 10 ng of the plasmid RL-TK (Promega) expressing *Renilla* under the herpes simplex virus promoter.

Luciferase Assay—The culture medium was discarded after 48 h, and cells were washed twice with PBS. For the luciferase assay, we used the dual-luciferase reporter assay system (Promega). Transient transfectants were harvested with lysis buffer, and the luciferase activity was measured with a luminometer (Victor 3, PerkinElmer Life Sciences). The values obtained were normalized with *Renilla* activity. We used the pGL3-basic vector without insert as a negative control.

RESULTS

Myotube Formation Is Slower in *Dysf*^{-/-} than in *Dysf*^{+/+} Muscle Cultures—The analysis of cellular growth of *Dysf*^{-/-} human muscle cultures compared with *Dysf*^{+/+} cultures showed no significant differences in the proliferation rate (Fig. 1A). However, at days 10 and 15, while the FI increased considerably in *Dysf*^{+/+} muscle cultures, it remained very low in *Dysf*^{-/-} muscle cultures ($p < 0.05$) (Fig. 1B).

Electron Microscopy Revealed Abnormal Differentiation of *Dysf*^{-/-} Primary Cultures—Morphological differences were appreciated in semi-thin sections and EM at 10 and 15 days of culture. At day 10, while *Dysf*^{+/+} cultured cells were mostly fusiform, with a diameter of 10–20 μ m and often multinucleated, *Dysf*^{-/-} myoblasts were in general star-shaped and had a diameter of 30–50 μ m. At EM, *Dysf*^{-/-} myoblasts showed enlarged rough endoplasmic reticulum (RER) cisterns, large Golgi complexes, and a heterogeneous population of lysosomes. Smooth endoplasmic reticulum was greatly developed. In contrast, in *Dysf*^{+/+} cells, RER cisterns were not enlarged or only slightly enlarged. Lysosomes were not abundant, and the heterogeneous shapes found in *Dysf*^{-/-} were not observed.

At 15 days of culture, analysis by light microscopy demonstrated some myotube *Dysf*^{+/+} containing up to eight nuclei (Fig. 2A). How-

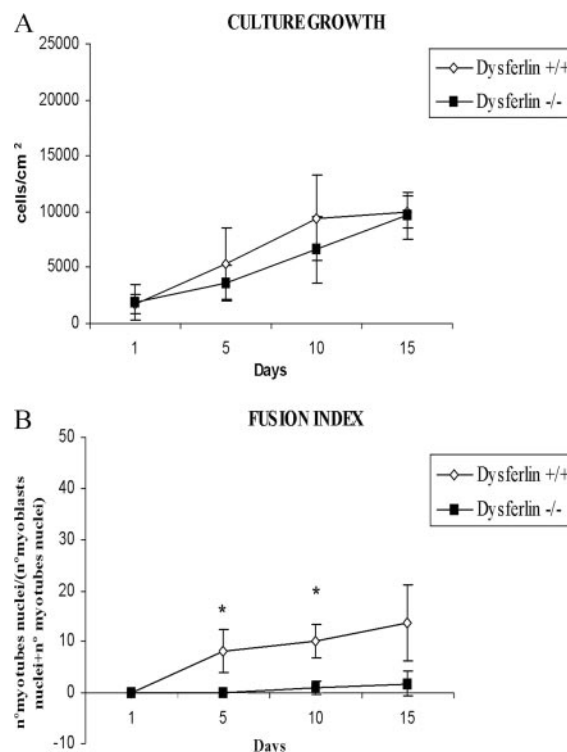


FIGURE 1. *Dysf*^{-/-} skeletal muscle cultures show normal proliferation rates and delayed myotube formation. A, comparison of cell culture growth of dysferlinopathy patients (*Dysf*^{-/-}) and control (*Dysf*^{+/+}) skeletal muscle cultures. The number of cells (2000 cells/cm²) in muscle cultures used at the beginning of the experiment was the same in both groups. At day 10, the culture medium was changed for one containing 2% of FBS. There were no statistically significant differences between *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} cultures, except that those from *Dysf*^{-/-} grew more slowly than controls. B, comparison of the FI of *Dysf*^{-/-} and *Dysf*^{+/+}. In *Dysf*^{-/-} muscle cultures, myoblasts started to fuse later than in those of *Dysf*^{+/+} (*, $p < 0.05$). Myoblasts in *Dysf*^{+/+} cultures started to fuse at a very early stage in muscle development, while those in the *Dysf*^{-/-} muscle cultures started to fuse at day 15.

ever, in *Dysf*^{-/-} muscle cultures the majority of myotubes were binucleated (Fig. 2B). Interestingly, some of the images observed resembled fusion phenomena by phagocytosis. Indeed, many picnotic nuclei were found, in agreement with the scarce number of cells bearing more than one nucleus in *Dysf*^{-/-} cultures. At this point, *Dysf*^{+/+} cells had a more prominent fusiform shape, whereas *Dysf*^{-/-} cells remained star-shaped. The myofibril structure was clearly observed in *Dysf*^{+/+} cells (Fig. 2, C and E) but was not visible in *Dysf*^{-/-} cells. Myofibril structure was disorganized in *Dysf*^{-/-} cells (Fig. 2D). RER remained enlarged in *Dysf*^{-/-} muscle cells, and the number of lysosomes and vacuoles was higher than in *Dysf*^{+/+} (Fig. 2F). Mitochondrial morphology was also very irregular in *Dysf*^{-/-} cultures at 15 days, compared with that of *Dysf*^{+/+} cells.

Dysferlin Expression Is Absent in Myotube *Dysf*^{-/-}—Immunofluorescence results showed that there were no dysferlin expression in myoblasts in control cultures at days 5 and 10. When myoblasts started to fuse to form myotubes, dysferlin expression increased, reaching its maximum levels at day 15 following the pattern previously described (9). Interestingly, dysferlin accumulated at the growing bud (end of the myotube) from day 15 (Fig. 3, A–C). In *Dysf*^{-/-} cultures, we did not detect dysferlin expression at any of the three stages (days 5, 10, and 15) (Fig. 3, D–F).

Dysferlin expression in human primary muscle cultures from control biopsies was detectable from day 10 using W-B analysis. Protein expression remained at similar levels until day 15. W-B of dysferlin in *Dysf*^{-/-} muscle cultures showed no bands corresponding to the molecular mass

FIGURE 2. Semi-thin and ultra-thin sections from *Dysf*^{-/-} muscle cultures show abnormal differentiation of myotubes. *A* and *B*, semi-thin sections of myoblasts cultured for 15 days and stained with toluidin blue. *A*, note myotubes with oval nuclei from a control *Dysf*^{+/+} culture. *B*, observe the irregular forms of the *Dysf*^{-/-} cells, with large cytoplasm and a single nucleus. *C–F*, ultrastructural analysis using transmission electron microscopy. *C*, EM of myotubes from *Dysf*^{+/+} with neatly organized myofibrils throughout the myotubes. *D*, cytoplasm from *Dysf*^{-/-} cultures with disorganized myofibrils, as well as scattered cytoplasmic organelles; note also the presence of dense bodies, such as lysosomes (arrows). *Inset*, detail of disorganized myofibrils. *E*, detail of another *Dysf*^{+/+} myotube, showing early skeletal muscle sarcomere (arrows). *F*, detail of a *Dysf*^{-/-} culture, showing large expansions of endoplasmic reticulum (arrows), rarely seen in *Dysf*^{+/+} cultures. Moreover, the *Dysf*^{-/-} culture displays large dictyosomes surrounded by clusters of vesiculae. *D*, dictyosome; *N*, nucleus. Scale bar: 10 μm (*A* and *B*), 1 μm (*C*); 0.5 μm (in *D*), 0.2 μm (*inset* in *D*), 1 μm (*E*), 0.5 μm (*F*).

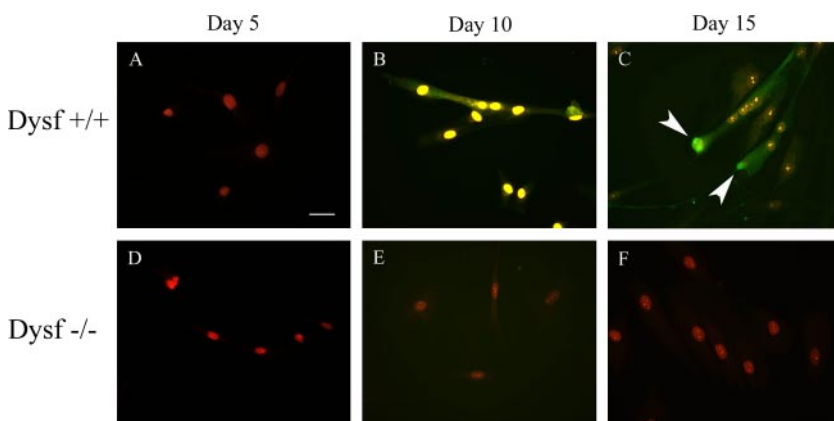
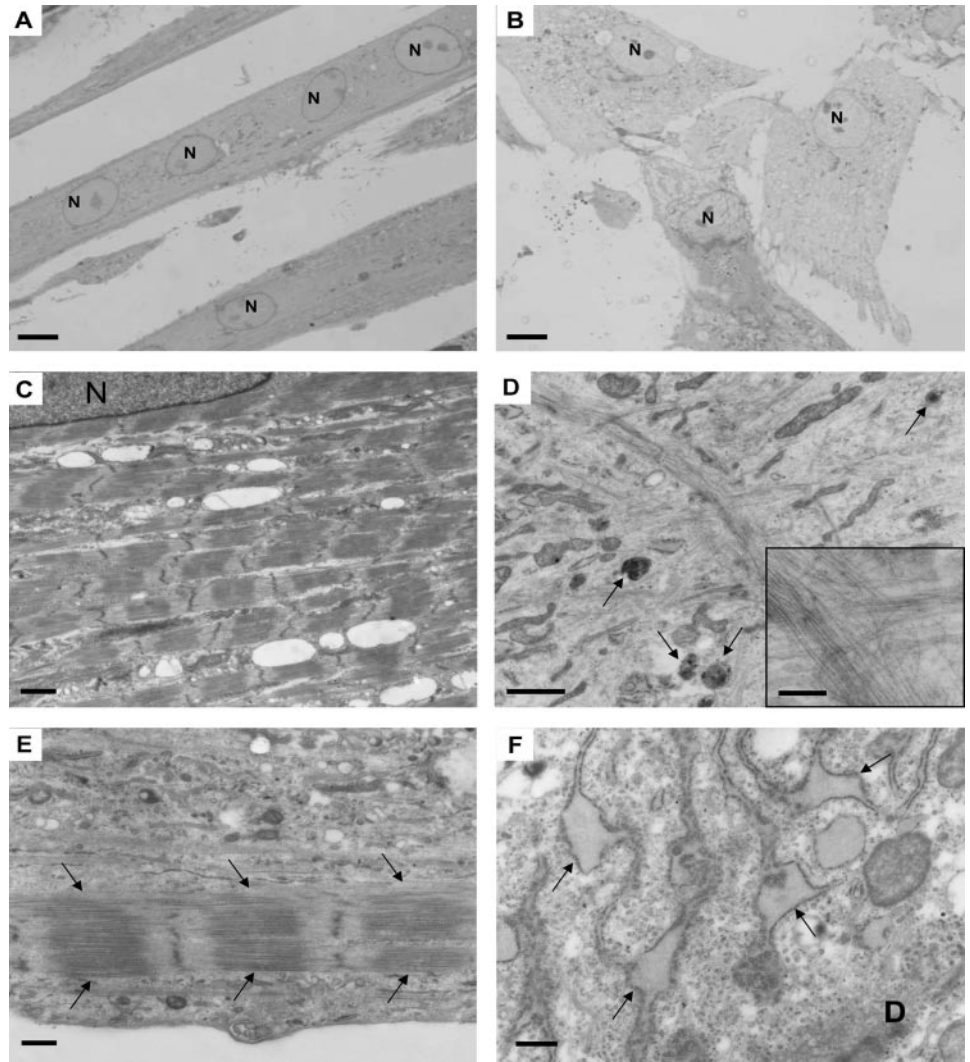


FIGURE 3. Dysferlin is not expressed in either *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} myoblasts or in *Dysf*^{-/-} myotubes. Dysferlin antibody was incubated with a secondary antibody labeled with fluorescein isothiocyanate, and the nuclei were dyed with ethidium bromide. *A–C*, dysferlin immunofluorescences from control skeletal muscle cultures (*Dysf*^{+/+}). Dysferlin staining was present in myotube stages of *Dysf*^{+/+} muscle cultures (day 15). An accumulation of dysferlin was observed in the growing pole of myotube. This region was involved in fusion phenomena of myoblasts (arrowheads). *D–F*, dysferlin immunofluorescence from dysferlin-deficient skeletal muscle cultures (*Dysf*^{-/-}). Dysferlin was absent in all stages of development of skeletal muscle cultures. Scale bar = 5 μm.

of dysferlin or lower at any of the stages analyzed either in myoblasts or in myotubes (data not shown).

*MyoD Expression Is Normal, but Myogenin Is Reduced in *Dysf*^{-/-} Muscle Cultures*—MyoD and desmin mRNA levels were no different from those of control cultures. MyoD expression in control cultures was higher in the proliferation than in the differentiation stages, reaching its maximum levels at day 5. MyoD expression showed the same pattern in *Dysf*^{-/-} cultures at

all the days analyzed, with slightly reduced levels as compared with controls. However, these differences were not statistically significant.

Myogenin expression was tested at days 5, 10, and 15 in *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} skeletal muscle cultures. In *Dysf*^{+/+} cultures, myogenin was expressed from day 10. However, in *Dysf*^{-/-} cultures, no bands corresponding to myogenin protein were observed at any of the stages analyzed (Fig. 4A). Immunofluorescence of *Dysf*^{-/-} myo-

Myogenin Expression in Dysferlinopathy

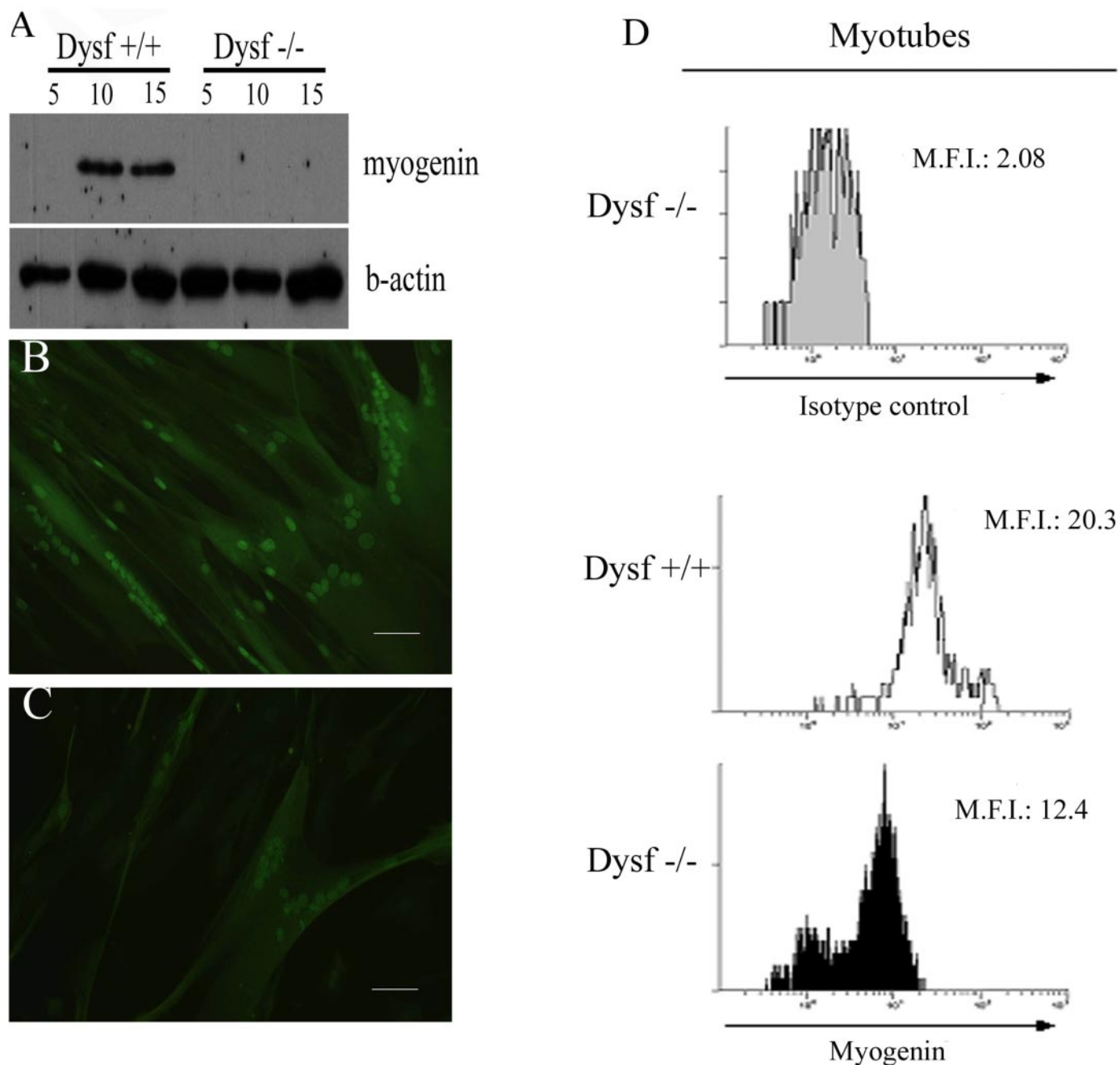


FIGURE 4. Western blot, immunofluorescence, and flow cytometry of $Dysf^{+/+}$ and $Dysf^{-/-}$ muscle cultures shows reduced expression of myogenin in the absence of dysferlin. *A*, Cells corresponding to the three different stages were processed for W-B. 200 μ g of non-collagen protein was added in each lane, and antibody anti- β -actin was used as a loading control. In $Dysf^{+/+}$ cultures, myogenin was absent in the early stages of myoblasts (day 5) and was detected when myotubes were abundant (day 15). Myogenin could not be detected in $Dysf^{-/-}$ extracts from any of the days analyzed and presented a severe reduction even at the myotube stage. *B*, $Dysf^{+/+}$ myotube nuclei showed positive staining for myogenin. *C*, myogenin expression was reduced in $Dysf^{-/-}$ myotubes. *D*, acquisition and analysis of $Dysf^{+/+}$ and $Dysf^{-/-}$ myotubes by flow cytometry showed a decrease in the expression of myogenin in myotube $Dysf^{-/-}$ (M.F.I.: 12.4) with regard to $Dysf^{+/+}$ myotubes (M.F.I.: 20.3). Scale bar: 50 μ m.

tubes using an anti-myogenin antibody showed that the nuclei staining were weaker than in control myotubes (Fig. 4, *B* and *C*).

Using flow cytometry, we then examined whether myogenin expression in control myotubes was higher than in $Dysf^{-/-}$. A flow cytometry assay with an anti-human myogenin antibody showed a decreased expression of myogenin in the $Dysf^{-/-}$ myotubes (M.F.I.: 12.4) compared with $Dysf^{+/+}$ myotubes (M.F.I.: 20.3) (Fig. 4*D*).

Similar results were obtained when mRNA levels were studied, showing that a reduced expression of myogenin paralleled a reduction of dysferlin mRNA in $Dysf^{-/-}$ muscle cultures ($p < 0.05$) (Fig. 5, *A* and *B*).

Dysferlin siRNA Effectively Reduces Dysferlin mRNA Levels—To further demonstrate the link between dysferlin and myogenin mRNA expression, we performed real-time PCR on cultures treated with dysferlin siRNA. Dysferlin mRNA was not reduced in the first 24 h. However, after 48 h of treatment with dysferlin siRNA, cultures showed a significant reduction of dysferlin mRNA ($\sim 80\%$) compared with those treated with luciferase siRNA ($p < 0.01$). This observation paralleled with a reduction of myogenin of $\sim 70\%$ ($p < 0.01$) observed in cultures treated with dysferlin siRNA (Fig. 6). At 72 h, both dysferlin and myogenin mRNA reached normal levels of expression. As

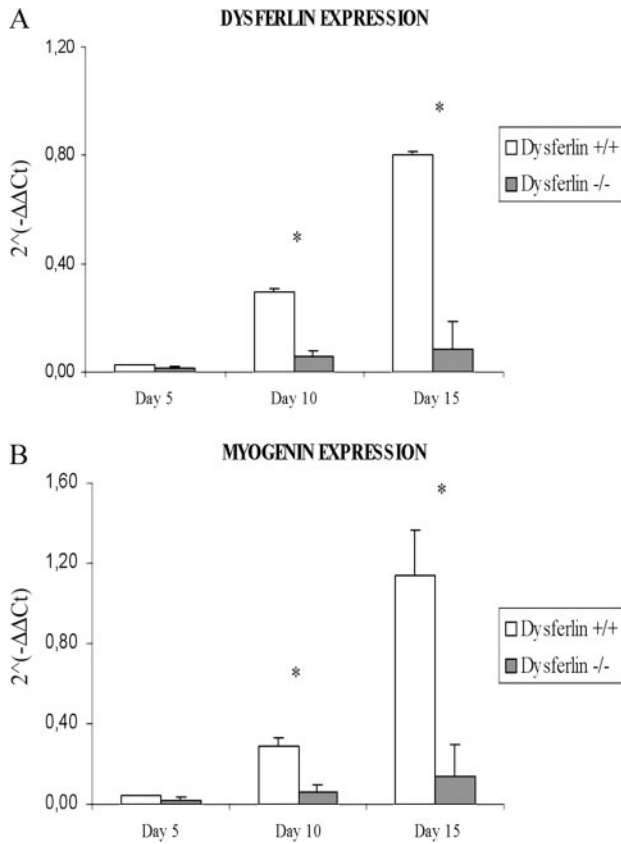


FIGURE 5. Dysferlin and myogenin mRNA expression is reduced in *Dysf*^{-/-} cultures. A, the dysferlin mRNA expression was low at all three stages in *Dysf*^{-/-} cultures (black bars), compared with *Dysf*^{+/+} muscle cultures in which the mRNA expression increased with skeletal muscle differentiation (white bars) (*, *p* < 0.05). B, myogenin mRNA in proliferation stages (days 5 and 10) showed low levels both in *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} muscle cultures. At myotube stages, mRNA levels increased in *Dysf*^{+/+} (white bars) (day 15) but remained low in in *Dysf*^{-/-} (black bars) (*, *p* < 0.05).

a control, we analyzed desmin mRNA expression and no differences were found between cultures treated with dysferlin siRNA or luciferase siRNA. At 24, 48, and 72 h we also analyzed the FI, and no differences were found between muscle cultures treated with dysferlin siRNA and the controls.

Luciferase Reporter Activity Containing an E-box Activated by Myogenin Was Lower in *Dysf*^{-/-} Patients—To demonstrate the reduction of myogenin levels observed in *Dysf*^{-/-} cultures, we performed a functional study using a pGL3-basic luciferase reporter plasmid containing a specific E-box as a myogenin target. Luciferase assays demonstrated significant differences between *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} cultures. The reporter gene was highly expressed in *Dysf*^{+/+} cultures, indicating that myogenin had a normal activity. In contrast, in *Dysf*^{-/-} cultures the reporter expression of firefly *Renilla* activated by myogenin was significantly decreased (*p* < 0.001) (Fig. 7). This result suggests that myogenin down-regulation in *Dysf*^{-/-} cultures may have functional implications.

DISCUSSION

Our study in human skeletal muscle primary cultures shows that the absence of dysferlin remarkably alters the process of muscle differentiation *in vitro* and points to a signaling pathway that would involve dysferlin and myogenin. The cultures from the three *Dysf*^{-/-} muscles showed complete absence of dysferlin expression in the cellular membrane both in myoblasts and myotubes at all stages analyzed. In contrast, the three normal primary cultures showed that dysferlin was progressively up-regulated from the myoblast to the myotube stage, as

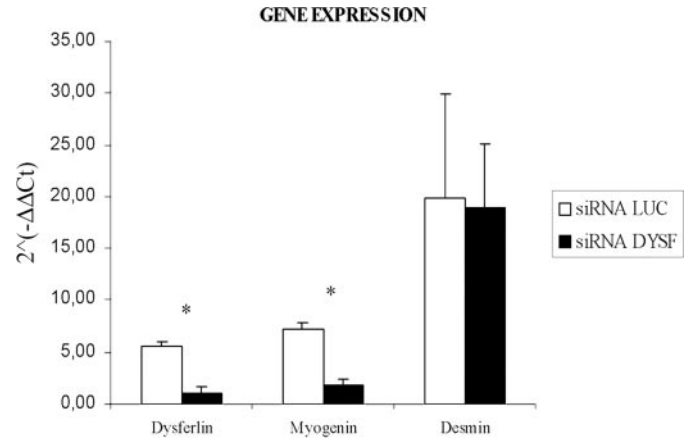


FIGURE 6. Dysferlin siRNA efficiently reduced dysferlin and myogenin expression in muscle cells. After 48 h of siRNA treatment a significant reduction of dysferlin mRNA expression was obtained when muscle cultures were treated with dysferlin siRNA compared with treatment of luciferase siRNA (*, *p* < 0.01). Myogenin mRNA expression was also significantly reduced (*, *p* < 0.01) after 48 h of dysferlin silencing, reaching levels of ~70% of expression reduction. The analysis of desmin mRNA levels was used as control, and no differences were observed between cultures treated with dysferlin siRNA and those treated with luciferase siRNA.

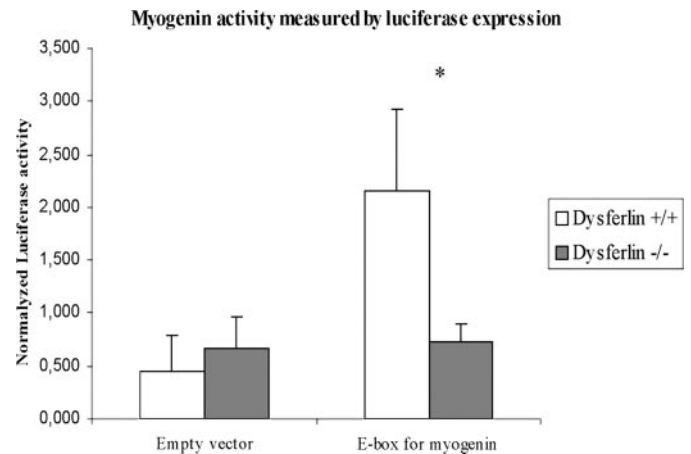


FIGURE 7. Myogenin binding to the E-box sequence is reduced in *Dysf*^{-/-} cultures. Confluent myoblasts were co-transfected with the luciferase pGL3-Basic vector containing a specific myogenin binding sequence (E-box) and a plasmid RL-TK expressing *Renilla* under the herpes simplex virus TK promoter as an internal control. Bars on the left show basal levels of luciferase activity in both *Dysf*^{+/+} (white bars) and *Dysf*^{-/-} (gray bars) cultures transfected with an empty vector (without the E-box). When cultures were transfected with the vector containing the E-box (bars on the right), luciferase activity decreased considerably in *Dysf*^{-/-} (gray bar) cultures compared with control cultures (white bar) (*, *p* < 0.05), indicating that levels of myogenin are highly reduced in the cultures from patients *Dysf*^{-/-}.

described previously (9). The absence of dysferlin seen *in vitro* correlated with the absence of dysferlin *in vivo* in the muscle biopsy of the three patients studied both by immunofluorescence and W-B.

By means of immunohistochemistry, we also found an accumulation of dysferlin at the sites of the myotubes where myoblasts fuse (growing buds) in *Dysf*^{+/+} muscle cultures, suggesting the involvement of dysferlin in fusion events. Semiquantitative real-time PCR showed a low expression of dysferlin mRNA in *Dysf*^{-/-} muscle cultures at the myotube stage. This was probably due to an instability of dysferlin mRNA and may explain why we did not detect the protein product by W-B or immunohistochemistry.

In view of the lack of expression of dysferlin at the myoblast stage in normal muscle, we did not anticipate significant differences between *Dysf*^{-/-} and *Dysf*^{+/+} cultures, and in fact, the proliferation rate in *Dysf*^{-/-} myoblasts was similar to that of controls. Accordingly, the levels of the primary MRF MyoD did not differ from *Dysf*^{+/+} cultures.

Myogenin Expression in Dysferlinopathy

In contrast, in *Dysf*^{-/-} cultures, myoblasts showed a reduced FI as compared with control cultures. Strikingly, *Dysf*^{-/-} cultures displayed a reduction of myogenin mRNA levels by semiquantitative real-time PCR, and the protein was undetectable by W-B. These findings were confirmed at the protein level using immunohistochemistry and flow cytometry, which showed a severe reduction of myogenin in *Dysf*^{-/-} myotubes. These results suggest that myogenin could be involved in the defective muscle differentiation observed in *Dysf*^{-/-} cultures, measured as lower FI.

When we analyzed myogenin mRNA levels at early stages (days 5 and 10), we found that it was low both in *Dysf*^{+/+} and *Dysf*^{-/-} muscle cultures, in agreement with the function of this secondary MRF, which is expressed with the differentiation toward the myotube stage.

In addition, using a luciferase activity-based assay, we demonstrated a diminished activity of myogenin only in *Dysf*^{-/-} myotubes. This potential link between dysferlin and myogenin was further confirmed by siRNA assays, since the knockdown of dysferlin gene *in vitro* conveyed a myogenin mRNA reduction. All together, these findings suggest that dysferlin is somehow involved in the muscle differentiation pathway conducted by myogenin.

As described previously, myogenin expression in *Dysf*^{+/+} cultures was up-regulated during myoblast differentiation both in culture and *in vivo* (19), in a similar pattern to dysferlin expression *in vitro* (9). Continuous cell lines of myoblasts isolated from myogenin mutant embryos from null mice deficient in myogenin normally differentiate in culture (20), indicating that various myoblast differentiation pathways must co-exist *in vitro*. *In vivo*, homozygous mutant myogenin null mice die perinatally due to a severe defect in the diaphragm. These mice presented a significant reduction in skeletal muscle mass throughout the body (11, 20). However, in the present study, the number of myoblasts appeared to be normal, confirming that myogenin is not required for lineage commitment but is needed for terminal differentiation. In agreement with these observations, the ultrastructure of *Dysf*^{-/-} myoblasts/myotubes differed from that of control cultures. Our findings in *Dysf*^{-/-} muscle cultures correlated with the original description of muscle biopsies from Miyoshi myopathy patients in which abnormalities of Z-disk, loss of myofilaments, dilatation of RER, and sarcolemmal vacuoles were observed (21). Myofiber disorganization and absence of Z-lines is also observed in homozygous mutant myogenin null mice (11, 20). Together with other ultrastructural disturbances, the absence of properly organized myofibrils at day 15 confirms the impairment in muscle differentiation observed in skeletal muscle cultures from dysferlinopathy patients.

Myogenin is a member of the basic helix-loop-helix gene family, which is essential for muscle development. In adult skeletal muscle myogenin expression is coincidental with satellite cell differentiation and fusion (22), and we have reported that dysferlin is expressed in activated satellite cells in adult skeletal muscle (9) indicating its role in muscle regeneration. In addition, dysferlin is involved in sarcolemmal repair mechanisms (6). The interaction of dysferlin with annexins A1 and A2 indicates that they may play a role in the aggregation and fusion of intracellular vesicles in response to membrane injury (7). Caveolin-3, which has been shown to interact with dysferlin (23), could also participate in vesicle fusion to the sarcolemma. Dysferlin also interacts with affixin, an intracytoplasmic protein that accumulates in the disruption site of the membrane and plays an important role in wound healing (24). All these data point to the hypothesis that dysferlin could act as a cal-

cium sensor that regulates membrane repair machinery (25). Indeed, the calcium-sensitive interaction of the C2A domain of dysferlin with phospholipids supports its role in membrane fusion events. However, since dysferlin is a large protein, and the remaining five C2 domains do not necessarily bind Ca²⁺ and phospholipids, it is reasonable to hypothesize that they may participate in protein-protein interactions (8) and signal transduction pathways (26). The absence of dysferlin would impair these other functions and, among other effects, disrupt myogenin expression. Further studies are needed to elucidate which proteins/factors interact with C2 domains of dysferlin to positively regulate myogenesis by increasing *myogenin* gene transcription.

In conclusion, this study supports the role of dysferlin in human muscle fusion and differentiation *in vitro*. Furthermore, it provides evidence of a link between dysferlin and myogenin and suggests they share a signaling pathway involved in differentiation of skeletal muscle *in vitro*.

REFERENCES

1. Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., Serrano, C., Urtizberea, J. A., Hentati, F., Hamida, M. B., Bohlega, S., Culper, E. J., Amato, A. A., Bossie, K., Oeltjen, J., Bejaoui, K., McKenna-Yasek, D., Hosler, B. A., Schurr, E., Arahata, K., de Jong, P. J., and Brown, R. H., Jr. (1998) *Nat. Genet.* **20**, 31–36
2. Bushby, K. M. (1999) *Brain* **122**, 1403–1420
3. Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-Garcia, R., Palmer, J., Gallano, P., Baiget, M., Matsuda, C., and Brown, R. H. (2001) *Ann. Neurol.* **49**, 130–134
4. Bushby, K. M. (2000) *Acta Neurol. Belg.* **100**, 142–145
5. Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., Richard, I., Marchand, S., Bourg, N., Argov, Z., Sadeh, M., Mahjneh, I., Marconi, G., Passos-Bueno, M. R., Moreira Ede, S., Zatz, M., Beckmann, J. S., and Bushby, K. (1998) *Nat. Genet.* **20**, 37–42
6. Bansal, D., Miyake, K., Vogel, S. S., Groh, S., Chen, C. C., Williamson, R., McNeil, P. L., and Campbell, K. P. (2003) *Nature* **423**, 168–172
7. Lennon, N. J., Kho, A., Bacskaï, B. J., Perlmutter, S. L., Hyman, B. T., and Brown, R. H., Jr. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 50466–50473
8. Davis, D. B., Doherty, K. R., Delmonte, A. J., and McNally, E. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22883–22888
9. De Luna, N., Gallardo, E., and Illa, I. (2004) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **63**, 1104–1113
10. Sabourin, L. A., and Rudnicki, M. A. (2000) *Clin. Genet.* **57**, 16–25
11. Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., and Klein, W. H. (1993) *Nature* **364**, 501–506
12. Braun, T., Rudnicki, M. A., Arnold, H. H., and Jaenisch, R. (1992) *Cell* **71**, 369–382
13. Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S., and Jaenisch, R. (1992) *Cell* **71**, 383–390
14. Zhang, W., Behringer, R. R., and Olson, E. N. (1995) *Genes Dev.* **9**, 1388–1399
15. Askanas, V., and Engel, W. K. (1975) *Neurology* **25**, 58–67
16. Illa, I., Gallardo, E., Gimeno, R., Serrano, C., Ferrer, I., and Juarez, C. (1997) *Am. J. Pathol.* **151**, 81–88
17. Anderson, L. V., and Davison, K. (1999) *Am. J. Pathol.* **154**, 1017–1022
18. Biederer, C. H., Ries, S. J., Moser, M., Florio, M., Israel, M. A., McCormick, F., and Buettner, R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 26245–26251
19. Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W. E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H., and Buckingham, M. (1989) *Nature* **341**, 303–307
20. Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., and Nonaka, I. (1993) *Nature* **364**, 532–535
21. Miyoshi, K., Kawai, H., Iwasa, M., Kusaka, K., and Nishino, H. (1986) *Brain* **109**, 31–54
22. Cooper, R. N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., and Butler-Browne, G. S. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 2895–2901
23. Matsuda, C., Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Aoki, M., Murayama, K., Nishino, I., Nonaka, I., Arahata, K., and Brown, R. H., Jr. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1761–1766
24. Matsuda, C., Kameyama, K., Tagawa, K., Ogawa, M., Suzuki, A., Yamaji, S., Okamoto, H., Nishino, I., and Hayashi, Y. K. (2005) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**, 334–340
25. Doherty, K. R., and McNally, E. M. (2003) *Trends Mol. Med.* **9**, 327–330
26. Rizo, J., and Sudhof, T. C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15879–15882

Gene Expression Profiling in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2A

Gene Expression Profiling in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2A

Amets Sáenz^{1*}, Margarita Azpitarte¹, Rubén Armañanzas², France Leturcq³, Ainhoa Alzualde¹, Iñaki Inza², Federico García-Bragado⁴, Gaspar De la Herran⁵, Julián Corcuera⁵, Ana Cabello⁶, Carmen Navarro⁷, Carolina De la Torre⁸, Eduard Gallardo⁸, Isabel Illa⁹, Adolfo López de Munain¹⁰

1 Experimental Unit, Hospital Donostia, Donostia-San Sebastián, Basque Country, Spain, **2** Department of Computer Science and Artificial Intelligence, Computer Science Faculty, University of the Basque Country, San Sebastián, Basque Country, Spain, **3** Laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France, **4** Department of Pathology, Hospital Virgen del Camino, Pamplona, Spain, **5** Department of Orthopedic Surgery, Hospital Donostia, Donostia-San Sebastián, Basque Country, Spain, **6** Department of Pathology, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain, **7** Department of Pathology, Hospital Meixoeiro, Vigo, Spain, **8** Laboratory of Experimental Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, **9** Department of Neurology, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain, **10** Department of Neurology, Hospital Donostia, Donostia-San Sebastián, Basque Country, Spain

Abstract

Limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) is a recessive genetic disorder caused by mutations in calpain 3 (CAPN3). Calpain 3 plays different roles in muscular cells, but little is known about its functions or *in vivo* substrates. The aim of this study was to identify the genes showing an altered expression in LGMD2A patients and the possible pathways they are implicated in. Ten muscle samples from LGMD2A patients in which molecular diagnosis was ascertained were investigated using array technology to analyze gene expression profiling as compared to ten normal muscle samples. Upregulated genes were mostly those related to extracellular matrix (different collagens), cell adhesion (fibronectin), muscle development (myosins and melusin) and signal transduction. It is therefore suggested that different proteins located or participating in the costameric region are implicated in processes regulated by calpain 3 during skeletal muscle development. Genes participating in the ubiquitin proteasome degradation pathway were found to be deregulated in LGMD2A patients, suggesting that regulation of this pathway may be under the control of calpain 3 activity. As frizzled-related protein (FRZB) is upregulated in LGMD2A muscle samples, it could be hypothesized that β -catenin regulation is also altered at the Wnt signaling pathway, leading to an incorrect myogenesis. Conversely, expression of most transcription factor genes was downregulated (MYC, FOS and EGR1). Finally, the upregulation of IL-32 and immunoglobulin genes may induce the eosinophil chemoattraction explaining the inflammatory findings observed in presymptomatic stages. The obtained results try to shed some light on identification of novel therapeutic targets for limb-girdle muscular dystrophies.

Citation: Sáenz A, Azpitarte M, Armañanzas R, Leturcq F, Alzualde A, et al. (2008) Gene Expression Profiling in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2A. PLoS ONE 3(11): e3750. doi:10.1371/journal.pone.0003750

Editor: Antoni L. Andreu, Hospital Vall d'Hebron, Spain

Received: August 29, 2008; **Accepted:** October 25, 2008; **Published:** November 18, 2008

Copyright: © 2008 Saenz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Health Research Fund of the Spanish Ministry of Health (FIS CP06/00099); Gipuzkoako Foru Aldundia (Berrikuntzarako eta Jakintzaren Gizarterako Departamentua, 76/06); European Union (FEDER Funds and CIBERNED); Instituto de Salud Carlos III. AS: Spanish Ministry of Health (FIS) and Basque Foundation for Health Innovation and Research (BIOEF) promoted by the Basque Government Department of Health. RA: Basque Government (AE-BFI-05/430).

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

* E-mail: amets.saenzpena@osakidetza.net

Introduction

Limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A) is a recessive genetic disorder caused by mutations in calpain 3 (CAPN3), a muscle-specific, calcium-dependent cysteine protease. Calpain 3 structure is similar to that of the ubiquitous calpains 1 and 2, but calpain 3 has specific regions (NS, IS1, and IS2) that confer it special characteristics such as autocatalytic and nuclear translocation capacity. Although calpain 3 was identified in 1989 [1], little is known about its function or its *in vivo* substrates. It has been reported to play different roles in the cell. Calpain 3 has a certain role in direct and indirect regulation of conventional calpains by proteolytic degradation of calpains and calpastatin respectively [2]. It may be involved in muscle contraction due to its link to titin and to its regulation by calcium [3–7].

Calpain 3 was shown to be in complex with dysferlin, suggesting a membrane homeostasis role of calpain 3 [8], and more recent

studies demonstrated that AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, serves as a direct substrate of calpain 3 in cell culture [9].

On the other hand, it has been confirmed that calpain 3 can cleave the C-terminal portion of FLNC *in vitro* and suggested that FLNC may be an *in vivo* substrate for calpain 3, functioning to regulate protein-protein interactions with sarcoglycans. Thus, calpain-mediated remodeling of cytoskeletal-membrane interactions, such as those occurring during myoblast fusion and muscle repair, may involve regulation of FLNC-sarcoglycan interactions [10].

Its presence in the nucleus has led to suggest that calpain 3 plays an important role in regulation of transcription factors indirectly controlling apoptotic processes [11,12]. Recent studies reported that the antiapoptotic factor, cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP), is NF- κ B dependent and is only expressed when CAPN3 is present [13]. However, other studies suggest that apoptosis may be secondary to muscle damage and inflammatory response [14].

Based on the observation of the C3 knockout (C3KO) mice, it has been suggested that calpain 3 is necessary for ubiquitination and acts upstream of the ubiquitination machinery [15].

Inflammatory cells have been detected in muscle tissue from patients with mutations in the CAPN3 gene in early stages [16] as happen in other dystrophies. The role of inflammation in many dystrophies seems to be unexplained, and it has been related to the presence of signaling factors (cytokines) that withstand inflammatory mechanisms and regulatory phenomena [17–19].

In this study, the RNA expression profiling in muscle from biopsies of LGMD2A patients and control subjects were compared in order to determine the potential functions and the pathways in which calpain 3 is implicated.

Materials and Methods

Muscle samples and RNA processing

Muscle biopsies were taken from 10 LGMD2A patients (3 females and 7 males aged 13–48 years, mean age 29,5 years) and 10 controls (2 females and 8 males aged 22–84 years, mean age 50,2 years). Two out of the 10 LGMD2A patients showed an inflammatory pattern with eosinophilic infiltrates in their biopsies.

For diagnostic purposes deltoid, quadriceps, and biceps muscle specimens were collected using institutionally approved protocols and after obtaining informed consent (Table 1). Muscle tissues were snap frozen and stored at -80°C . Most of the 7 symptomatic cases showed similar necrosis and regenerating phenomena (data not available in one case).

The quality of all RNAs obtained from muscle biopsies (RNAPlus, QBiogene) was verified using spectrophotometry and the Bioanalyzer system (Agilent). All of them showed acceptable quality and integrity (RIN above 7) to be eligible for the experiment.

All RNAs were reverse-transcribed, and biotinylated cRNA probes were generated by *in vitro* transcription (Ambion, CA, USA). Fragmented cRNA of each sample was hybridized individually to human HG-U133A (22.283 probe sets) and HG-U133B (22.645 probe sets) GeneChips (Affymetrix, Santa Clara, California) in order to analyze the expression of 44.928 probes, comprising more than 33.000 genes.

Data analysis

In-depth quality controls were performed to analyze the validity of the hybridization processes in accordance with four criteria. First, the correct presence of the signal corresponding to the spike control BioB. Second, the expression ratio between the 3' and 5' ends of the housekeeping GAPDH should not exceed a value of three. Third, the full percentage of presences detected by the Affymetrix Detection algorithm for each array must be in the range 40–60. And finally, the percentage of outlier probe sets detected within each microarray should be less than 5%. All hybridized arrays on the study met all four quality criteria, demonstrating the reliability of data generated.

The hybridized arrays were scanned, and raw data were extracted using the Microarray Analysis Suite 5.0 (MAS5; Affymetrix). The raw data were normalized using RMA (Robust Multichip Average) expression summary in Bioconductor [20]. RMA consists of three steps: a background adjustment, quantile normalization, and finally summarization [21–23].

The sensitivity of microarray-generated data to noise from experimental variables is well documented [24]. For the analysis, the average values of each tested group (patients and controls) were used in order to obtain the most homogeneous results, trying to avoid variability between individual cases due to different characteristics (genetic background, sex, age, muscles, mutations,

etc.). Two statistical methods were applied in order to distinguish significant and substantial differential expression from noise and variation due to either genetic heterogeneity or experimental procedures.

First, in order to identify significantly different genes between LGMD2A patients and normal controls, a geometric fold-change analysis was used [24,25]. The threshold was set at a two-fold change value. Using the criterion of fold-change implies that larger fold changes are most likely to be real and no hypothesis is assumed. Principal component analysis (PCA) was performed after array normalization. PCA is a technique that summarizes a large set of variables in a smaller set that retains the essential variance of the original data set [26]. PCA derives an equivalent, uncorrelated set of new variables from the original set of correlated variables according to their contribution to a ranked set of principal components [27].

Second, Class Comparison Difference Analyses were performed using BRB-ArrayTools developed by Dr. Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team. In order to identify probe sets with significant intensity differences between disease classes, a two-sample univariate *t*-test was applied to the unaffected control data set vs. the LGMD2A data set. The use of *p*-values implies hypothesis testing. It is assumed in the null hypothesis that there is no fold change and then evidence was looked for to reject it using a type-1 error. The threshold was set at $p < 0.001$.

To minimize false positives, only the probe sets commonly yielded by both methodologies were included into the final list of genes differentially expressed in LGMD2A.

Moreover, as an additional supporting process, two machine learning feature selection techniques were run. Symmetrical uncertainty ranking [28] was first applied as an univariate criterion to measure the worth of each probe set alone: this computes the mutual information with respect to the class phenotype and compensates for the bias of the information gain. Correlation-based Feature Subset (CFS) selection [29], a multivariate feature selection that evaluates the merit of a probe set subset by measuring the individual predictive power of each probe set along with the redundancy within that subset, was then used. CFS outputs a subset of features instead of individual relevances.

The same procedure was used to compare samples from patients who were asymptomatic but had eosinophilic infiltrates in their muscle biopsies (2 cases) and samples from healthy controls (10 cases).

Microarray data have been submitted to the GEO (Gene Expression Omnibus) public database (accession GSE11681).

Quantitative Real-Time PCR

To investigate the validity of array data, expression levels of the differentially expressed genes were measured using the TaqMan quantitative RT-PCR assay. Relative expression levels initially determined with the cDNA microarrays were correlated to the expression levels assessed using quantitative RT-PCR for each patient sample.

Whereas microarrays identify target genes of interest among thousands of genes, truly quantitative information relies on quantitative RT-PCR. Some of the significantly regulated changes found on the microarray could be replicated by quantitative RT-PCR. Quantitative RT-PCR was performed using the 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Because of the limiting RNA amount isolated from muscle biopsies used for microarray analysis, only a few samples (6 cases) were used for confirmation with quantitative RT-PCR experiments.

The TaqMan Low Density Arrays (TLDA) were purchased from Applied Biosystems, and the protocol recommended by the

Table 1. Distribution of muscle biopsies taken from 10 LGMD2A patients and 10 control subjects.

Biopsy Number	Status	Gender	Muscle	Age	Myopathological data	Gardner-Medwin-Walton Scale	CAPN3 mutations	
							Mutation 1	Mutation 2
EXP-01	LGMD2A	M	Quadriceps	34	Mild myopathic changes (fiber size alteration, centrally located nuclei and splitting) No necrosis, no regeneration, no lobulated fibers.	2	p.(Gly222Arg)	p.(Arg748Gln)
EXP-02	LGMD2A	F	Deltoid	33	Necrosis and regenerating phenomena	3	c.946-1G>A	p.(Gln600Arg)
EXP-03	LGMD2A	M	Quadriceps	37	Necrosis, regenerating phenomena and fibrosis	Unknown	p.(Met248Arg)	p.(Arg769Gln)
EXP-04	LGMD2A	M	Quadriceps	44	Necrosis and regenerating phenomena	Unknown	p.(Gln300X)	p.(Gln600Arg)
EXP-05	LGMD2A	M	Deltoid	13	Inflammatory reaction around necrotic and non necrotic fibers. Inflammation collects at endomyisial site sometimes with perivascular infiltrate without destruction of walls of arterioles and venules. Numerous eosinophilic leucocytes are present.	Asymptomatic	p.(Arg788SerfsX14)	p.(Arg788SerfsX14)
EXP-09	LGMD2A	F	Biceps braquialis	14	Myositis with local infiltration of eosinophils. Patchy, focal inflammatory cell infiltrate with minor changes in the architecture of fibers without changes in the distribution of the fiber type.	Asymptomatic	p.(Arg490Trp)	p.(Gly691TrpfsX7)
EXP-35	LGMD2A	M	Deltoid	48	Necrosis, fibrosis, lobulated fibres	7	p.(Gln142X)	p.(Gln142X)
EXP-36	LGMD2A	M	Quadriceps	26	Necrosis and regenerating phenomena	2	p.(Lys254Glu)	c.1910delC
EXP-40	LGMD2A	M	Quadriceps	29	Mild myopathic changes (centrally located nuclei and fibrosis)	7	p.(Ala160Gly)	c.1029+3A>G
EXP-41	LGMD2A	F	Deltoid	17	No data available	2	c.2185-12_2194del	p.(Arg788SerfsX14)
EXP-25	Control	F	Deltoid	57				
EXP-27	Control	M	Quadriceps	50				
EXP-28	Control	M	Quadriceps	22				
EXP-29	Control	F	Quadriceps	73				
EXP-30	Control	M	Quadriceps	84				
EXP-31	Control	M	Quadriceps	46				
EXP-32	Control	M	Quadriceps	48				
EXP-33	Control	M	Deltoid	51				
EXP-38	Control	M	Quadriceps	31				
EXP-39	Control	M	Quadriceps	41				

doi:10.1371/journal.pone.0003750.t001

manufacturer was used. Customer-designed TLDA were used in order to test a series of 63 genes. In order to select these genes, genes with unknown function, hypothetical proteins, and open reading frame regions were excluded. Gene families were represented including only some of the members, such as collagens, etc. Moreover, genes showing differential expression profiling in the comparison between patients with eosinophilic infiltrates and healthy controls were included in the TLDA, as well as genes with expression variation in other studies.

Expression levels for all transcripts were determined relative to the internal housekeeping control gene GAPDH in the TLDA which, as expected, did not demonstrate altered expression according to microarray analysis.

In order to identify probe sets with significant intensity differences, the method applied to the unaffected control data set vs. the LGMD2A data set was Benjamini-Hochberg method using Stat Miner program (Integromics).

Results

After having adjusted the background, normalized and summarized the data, the fold change obtained generates a list by magnitude of response. As a result of this method, the fold change analysis identified 156 differentially expressed probe sets in LGMD2A skeletal muscle compared to control skeletal muscle. Of these, 92 were significantly overexpressed and 64 showed a reduced expression in LGMD2A patients compared to the unaffected controls.

PCA grouped together on the one hand patient samples and on the other hand control samples and a greater variability was seen among controls due to the heterogeneity of this group (Figure 1).

On the other hand, the additional statistical method used to analyze the data, the Class Comparison Differences method, applied a two-sample univariate *t*-test to the unaffected control data set vs. the LGMD2A data set. This method identified 627 probe sets with a *p* value higher than 0.001.

However, the final list of genes comprised 86 probe sets (74 genes) commonly yielded by the two methodologies which were differentially expressed in LGMD2A compared to unaffected muscle biopsies. Of these 74 genes, 53 were overexpressed and 21 had a reduced expression in the LGMD2A patients and all the genes were clustered into functional groups (Table 2). Transcripts were classified according to different biological processes, as obtained from LocusLink (www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/): extracellular matrix proteins/phosphate transport, cell adhesion, muscle development, transcription factors, signaling pathways, metabolic process, transport, ubiquitin cycle, and other functions.

The additional supporting process, the Correlation-based Feature Subset selection (CFS) [29] highlighted a set of 21 genes. Of these 21 genes, 7 corresponded to the previously determined group of 74 genes. In turn, Symmetrical Uncertainty Ranking returned correlation coefficients higher than 0.5 for 24 genes within the list. Note that the highest correlation was 0.816 when the coefficient was constrained between 1 (maximum) and 0 (minimum). The average coefficient for the whole gene list was 0.36, with a standard deviation of 0.177.

Overview of expression profiling in LGMD2A muscles

Some transcript classes were of particular interest in this analysis (Table 2). Most genes found to be dysregulated in LGMD2A were genes grouped in the transcription factor category, and some of them showed the lowest fold-change values obtained in the study (FOS, EGR1). By contrast, genes showing the highest fold-change values included extracellular matrix proteins, genes involved in muscle development, and three additional genes with different functions (FRZB, TFRC, and CAPN6).

As a whole, in most of the biologically classified processes, the same trend to up- or downregulation was seen for all genes involved in the same process. Genes associated with extracellular matrix (collagen types I, III, V, and XV, and SPARC), cell adhesion, muscle development (MYH3, MYL5 and ITGB1BP2), signaling pathways, and ubiquitin cycle predominated among

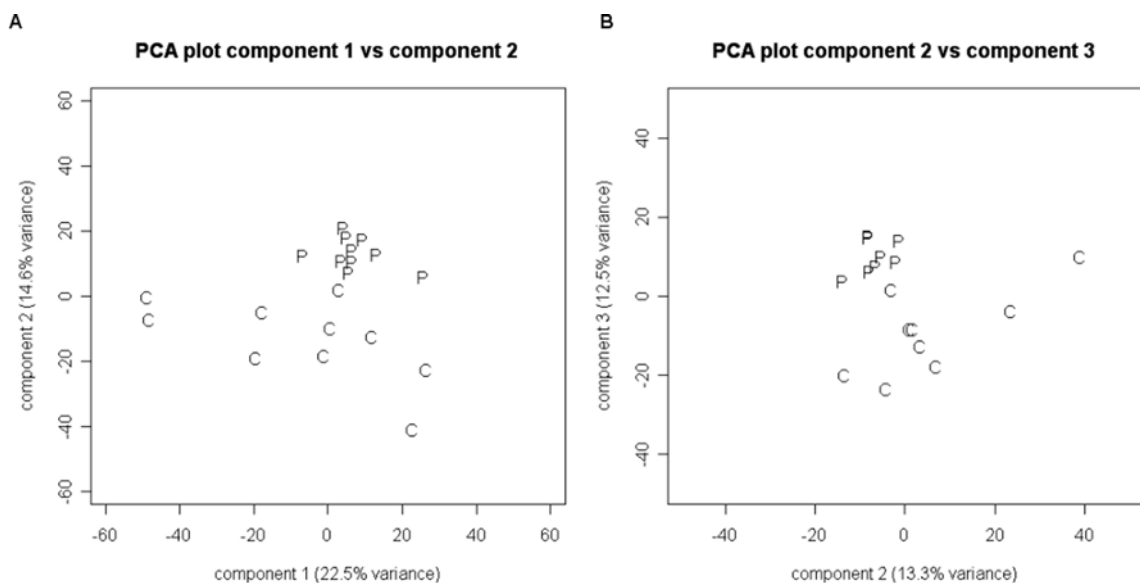


Figure 1. Principal component analysis (PCA) of HG-133A microarrays (A) and of HG-133B microarrays (B) after normalization. P: LGMD2A Patients. C: Healthy controls. Muscle specimens obtained from individuals of the same status showed the greatest similarities.

Figure 1. Principal component analysis (PCA) of HG-U133A microarrays (A) and of HG-U133B microarrays (B) after normalization. P: LGMD2A Patients. C: Healthy controls. Muscle specimens obtained from individuals of the same status showed the greatest similarities. doi:10.1371/journal.pone.0003750.g001

Table 2. Significantly differentially regulated transcripts, NV: Not validated by TLDAs.

Affymetrix ID	Biological process/Gene title	Gene symbol	Fold change	Parametric p value Class Comparison	Fold change Validated by RT-PCR	Significant p value Stat Miner
Extracellular matrix proteins						
202310_s_at	collagen, type I, alpha 1	COL1A1*	4.71	0.0003482	5.86	0.012178774
202404_s_at	collagen, type I, alpha 2	COL1A2*	4.72	6.61e-05	NV	-
211161_s_at	collagen, type III, alpha 1	COL3A1*	7.72	1.1e-06	13.71	-
201852_x_at			5.12	7.4e-06		
215076_s_at			4.79	3.48e-05		
212488_at	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	2.07	8.18e-05	9.24	1.13E-04
221729_at	collagen, type V, alpha 2	COL5A2	3.12	<1e-07	NV	-
221730_at			2.12	3e-07		
203477_at	collagen, type XV, alpha 1	COL15A1*	2.80	2.36e-05	NV	-
225681_at	collagen triple helix repeat containing 1	CTHRC1	2.96	3.74e-05	NV	-
Cell adhesion						
201005_at	CD9 antigen (p24)	CD9 *	2.38	6.36e-05	2.16	5.71E-02
212063_at	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44 *	2.35	0.0002703	2.23	0.3071496
211719_x_at	fibronectin 1	FN1*	2.33	0.0006326	3.30	1.16E-02
210495_x_at			2.30	0.0001008		
216442_x_at			2.21	0.0001307		
Muscle development						
205940_at	myosin, heavy polypeptide 3, skeletal muscle, embryonic	MYH3*	11.78	1.4e-06	40.62	2.15E-04
205145_s_at	myosin, light polypeptide 5, regulatory	MYL5	4.28	3.49e-05	7.21	1.83E-02
204173_at	myosin light chain 1 slow a	MLC1SA (= MYL6B)	2.41	0.0003024	3.28	1.77E-02
219829_at	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	ITGB1BP2	2.23	1.3e-06	2.50	0.013391304
Transcription factors						
202431_s_at	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	MYC*	0.48	0.0006587	0.35	-
201466_s_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN*	0.47	4.98e-05	0.69	0.443749559
219990_at	E2F transcription factor 8	E2F8	3.22	0.0001105	4.52	4.80E-03
201473_at	jun B proto-oncogene	JUNB*	0.41	0.0002329	NV	-
209189_at	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS*	0.12	7.52e-05	0.10	-
203973_s_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	CEBPD*	0.39	0.0009174	1.61	0.266597408
201694_s_at	early growth response 1	EGR1*	0.31	5.16e-05	0.13	1.74E-03
227404_s_at			0.12	8.11e-05		
209357_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	0.39	9e-07	0.57	0.255171653
210479_s_at	RAR-related orphan receptor A	RORA	0.46	0.0003675	NV	-
202393_s_at	Kruppel-like factor 10	KLF10	0.45	0.0000651	0.49	0.130862236

Table 2. cont.

Affymetrix ID	Biological process/Gene title	Gene symbol	Fold change	Parametric p value Class Comparison	Fold change Validated by RT-PCR	Significant p value Stat Miner
221778_at	KIAA1718 protein	KIAA1718 (JHDM1D)	0.48	0.0009927	NV	-
Signal transduction						
209541_at	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1*	2.81	1e-07	1.96	7.01E-02
209822_s_at	very low density lipoprotein receptor	VLDLR*	2.63	3e-07	NV	-
213880_at	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5	LGR5	0.30	0.0004577	0.23	6.35E-02
219654_at	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine),PTPLA member a		2.42	4.83e-05	NV	-
222918_at	RAB9B, member RAS oncogene family	RAB9B	2.04	1.09e-05	NV	-
212099_at	ras homolog gene family, member B	RHOB	0.41	0.0000594	NV	-
217728_at	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100A6*	2.26	0.0008602	2.43	5.00E-02
Signal pathways						
200665_s_at	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC*	2.02	0.000903	2.55	5.82E-02
218087_s_a	sorbin and SH3 domain containing 1	SORBS1	2.05	0.000123	NV	-
214844_s_at	docking protein 5	DOK5	2.24	3.16e-05	3.16	6.09E-03
203697_at	frizzled-related protein	FRZB	5.42	0.000466	13.16	2.41E-04
203698_s_at			2.99	0.000466		
203789_s_at	sema domain, immunoglobulin domain (lg), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	SEMA3C	2.86	0.0001054	NV	-
201309_x_at	chromosome 5 open reading frame 13	C5orf13	2.09	0.0005666	NV	-
236860_at	Neuropeptide Y receptor Y6 (pseudogene)	NPY6R	4.09	0.0007927	NV	-
Metabolic process						
201425_at	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)	ALDH2	0.43	8.62e-05	0.67	0.459523739
209301_at	carbonic anhydrase II	CA2*	0.48	0.0007153	0.79	0.522535838
202464_s_at	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	PFKFB3	0.15	1.5e-06	0.45	0.141846652
Transport						
208691_at	transferrin receptor (p90, CD71)	TFR3*	8.11	6.47e-05	4.52	4.80E-03
207332_s_at			5.99	6.28e-05		
204430_s_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member 5	SLC2A5	2.17	0.0003736	3.74	2.69E-03
201560_at	chloride intracellular channel 4	CLIC4	2.20	0.0001832	NV	-
202236_s_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 15	SLC16A1	2.55	<1e-07	NV	-
205073_at	Cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	CYP2J2	2.04	3.4e-05	NV	-
224579_at	Solute carrier family 38, member 1	SLC38A1	2.58	0.0007761	NV	-
219525_at	hypothetical protein FLJ10847	FLJ10847 (SLC47A1)	0.47	6.42e-05	NV	-
217966_s_at	chromosome 1 open reading frame 24	C1orf24 (FAM129A)	0.47	0.00045	0.78	0.55888133
Ubiquitin cycle						

Table 2. cont.

Affymetrix ID	Biological process/Gene title	Gene symbol	Fold change	Parametric p value Class Comparison	Fold change Validated by RT-PCR	Significant p value Stat Miner
218306_s_at	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	HERC1	2.22	0.0000045	2.45	2.29E-02
218575_at	Anaphase promoting complex subunit 1	ANAPC1	2.02	9e-07	1.31	0.447268323
229267_at			2.07	0.0001629		
Other functions						
218273_s_at	protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit (mitochondrial)	PPM2C	2.49	1.55e-05	3.08	2.97E-02
201609_x_at	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	ICMT*	2.25	7.2e-06	NV	-
201611_s_at			2.00	1.88e-05		
202965_s_at	calpain 6	CAPN6	2.05	1.71e-05	5.31	9.12E-04
212848_s_at	chromosome 9 open reading frame 3	C9orf3	2.01	0.0003013	NV	-
201010_s_at	Thioredoxin interacting protein	TXNIP*	0.43	1e-05	0.49	0.133790906
201009_s_at			0.42	0.0009904		
202917_s_at	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	0.34	0.0002179	0.27	1.51E-02
209398_at	histone 1, H1c	HIST1H1C	0.45	0.0003089	0.76	0.491015255
225061_at	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	DNAJA4*	2.53	0.0000529	3.65	8.54E-03
209596_at	matrix-remodellng associated 5	MXRA5	2.90	5e-07	NV	-
219087_at	asporin (LRR class 1)	ASPIN	4.58	4e-07	NV	-
235022_at	chromosome 18 open reading frame 19	C18orf19	2.34	1e-07	NV	-
218820_at	chromosome 14 open reading frame 132	C14orf132	2.14	2.87e-05	NV	-
202016_at	mesoderm specific transcript homolog (mouse)	MEST	2.11	0.000709	NV	-
218999_at	hypothetical protein FLJ11000	FLJ11000 (TMEM140)	0.49	218999_at	NV	-
224836_at	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	TP53INP2*	2.46	0.0003853	NV	-
Unknown function						
238124_at	Myomesin family, member 3	MYOM3	2.30	0.0000126	6.74	1.86E-04
230284_at			2.01	0.0000003		
202759_s_at	PALM2-AKAP2 protein	PALM2-AKAP2	2.16	0.0000007	NV	-
229778_at	Hypothetical protein MGC10946	MGC10946 (C12orf39)	2.75	0.0000022	NV	-
211071_s_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 11	MLLT11	3.92	0.0002385	NV	-
218876_at	brain specific protein	CGI-38 (TPPP3)	2.86	0.0000867	NV	-
221104_s_at	nipsnap homolog 3B (C. elegans)	NIPSNAP3B	2.68	0.0001963	NV	-
225242_s_at	steroid sensitive gene 1	URB (CCDC80)	3.22	0.0004132	NV	-

* Dysregulated genes in FSHD, DMD, α -sarcoglycan, and congenital myopathies (Campanaro et al 2002, Winokur et al 2003, Haslett et al 2003, Taniguchi et al 2006, Osborne et al 2007). doi:10.1371/journal.pone.0003750.t002

upregulated genes. However, all genes involved in metabolic processes and transcription factors (except for the E2F8 gene) were downregulated (Table 2).

On the other hand, upregulation of IGF1, which is a regulator of somatic growth and cell proliferation, was seen in this study. IGFa is an inducer of different pathways such as the phosphatidylinositol 3-kinase survival (through activation of AKT1, AKT2), the calcineurin-mediated signaling pathways, and of GATA2 activation.

HERC1 and ANAPC1 are genes implicated in the ubiquitin cycle and showed upregulation in LGMD2A muscle samples. HERC1, ubiquitously expressed, is located in the cytosol in the Golgi apparatus, stimulating guanine nucleotide, forming a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70, and is involved in protein trafficking. ANAPC1 is a component of the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), a cell cycle-regulated E3 ubiquitin ligase that controls progression through mitosis and the G1 phase of the cell cycle.

There are two deregulated genes according to our results whose cell location is the mitochondrial matrix, one of which is involved in the metabolic process, ALDH2 (aldehyde dehydrogenase 2 family) (downregulated), while the other, the PPM2C gene (protein phosphatase 2C, magnesium-dependent, catalytic subunit) (upregulated) is implicated in protein amino acid dephosphorylation.

Expression changes in common with other muscular dystrophies

Twenty four out of the 74 deregulated genes with altered expression in LGMD2A were also deregulated in other muscular dystrophies (DMD, α -SGD, FSHD, dysferlinopathies, Fukuyama-type congenital muscular dystrophy, and laminin- α 2 deficient congenital muscular dystrophy) [24,30–35] (Table 2).

LGMD2A and eosinophil infiltration

A comparison was made between biopsies of control muscles (10 cases) and biopsies from two cases showing eosinophil infiltrates. Results of this comparison are summarized in Table 3.

Genes involved in immune response such as IL-32, IGHG1, and IGKC were upregulated, as well as CAPN6, while those involved in chemotaxis or regulation of the protein kinase B signaling cascade were downregulated in asymptomatic cases comparing with controls.

Validation of microarray data by quantitative RT-PCR

The main correlation between the two assays is showed in Figure 2. Real-time PCR was not only used to confirm the abnormal gene expression profiles detected by microarray analysis, but also to better define fold-change variations using a more sensitive approach. This approach showed mean fold changes in expression levels directionally similar to those determined by microarray analysis. Overall, fold change was lower when the microarray approach was used compared to real-time PCR (Table 2).

Discussion

The main correlation between the two assays, microarrays and quantitative RT-PCR, was high for all genes, indicating a good agreement between both assays for identification of deregulated genes.

On the other hand, by means of the additional supporting process, a high correlation degree among results was shown and it provided more reliability to the final list of genes. Therefore, results of the two machine learning approaches support the degree of relevance of the 74 genes identified.

Calpain 3 was not abnormally regulated in the microarray study (data not shown). While protein analysis usually shows an absence of protein in patients, the microarray data did not reveal a reduction of calpain 3 mRNA indicating that this primary genetic defect cannot be identified by expression profiling. It is worthwhile mentioning that the presence of different missense mutations in most of the patients may explain this observation as well as the variability found in the Western Blot including normal patterns [36].

In LGMD2A muscles, genes associated with ECM/membrane-related, cell adhesion genes, muscle development genes, signaling pathway genes, and ubiquitin cycle genes were upregulated (Table 2).

Extracellular matrix

The general trend for structural genes to be expressed at higher levels in patients could reflect a general upregulation of structural genes in the mutant muscle, as previously reported for other types of muscular dystrophies [37].

It is interesting to note that a large proportion of genes associated to the extracellular matrix were probably upregulated as a result of fibrotic infiltration. These genes include extracellular matrix proteins such as collagen types I and III (the two major collagens in the ECM), cell adhesion proteins such as CD9, CD44, and fibronectin.

SPARC, overexpressed in the fibroblasts of skin biopsy specimens obtained from patients with systemic sclerosis [38], could be the factor involved in the interstitial fibrosis seen in muscles of LGMD2A patients. It is a matricellular glycoprotein that may modulate cell interaction within the ECM by binding to both ECM structural components and growth factors.

Muscle development

Our results showed that MYH3 (myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic) is highly upregulated in samples from LGMD2A patients. Expression of embryonic myosin heavy chain is a hallmark of muscle regeneration after birth and a characteristic marker of human muscular dystrophies. During normal human development, expression is restricted to the embryonic period of development [39]. This could indicate a failed muscular regeneration attempt to compensate a downstream injury.

Another upregulated gene is myosin light chain 1 slow A (MLC1SA), a transcriptional regulator promoting muscle cell proliferation expressed in both slow-twitch skeletal muscle and non-muscle tissue. This gene showed a high individual correlation with class phenotype (0.442), and was one of the seven genes included in the CFS output. This fact flawlessly demonstrates its importance not only from an individual point of view, but also because of its potential interactions. MLC1SA is one of the two phosphorylatable regulatory light chains forming the myosin complex. Cohen et al [40] found that MLC1SB (Accession N^o P09542 in mice) was a substrate for calpain 3. To date, no contractile proteins have been identified as *in vivo* substrates for CAPN3. Identification of MLC1 as a potential substrate for CAPN3 was of interest because, in a previous study, Kramerova et al [15] demonstrated that CAPN3 regulates sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin–proteasome system.

LGMD2A patients showed upregulation of the IGF-1 gene as previously observed in other muscular dystrophies. Normal skeletal muscle is able to efficiently repair itself in response to injury. IGF-1 has been implicated as a factor that may affect many steps in gene expression control, including cell proliferation, differentiation, and degradation processes. IGF-1 is a peptide that has been shown to have anabolic effects on muscle cells. This action can be explained based on the molecular signaling events

Table 3. Significantly differentially regulated transcripts comparing patients with eosinophilic infiltrates to healthy controls.

Probe set	Biological process/Gene title	Gene symbol	Fold change	Parametric p-value
Phosphate transport				
212489_at	collagen, type V, alpha 1	COL5A1	2.39	0.0000009
221729_at	collagen, type V, alpha 2	COL5A2	3.20	0.0001189
225681_at	collagen triple helix repeat containing 1	CTHRC1	3.25	0.0002197
230867_at	hypothetical protein LOC131873	LOC131873	2.28	0.0000307
Signaling pathway				
203697_at	frizzled-related protein	FRZB	7.67	0.0004106
203698_s_at			3.02	0.0004541
Signal transduction				
209541_at	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	3.06	0.0000059
209542_x_at			2.51	0.000116
211577_s_at			2.14	0.0001273
209822_s_at	very low density lipoprotein receptor	VLDLR	3.35	0.0002441
Immune response				
203828_s_at	interleukin 32//interleukin 32	IL32	5.45	0.0005892
211430_s_at	immunoglobulin heavy locus//immunoglobulin heavy constant gamma 1 (G1m marker)//immunoglobulin heavy constant gamma 2 (G2m marker)//immunoglobulin heavy constant gamma 3 (G3m marker)//immunoglobulin heavy constant mu	IGH@//IGHG1//IGHG2//IGHG3//IGHM	4.37	0.0001606
221651_x_at	immunoglobulin kappa constant//immunoglobulin kappa variable 1-5	IGKC//IGKV1-5	2.21	0.0001881
Transcription				
214608_s_at	eyes absent homolog 1 (Drosophila)	EYA1	2.30	0.0001005
209357_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/A-sp-rich carboxy-terminal domain, 2	CITED2	0.34	0.0009738
227705_at	transcription elongation factor A (SII)-like 7	TCEAL7	2.79	0.000246
Metabolic process				
43427_at	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	ACACB	0.44	0.0002438
49452_at			0.39	0.0001128
224918_x_at	microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	0.27	0.0003928
Transport				
202236_s_at	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 1	SLC16A1	2.74	0.0000816
239984_at	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha	SCN7A	2.64	0.0005832
Other functions				
205206_at	Kallmann syndrome 1 sequence	KAL1	0.25	0.0004374
226312_at	TORC2-specific protein AVO3	AVO3	0.47	0.0003421
227013_at	LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)	LATS2	0.41	0.0005208
224842_at	PI-3-kinase-related kinase SMG-1	SMG1	0.39	0.0002757

Table 3. cont.

Probe set	Biological process/Gene title	Gene symbol	Fold change	Parametric p-value
202965_s_at	calpain 6	CAPN6	4.00	<1e-07
201609_x_at	isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase	ICMT	2.35	0.0007576
202998_s_at	lysyl oxidase-like 2	LOXL2	2.03	0.0004611
209596_at	matrix-remodelling associated 5	MXRA5	4.66	0.0001074
209398_at	histone 1, H1c	HIST1H1C	0.26	0.0007007
226322_at	ARG99 protein (Gene name: TMTCI)	ARG99	0.45	0.0002993
205381_at	leucine rich repeat containing 17	LRRCT17	2.60	0.0001683
219087_at	asporin (LRR class 1)	ASPN	5.76	0.000238
Unknown				
202760_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein 2//PALM2-AKAP2 protein	AKAP2//PALM2-AKAP2	2.71	0.0000528
202759_s_at	PALM2-AKAP2 protein	PALM2-AKAP2	3.29	0.0000042
226155_at	KIAA1600	KIAA1600	0.46	0.0004366
235022_at	chromosome 18 open reading frame 19	C18orf19	2.46	0.0002359
229778_at	hypothetical protein MGC10946	MGC10946	2.92	0.0007268
219525_at	hypothetical protein FLJ10847	FLJ10847	0.42	0.0004347
211724_x_at	hypothetical protein FLJ20323	FLJ20323	0.45	0.0003093
225893_at	clone TESTIS-724 mRNA sequence		0.41	0.0001744

doi:10.1371/journal.pone.0003750.t003

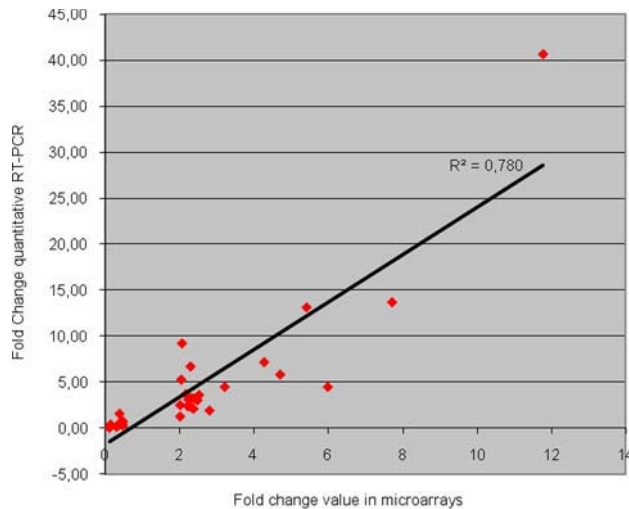


Figure 2. Comparison between expression data obtained from microarray experiments and data obtained from quantitative RT-PCR.

Figure 2. Comparison between expression data obtained from microarray experiments and data obtained from quantitative RT-PCR.

doi:10.1371/journal.pone.0003750.g002

initiated by its receptor, a tyrosine kinase activated on IGF-1 binding, and transmitted through a cascade of intracellular events, leading to a general increase in protein synthesis [41,42].

Integrin $\beta 1$ binding protein (ITGB1BP2 = melusin), also upregulated in LGMD2A muscles, is present in a costamere-like pattern consisting of two rows flanking α -actinin at Z line. Melusin expression is upregulated during *in vitro* differentiation of the C2C12 murine myogenic cell line, and is regulated during *in vivo* skeletal muscle development [43]. Upregulation of the melusin gene may alter a process that is tightly controlled in muscle development, leading to inadequate muscle differentiation and maturation. The generalized inhibition of terminal stages of myogenic differentiation in C3KO myotubes affects at least two events: sarcomere formation and integrin isoform replacement [44]. During myogenesis, two isoforms of $\beta 1$ integrin are expressed: $\beta 1A$ is expressed in myoblasts and is downregulated during myogenesis, while $\beta 1D$ appears after fusion and eventually displaces $\beta 1A$ in mature myotubes [45]. Neither $\beta 1A$ nor $\beta 1D$ were cleaved by CAPN3, suggesting that changes in the level of integrin isoforms are not a direct result of calpain 3 absence [44].

Ubiquitin cycle and protein degradation

It is still unclear whether CAPN3 directly cleaves proteins to make them available for ubiquitination or whether the effect of CAPN3 is indirect (i.e. through regulation of other proteins involved in ubiquitination) [15]. In LGMD2A muscle samples, the HERC1 and ANAPC1 genes involved in the ubiquitin cycle are upregulated, suggesting that their regulation may be under the control of calpain 3.

Moreover, Ono et al [46] found proteolysis of proteasome regulatory subunit RPS6A by calpain 3, which may indicate that the ubiquitin-proteasome system is subject to regulation by calpain.

As ubiquitination tags proteins for degradation, decreased ubiquitination may lead to excessive accumulation of the proteins that should otherwise be degraded. This in turn could trigger a cell stress response, one manifestation of which is upregulation of heat shock proteins [15]. According to the reported data, the Dnaj

(Hsp40) homolog, subfamily A member 4 (DNAJA4), that showed upregulation, may regulate the chaperone function of Hsp70 proteins [47].

Signaling pathways

The protein coded by HERC1, upregulated in LGMD2A patients, has a C-terminal HECT (homologous to E6-AP C-terminus) domain, which suggests that it has an ubiquitin ligase activity.

β -catenin plays a critical role in many cellular and morphogenic processes by performing two distinct functions: in the nucleus, it acts as a mandatory coactivator of TCF/LEF transcription factors in response to Wnt signaling during both embryonic development and adult muscle regeneration, while at the cell membrane, β -catenin associates with the cadherin complex that links adhesion molecules to the cytoskeleton. In both cases, the concentration of β -catenin has been shown to be tightly regulated through ubiquitin-mediated degradation [44].

Two distinct ubiquitin ligase complexes control β -catenin levels in cytoplasm and at the membrane [48]. Ubiquitination and degradation of the cytosolic pool of β -catenin are under the control of Wnt signaling. Degradation of the membrane pool of β -catenin in skeletal muscle is mediated by the Ozz-E3 ubiquitin ligase complex [49]. Thus, it may be suggested that membrane β -catenin is indirectly regulated by CAPN3. It should also be noted that Trim32, found mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2H, is another putative E3-ubiquitin-ligase [50].

On the other hand, frizzled-related protein (FRZB) is upregulated in LGMD2A muscle samples. It could therefore be hypothesized that β -catenin regulation is also altered at the Wnt signaling pathway, leading to an abnormal myotube fusion or incorrect myogenesis.

Deregulation of mitochondrial genes

In our results, the mitochondrial genes found to be deregulated were ALDH2 and PPM2C. ALDH2 was downregulated in patient samples and is implicated in the glycolysis/gluconeogenesis pathway. On the contrary, expression of the PPM2C mitochondrial gene was upregulated in our study. Protein phosphatase 1J (PPM1J_mouse, PP2C family) was found to be an *in vivo* substrate for calpain 3 [40].

In later stages of the disease, the muscle pathology is characterized mainly by the presence of lobulated fibers (LF), which are composed of misaligned myofibrils that form a lobular pattern, in addition to fiber size variation and interstitial fibrosis. Lobulated muscle fibers reflect an abnormal spatial distribution of the intermyofibrillar mitochondria network [51]. In C3KO mice, abnormal A-bands were seen, suggesting a role for calpain 3 in correct formation of sarcomeres or maintenance of sarcomere alignment [14].

mRNA expression profiles were specifically altered in LGMD2A muscles with lobulated fibers Keira et al [52]. Genes encoding for extracellular matrix (ECM)/membrane-related, cytoskeletal, or sarcomeric proteins were also upregulated in LF muscles.

According to these results, identification of these mitochondrial proteins suggests that CAPN3 may be involved in mitochondrial protein turnover.

Common genes with altered expression in different muscular dystrophies

According to Table 2, LGMD2A can be characterized as an active fibrotic disease with suppressed muscle regeneration, since LGMD2A cases share upregulation of the extracellular matrix

(ECM) components with congenital muscular dystrophy cases and share downregulation of the transcription factors with Duchenne muscular dystrophies.

In muscles from patients with Duchenne muscular dystrophy, upregulated genes were mostly those related to immune response, sarcomeric, ECM, and cell growth, whereas downregulated genes were associated to energy metabolism, transcription/translation, signaling, and proteasomes [32].

c-fos and c-jun proteins have been described as showing strong cytoplasmic expression related to the degeneration process occurring in Duchenne and Becker muscular dystrophies [53]. However our results contradict the previously published results and they showed a strong downregulation of c-fos and c-jun in our samples.

Recently Gan et al [54] reported that Dishevelled (Dvl) and c-Jun form a complex with β -catenin-T-cell factor 4 (TCF-4) on the promoter of Wnt target genes and regulate gene transcription. c-Jun mediates Dvl association with the functional TCF- β -catenin complex and functions as a key component of Wnt signaling *in vivo*. Since genes coding for proteins in this pathway are dysregulated in LGMD2A patients, it may be suggested that the downregulation of c-jun and other transcription factors observed in LGMD2A patients are regulated in an indirect way by calpain 3.

TFRC (transferrin receptor) and VLDLR (very low density lipoprotein receptor) are upregulated in LGMD2A patients as occurred in FSHD muscles [33]. Transferrin is a key myoblast trophic factor, initially promoting myoblast proliferation and subsequently supporting myogenic differentiation. However, TXNIP (thioredoxin-interacting protein) is downregulated in LGMD2A muscles and was also downregulated in FSHD samples [33]. Since TXNIP acts as an oxidative stress mediator, this finding is consistent with the enhanced vulnerability to oxidative stress seen in LGMD2A, as observed in FSHD myoblasts [33]. Many of the genes deregulated in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) are involved in myogenesis, cell differentiation, and cell-cycle control.

According to the available information, it could be suggested that FSHD shared the greatest quantity of differentially expressed genes and the deregulation tendencies (up/downregulation) are the same and in a similar range of variation. However it would be difficult to establish any correlation given that in the FSHD, even in patients with the same deletion fragment, high variability of impairment and of muscle affectation grade is observed. Therefore, the data depend enormously on the place and on the moment that biopsy has been taken.

S100A6 (calcylin) and S100A8 (calgranulin A), dysregulated in LGMD2A muscles, are involved in various intracellular and extracellular regulatory activities [55]. Upregulation of S100A6 expression was seen also in LGMD2B and as in other muscular dystrophies, the structural defect causes a general membrane instability that leads to an altered uptake of calcium ions into the muscle fibers [31]. Since calpain 3 interacts with dysferlin and AHNAK, a role of calpain 3 in membrane homeostasis has been suggested [8,9]. The increased Ca²⁺ concentration probably influences expression of various signaling molecules whose transcription is sensitive to calcium concentration.

Dysferlin was not abnormally regulated in LGMD2A patients in the microarray study. The value obtained for the expression of the DYSF gene did not fulfil the established criteria to be considered as differently expressed (data not shown).

In this study mRNA levels are analysed, not protein quantities. Even if the protein is reduced in the Western Blot, this reduction may not be regulated at a transcriptional level, it may happen at a post-translation level. Since calpain 3 was shown to be in complex

with dysferlin and it has been demonstrated that AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, serves as a direct substrate of calpain 3 in cell culture, the lack of one of these proteins may justify the reduction of the other.

As described in previous works [31] while western blotting tests showed a reduction or the absence of dysferlin protein in most LGMD2B patients, the microarray data showed a reduction of dysferlin mRNA for some of the patients analysed. This could be due to the different types of mutations of the gene that affects the translation efficiency of the mRNA or the stability of the protein. Additionally, while protein analysis usually shows an absence of protein in the C57BL/10.SJL-*Dysf* mice, the microarray data did not reveal a reduction of dysferlin mRNA indicating that this primary genetic defect cannot be identified by expression profiling [37]. Moreover, it has been observed that neither calpain-3 nor caveolin was consistently reduced in dysferlinopathies.

The vast majority of upregulated genes in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) and laminin-a2 deficient congenital muscular dystrophy (MDC1A) encode extracellular matrix components, presumably related to fibrotic change. However, mature muscle components were extremely downregulated in congenital muscular dystrophies [34].

Muscle regeneration is also a process that depends on the skeletal muscle basement membrane. Basement membrane is thought to not only maintain cell integrity but also to mediate signal transmission in cell differentiation, growth, attachment, survival, polarity, proliferation, and apoptosis [56,57]. It is hypothesized that upregulation of ECM genes might arise from signal transduction defects due to basement membrane dysfunction. It is possible that muscle fibers keep high transcription levels of ECM to create basement membrane components [34].

Costameric proteins can interact with many components of both the sarcolemma and cytoskeleton. Different publications support a role for the costamere/Z-disk axis in mechanotransduction, the dynamic process through which mechanical stimuli are sensed by muscle cells and converted into biochemical responses [57].

Based on our results and since collagens, melusin and fibronectin, were deregulated, we may hypothesize that upregulation of ECM genes found in LGMD2A patients may result from signal transduction defects due to basement membrane dysfunction. Calpain 3 recognizes a wide range of substrates, including cytoskeletal proteins and myofibrillar proteins [40,46]. These cytoskeletal proteins and matrix proteins contribute to cell shape, mechanical resistance, and morphological integrity of muscle cells, and are part of a complex network of filaments and tubules that transmit mechanical and chemical stimuli between cells. The cytoskeleton is not only involved in cell stability and integrity, but also plays a significant role in signal transmission from the cell membrane to the nucleus.

LGMD2A and eosinophilic infiltrations

Presence of eosinophilic cells has recently been detected in muscle tissue from patients with mutations in the CAPN3 gene [16].

In our study, IL-32 was upregulated in LGMD2A patients with eosinophilic infiltrates (Table 3). Although IL-32 does not share sequence homology with known cytokine families, IL-32 induces various cytokines, human TNF α , and IL-8 in THP-1 monocytic cells. IL-32 activates typical cytokine signal pathways of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and p38 mitogen-activated protein kinase [58]. The neutrophil-derived proteinase 3 (PR3) was identified as a putative IL-32 receptor [59], supporting the possibility that IL-32 upregulation in muscle may be chemoattractant for eosinophilic cells.

Eosinophilia has also been reported as a prominent feature of the necrotic phase in dystrophin-deficient mdx mice. This study suggested that eosinophilia was promoted by at least perforin-dependent cytotoxicity of effector T cells and T-cell production of interleukin-5 (IL-5) [60]. However these authors concluded that some eosinophilia of mdx muscle is independent from perforin-mediated processes and that it may be suggested that a similar mechanism of calpain 3 could act in this process.

Inflammatory features may be seen in some muscular dystrophies, such as facioscapulohumeral muscular dystrophy [17] and dysferlinopathies [19]. Moreover, a Becker muscular dystrophy presenting eosinophilic inflammatory myopathy was described by Weinstock et al [18].

Although the comparison between gene expression profiles between LGMD2A with and without eosinophilia would be interesting, it was not possible to perform. The methods used needed a higher quantity of samples to obtain significant results. Moreover, when a PCA plot was performed for LGMD2A patients only (including cases with and without eosinophilia), no different groups were created and this may be due to the low sample number too.

It seems that the comparison between asymptomatic patients with eosinophilia with control samples is more indicated to shed some light onto the initial mechanism that triggers the eosinophilic cell attraction to muscle. The comparison between asymptomatic patients and controls allows a clearer view due to a lower interfering expression variation.

In a first approach asymptomatic cases were considered as affected and were included into the patient group in the general analysis. These cases were included in the affected group due to their abnormal muscle biopsy pattern. Additionally reinforcing this decision, the PCA plots clustered together the LGMD2A case with or without eosinophilia.

Finally in an additional analysis, however, it was decided to consider them as a different group compared to the controls in order to obtain information about eosinophilic attraction in the early stage of the disease.

Conclusions

In conclusion, upregulated genes were mostly those related to extracellular matrix, cell adhesion, sarcomeric proteins, and signal transduction. It is therefore suggested that different proteins located at or participating in the costameric region are involved in

processes regulated by calpain 3 during skeletal muscle development. Upregulation of these proteins may indicate a compensatory attempt of the muscle, and since most of these genes are also upregulated in other dystrophic processes, upregulation might be relatively nonspecific.

It was also found that genes participating in the ubiquitin proteasome degradation pathway are deregulated in LGMD2A patients, which suggests that regulation of this pathway may be under the control of calpain 3 activity.

Finally, the upregulation of IL-32 and immunoglobulin genes may cause the eosinophil chemoattraction observed in the inflammatory findings in presymptomatic stages. This upregulation seems to disappear when the disease progresses. However, they might be quite specific markers for the disease.

Though samples taken from different muscles could add variability to the results of the expression array analysis, correlation of the results with the quantitative RT-PCR results gave strength to the findings. Gene expression profiling is presented as a useful approach to mine new data and hopefully open new perspectives for muscular disorders, shedding some light on identification of novel therapeutic targets for limb-girdle muscular dystrophies.

Looking ahead, each of these methods should be individually analyzed in the animal model and in cell models.

This analysis gives a total of 24 genes that may be considered as potential diagnostic or evolutionary biomarkers of the disease. However, this question will not be solved until the predictive value of these markers is proved in a series of patients with different evolutive status and secondly until the consistency of the results in different muscles and different laboratories is proved.

Acknowledgments

We would like to thank Nathalie Deburgrave and Caroline Beugnet for their technical assistance, Harry Zuzan for discussions on data analysis and Daisy E. Hilton (Celer Soluciones) for manuscript editing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS. Performed the experiments: AS MA FL. Analyzed the data: AS MA RA AA IInza ALdM. Contributed reagents/materials/analysis tools: AS MA FL FGB GDIH JC AC CN CDIT EG Illa ALdM. Wrote the paper: AS RA ALdM.

References

- Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, et al. (1989) Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* 264: 20106–20111.
- Ono Y, Kakinuma K, Torii F, Irie A, Nakagawa K, et al. (2004) Possible regulation of the conventional calpain system by skeletal muscle-specific calpain, p94/calpain 3. *J Biol Chem* 279: 2761–2771.
- Kimbara K, Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K (1998) Skeletal muscle-specific calpain, p94: structure and physiological function. *Biochem Pharmacol* 56: 415–420.
- García Díaz BE, Gauthier S, Davies PL (2006) Ca²⁺ dependency of calpain 3 (p94) activation. *Biochemistry* 45: 3714–3722.
- Sorimachi H, Kimbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, et al. (1995) Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J Biol Chem* 270: 31158–31162.
- Ono Y, Torii F, Ojima K, Doi N, Yoshioka K, et al. (2006) Suppressed disassembly of autolyzing p94/CAPN3 by N2A connectin/titin in a genetic reporter system. *J Biol Chem* 281: 18519–18531.
- Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, et al. (2008) Multiple molecular interactions implicate connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283: 14801–14814.
- Huang Y, Verheesen P, Roussis A, Frankhuizen W, Ginjaar I, et al. (2005) Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet* 13: 721–730.
- Huang Y, de Morrée A, van Remoortere A, Bushby K, Frants RR, et al. (2008) Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 17: 1855–1866.
- Guyon JR, Kudryashova E, Potts A, Dalkilic I, Brosius MA, et al. (2003) Calpain 3 cleaves filamin C and regulates its ability to interact with gamma- and delta-sarcoglycans. *Muscle Nerve* 28: 472–483.
- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, et al. (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the IkappaB alpha/NF-kappaB pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med* 5: 503–511.
- Baghdiguian S, Richard I, Martin M, Coopman P, Beckmann JS, et al. (2001) Pathophysiology of limb girdle muscular dystrophy type 2A: hypothesis and new insights into the IkappaB alpha/NF-kappaB survival pathway in skeletal muscle. *J Mol Med* 79: 254–261.
- Benayoun B, Baghdiguian S, Lajmanovich A, Bartoli M, Daniele N, et al. (2008) NF-kappaB-dependent expression of the antiapoptotic factor c-FLIP is regulated by calpain 3, the protein involved in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *FASEB J* 22: 1521–1529.
- Kramerova I, Kudryashova E, Tidball JG, Spencer MJ (2004) Null mutation of calpain 3 (p94) in mice causes abnormal sarcomere formation in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet* 13: 1373–1388.
- Kramerova I, Kudryashova E, Venkatraman G, Spencer MJ (2005) Calpain 3 participates in sarcomere remodeling by acting upstream of the ubiquitin-proteasome pathway. *Hum Mol Genet* 14: 2125–2134.

16. Krahn M, Lopez de Munain A, Streichenberger N, Bernard R, Pécheux C, et al. (2006) CAPN3 mutations in patients with idiopathic eosinophilic myositis. *Ann Neurol* 59: 905–911.
17. Arahata K, Ishihara T, Fukunaga H, Orimo S, Lee JH, et al. (1995) Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve* 2: S56–66.
18. Weinstock A, Green C, Cohen BH, Prayson RA (1997) Becker muscular dystrophy presenting as eosinophilic inflammatory myopathy in an infant. *J Child Neurol* 12: 146–147.
19. Gallardo E, Rojas-García R, de Luna N, Pou A, Brown RH Jr, et al. (2001) Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 57: 2136–2138.
20. Gentleman R, Carey V, Huber W, Irizarry R, Dudoit S (2005) Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Springer.
21. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, et al. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249–264.
22. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, et al. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31: e15.
23. Bolstad BM, Irizarry R A, Astrand M, Speed TP (2003) A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics* 19: 185–193.
24. Haslett JN, Sanoudou D, Kho AT, Han M, Bennett RR, et al. (2003) Gene expression profiling of Duchenne muscular dystrophy skeletal muscle. *Neurogenetics* 4: 163–171.
25. Bakay M, Chen YW, Borup R, Zhao P, Nagaraju K, et al. (2002) Sources of variability and effect of experimental approach on expression profiling data interpretation. *BMC Bioinformatics* 3: 4.
26. Duda RO, Hart PE, Stork DG (2000) Pattern classification. New York: Wiley-Interscience.
27. Kang PB, Kho AT, Sanoudou D, Haslett JN, Dow CP, et al. (2005) Variations in gene expression among different types of human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 32: 483–491.
28. Wang Y, Tetko IV, Hall MA, Frank E, Facius A, et al. (2005) Gene selection from microarray data for cancer classification – a machine learning approach. *Comput Biol Chem* 29: 37–46.
29. Hall MA, Smith LA (1997) Feature Subset Selection: A Correlation Based Filter Approach, Proceedings of the Fourth International Conference on Neural Information Processing and Intelligent Information Systems, 855–858.
30. Chen YW, Zhao P, Borup R, Hoffman EP (2000) Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* 151: 1321–1336.
31. Campanaro S, Romualdi C, Fanin M, Celegato B, Pacchioni B, et al. (2002) Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray. *Hum Mol Genet* 11: 3283–3298.
32. Noguchi S, Tsukahara T, Fujita M, Kurokawa R, Tachikawa M, et al. (2003) cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 12: 595–600.
33. Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, et al. (2003) Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet* 12: 2895–2907.
34. Taniguchi M, Kurahashi H, Noguchi S, Sese J, Okinaga T, et al. (2006) Expression profiling of muscles from Fukuyama-type congenital muscular dystrophy and laminin-alpha 2 deficient congenital muscular dystrophy: is congenital muscular dystrophy a primary fibrotic disease? *Biochem Biophys Res Commun* 342: 489–502.
35. Osborne RJ, Welle S, Venance SL, Thornton CA, Tawil R (2007) Expression profile of FSHD supports a link between retinal vasculopathy and muscular dystrophy. *Neurology* 68: 569–577.
36. Sáenz A, Leturcq F, Cobo AM, Poza JJ, Ferrer X, et al. (2005) LGMD2A: genotype-phenotype correlations based on a large mutational survey on the calpain 3 gene. *Brain* 128: 732–742.
37. von der Hagen M, Laval SH, Cree LM, Haldane F, Pocock M, et al. (2005) The differential gene expression profiles of proximal and distal muscle groups are altered in pre-pathological dysferlin-deficient mice. *Neuromuscul Disord* 15: 863–877.
38. Zhou X, Tan FK, Guo X, Arnett FC (2006) Attenuation of collagen production with small interfering RNA of SPARC in cultured fibroblasts from the skin of patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 54: 2626–2631.
39. Karsch-Mizrachi I, Travis M, Blau H, Leinwand AL (1989) Expression and DNA sequence analysis of a human embryonic skeletal muscle myosin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* 17: 6167–6179.
40. Cohen N, Kudryashova E, Kramerova I, Anderson LV, Beckmann JS, et al. (2006) Identification of putative in vivo substrates of calpain 3 by comparative proteomics of overexpressing transgenic and nontransgenic mice. *Proteomics* 6: 6075–6084.
41. Marotta M, Sarria Y, Ruiz-Roig C, Munell F, Roig-Quilis M (2007) Laser microdissection-based expression analysis of key genes involved in muscle regeneration in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 17: 707–718.
42. Baldwin KM, Haddad F (2002) Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 81: S40–51.
43. Brancaccio M, Guazzone S, Menini N, Sibona E, Hirsch E, et al. (1999) Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274: 29282–29288.
44. Kramerova I, Kudryashova E, Wu B, Spencer MJ (2006) Regulation of the M-cadherin-beta-catenin complex by calpain 3 during terminal stages of myogenic differentiation. *Mol Cell Biol* 26: 8437–8447.
45. Belkin AM, Zhidkova NI, Balzac F, Altruda F, Tomatis D, et al. (1996) Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol* 132: 211–226.
46. Ono Y, Hayashi C, Doi N, Kitamura F, Shindo M, et al. (2007) Comprehensive survey of p94/calpain 3 substrates by comparative proteomics—possible regulation of protein synthesis by p94. *Biotechnol J* 2: 565–576.
47. Cyr DM, Langer T, Douglas MG (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* 19: 176–181.
48. Wu G, Liu C, He X (2004) Ozz: a new name on the long list of beta-catenin's nemesis. *Mol Cell* 13: 451–453.
49. Nastasi T, Bongiovanni A, Campos Y, Mann L, Toy JN, et al. (2004) Ozz-E3, a muscle-specific ubiquitin ligase, regulates beta-catenin degradation during myogenesis. *Dev Cell* 6: 269–282.
50. Frosk P, Weiler T, Nylén E, Sudha T, Greenberg CR, et al. (2002) Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *Am J Hum Genet* 70: 663–672.
51. Figarella-Branger D, El-Dassouki M, Saenz A, Cobo AM, Malzac P, et al. (2002) Myopathy with lobulated muscle fibers: evidence for heterogeneous etiology and clinical presentation. *Neuromuscul Disord* 12: 4–12.
52. Keira Y, Noguchi S, Kurokawa R, Fujita M, Minami N, et al. (2007) Characterization of lobulated fibers in limb girdle muscular dystrophy type 2A by gene expression profiling. *Neurosci Res* 57: 513–521.
53. Olivé M, Martínez-Matos JA, Pirretas P, Povedano M, Navarro C, et al. (1997) Expression of myogenic regulatory factors (MRFs) in human neuromuscular disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 475–482.
54. Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, et al. (2008) Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *J Cell Biol* 180: 1087–1100.
55. Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 33: 637–668.
56. Campbell KP, Stull JT (2003) Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem* 278: 12599–12600.
57. Ervasti JM (2003) Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J Biol Chem* 278: 13591–13594.
58. Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA (2005) Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha. *Immunity* 22: 131–142.
59. Dinarello CA, Kim SH (2006) IL-32, a novel cytokine with a possible role in disease. *Ann Rheum Dis* 65: iii61–64.
60. Cai B, Spencer MJ, Nakamura G, Tseng-Ong L, Tidball JG (2000) Eosinophilia of dystrophin-deficient muscle is promoted by perforin-mediated cytotoxicity by T cell effectors. *Am J Pathol* 156: 1789–1796.

Human Apolipoprotein A-II Determines Plasma Triglycerides by Regulating Lipoprotein Lipase Activity and High-Density Lipoprotein Proteome

Human Apolipoprotein A-II Determines Plasma Triglycerides by Regulating Lipoprotein Lipase Activity and High-Density Lipoprotein Proteome

Josep Julve; Joan Carles Escolà-Gil; Noemi Rotllan; Catherine Fiévet; Emmanuelle Vallez; Carolina de la Torre; Vicent Ribas; John H. Sloan; Francisco Blanco-Vaca

Introduction—Apolipoprotein (apo) A-II is the second most abundant high-density lipoprotein (HDL) apolipoprotein. We assessed the mechanism involved in the altered postprandial triglyceride-rich lipoprotein metabolism of female human apoA-II-transgenic mice (hapoA-II-Tg mice), which results in up to an 11-fold increase in plasma triglyceride concentration. The relationships between apoA-II, HDL composition, and lipoprotein lipase (LPL) activity were also analyzed in a group of normolipidemic women.

Methods and Results—Triglyceride-rich lipoprotein catabolism was decreased in hapoA-II-Tg mice compared to control mice. This suggests that hapoA-II, which was mainly associated with HDL during fasting and postprandially, impairs triglyceride-rich lipoprotein lipolysis. HDL isolated from hapoA-II-Tg mice impaired bovine LPL activity. Two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, and immunonephelometry identified a marked deficiency in the HDL content of apoA-I, apoC-III, and apoE in these mice. In normolipidemic women, apoA-II concentration was directly correlated with plasma triglyceride and inversely correlated with the HDL-apoC-II+apoE/apoC-III ratio. HDL-mediated induction of LPL activity was inversely correlated with apoA-II and directly correlated with the HDL-apoC-II+apoE/apoC-III ratio. Purified hapoA-II displaced apoC-II, apoC-III, and apoE from human HDL2. Human HDL3 was, compared to HDL2, enriched in apoA-II but poorer in apoC-II, apoC-III, and apoE.

Conclusion—ApoA-II plays a crucial role in triglyceride catabolism by regulating LPL activity, at least in part, through HDL proteome modulation. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:232-238.)

Key Words: VLDL ■ chylomicron ■ transgenic mice ■ lipolysis ■ proteomics

Apolipoprotein (apo) A-II is the second most abundant protein, comprising $\approx 20\%$ of high-density lipoprotein (HDL) total protein mass; however, its function remains unclear.¹⁻⁴ Evidence for a role of apoA-II in triglyceride (TG) and free fatty acid (FFA) metabolism was provided by reports that showed a positive correlation between apoA-II synthesis and very-low-density lipoprotein apoB in humans, and that showed the *APOA-II* locus was linked to a locus controlling plasma levels of apoA-II and FFA in mice and humans.¹ More recently, several clinical studies reported an association between the -265T>C allele affecting the D element of the *apoA-II* promoter, altered plasma apoA-II concentration, and postprandial metabolism of large triglyceride-rich lipoproteins (TRL).⁵⁻⁷ Further evidence for a role of apoA-II in TG metabolism in humans has been provided by studies of

controls and cases with coronary artery disease, and in families with familial combined hyperlipidemia.^{8,9} Both studies showed a direct association between apoA-II and plasma TG levels. However, the mechanism whereby apoA-II affects TG metabolism in humans is largely unknown.

A direct effect of apoA-II on TG and FFA metabolism is also supported by studies conducted in genetically modified mice. Mice overexpressing mouse and human apoA-II (hapoA-II) exhibit marked hypertriglyceridemia and increased FFA.^{1,10,11} Knocking out of apoA-II in mice decreased plasma TRL concentration and increased remnant catabolism.¹² However, whether apoA-II variability causes increased TRL synthesis, decreases TRL catabolism, or both, remains controversial.¹⁻⁴ Our hapoA-II transgenic mice (hapoA-II-Tg mice) fed an atherogenic, cholate-containing

Received on: December 19, 2008; final version accepted on: October 27, 2009.

From Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (J.C.E.-G., N.R., C.T., V.R.) and Servei de Bioquímica (F.B.-V.), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain; CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (J.J., J.C.E.-G., N.R., F.B.-V.), CIBERDEM, Barcelona, Spain; Departament de Bioquímica i Biologia Molecular (F.B.-V.), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; Univ Lille Nord de France (C.F., E.V.), F-59000, Lille, France; Inserm U545 (C.F., E.V.), F-59000, Lille, France; UDSL (C.F., E.V.), F-59000, Lille, France; Institut Pasteur de Lille (C.F., E.V.), F-59019, Lille, France; Servei de Proteòmica (C.T.), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; Linco Diagnostics Service (J.H.L.), St. Charles, Mo.

Correspondence to F. Blanco-Vaca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Servei de Bioquímica, C/Antoni M Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail fblancova@santpau.cat

J.J. and J.C.E.-G. contributed equally to this work.

© 2010 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.198226

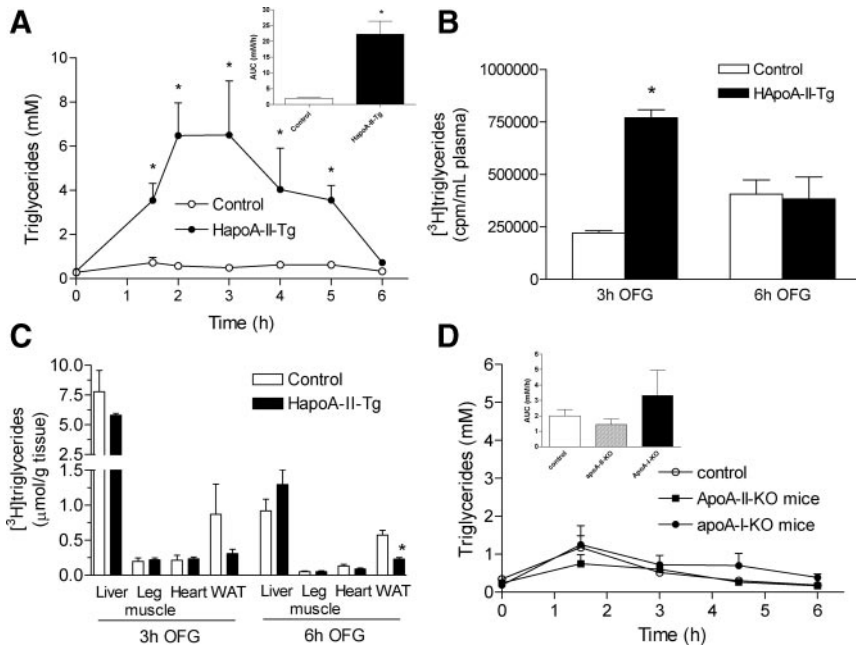


Figure 1. Oral fat gavage (OFG) assays in transgenic (Tg) and knockout (KO) mice. A, TG was measured before and after a single bolus of 150 μ L of olive oil in female hapoA-II-Tg and control mice. In separate experiments, radiolabeled TG were, respectively, measured in plasma (B) and in target tissues (C) after a single bolus of 150 μ L of radiolabeled olive oil-based emulsion (20 μ Ci per mouse) at the times indicated. D, TG were also measured before and after a single bolus of 150 μ L of olive oil in female apoA-I KO and apoA-II KO mice. Results are expressed as mean \pm SEM of individual animals (n=5 mice at each time point). * P <0.05 compared with the control.

diet or cross-bred with apoE knockout (KO) mice presented higher very-low-density lipoprotein production and normal very-low-density lipoprotein TG catabolism and postheparin lipolytic activities when analyzed in fasting conditions.¹ In contrast, an independently generated line of hapoA-II-Tg mice exhibited marked postprandial hypertriglyceridemia, which was associated with an increase in plasma hapoA-II compared to fasted mice, and impaired lipolysis of TRL enriched with hapoA-II.^{10,13}

To gain more insight into the role of human apoA-II in TG metabolism, we conducted a detailed study of TRL and HDL in our hapoA-II Tg mice and in a group of normolipidemic women. Our data show that accumulation of hapoA-II increases plasma TG through an impaired HDL induction of lipoprotein lipase (LPL) activity that depends, at least in part, on changes induced in the protein composition of discrete HDL subfractions.

Materials and Methods

The hapoA-II-Tg mice were developed as previously described.¹⁴ Twenty-three healthy women were enrolled in the study, which was approved by the Ethics Committee for Clinical Investigation of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. For further experimental details, see the online data supplement at <http://atvb.ahajournals.org>.

Results

Mouse Plasma Lipid and Lipoprotein Profile and Functional Distribution of TG After Oral Fat Gavage

The hapoA-II-Tg mice used in this study displayed 2.5-fold higher hapoA-II plasma levels than those of normolipidemic humans.¹ No differences were found in food consumption among mice of different genotypes (4.1 \pm 0.3 in control mice vs 3.9 \pm 0.3 grams/day in hapoA-II-Tg). Plasma TG levels in female hapoA-II-Tg mice were maximal between 2 hours and 3 hours after the oral fat gavage (OFG), and at that time were 11-fold higher than those in control mice (Figure 1A). Plasma

TG in male hapoA-II-Tg mice were 7.5-fold higher 3 hours after the OFG (5.9 \pm 1.0 vs 0.8 \pm 0.1 mmol/L in controls). Because females were more prone to hypertriglyceridemia, we conducted a series of experiments in our female hapoA-II-Tg mice. Radiolabeled TG mixed with olive oil was individually gavaged, and the radiolabeled TG was determined in plasma and target tissues at the times indicated (Figure 1B, C). Plasma levels of radiolabeled TG in hapoA-II-Tg mice were significantly higher than those of control mice after 3 hours of OFG administration (Figure 1 B). At that time, a very high percentage (>99%) of radioactivity present in the lipoprotein-depleted fraction was mainly attributable to FFA, and these were found to be significantly decreased in hapoA-II-Tg mice (1.5%) compared to control mice (8.9%). The hapoA-II-Tg mice showed decreased radiolabeled TG in parametrial White Adipose Tissue (pWAT) 6 hours after OFG (Figure 1C).

Because hypertriglyceridemia is common in patients with inherited HDL deficiency, and because hapoA-II is known to displace mouse apoA-I from the HDL surface,¹ we determined postprandial plasma TG profiles after an OFG in female apoA-I KO and apoA-II KO mice (Figure 1D). Although potential changes in postprandial TG could be observed and were consistent with previous studies,^{12,15} the area under the curve of TG after the OFG in apoA-I KO and apoA-II KO mice did not significantly differ from that of control mice (Figure 1D). This may be because of the limited number of animals studied. However, overall, these results suggested that the increased postprandial TG in hapoA-II-Tg mice was not attributable to their decreased HDL.

Postprandial plasma hapoA-II concentration in the hapoA-II-Tg mice used in the present study (82.6 \pm 5.3 mg/dL) did not differ significantly from that found in fasting plasma (75.0 \pm 4.2 mg/dL). Fast protein liquid chromatography (FPLC) analyses of postprandial plasma revealed a dramatic increase in TG and cholesterol amount and size of the TRL particles of hapoA-II-Tg mice compared with those of control mice (Figure 2A, B,

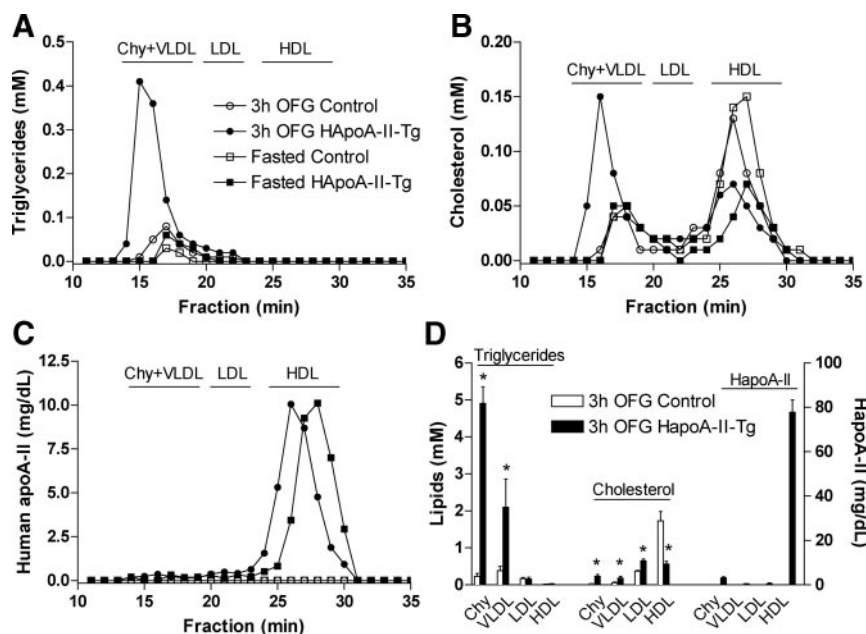


Figure 2. Analysis of plasma lipoproteins of hapoA-II-Tg and control mice isolated by fast protein liquid chromatography (A–C) or sequential ultracentrifugation (D) during fasting and after OFG. A, TG. B, Cholesterol. C, hapoA-II. D, Concentrations of TG, cholesterol, and hapoA-II in lipoprotein fractions.

respectively). Decreased HDL cholesterol in hapoA-II-Tg mice was not more pronounced postprandially than in fasting conditions (Figure 2B). The hapoA-II was mainly found in the HDL fraction (77.8 ± 5.51 mg/dL), but small amounts could be detected in chylomicrons (3.1 ± 0.5 mg/dL; Figure 2C, D). Sixty-eight percent of plasma TG in hapoA-II-Tg mice floated as chylomicrons (Figure 2D). The TG-to-protein ratio confirmed that postprandial plasma transgenic TRL were significantly larger than those of control TRL (online Figure 1).

Effect of hapoA-II Expression on TRL Plasma Turnover in Mice

In vivo analyses were performed to evaluate the causes of postprandial hypertriglyceridemia in hapoA-II-Tg mice. Data indicated that TG intestinal and liver secretion in hapoA-II-Tg mice did not significantly differ from those of control mice (Figure 3A, B). In vivo catabolic studies with autologous [3 H]-TG-TRL showed that the fractional catabolic rate of hapoA-II-Tg-mice [3 H]-TG-TRL was significantly reduced in plasma of hapoA-II-Tg mice compared to that of control mice under postprandial conditions (Figure 3C, D). In contrast, [3 H]-TG-TRL fractional catabolic rate did not significantly differ between genotypes under fasting conditions. Changes in TG clearance in hapoA-II-Tg mice under postprandial conditions may reflect the dilution of [3 H]-TG-TRL in an expanded TRL pool. For this reason, we also performed cross-infusion experiments consisting of the injection of labeled TRL from transgenic mice into control mice, and labeled TRL from control into hapoA-II-Tg mice (see the 2 last bars of Figure 3D). Data indicated that control [3 H]-TG-TRL clearance from plasma of hapoA-II-Tg mice was significantly delayed compared to that in control mice, whereas hapoA-II-Tg [3 H]-TG-TRL were cleared from plasma of control mice as rapidly as the autologous control [3 H]-TG-TRL (Figure 3D). This could indicate that the plasma content, rather than TRL origin, was the main determinant of the changes in TRL catabolism. Although postheparin postpran-

dial or fasting plasma LPL activity toward an artificial triolein-based substrate in hapoA-II-Tg mice did not differ from control mice (Figure 3E), coinubation with HDL of control mice increased bovine LPL activity 60% more than coinubation with apoA-II-Tg mice HDL (Figure 3F). In addition, we conducted experiments to test the ability of HDL from hapoA-II-Tg mice and control mice to modulate in vitro bovine LPL activity toward TRL (data not shown). Coinubation of TRL with HDL from control mice and hapoA-II-Tg mice at ratios similar to those found in vivo in each group of mice (Figures 1 and supplemental Figure I) resulted in 4-fold more enzymatic activity in the former condition compared with the latter. To rule out the possibility that the redistribution of hapoA-II in chylomicrons could affect LPL activity, we incubated control chylomicrons with free hapoA-II at 37°C for 3 hours. The rate of FFA formation in apoA-II-enriched chylomicrons, at a hapoA-II concentration of 3 mg/dL (which represents $\approx 4\%$ of the total concentration of proteins in chylomicrons), was similar to that of control chylomicrons (13.8 ± 0.9 vs 11.9 ± 0.7 nmol of FFA/mL per minute).

Effect of hapoA-II on Plasma and HDL-Associated Apolipoproteins in Mice

HDL protein composition was studied by 2-dimensional gel electrophoresis. This analysis showed the existence of 10 significant, differentially expressed spots (Figure 4A) and 2 hapoA-II isoforms in apoA-II-Tg mice HDL. Identification of these spots was performed by Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Figure 4A, B). Two spots contained a mixture of paraoxonase 1 and an apoA-I isoform; thus, the respective contributions to their decreased abundance could not be determined. To confirm these changes, we measured several available murine apolipoproteins by immunonephelometry in plasma and in HDL obtained by ultracentrifugation (Figure 4C, D). This method confirmed that the amount of apoC-III was almost negligible in hapoA-II-Tg mice HDL, whereas

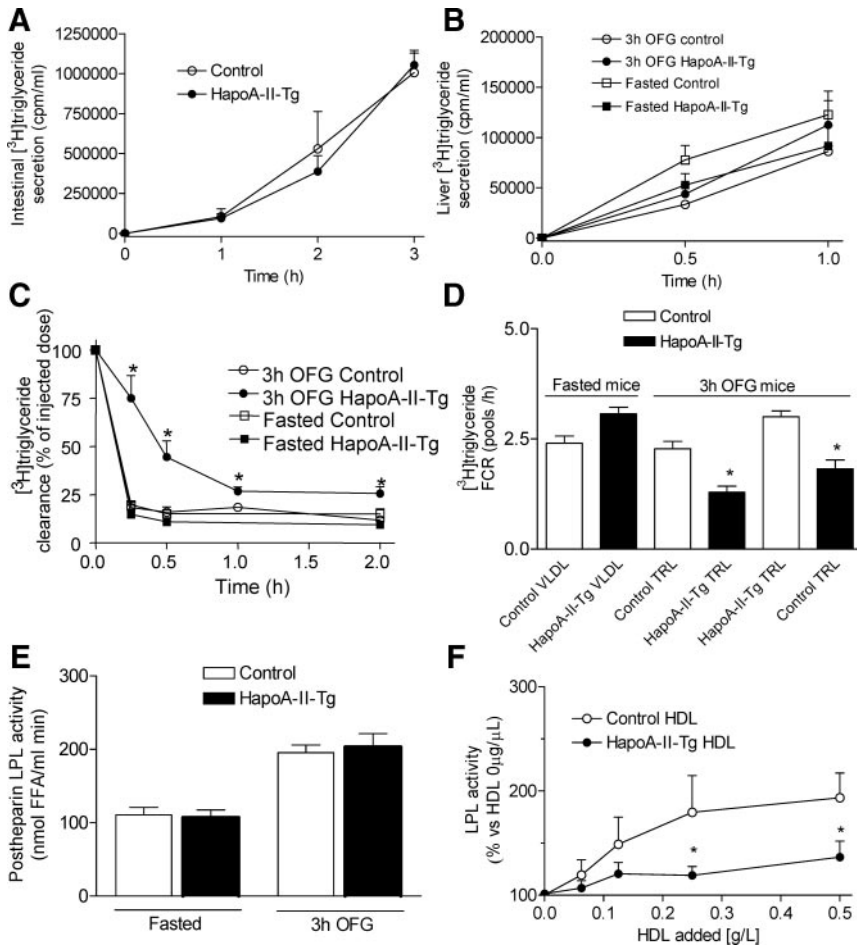


Figure 3. Effect of hapoA-II on in vivo intestinal and liver TG secretion, autologous and heterologous TRL catabolism, and LPL activity. A, In vivo intestinal TG secretion in overnight fasted hapoA-II-Tg and control mice given an OFG of [³H]-TG. B, In vivo liver TG secretion of mice after intravenous injection of 10 μ Ci of [³H]-oleic acid. C, Plasma clearance of autologous [³H]-TRL-TG, isolated during fasting or 3 hours after an OFG and injected intravenously. D, Plasma [³H]-TG clearance of (C) displayed as fractional catabolic rate (first 4 bars). The last 2 bars correspond to heterologous infusions (performed 3 hours after OFG): [³H]-TG-labeled TRL of transgenic mice were injected into control mice and control [³H]-TG-labeled TRL were injected into hapoA-II transgenic mice. E, LPL activity in postheparin plasma in mice. Each value represents the mean \pm SEM of data from 5 mice. F, Bovine LPL activity against a tri[9,10(n)-³H] oleate-based emulsion incubated with mouse HDL samples at 37°C for 60 minutes. The SEM at each point are indicated unless they fall within the bar. With the exception of (E), results are expressed as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments with pools of 3 to 4 animals. **P*<0.05 vs HDL from control mice.

plasma apoC-III levels were 3-fold higher in postprandial conditions, thereby indicating a redistribution of this apolipoprotein to TRL (Figure 4C, D). Again, apoA-I was decreased in plasma and in HDL in fasting and postprandial conditions (Figure 4C, D).

Human Studies

In a group of healthy normolipidemic women (n=23), hapoA-II concentration was found to be directly correlated with plasma TG (*r*=0.72; *P*<0.001; Figure 5A). HDL of these women was incubated in the presence of a triolein-based emulsion

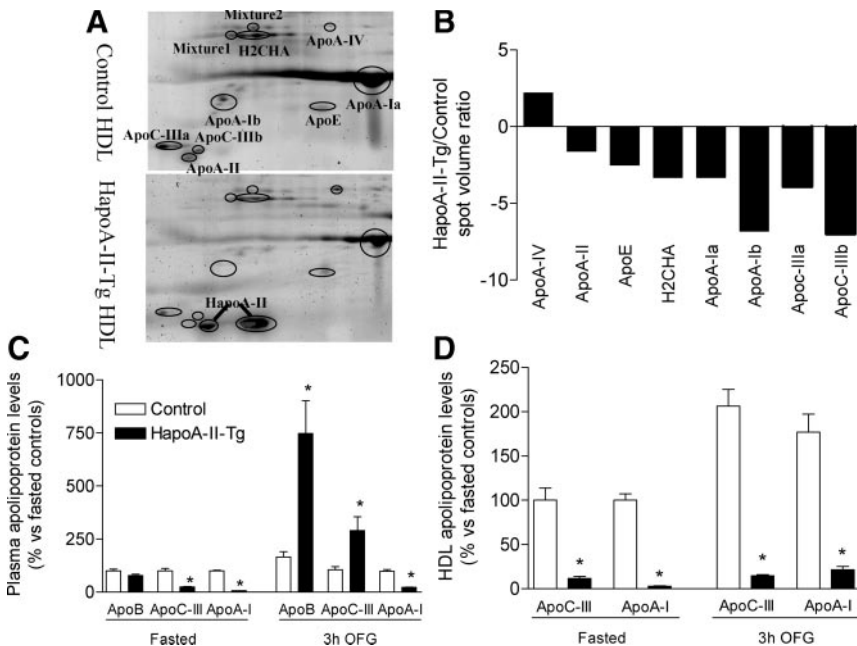


Figure 4. Analysis of plasma and HDL-associated apolipoproteins. A, Representative 2-dimensional gel containing HDL proteins stained with Flamingo fluorescent gel stain and identified by MALDI-TOF spectrometry. B, The hapoA-II-Tg/control HDL protein spot volume ratio of HDL proteins identified by MALDI-TOF spectrometry and showing statistically significant differences. H2CHA, H-2 class I histocompatibility antigen. In all cases, HDL proteome was analyzed from 3 independent HDL pools (of 3 to 4 animals each) obtained 3 hours after OFG. C, Plasma murine apoB, apoC-III, and apoA-I determined by immunonephelometry in hapoA-II-Tg mice and control mice, both in fasting state and 3 hours after OFG. Each value represents the mean \pm SEM of data from 6 mice. D, HDL-associated apolipoproteins determined by immunonephelometry. Each value represents the mean \pm SEM of data from 4 independent HDL pools of 3 to 4 animals each. C and D, Plasma murine apolipoprotein levels are reported as the mean of percentage change compared with the results obtained in fasted control mice. **P*<0.05 vs control mice.

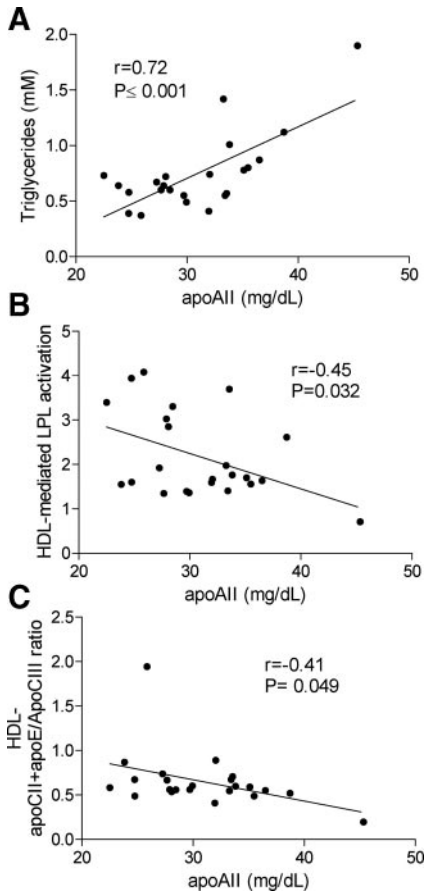


Figure 5. Correlations between hapoA-II and plasma TG, HDL apolipoproteins, and HDL-mediated LPL modulation in healthy fasted women. A, Correlation between hapoA-II and plasma TG. B, Correlation between hapoA-II and HDL-mediated LPL induction. C, Correlation between hapoA-II and the HDL-apoC-II+apoE/apoC-III ratio. R indicates Pearson coefficient correlation with the corresponding probability value.

and bovine LPL. ApoA-II was found to be inversely correlated with HDL-mediated induction of LPL activity ($r=-0.45$; $P<0.04$; Figure 5B). HDL modulation of LPL activity was also directly correlated with the HDL-apoC-II+apoE/apoC-III, HDL-apoC-II/apoC-III, and apoA-V/apoA-I ratios (see supplemental Table II for detailed correlation coefficients); however, only the first parameter significantly correlated with apoA-II ($r=-0.41$; $P<0.05$; Figure 5C).

Effect of hapoA-II on Human HDL Apolipoprotein Content

Coincubation of human HDL2 with purified hapoA-II clearly decreased the intensity of the immunoreactive bands, both in denaturing and nondenaturing conditions, corresponding to human apoC-II, apoC-III, and apoE when analyzed by Western blot (Figure 6A). This incubation also generated a novel peak that contained mainly apoA-II and apoA-I (data not shown). ApoA-II was preferentially located in HDL3, and this was concomitant with a strongly decreased content of apoC-II, apoC-III, and apoE in HDL3 compared to that of HDL2 (Figure 6B).

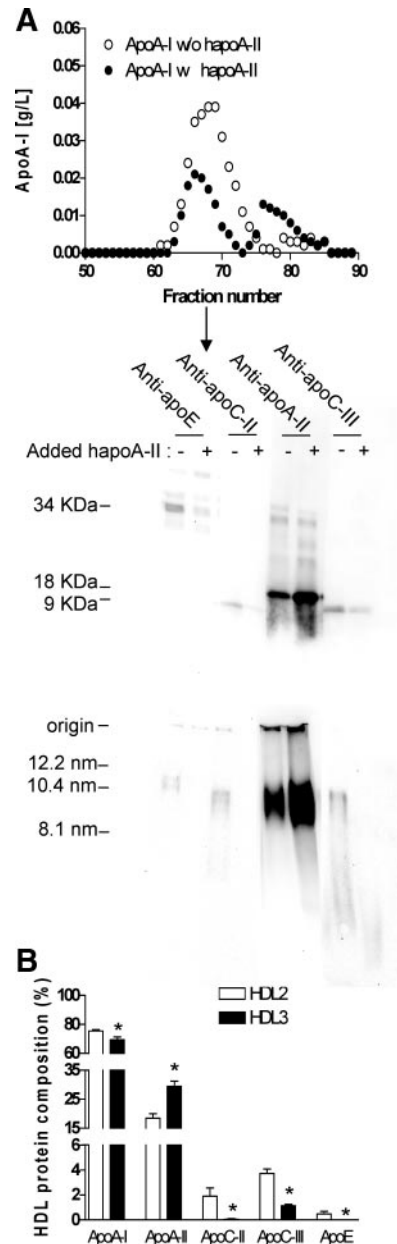


Figure 6. Effect of hapoA-II on human HDL apolipoprotein composition. A, FPLC profiles of native human HDL2 (apoA-I concentration of 30 mg/dL) before and after incubation with 60 mg/dL of purified hapoA-II. The results of specific immunoblots of fraction 67 are shown both in denaturing and nondenaturing conditions. B, Relative apolipoprotein concentration of HDL2 and HDL3 isolated by ultracentrifugation of 7 pools of normolipidemic plasma. Indicated apolipoproteins were determined by immunonephelometry.

Discussion

Evidence favoring a role for apoA-II in TG metabolism stems from experiments in mice^{1-4,10,11} and, also, human studies.^{1,5-9} However, the precise mechanism by which hapoA-II influences TG metabolism remains unclear. In the current study, we show that overexpression of human apoA-II in transgenic mice increased postprandial plasma TG concentration. A similar degree of postprandial hypertriglyceridemia was also found in the double hapoA-IIx CETP-Tg mice having a hapoA-II plasma concentration of 42 mg/dL,¹⁶

thereby indicating that the effect of hapoA-II on TG metabolism also occurs at more physiologically significant levels. Because liver and intestinal TG secretion was comparable between hapoA-II-Tg mice and control mice, we focused our study on postprandial TRL catabolism. Our data clearly show that the hypertriglyceridemia of hapoA-II-Tg mice was primarily caused by a decrease in TRL clearance. An important question is whether postprandial plasma TG accumulation resulted from the association of hapoA-II with TRL. In a previous report using independently generated hapoA-II-Tg mice,¹³ severe postprandial hypertriglyceridemia was associated with a marked increase in plasma hapoA-II concentration in TRL particles, which were found to be poor LPL substrates.¹⁰ In contrast, plasma hapoA-II of our hapoA-II-Tg mice was mainly found associated with HDL during the postprandial state, and we found no nearly complete depletion of the HDL fraction nor a fed-to-fasted switch in hapoA-II concentration. It is possible that the different hapoA-II gene constructions used to generate these 2 hapoA-II-Tg mice^{1,13} could explain their differences in hapoA-II plasma concentration regulation in these 2 different transgenic models. Increased catabolism and decreased production of HDL were the main mechanisms leading to the partial HDL deficiency in our hapoA-II-Tg mice.¹⁷ These changes seemed to be more severe in the other transgenic model,¹⁸ leading to severe hapoA-II accumulation in TRL. Taken together, our data indicate that the amount of hapoA-II present in TRL in our hapoA-II-Tg mice did not impair its catabolism.

ApoA-II variability was also correlated with the concentration of TG in healthy normolipidemic women with hapoA-II levels ranging from 22.5 to 45.4 mg/dL. In agreement with data from our hapoA-II-Tg, hapoA-II concentration was found to be directly correlated with plasma TG 3 hours after the fat-loading test ($r=0.59$; $P<0.05$) in 13 subjects who were given a fatty meal with 1 gram of fat per kilogram of body weight, whereas that with HDL cholesterol was only close to significance ($r=-0.51$; $P=0.073$). Importantly, plasma apoA-II levels were unaffected by the fat-loading test (34.8 ± 1.4 vs 35.6 ± 1.5 mg/dL under fasting conditions), and TRL contained negligible amounts of apoA-II. This finding strongly suggests that the marked increase in hapoA-II in TRL that leads to LPL inhibition is not a physiological mechanism in humans. Nevertheless, a direct LPL inhibition by apoA-II may indeed occur in pathological situations, such as hypertriglyceridemia associated with Tangier disease and type V hyperlipidemia in humans,¹ in cases of extreme HDL deficiency in apoA-II-Tg mice,^{10,19} and when apoA-II accumulates in TRL, as in mouse apoA-II-Tg mice.¹¹ This and other major differences between human and mouse apoA-II, such as the divergent effect on HDL levels, had been attributed to species-specific differences in amino acid sequence, dimer formation, and affinity for lipoprotein surfaces.¹ The reported inhibition of LPL by apoA-II may also be extendable to other lipases, such as hepatic lipase and endothelial lipase.^{12,20}

Data obtained in our hapoA-II-Tg mice suggested that the presence of hapoA-II in HDL might influence HDL apolipoprotein composition or apolipoprotein transfer to TRL, thereafter altering TRL postprandial catabolism. To test this hypothesis in detail, LPL assays were performed using mouse

HDL from each genotype as the activator apolipoprotein source. Our results clearly indicated that the ability of hapoA-II HDL to modulate LPL activity was lower than that induced by control HDL. We also found that apoA-II levels showed an inverse correlation with the capacity of HDL to induce LPL activity in healthy normolipidemic volunteers in absence of plasma as a source of LPL-activating apolipoproteins, and this parameter was also strongly correlated with the HDL-apoC-II+apoE/apoC-III ratio. ApoC-II is well-known to be an effective activator of LPL activity, whereas apoC-III acts as an inhibitor.²¹ ApoE may also exert enhancing effects on the action of LPL, although apoE is mainly a ligand of different cellular lipoproteins.²² It is also well-known that at least part of apoC-II, apoC-III, and apoE is acquired by TRL from the HDL reservoir during the postprandial state; thus, the alteration in HDL composition during fasting may strongly affect TRL metabolism and plasma TG levels.²³⁻²⁵ Therefore, it is conceivable that an altered concentration and, therefore, transfer of these HDL apolipoproteins impaired TG catabolism in individuals with high hapoA-II levels. The hapoA-II-Tg mice provided a useful model to gain more insight into this question. Proteomic and immunonephelometric analyses of the HDL of hapoA-II-Tg mice did demonstrate a decreased content in apoA-I and paraoxonase 1, a deficiency previously reported to be caused by displacement of the HDL surface by a high hapoA-II content,^{26,27} and also demonstrated a deficiency in the HDL content of apoC-III and apoE. Thus, it is possible that hapoA-II-Tg mice HDL is a poor acceptor for apoC-III, thereby causing redistribution to TRL during the postprandial state, which impairs LPL activity. Alternatively, apoC-III accumulation in postprandial TRL of hapoA-II-Tg mice could be the consequence, rather than the cause, of the hypertriglyceridemia. ApoC-II, the main cofactor required for LPL activity, was not identified by proteomic analysis and could not be measured by immunonephelometry. Previous reports showed that HDL3 presented a higher apoA-II-to-apoA-I ratio than HDL2,^{28,29} whereas apoC-II, apoC-III, and apoE were found to be mainly associated with HDL2.^{28,30,31} We therefore analyzed whether human HDL subfractions enriched with apoA-II were poorer in apoC-II, apoC-III, and apoE. This was the case, as demonstrated by quantifying these apolipoproteins in pools of HDL2 and HDL3. In an attempt to ascertain whether hapoA-II could affect apoC-II content and whether there was a common mechanism responsible for the rest of the changes found in HDL apolipoproteins, we incubated purified hapoA-II with human HDL2 and found that the increased association of hapoA-II with HDL2 caused a decrease in the content of apoC-II, apoC-III, and apoE. The displacement of these apolipoproteins, especially apoC-II, from HDL and the consequent altered transfer to TRL may thus explain, at least in part, the association found between hapoA-II with TG and with the capacity of HDL to activate LPL, both in mice and humans.^{1,26} These results also demonstrate that hapoA-II is a major regulator of the apoC-II, apoC-III, and apoE distribution in discrete HDL particle subfractions, as previously shown with paraoxonase 1.²⁶ This is likely to be attributable to the higher affinity of hapoA-II for the HDL surface compared with these apolipoproteins.^{1,26} Therefore, although

TRL apolipoprotein composition is recognized as modulator TG metabolism, our results indicate that HDL composition could play an active role in this process. Further, based on our observations, we speculate that the relative decrease in HDL2 found in hypertriglyceridemia²⁹ could play an active role in its pathophysiology by decreasing LPL activity.

In conclusion, our study shows that apoA-II excess in HDL may contribute to postprandial hypertriglyceridemia by inhibiting TRL lipolysis mediated by LPL attributable, at least in part, to apoC-II, apoC-III, and apoE displacement from the HDL surface. Because the results of this displacement are consistent with the differential distribution of apoA-II and apoC-II, apoC-III, and apoE in HDL2 and HDL3, it is suggested that apoA-II has a role in determining the proteome of discrete HDL particle subfractions.

Sources of Funding

This work was funded in part by FIS grants 06/0551, 07/1067, and 08/1147, and by AGAUR 2009-SGR-1205. CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, CIBERDEM, is a project of the Instituto de Salud Carlos III.

Disclosure

None.

References

- Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC, Martin-Campos JM, Julve J. Role of apoA-II in lipid metabolism and atherosclerosis: advances in the study of an enigmatic protein. *J Lipid Res*. 2001;42:1727–1739.
- Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, Clavey V. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2002;164:1–13.
- Kalopissis AD, Pastier D, Chambaz J. Apolipoprotein A-II: beyond genetic associations with lipid disorders and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:165–172.
- Martin-Campos JM, Escola-Gil JC, Ribas V, Blanco-Vaca F. Apolipoprotein A-II, genetic variation on chromosome 1q21-q24, and disease susceptibility. *Curr Opin Lipidol*. 2004;15:247–253.
- van't Hooft FM, Ruotolo G, Boquist S, de Faire U, Eggertsen G, Hamsten A. Human evidence that the apolipoprotein a-II gene is implicated in visceral fat accumulation and metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Circulation*. 2001;104:1223–1228.
- Corella D, Arnett DK, Tsai MY, Kabagambe EK, Peacock JM, Hixson JE, Straka RJ, Province M, Lai CQ, Parnell LD, Borecki I, Ordovas JM. The -256T>C polymorphism in the apolipoprotein A-II gene promoter is associated with body mass index and food intake in the genetics of lipid lowering drugs and diet network study. *Clin Chem*. 2007;53:1144–1152.
- Delgado-Lista J, Perez-Jimenez F, Tanaka T, Perez-Martinez P, Jimenez-Gomez Y, Marin C, Ruano J, Parnell L, Ordovas JM, Lopez-Miranda J. An apolipoprotein A-II polymorphism (-265T/C, rs5082) regulates postprandial response to a saturated fat overload in healthy men. *J Nutr*. 2007;137:2024–2028.
- Allayee H, Castellani LW, Cantor RM, de Bruin TW, Lusis AJ. Biochemical and genetic association of plasma apolipoprotein A-II levels with familial combined hyperlipidemia. *Circ Res*. 2003;92:1262–1267.
- Birjmohun RS, Dallinga-Thie GM, Kuivenhoven JA, Stroes ES, Otvos JD, Wareham NJ, Luben R, Kastelein JJ, Khaw KT, Boekholdt SM. Apolipoprotein A-II is inversely associated with risk of future coronary artery disease. *Circulation*. 2007;116:2029–2035.
- Dugue-Pujol S, Rousset X, Pastier D, Quang NT, Pautre V, Chambaz J, Chabert M, Kalopissis AD. Human apolipoprotein A-II associates with triglyceride-rich lipoproteins in plasma and impairs their catabolism. *J Lipid Res*. 2006;47:2631–2639.
- Castellani LW, Nguyen CN, Charugundla S, Weinstein MM, Doan CX, Blaner WS, Wongsiriroj N, Lusis AJ. Apolipoprotein AII Is a Regulator of Very Low Density Lipoprotein Metabolism and Insulin Resistance. *J Biol Chem*. 2008;283:11633–11644.
- Weng W, Breslow JL. Dramatically decreased high density lipoprotein cholesterol, increased remnant clearance, and insulin hypersensitivity in apolipoprotein A-II knockout mice suggest a complex role for apolipoprotein A-II in atherosclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:14788–14794.
- Boisfer E, Lambert G, Atger V, Tran NQ, Pastier D, Benetollo C, Trottier JF, Beaucamps I, Antonucci M, Laplaud M, Griglio S, Chambaz J, Kalopissis AD. Overexpression of human apolipoprotein A-II in mice induces hypertriglyceridemia due to defective very low density lipoprotein hydrolysis. *J Biol Chem*. 1999;274:11564–11572.
- Marzal-Casacuberta A, Blanco-Vaca F, Ishida BY, Julve-Gil J, Shen J, Calvet-Marquez S, Gonzalez-Sastre F, Chan L. Functional lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Biol Chem*. 1996;271:6720–6728.
- Voyziakiis E, Goldberg IJ, Plump AS, Rubin EM, Breslow JL, Huang LS. ApoA-I deficiency causes both hypertriglyceridemia and increased atherosclerosis in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res*. 1998;39:313–321.
- Escola-Gil JC, Julve J, Marzal-Casacuberta A, Ordonez-Llanos J, Gonzalez-Sastre F, Blanco-Vaca F. ApoA-II expression in CETP transgenic mice increases VLDL production and impairs VLDL clearance. *J Lipid Res*. 2001;42:241–248.
- Julve J, Escola-Gil JC, Ribas V, Gonzalez-Sastre F, Ordonez-Llanos J, Sanchez-Quesada JL, Blanco-Vaca F. Mechanisms of HDL deficiency in mice overexpressing human apoA-II. *J Lipid Res*. 2002;43:1734–1742.
- Pastier D, Dugue S, Boisfer E, Atger V, Tran NQ, van Tol A, Chapman MJ, Chambaz J, Laplaud PM, Kalopissis AD. Apolipoprotein A-II/A-I ratio is a key determinant in vivo of HDL concentration and formation of pre-beta HDL containing apolipoprotein A-II. *Biochemistry*. 2001;40:12243–12253.
- Ribas V, Palomer X, Roglans N, Rotllan N, Fievet C, Tailleux A, Julve J, Laguna JC, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Paradoxical exacerbation of combined hyperlipidemia in human apolipoprotein A-II transgenic mice treated with fenofibrate. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1737:130–137.
- Broedl UC, Jin W, Fuki IV, Millar JS, Rader DJ. Endothelial lipase is less effective at influencing HDL metabolism in vivo in mice expressing apoA-II. *J Lipid Res*. 2006;47:2191–2197.
- Shachter NS. Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:297–304.
- Heeren J, Beisiegel U. Intracellular metabolism of triglyceride-rich lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:255–260.
- Taskinen MR, Glueck CJ, Kashyap ML, Srivastava LS, Hynd BA, Perisutti G, Robinson K, Kinnunen PJ, Kuusi T. Post-heparin plasma lipoprotein and hepatic lipases. Relationships to high density lipoprotein cholesterol and to apolipoprotein CII in familial hyperalphalipoproteinemic and in normal subjects. *Atherosclerosis*. 1980;37:247–256.
- Goldberg IJ, Scheraldi CA, Yacoub LK, Saxena U, Bisgaier CL. Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV. *J Biol Chem*. 1990;265:4266–4272.
- Dallinga-Thie GM, Berk P II, Bootsma AH, Jansen H. Atorvastatin decreases apolipoprotein C-III in apolipoprotein B-containing lipoprotein and HDL in type 2 diabetes: a potential mechanism to lower plasma triglycerides. *Diabetes Care*. 2004;27:1358–1364.
- Ribas V, Sanchez-Quesada JL, Anton R, Camacho M, Julve J, Escola-Gil JC, Vila L, Ordonez-Llanos J, Blanco-Vaca F. Human apolipoprotein A-II enrichment displaces paraoxonase from HDL and impairs its antioxidant properties: a new mechanism linking HDL protein composition and antiatherogenic potential. *Circ Res*. 2004;95:789–797.
- Scanu AM, Lagocki P, Chung J. Effect of apolipoprotein A-II on the structure of high-density lipoproteins: relationship to the activity of lecithin:cholesterol acyl transferase in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 1980;348:160–173.
- Schaefer EJ, Foster DM, Jenkins LL, Lindgren FT, Berman M, Levy RI, Brewer HB Jr. The composition and metabolism of high density lipoprotein subfractions. *Lipids*. 1979;14:511–522.
- Patsch JR, Prasad S, Gotto AM Jr, Patsch W. High density lipoprotein2. Relationship of the plasma levels of this lipoprotein species to its composition, to the magnitude of postprandial lipemia, and to the activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase. *J Clin Invest*. 1987;80:341–347.
- Cheung MC, Albers JJ. Distribution of high density lipoprotein particles with different apoprotein composition: particles with A-I and A-II and particles with A-I but no A-II. *J Lipid Res*. 1982;23:747–753.
- Davidson WS, Silva RA, Chantepie S, Lagor WR, Chapman MJ, Kontush A. Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals particle-specific protein clusters: relevance to antioxidant function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:870–876.

