

**Departament de medicina, línia de Neurologia, Universitat Autònoma de
Barcelona**

**Estudis funcionals de la disferlina i
aproximacions terapèutiques en un model
murí de miopatia per dèficit de disferlina**

**Tesi doctoral presentada per Bàrbara Flix Ordóñez per tal d'optar al títol de Doctora en
Medicina per la Universitat Autònoma de Barcelona**

**Director:
Eduard Gallardo Vigo**

**Doctorand:
Bàrbara Flix Ordóñez**

**Tutora:
Isabel Illa Sendra**

Barcelona, 2013

Als meus pares

Agraïments

M'agradaria començar agraint-li al meu director de tesi, l'Eduard, per tot el que m'ha ensenyat i per haver-me confiat els seus projectes. També voldria agrair-li tant a ell com a la meva tutora, l'Isabel, que m'hagin donat la oportunitat de fer aquesta tesi amb ells.

A la Noemí i la Gisela, per totes les coses que m'ha ensenyat. Sobretot per ensenyar-me tot allò sobre la ciència que no es pot llegir a un article. Per ensenyar-me una actitud davant de la feina, de la ciència i de la vida. Per ser tant optimistes, i contagiar-me. Perquè jo de post-doc vull ser com elles! Gràcies per donar-me un model a seguir.

A tots els companys del laboratori i de la clínica, als que hi són i als que ja no. La Fina, l'Esther, el Luis, l'Eugenia, el Ricard, l'Aida, el Jordi, la Marina, la Mireia, la Sonia, la Karolina, el Joan, l'Elias, l'Alba i l'Anna... per l'ajuda, el que m'han ensenyat i per amenitzar el meu dia a dia. Però sobretot al Xavi i al Miquel, per ser com germans, per compartir-ho tot amb mi, ajudar-me sempre en tot i perquè hem crescut junts. No m'imagino una tesi sense tots vosaltres!

A la Carolina de la Torre, per ensenyar-me aquesta estranya tècnica anomenada blue native, inclús en dissabte.

Al Dr. Xavier Navarro, el Renzo Mancuso i la Eva Santos del campus Bellaterra per la seva col·laboració en els estudis funcionals en ratolins. Al Dr. Barquinero del Vall d'Hebrón, per fer possible el trasplantament de moll d'os.

A l'Antoine de Morrée, per la informació i les eines compartides i per les nostres col·laboracions.

A la Carme, per tota l'ajuda tècnica, que no ha estat poca. Pel seu interès, per la seva motivació, perquè els estudis de confocal ja no són el que eren des de que va marxar. I per haver-se convertit en una gran amiga.

A les meves nenes de Sant Pau, especialment la Sonia i la Raquel, per regalar-me tants dimecres i copetes als vespres.

Al Dr. Alberto Lleó, pels consells sobre FLIM, per la seva disposició a trobar 20 minuts per reunir-se amb mi, tot i ser un home tan ocupat i amb tantes responsabilitats.

Als nens i nenes del laboratori d'Alzheimer, sobretot a la Marta, que tant m'ha ajudat en tot, a ser millor persona i a tenir les coses més clares, i a més, m'ha donat una nova il·lusió i no m'ha deixat caure en el bucle anticientífic post-doctoral.

A la Bet, el Carlitos i la Sílvia d'immuno, per la germanor del pavelló 17.

Al Josep Julve, per ser sempre tant amable i ajudar-me en tot allò que ha pogut. Al David, per portar-se sempre les dues espatlles i ensenyar-me els seus curiosos mètodes amb els ratolins.

A l'Antònia, la Marta Rosal i l'Alex Rojo, per tota l'ajuda amb els temes de ratolins.

A l'Ignasi Gich pel suport en temes d'estadística, i a la Carolyn pel suport en l'anglès, per tot el que m'ha ensenyat i per la seva implicació.

Al Lucas, que tantes vegades m'ha ajudat en els meus desastres informàtics, però sobretot per aquella vegada que va salvar aquesta tesi recuperant 21 Gb d'informació del meu ordinador espatllat.

A les Biogirls, la Bea, la Montse, la Marta, la Nuri, l'Ali, la Fani, la Maria i el Lluís, per les distraccions i per estar sempre allà, i sobretot a la Rebeca i a la Blanca, perquè tenir-les a Sant Pau i viure juntes el procés de la tesi ha estat un plaer.

Al Miguel i al Ruben, per totes les estones d'esbarjo que m'han donat, per ser bons amics i casi família.

A l'Anna i al Xavi, per saber que és la disferlina tot i no ser de ciències.

I per últim, a tots els pacients que han fet possible aquest treball.

Bé, espero no oblidar-me a ningú, si ho he fet demano disculpes, són tants els que m'han ajudat professional i personalment durant aquests 4 anys, que no m'estranyaria que se m'escapes algú.

A tots, GRÀCIES!

Abreviatures

Abreviatura	Definició
2'OMePS	2'O-metilfosforotioat modificat
A1	Annexina A1/annexin A1
AAV	Adenovirus associat/ associated-adenovirus
ADP	Adenosina di-fosfat /adenosin-di-phosphate
AME	Atròfia muscular espinal
AMP	Adenosina mono-fosfat /adenosin-mono-phosphate
AOs	Oligonucleòtids antisentit/antisense oligonucleotides
ATP	Adenosina tri-fosfat /adenosin-tri-phosphate
b-FGF	Factor basic de creixement de fibroblasts/basic fibroblast growth factor
BM	Moll d'os /Bone marrow
BMD	Becker muscular dystrophy/ distròfia muscular de Becker
BMT	Trasplantament de moll d'os/ bone marrow transplantation
bmSP	Síde population derivada de moll d'os/ bone marrow side population
BN/ BN-PAGE	Electroforesis en gel de poliàcrilamida en condicions natives/Blue Native Poliacrilamide gel electrophoresis
CALQ1	Calseqüestrina-1/calsequestrin-1
CD14	Grup de diferenciació 14/Cluster of differentiation 14
CD206	Grup de diferenciació 206/Cluster of differentiation 206
CD56	Grup de diferenciació 56/Cluster of differentiation 56
cDNA	Àcid desoxirribonucleic complementari
CK	Creatina quinasa/creatin kinase
CMAP	Compost dels potencials d'acció muscular/ compound of muscular action potentials
CTX	Cardiotoxina
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAT	Miopatia distal amb inici en el compartiment anterior/ distal anterior compartment myopathy
DGC	Complex distrofina-glicans/dystrophin-
DHPR	Receptor de dihidropiridina/ dihydroxipiridin receptor
DMD	Distrofia muscular de Duchenne/Duchenne muscular dystrophy
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DNA	Àcid desoxirribonucleic /desoxirribonucleic acid
Dyn	Dineina citoplasmàtica/cytoplasmic dynein
Dysf	Disferlina/dysferlin
EAE	Encefalitis autoimmunitària experimental
EGF	Factor de creixement epitelial/Epithelial growth factor
EMG	Electromiografia
ER	Reticle endoplasmàtic/endoplasmic reticulum
FBS	Serum fetal boví/fetal bovine serum
FLIM/FRET	Fluorescence-lifetime imaging microscopy- Förster (Fluorescence) resonance energy transfer
FSHD	Distrofia fascio-scapulo-humeral/fascio-scapulo-humeral dystrophy
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GFP	Proteïna verd fluorescent/green fluorescence protein
GM-CSF	Factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags/ Granulocyte macrophage-colony-stimulating factor
Gy	Gray (unitat de mesura de radiació)
H&E	Hematoxilina&Eosina
H ₂ O ₂	Peroxid d'hidrogen

hASC	Cèl·lules estromals humanes derivades de teixit adipós/human adiposite stromal cells
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Deasetilasa d'histones/histone deacetylase
HGF	Factor de creixement hepàtic /hepatocyte growth factor
HRP	Peroxidasa de rabe/ horse radish peroxidase
HUCB	Cèl·lules de cordó umbilical humanes/ human umbilical cord blood
ICQ	Immunocitoquímica
IHQ	Immunohistoquímica
ILK	Quinasa d'unió a integrina /integrin linking kinase
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP	Immunoprecipitació
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRDye	Marcatge infraroig /infrared Dye
LB	Brou de Luria/ luria's broth
LGMD	Distrofia muscular de cintures/ limb-girdle muscular dystrophy
MABs	Mesangioblastes
MO	Macròfags
MRFs	Factors reguladors de la miogènesi/ myogenic regulation factors
mRNA	Acid ribonucleic missatger/messenger ribonucleic acid
mSP	Side population derivada de múscul/ muscle side population
MUAPs	Unitats dels potencials d'acció motora/ motor unit action potentials
MYOM2	Miomesina-2/myomesin-2
nNOS	Sintasa de l'oxid nítric neuronal/neuronal nitric oxide sintase
pb	Parells de bases
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa/ polymerase chain reaction
PDGF	Factor de creixement derivat de plaquetes/ platelet derived growth factor
PMA	Acetat de forbol miristat/ phorbol miristate acetate
PMO	Morfolinos oligomers fosfodiàmidat /phosphodiámidate morpholino oligomers
PTRF	Polymerase I and transcript release factor
rAAV	Adenovirus associat recombinant/recombinant associated-adenovirus
RNA	Acid ribonucleic/ribonucleic acid
ROI	Regió d'interès /region of interest
RT-PCR	Retro-transcripció per reacció en cadena de la polimerasa/retrotranscription-polymerase chain reaction
RyR	Receptor de rianodina/ ryanodin receptor
SCID	Immunodeficiència combinada severa/ Severe combined immunodeficiency
SDS	Dodecilsulfat sodic
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliàcrilamida-dodecilsulfat sodic
SERCA	ATPasa del calci del reticle sarcoplàsmic-endoplàsmic/ sarcoplasmic-endoplasmic calcium ATPase
siRNA	Silenciament d'acid ribonucleic/silencing ribonucleic acid
SOC	Brou superòptim amb repressió de catabolits/Super Optimal broth with Catabolite repression
SP	Side population
SR	Reticle sarcoplàsmic/ sarcoplasmic reticulum
TA	Tibial anterior
TMO	Trasplantament de moll d'os
TNF	Factor de necrosi tumoral /tumoral necrosis factor
Trim72/MG53	Tripartite containing motif 72/ mitsugumin 53
TSP1	Trombospondina-1
UI	Unitats d'activitat biològica
WB	Western blot

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ	9
1. EL MÚSCUL	11
1.1 ESTRUCTURA DEL MÚSCUL ESQUELÈTIC	11
1.2 DIFERENCIACIÓ I FORMACIÓ MUSCULAR	13
1.3 LES CÈL·LULES SATÈL·LIT	14
1.4 COMPLEXES PROTEICS AL MÚSCUL ESQUELÈTIC	15
2. LES DISTRÒFIES MUSCULARS	19
2.1 LES DISTRÒFIES MUSCULARS DE CINTURES	20
2.2 LES MIOPATIES DISTALS	21
3. LES MIOPATIES PER DÈFICIT DE DISFERLINA	23
4. EL GEN DYSF	24
5. LA PROTEÏNA DISFERLINA	25
5.1 FUNCIONS DE LA DISFERLINA	26
5.2 INTERACCIONS DE LA DISFERLINA	28
6. MODELS PER L'ESTUDI DE LES DISFERLINOPATIES	34
6.1 MODELS CEL·LULARS	34
6.2 MODELS ANIMALS	34
7. TERÀPIES	35
7.1 TERÀPIES EN DISTRÒFIES MUSCULARS	35
7.2 TERÀPIES EN DISFERLINOPATIES	40
HIPÒTESIS I OBJECTIUS	47
MATERIAL I MÈTODES	51
1. MOSTRES	53
1.1 CULTIU CEL·LULAR	53
1.2 MODELS ANIMALS	54
1.3 BIÒPSIES	55
2. PROCEDIMENTS IN VITRO	55
2.1 TRANSFECCIÓ CEL·LULAR	55
2.2 LESIÓ DE MIOTUBS EN CULTIU	55
2.3 CO-CULTIU DE MIOTUBS I HL60 MARCADA I ANÀLISI DE L'ÍNDEX DE FUSIÓ	55
3. PROCEDIMENTS IN VIVO	56
3.1 TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS	56
3.2 LESIÓ AMB CARDIOTOXINA	56
3.3 TESTS FUNCIONALS	57
3.4 EUTANÀSIA DELS ANIMALS I EXTRACCIÓ DE MOSTRES	58
4. TRACTAMENT DE MOSTRES	58
4.1 TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE DNA	58
4.2 TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE RNA	59
4.3 TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE PROTEÏNES	60
4.4 TÈCNIQUES DE MANIPULACIÓ DE TEIXITS	61
4.5 TÈCNIQUES PER L'ESTUDI DE PROTEÏNES	61
5. MICROSCOPIA	68
5.1 MICROSCOPI DE FLUORESCÈNCIA	68
5.2 MICROSCOPI INVERTIT DE FLUORESCÈNCIA PER LA VISUALITZACIÓ DE CULTIUS CEL·LULARS	68

5.3 MICROSCOPIA CONFOCAL	68
6. ESTADÍSTICA	70
RESULTATS	71
1. ASSAIGS FUNCIONALS PER L'ESTUDI DE MINIDISFERLINES COM A POSSIBLE TERÀPIA GÈNICA	73
1.1 IDENTIFICACIÓ DEL MARCADOR LISOSOMAL LAMP-1 COM A MARCADOR DE REPARACIÓ DE MEMBRANA PLASMÀTICA EN MÚSCUL ESQUELÈTIC	73
1.2 ESTUDI DE LA LOCALITZACIÓ DE LAMP-1 COM A TEST FUNCIONAL DE EL PROCÉS DE REPARACIÓ DE MEMBRANA	74
1.3 ASSAIG DE REPARACIÓ AMB IODUR DE PROPIDI	75
2. ESTUDI DE LA MOTILITAT DE MONÒCITS DE PACIENTS AMB DÈFICIT DE DISFERLINA	76
3. ESTUDI DEL COMPLEX DE LA DISFERLINA	79
3.1 BLUE NATIVE	79
3.2 IMMUNOPRECIPITACIONS	80
3.3 ANÀLISI COMBINAT IP/BN	82
3.4 CARACTERITZACIÓ DE LES INTERACCIONS DIRECTES	86
3.5 ANÀLISIS IPA	90
3.6 CARACTERITZACIÓ DE L'EXPRESSIÓ DE LES PROTEÏNES DEL COMPLEX DE LA DISFERLINA EN PACIENTS AMB DISFERLINOPATIA	92
4. LA LÍNIA CEL·LULAR HL60 ÉS CAPAÇ DE FUSIONAR AMB MIOTUBS IN VITRO	97
5. ESTUDI DE LA CAPACITAT TERAPÈUTICA DEL TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS EN UN MODEL MURÍ DE DISFERLINOPATIA	98
5.1 IDENTIFICACIÓ D'UNA SOCA DE RATOLINS A/J SENSE MUTACIONS AL GEN DE LA DISFERLINA	98
5.2 TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS	99
DISCUSSIÓ DELS RESULTATS	115
CONCLUSIONS	129
BIBLIOGRAFIA	133
ANNEX 1	151
ANNEX 2	199

INTRODUCCIÓ

1. El múscul

La paraula múscul deriva de la paraula llatina *musculus*, formada per la paraula *mus* (ratolí), del grec, i *culus* (diminutiu). Això és degut a que els antics romans comparaven la contracció del múscul del braç al fer una flexió amb un petit ratolí. Poc a poc, es va usar la paraula per designar tots els músculs del cos.

Al cos humà, tenim més de 650 músculs diferents. Aquests, es poden dividir en tres tipus principals: el múscul esquelètic, estriat i de contracció voluntària, el múscul cardíac, estriat i de contracció involuntària, i el múscul llís, no estriat i de contracció involuntària. Aquests tipus musculars es diferencien en quan a funció, estructura i desenvolupament, però tots ells generen forces de contracció mitjançant sistemes organitzats d'actina i miosina.

1.1 Estructura del múscul esquelètic

El múscul esquelètic està format per cèl·lules altament diferenciades anomenades fibres musculars. Cada fibra muscular està envoltada per una estructura de teixit connectiu anomenada endomisi. Diverses fibres musculars s'agrupen formant el que anomenem fascicle, i cada fascicle està envoltat pel perimisi. Diversos fascicles s'agrupen en una malla de teixit connectiu que es coneix amb el nom d'epimisi, i que és equivalent al que denominem múscul. Les fibres musculars estan altament vascularitzades, ja que requereixen d'un alt aport de nutrients durant la contracció. A més, estan innervades per un axó de motoneurona, que contacta amb les fibres en una regió a la que anomenem placa motora. En aquesta regió és on es produeix l'alliberació d'acetilcolina per part de la motoneurona, senyal que activarà la contracció muscular.

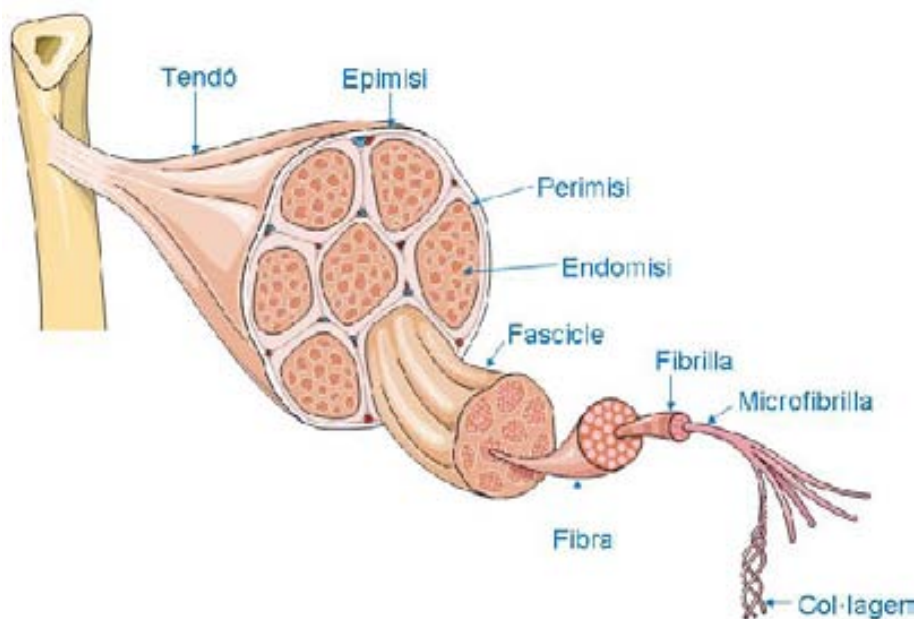


Figura 1. Estructura del múscul esquelètic.

Les fibres musculars esquelètiques poden ser de dos tipus: les fibres tipus 1, o fibres de contracció lenta, i les fibres de tipus 2, o de contracció ràpida. Aquests dos tipus de fibres es diferencien en la composició proteica i en el seu metabolisme.

Totes les fibres musculars, són cèl·lules multinucleades, formades majoritàriament per tres components: miofibretes, membranes i citoesquelet.

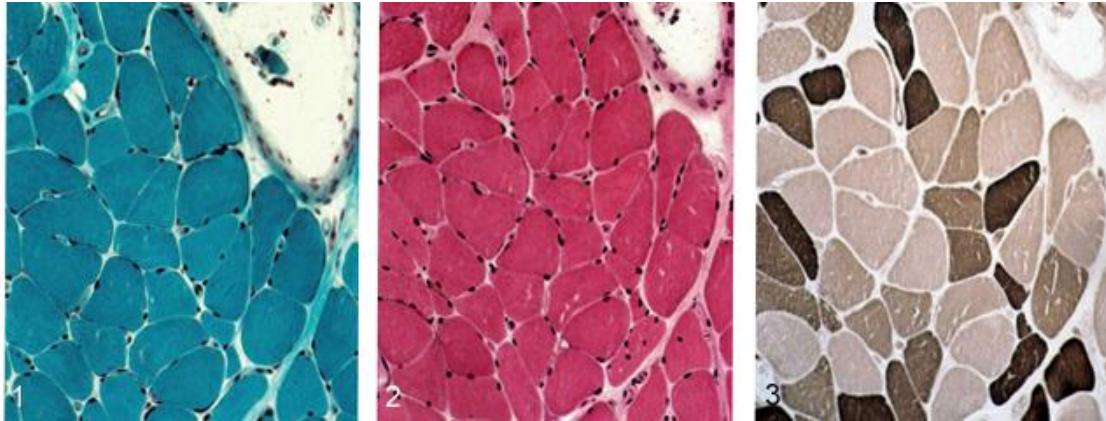


Figura 2. Tincions histoquímiques de talls criopreservats de múscul esquelètic: 1) tricròmic modificat de Gomori; 2) Eosina & Hematoxilina (H&E); 3) ATPasa a pH 9,4.

Les **miofibretes** són estructures compostes de filaments d'actina i miosina que confereixen al múscul les propietats de contracció i elasticitat. Aquests miofilaments es divideixen en compartiments anomenats sarcòmers. Els sarcòmers estan estructurats en bandes I (isotròpiques) o bandes clares, compostes de miofilaments primers d'actina, alternades amb bandes A (anisotròpiques) o bandes fosques, compostes per miofilaments gruixuts de miosina. Les bandes I, a més d'actina, contenen altres proteïnes com ara la tropomiosina i la troponina, proteïnes que intervenen en la regulació de les contraccions musculars. També presenten llocs d'unió a miosina. Cada filament de miosina té unes petites projeccions denominades ponts, les quals interaccionen amb els filaments d'actina, produint la contracció muscular. Aquestes bandes A s'interdigitalitzen amb els extrems lliures de les bandes I.

Els sarcòmers estan delimitats pels discs Z, que són eixos transversals que uneixen els miofilaments d'actina. Al mig de la banda A hi trobem la zona H, on només hi ha filaments de miosina. Al mig de la zona H hi trobem la línia M, composta per elements connectors del citoesquelet.

A més de l'actina i la miosina, als sarcòmers hi trobem altres proteïnes a les que anomenem proteïnes accessòries, que són les següents: α -actinina, β -actinina, tropomiosina, troponina, proteïna C, y la proteïna de la línia M.

Un altre component principal de les fibres musculars són els diferents sistemes de membranes, com ara els túbuls transversals (túbuls T) i el reticle sarcoplàsmic (SR). Aquests dos sistemes són independents, però ambdós controlen el flux de calci dins la fibra muscular essent els responsables d'iniciar i finalitzar la contracció muscular. Es troben propers a les bandes de les miofibretes. Aquestes estructures s'expliquen en detall més endavant.

Per últim, el citoesquelet és un component essencial en les cèl·lules musculars. La seva funció és establir i mantenir la forma, determinar el moviment, el transport citoplasmàtic i la morfogènesi. Està format per filaments intermedis, microtúbuls i filaments d'actina.

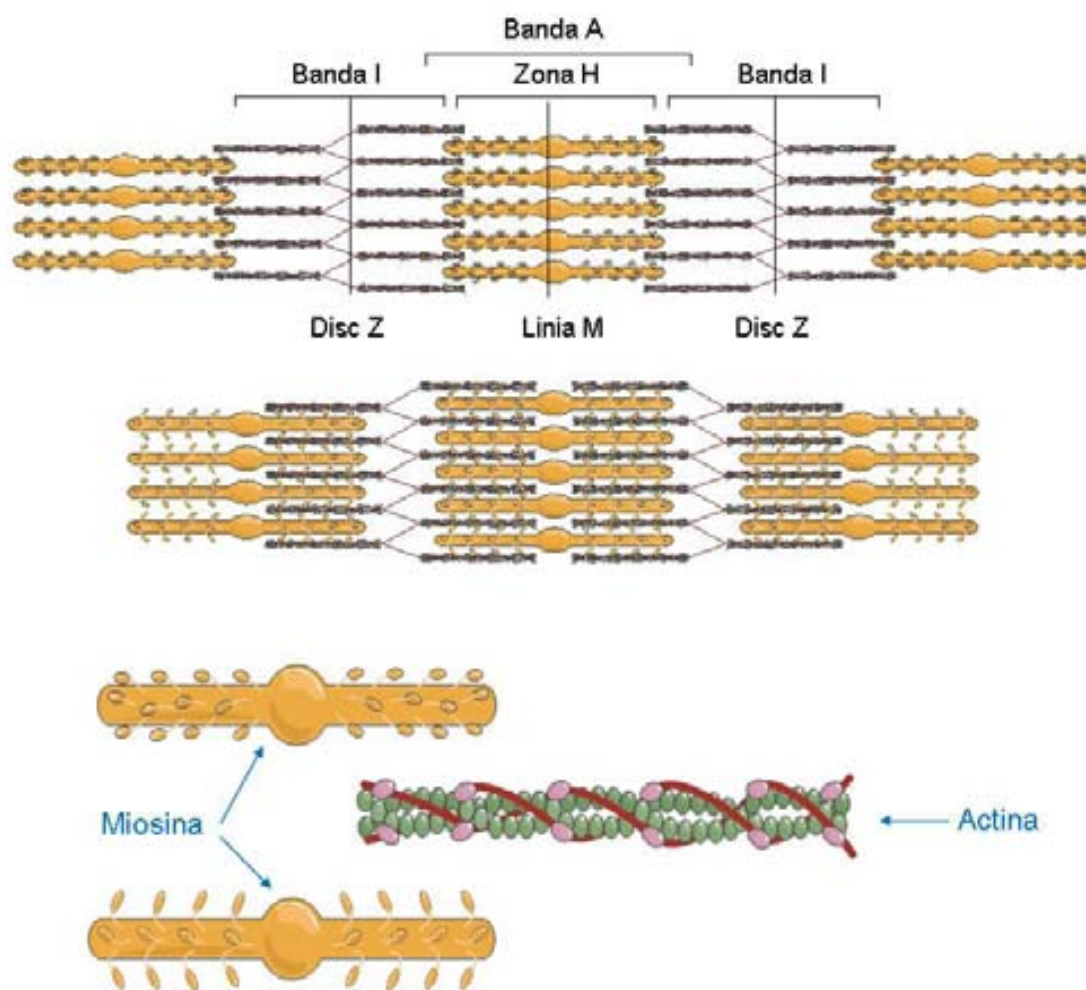


Figura 3. Estructura de les miofibretes.

1.2 Diferenciació i formació muscular

Els mioblasts són les cèl·lules progenitores musculars. Les fibres musculars es formen per la fusió de diversos mioblastes entre si, formant miotubs. Els miotubs són cèl·lules multinucleades, que presenten els nuclis centrals i on les miofibretes es disposen perifèricament. En la fase final de

diferenciació, es produeix una reorganització de les miofibretes, dels túbuls T i del reticle endoplasmàtic (ER), i els nuclis es situen perifèricament a les fibres.

En el procés de diferenciació cel·lular de mioblast a miotub, estan implicats diversos factors de transcripció anomenats factors reguladors de la miogènesi (MRFs). Aquests MRFs són de la superfamília bHLH. Tots contenen un domini d'unió a DNA conservat i un domini bHLH necessari per l'heterodimerització. La família dels MRFs, en vertebrats, està formada per MyoD, Myf-5, miogenina i MRF-4, els quals comparteixen una alta homologia en la seqüència aminoacídica. S'anomenen MRFs primaris els factors de transcripció MyoD i Myf-5, ja que són essencials per la determinació de les cèl·lules somàtiques proliferatives cap a la línia miogènica [1,2,3] i per a la proliferació dels mioblastes [4]. A més, estan implicats en la regulació del cicle cel·lular i en la remodelació de la cromatina [5]. En canvi, l'activació del programa de diferenciació depèn de l'expressió dels MRFs secundaris, és a dir de miogenina i MRF-4, i de la disminució dels MRFs primaris [6,7].

1.3 Les cèl·lules satèl·lit

El múscul esquelètic adult és un teixit molt estable però degut a la seva funció, és un teixit que es lesiona amb freqüència. Tot i així, el múscul esquelètic té capacitat d'autoreparar-se. Una part d'aquesta reparació la duen a terme tots els sistemes cel·lulars de reparació de membranes, però la major part d'aquesta reparació és deguda a les cèl·lules satèl·lit, un grup de cèl·lules progenitores miogèniques que es troben en estat quiescent al teixit muscular [8]. L'origen d'aquestes cèl·lules no es coneix bé, però hi ha evidències que indiquen que podrien derivar de l'aorta dorsal [9].

Aquestes cèl·lules es localitzen entre la lamina basal i la membrana plasmàtica de les fibres [8]. Es troben en estat quiescent, fins que es produeix una lesió a la fibra muscular. Aquesta lesió provoca l'alliberament per part de les fibres musculars danyades de diversos factors mitogènics pels precursors musculars, com ara el factor bàsic de creixement de fibroblasts (b-FGF), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), la transferrina i el factor de creixement hepàtic (HGF) [10]. A més, els macròfags que envaeixen l'àrea on s'ha produït el dany també produeixen factors mitogènics pels precursors musculars [11]. Tots aquests factors provoquen l'activació de les cèl·lules satèl·lit, fent-les proliferar i fusionar amb la fibra danyada per tal de donar continuïtat a la membrana cel·lular d'aquesta. Aquest procés pel qual les cèl·lules satèl·lits proliferen s'anomena divisió asimètrica, ja que una de les cèl·lules filles resultants de la divisió segueix proliferant o es fusiona amb la fibra danyada, i l'altre cèl·lula filla resta quiescent per tal de mantenir la població de cèl·lules satèl·lits [12].

1.4 Complexes proteics al múscul esquelètic

Sarcolemma

Sarcolemma és el nom específic que rep la membrana cel·lular de les fibres musculars. Aquesta membrana està altament especialitzada, presentant unes característiques diferents a la majoria de membranes, ja que degut a la capacitat de contracció del múscul, requereix una estabilitat molt superior a la de la resta de tipus cel·lulars.

Un complex proteic molt important pel manteniment de l'estabilitat del sarcolemma és el complex distrofina-glicans (DGC), la funció del qual és ancorar el citoesquelet d'actina amb la matriu extracel·lular. Aquest complex està format per diferents proteïnes: distrofina, distroglicans, sarcoglicans, distrobrevines, sintrofines i sarcospan.

La distrofina és una proteïna molt gran, amb un domini N-terminal d'unió a la γ -actina del citoesquelet, un domini C-terminal d'unió al β -distroglicà i un domini central anomenat rod format de 24 repeticions espectrina-like, on es troba el segon lloc d'unió a la γ -actina [13]. El β -distroglicà és una proteïna transmembrana, que mitjançant el seu domini N-terminal interacciona amb el α -distroglicà, que a la vegada, s'uneix a la cadena α de la laminina-2 de la matriu extracel·lular, formant així un pont estructural entre el citoesquelet d'actina i la matriu extracel·lular [14]. Aquest pont és essencial per a la integritat de la membrana cel·lular durant el procés de contracció muscular. La distrofina també interacciona amb les sintrofines, tot i que aquestes no són membres integrals del DGC [15]. Les sintrofines són una família de proteïnes adaptadores modulares, que a part d'interaccionar amb la distrofina, interaccionen amb la sintasa d'òxid nítric neuronal específica de múscul (nNOS) [16]. L'òxid nítric és una molècula senyalitzadora molt important en el múscul esquelètic. Regula la producció de força muscular, l'autoregulació del flux sanguini, la diferenciació dels miòcits, la respiració cel·lular i l'homeòstasi de la glucosa [17]. A més, la nNOS presenta llocs d'unió a caveolina-3 (Cav-3), proteïna que per altre banda interacciona amb altres proteïnes implicades en la senyalització del múscul esquelètic [18,19].

La caveolina-3 és una proteïna de membrana específica de múscul, que co-localitza amb la distrofina. De fet, interacciona amb el DGC via el β -distroglicà [20]. La caveolina-3 pot oligomeritzar per formar caveoles, que són petites invaginacions a la membrana que participen en la captació de soluts i l'organització de membranes. A més, la caveolina-3 interacciona amb la disferlina, una proteïna relacionada amb la reparació del sarcolemma després de una lesió, relacionant així la caveolina-3 amb aquesta funció [21].

Les distrobrevines són una altra família de proteïnes relacionades amb la senyalització del DGC [22]. Interaccionen amb la distrofina gràcies a que ambdues proteïnes presenten un domini "coiled coil" [23].

Al nucli del DGC hi trobem els sarcoglicans (α , β , γ i δ) i el sarcospan, els quals es creu que estan implicats en l'estabilització del complex al sarcolemma [24].

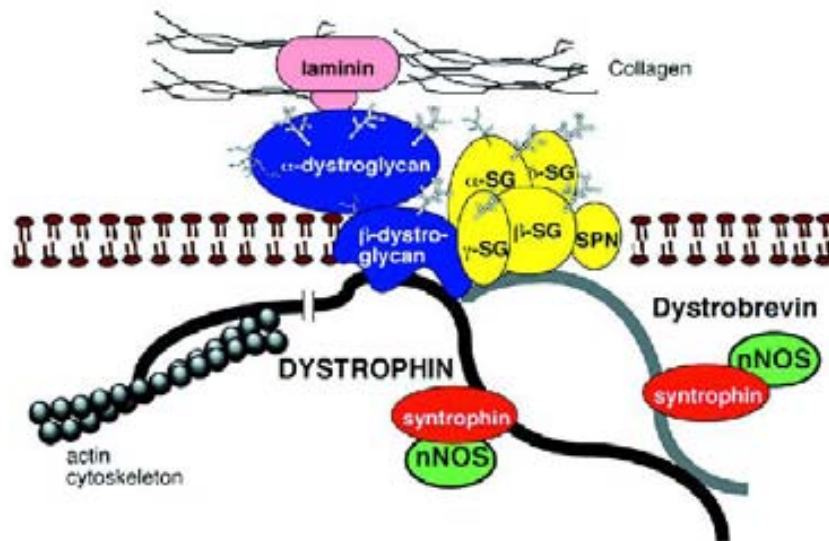


Figura 4. Estructura del complex distrofina-glicans (DGC). Extret de “Chamberlain, JS et al Hum. Mol. Genet. 2002”[24].

Sistema de Transport vesicular

El transport vesicular és una de les activitats majoritàries de les cèl·lules. És la manera que aquestes tenen de localitzar les diferents molècules i proteïnes en el compartiment cel·lular adequat. Bàsicament trobem dos tipus de transport vesicular, el transport anterògrad, en direcció a l'exterior de la cèl·lula, com ara tots els processos d'exocitosi, i el transport retrògrad, de fora cap a dins de la cèl·lula, com ara l'endocitosi. Tot i així, el transport es pot donar entre els diferents compartiments cel·lulars, sense començar o arribar a la membrana plasmàtica. Per tant, la especificitat del transport és clau per mantenir la correcta organització funcional de la cèl·lula. Aquesta especificitat està regulada per un conjunt de proteïnes de coberta. Les vesícules poden estar recobertes de proteïnes, com per exemple la clatrina, que, no només marquen el seu origen i diana, sinó que col·laboren en la seva formació.

La via endocítica té com a funció internalitzar macromolècules de l'exterior cel·lular. El primer pas és la formació de la vesícula a partir de la membrana plasmàtica, formant així els endosomes temprans. Aquests maduraran convertint-se en endosomes tardans, que fusionaran amb l'aparell de Golgi o amb els lisosomes, depenent de la seva càrrega. També es considera transport retrògrad el pas de membranes des de l'aparell de Golgi al reticle endoplasmàtic.

A la via anterògrada trobem les vesícules que van des de el reticle endoplasmàtic a Golgi. Des de l'aparell de Golgi surten vesícules que poden formar vesícules secretores, que fusionaran amb la membrana plasmàtica alliberant el seu contingut a l'exterior.

Totes les vesícules tenen marcadors de superfície que identifiquen el seu origen i la seva càrrega, així com les membranes receptores tenen receptors complementaris per tal reconèixer les vesícules adequades. Les proteïnes de la família SNARE són les responsables d'aquest reconeixement i catalitzen la fusió de membranes.

El transport vesicular dins les cèl·lules és un procés dependent d'ATP, ja que requereix d'un transport actiu per part de les proteïnes motores. Totes les proteïnes motores que transporten compartiments cel·lulars al llarg dels filaments d'actina són de la superfamília de les miosines. Les proteïnes motores implicades en el transport a través del microtúbuls són de la superfamília de les kinesines o de la superfamília de les dineïnes. En general les kinesines realitzen el transport anterògrad i les dineïnes el retrògrad. Aquestes proteïnes motores tenen un cap o domini motor. Aquest pot unir-se a diferents cues, que reconeixen diferents càrregues de manera específica permetent que cada membre de la família realitzi funcions diferents [25].

Regulació del calci i contracció muscular

El calci és una molècula de senyalització molt important en molts teixits, però especialment al múscul esquelètic. És el responsable de la contracció muscular així com de moltes cascades de senyalització.

En estat de repòs, la concentració de calci a les miofibres és de 50nM aproximadament. El cicle del calci comença quan es despolaritzen la membrana plasmàtica i els túbuls T. Els túbuls T són invaginacions del sarcolemma [26,27] on hi trobem el receptor de dihidropiridina (DHPR). La conversió d'una senyal elèctrica a una senyal química a la membrana dels túbuls T és activada a través d'un canvi estructural al DHPR càrrega-dependent que provocarà l'entrada de calci al citosol [28]. Aquesta entrada de calci activa el receptor de rianodina (RyR), que es troba a la membrana del reticle sarcoplàsmic (SR). El RyR eleva el calci citosòlic a una concentració 100 vegades superior als nivells basals.

Aquest calci citosòlic s'uneix a una de les subunitats de la troponina als miofilaments primis. La troponina està unida a la tropomiosina, i aquesta, a l'actina, bloquejant així els llocs d'unió de la miosina. Al unir-se el calci a la troponina, aquesta canvia de conformació, desplaçant la tropomiosina del seu lloc d'unió a l'actina, alliberant els llocs d'unió d'aquesta amb la miosina. D'aquesta manera, la miosina, que és una proteïna motora, comença a desplaçar-se al llarg dels filaments d'actina, activant així la contracció.

El procés de relaxació muscular és dut a terme per part del reticle sarcoplàsmic (SR). El SR és una forma de reticle endoplàsmic (ER) llis que es troba al múscul esquelètic i al múscul llis. La diferència bàsica entre el SR i el ER radica en les proteïnes que contenen i en que, mentre el ER sintetitza proteïnes, el SR bombeja i emmagatzema calci. El SR és el màxim responsable de l'acoblament de

l'excitació-contracció. Un cop produïda la contracció muscular, entren en joc dues de les proteïnes més importants pel correcte funcionament del SR, que són la ATPasa de calci del reticle sarco/endoplàsmic (SERCA) i la calsequestrina. La SERCA és una proteïna que bombeja calci del citosol cap la llum del SR per tal de restablir els nivells de calci citosòlic. Per facilitar la funció ATP dependent de les proteïnes SERCA, dins el SR hi trobem la calsequestrina, una proteïna que uneix diversos ions calci per tal de disminuir la concentració d'aquests al lumen del SR facilitant així la funció de les ATPases [29].

A part de controlar la contracció mitjançant la unió a tropomiosina, el calci també afecta l'aparell de contracció unint-se a la miosina dels miofilaments gruixuts i a altres proteïnes motores.

A més, la concentració de calci també controla l'estat energètic del múscul esquelètic regulant el reservori d'ATP [30].

Entre les múltiples funcions del calci, podem subratllar la seva funció en la regulació de diversos factors de transcripció, regulant així l'expressió de proteïnes implicades en el seu cicle [31].

Per una altre banda, al múscul esquelètic s'expressen un gran nombre de proteïnes d'unió a calci, com ara la Calmodulina, la família de proteïnes S100, les calpaïnes, calcineurina, sorcina i les annexines. Aquest conjunt de proteïnes no estan directament implicades en els processos de contracció i relaxació però són importants per el correcte funcionament del múscul.

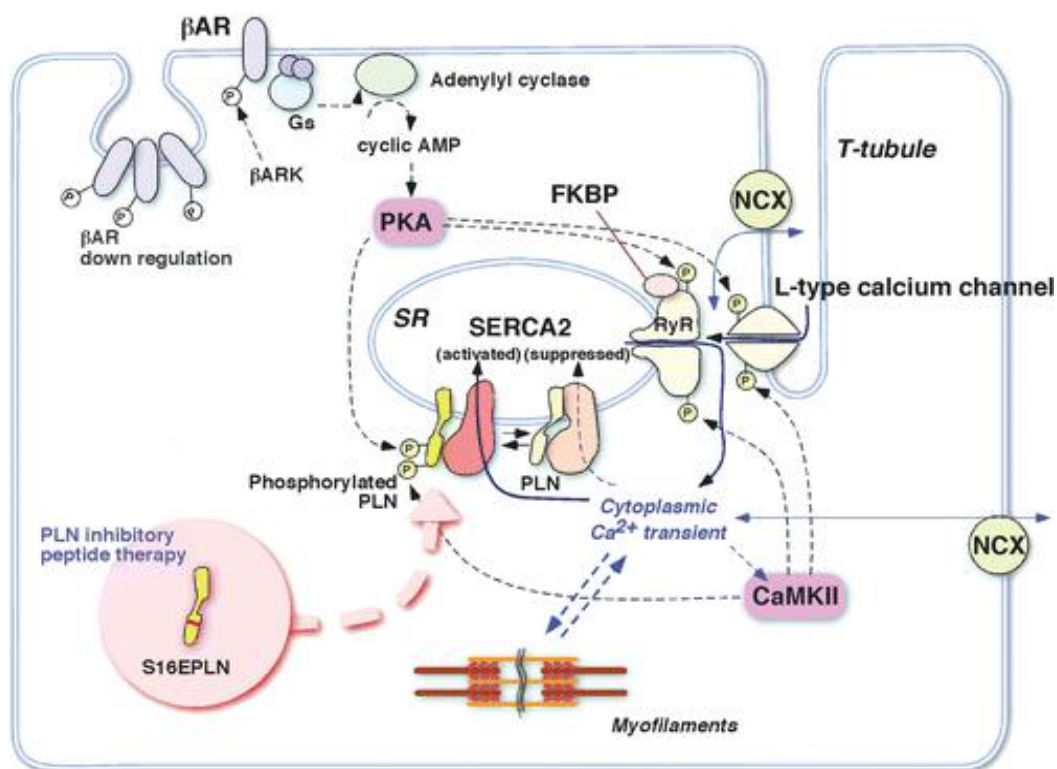


Figura 5. Homeòstasi del calci al múscul esquelètic. Extret de "Kaye, DM et al Annual rev med 2008"[32].

Metabolisme

Degut a la seva especialització funcional, el múscul esquelètic ha adaptat el seu metabolisme. El múscul té una gran reserva d'ATP en forma de fosfocreatina. L'energia d'aquesta molècula pot ser alliberada gràcies a la funció de la creatina quinasa, permetent així l'obtenció ràpida d'energia pels primers segons de la contracció muscular [33].

Una altra reacció que permet l'obtenció ràpida d'energia és la realitzada per l'enzim mioadenilat quinasa, que produeix ATP i AMP a partir de dues molècules de ADP.

A més, el fet de que el múscul presenti les seves pròpies reserves de glicogen, permet el manteniment de la contracció muscular en els seus primers minuts. Passat aquest temps, la captació de la glucosa en sang és indispensable pel metabolisme muscular.

La via metabòlica utilitzada per l'obtenció d'energia depèn del tipus d'exercici que s'està realitzant. En les fases de repòs, el múscul usa majoritàriament àcids grassos [34]. En el cas de realitzar un exercici extremadament intens, l'energia s'obté exclusivament de la glucòlisi anaeròbica del glicogen muscular. Si l'exercici és d'intensitat submàxima, l'energia s'obté de la glucòlisi aeròbica donant lloc a la producció de piruvat, que és el principal substrat del cicle de Krebs. En un exercici submàxim d'intensitat moderada, el múscul, a més de la glucòlisi aeròbica utilitza glucosa sanguínia, però si l'exercici es manté durant un temps perllongat i les reserves s'esgoten, el metabolisme pot canviar i es comencen a oxidar les reserves d'àcids grassos.

2. Les distròfies musculars

Les distròfies musculars progressives són un conjunt de malalties clínica i genèticament molt heterogènies, causades per mutacions en gens codificants per proteïnes musculars. Aquestes mutacions poden provocar la no expressió o l'expressió molt reduïda de la proteïna així com l'expressió de formes mutades no funcionals o amb un efecte dominant negatiu. Aquestes malalties estan caracteritzades per la degeneració i pèrdua progressiva de múscul esquelètic. Els símptomes més freqüents són la debilitat muscular i els nivells elevats de creatina quinasa (CKs) en sang, enzim que s'allibera al degenerar el múscul esquelètic. Amb freqüència es dona una pèrdua de massa muscular, que en alguns casos pot ser difícil d'observar, ja que algunes distròfies musculars comporten l'acumulació de greixos i l'augment del teixit connectiu que provoquen que el múscul tingui una aparença normal o hipertròfica. Fins a finals dels 90, la classificació inicial de les distròfies musculars era bàsicament clínica. El criteri clínic segueix vigent i és de gran utilitat per establir diagnòstics diferencials. La distribució de la debilitat, edat d'aparició dels símptomes i l'afectació cardíaca són els principals trets clínics a tenir en compte, però també són molt importants les proves complementaries, com ara els nivells de CKs, l'estudi de la biòpsia muscular o els estudis d'imatge muscular (ressonància i tomografia). Tot i així, la definició final d'una

distròfia muscular en concret ve donada per la presència de mutacions en el gen que la causa. Gràcies al desenvolupament de la biologia molecular s'han pogut identificar més de 30 gens causants de distròfia muscular. També s'ha pogut observar com mutacions en un mateix gen poden causar diversos fenotips, fent que la classificació clínica es solapi.

Dins la classificació clínica de les distròfies musculars, ens centrarem en les distròfies musculars de cintures i les miopaties distals.

2.1 Les distròfies musculars de cintures

Les distròfies musculars de cintures (Limb-girdle muscular dystrophy, LGMD), s'inicien amb l'afectació dels músculs proximals de les extremitats, és a dir, a la musculatura pèlvica i/o a la cintura escapular. Es classifiquen segons si són de caràcter dominant, com a tipus 1, o de caràcter recessiu, com a tipus 2. Es denominen com a LGMD1 o LGMD2 seguit de una lletra, que ens indica el gen responsable en aquesta patologia en concret segons l'ordre de descobriment. S'han descrit vuit LGMD dominants (A-H) i 15 de recessives (A-Q). Els gens afectes són molt diversos. Poden ser des de gens codificants per proteïnes estructurals, implicades en la reparació i estabilitat de membrana, enzims o proteïnes de contracció muscular.

Malaltia	Gen	Locus
LGMD1A	<i>MYOT</i>	5q31.2
LGMD1B	<i>LMNA</i>	1q22
LGMD1C	<i>CAV3</i>	3p25.3
LGMD1D	<i>DES</i>	2q35
LGMD1E	<i>DNAJB6</i>	7q36.3
LGMD1F	desconegut	7q32.1-q32.2
LGMD1G	desconegut	4q21
LGMD1H	desconegut	3p25.1-p23

Taula 1. Classificació de les distròfies musculars de cintures de caràcter dominant.

Malaltia	Gen	Locus
LGMD2A	CAPN3	15q15.1
LGMD2B	DYSF	2p13.2
LGMD2C	SGCG	13q12.12
LGMD2D	SGCA	17q21.33
LGMD2E	SBCB	4q12
LGMD2F	SGCD	5q33.3
LGMD2G	TCAP	17q12
LGMD2H	TRIM32	9q33.1
LGMD2I	FKRP	19q13.32
LGMD2J	TTN	2q31.2
LGMD2K	POMT1	9q34.13
LGMD2L	ANO5	11p14.3
LGMD2M	FKTN	9q31.2
LGMD2N	POMT2	14q24.3
LGMD2O	POMGNT1	1p34.1
LGMD2Q	PLEC	8q24.3

Taula 2. Classificació de les distròfies musculars de cintures de caràcter recessiu.

2.2 Les miopaties distals

Les miopaties distals són miopaties caracteritzades per un patró de debilitat predominantment de mans i peus, ja que s'inicien amb l'afectació dels músculs distals de les extremitats. S'han descrit unes 20 miopaties distals, moltes de les quals segueixen avui en dia sense caracterització genètica. No tenen un sistema de classificació tant organitzat com les LGMD. Els gens afectes són molt diversos, i poden ser gens causants també d'una LGMD.

Malaltia	Gen	Locus	Herència
Miopatia de Miyoshi (MM)	DYSF	2p12-14	AR
Distròfia muscular del tibial (TMD)	TTN	2p31	AD
Miopatia de Nonaka	GNE	9p12-p12	AR
Miopatia hereditària per cossos d'inclusió	GNE	9p12-p12	AR
Miopatia de Laing	MYH7	14q11.2	AD
Miotilinopatia	MYOT	5q31	AD
Nebulinopatia	NEB	2q22	AR
Caveolinopatia amb fenotip distal	CAV3	3p25	AD
Zaspopatia	ZASP	10q22	AD
Miopatia per dèficit d'anoctamina 5	ANO5	11p14-12	AR
Miopatia per dèficit de KLHL9	KLHL9	9p22	AD
Miopatia distal relacionada amb la dinamina 2	DNM2	19.p13.2	AD
Miopatia de Welander	TIA1	2p13	AD
Filaminopatia	FLNC	7q32	AD
Valosinopatia	VCP	9p13-p12	AD

Taula 3. Classificació de les distròfies musculars distals causades per un gen conegut.

3. Miopaties per dèficit de disferlina

Dins de les distròfies musculars o miopaties, trobem les miopaties per dèficit de disferlina, que comparteixen la presència de mutacions en el gen *DYSF*. Es tracta d'una malaltia autosòmica recessiva que presenta una gran heterogeneïtat clínica [35,36,37,38,39,40,41,42]. Les característiques bàsiques que poden englobar la majoria dels fenotips, són la debilitat muscular, els alts nivells de Creatina quinasa (CKs) en sang i el patró distròfic amb la presència d'infiltrats inflamatoris en la biòpsia muscular [43].

Dels diversos fenotips amb els quals es pot presentar la malaltia, els dos més comuns són la LGMD2B (taula 2) i la miopatia de Miyoshi (taula 3). El primer en ser descrit va ser la miopatia de Miyoshi, tot i que no va ser fins a l'any 1998 que es va relacionar amb el gen *DYSF*. La miopatia de Miyoshi es caracteritza per un inici de la debilitat als músculs distals [37].

La distròfia de cintures 2B (LGMD2B), va ser la primera en ser relacionada amb la regió p del cromosoma 2 a l'any 1995 [40], i posteriorment, a l'any 1998, amb el gen *DYSF* [44,45]. La LGMD2B es caracteritza per un inici de la debilitat a la musculatura proximal [41].

Altres fenotips descrits en pacients amb mutacions al gen de la disferlina són: la miopatia distal amb inici en el compartiment anterior (DAT) [36], una forma congènita de la malaltia [38], un cas

de inici molt tardà [42], la hiperCKèmia asimptomàtica, el fenotip pseudometabòlic (edema i dolor sense debilitat ni atròfia a bessons) [39] i casos aïllats de portadors d'una mutació amb una afectació clínica més lleu [35]. Tot i la diversitat de fenotips de les disferlinopaties, un estudi de l'any 2010 demostra que a nivell de ressonància magnètica muscular tant en les formes distals com proximals s'observa ja des de l'inici afectació tant de músculs distals com proximals [46].

3.1 Diagnòstic

El diagnòstic de les distròfies musculars és complexa. Totes les distròfies musculars són malalties anomenades rares, degut a la seva baixa incidència en la població. Per aquest motiu, una de les principals raons del retràs en el diagnòstic, és la falta de personal mèdic especialitzat. Per aquest motiu, la majoria de malalts, després de visitar diferents neuròlegs de la seva àrea, acaben essent derivats a centres de referència en patologia neuromuscular.

El diagnòstic d'aquestes malalties es basa inicialment en criteris clínics. El facultatiu explora el pacient, redacta una història clínica i familiar, comprova el balanç muscular, se li realitzen estudis bioquímics com ara els nivells de CKs en sang, se li realitzen estudis d'electromiografia i es conclou amb una orientació diagnòstica. Segons l'orientació clínica, se li realitzaran unes proves específiques. En el cas de les distròfies musculars, és important pel diagnòstic definitiu la realització de una biòpsia muscular en la que es realitzaran estudis anatomopatològics dels talls histològics, mitjançant tincions histoquímiques. En la biòpsia, es podran observar les característiques generals de les distròfies musculars, com ara la presència de nuclis centrals, la variabilitat en la mida de les fibres, fibrosi, i en el cas de les disferlinopaties, la presència d'infiltrats inflamatoris. A més, es poden realitzar estudis d'immunohistoquímica (IHQ) que podran ajudar a determinar si la malaltia és deguda a l'absència d'una proteïna en concret. Quan el clínic té una clara sospita de disferlinopatia, a partir del teixit muscular s'estudiarà la presència/absència de la proteïna disferlina mitjançant les tècniques de IHQ i western blot (WB). Per últim, si s'observa una clara absència d'aquesta proteïna en múscul, s'estudiarà el gen DYSF per determinar si té mutacions patogèniques.

En el cas de les disferlinopaties, s'ha avançat molt en els mètodes diagnòstics. Si el clínic sospita des de un inici una miopatia per dèficit de disferlina, abans de realitzar la biòpsia muscular, prova clarament invasiva, es pot estudiar l'expressió de disferlina en els monòcits de sang perifèrica [47]. S'ha descrit que la disferlina s'expressa en diferents teixits, entre els quals el múscul esquelètic i els monòcits de sang perifèrica [44,48]. Per aquest motiu, s'ha desenvolupat un mètode diagnòstic basat en la separació de monòcits CD14+ a partir d'una extracció de sang dels pacients [47]. Mitjançant el western blot, es pot determinar la quantitat de disferlina expressada pels monòcits, que s'ha pogut correlacionar amb la quantitat d'aquesta proteïna en múscul, evitant la realització

de la biòpsia muscular [49]. A més a més, a nivell genètic, es poden estudiar les mutacions al gen DYSF mitjançant al seqüenciació del RNA missatger (mRNA) dels monòcits [48]. Això facilita molt la recerca de mutacions, ja que sino, en el cas de treballar amb DNA genòmic, s'hauria de seqüenciar el gen DYSF exó a exó.

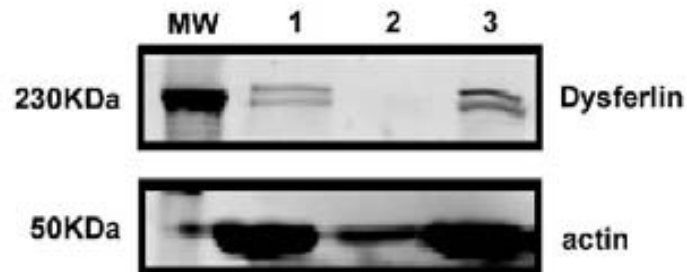


Figura 6. Western Blot per disferlina i β -actina en monòcits de sang perifèrica de 1) individu control; 2) individu amb mutacions al gen DYSF i 3) pacient amb sospita de disferlinopatia.

4. El gen DYSF

El gen DYSF va ser clonat al 1998 [44,45], i des de aquell moment, s'han dut a terme molts estudis per entendre la seva funció. El gen DYSF es troba localitzat al cromosoma 2, a la regió 2p13.3-p13.1, i avarca una zona d'unes 200Kb. El gen s'estructura en 55 exons i dona lloc a un mRNA total de 6,2Kb. Fins el dia d'avui, s'han descrit 14 variants de *splicing* [50].

La regió promotora que s'ha identificat avarca des de els nucleòtids -2035 al +1222, y presenta una regió potenciadora (*enhancer*), una regió silenciadora (*silencer*) y un illot CpG que engloba el codó d'inici. A més, presenta diverses seqüències d'unió a diversos factors de transcripció musculars com ara la miogenina i el MyoD [51].

S'han descrit 360 variacions en el gen DYSF incloent mutacions patogèniques i polimorfismes no patogènics [52]. Desafortunadament de cara a facilitar el cribatge de mutacions, aquests canvis es donen al llarg de tot el gen sense la presència de punts calents (*hot spots*).

A més, no s'han pogut relacionar les diferents mutacions amb fenotips concrets. Encara que fins ara no ha estat demostrat, és possible que la variabilitat fenotípica observada en les disferlinopaties vingués donada per variants genotípiques en altres proteïnes que formen part del complexa en el que es troba la disferlina.

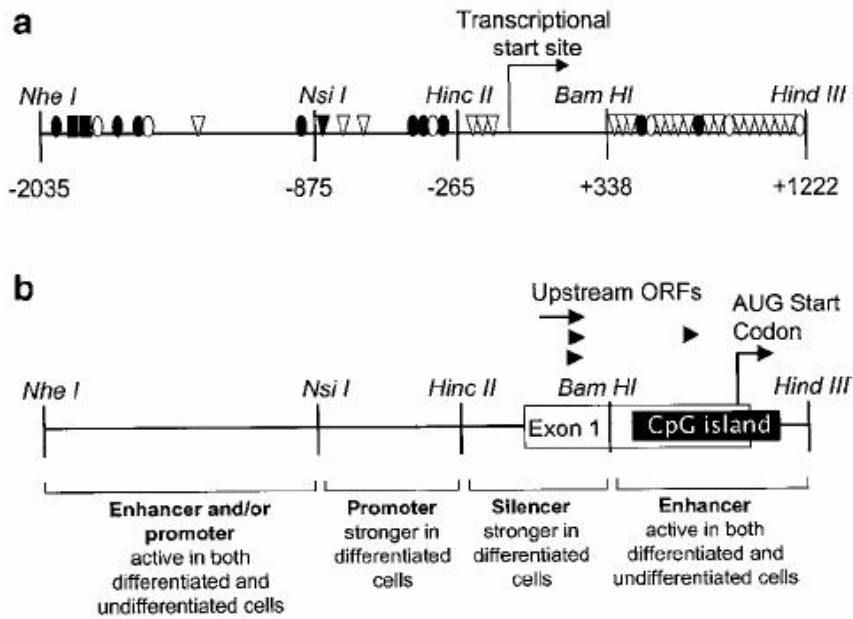


Figura 7. Estructura del promotor del gen DYSF. Extret de "Foxton, RM. Et al., Eur J Hum Genet 2004"[51].

5. La proteïna disferlina

La disferlina és una proteïna de la família de les ferlines. En mamífers s'han identificat quatre membres d'aquesta família: la disferlina, la otoferlina, la mioferlina i la Fer1L4.

La disferlina és una proteïna de tipus II, és a dir, amb el domini C-terminal extracel·lular. Aquesta proteïna està ancorada al sarcolemma, però a diferència de la majoria de proteïnes de membrana, només presenta un petit segment transmembrana i tan sols té 13 aminoàcids extracel·lulars. La disferlina és una proteïna gran, que consta de 2080 aminoàcids, amb un pes molecular de 237KDa. Presenta 5 dominis (7 possibles) C2 d'unió a fosfolípids regulats per calci, un domini conservat de la família de les ferlines, una regió transmembrana i dues regions de repeticions de seqüències imbricades, anomenades Dysf-N i Dysf-C, de funció desconeguda [53].



Figura 8. Estructura de la proteïna disferlina humana. En blau els dominis C2, en groc la regió transmembrana.

Els dominis C2 són dominis conservats d'uns 130 aminoàcids que s'uneixen a fosfolípids aniónics com ara la fosfatidilserina, de manera calci dependent [54]. Els dominis C2 uneixen el calci mitjançant 5 residus molt conservats carregats negativament. Es creu que el calci neutralitza aquests residus àcids permetent la unió a fosfolípids [55] i a altres proteïnes [56]. S'ha demostrat

que el domini C2A és capaç d'unir fosfatidilserines, fosfatidilinositol 4-fosfat i als fosfatidilinositols 4,5-bifosfat de manera calci-depenent [57].

En humans, la disferlina s'expressa també en cor, placenta, fetge, pulmons, pàncrees i ronyons [44], però la majoria d'estudis es centren en la seva funció en múscul esquelètic [58] i en monòcits [47,59,60].

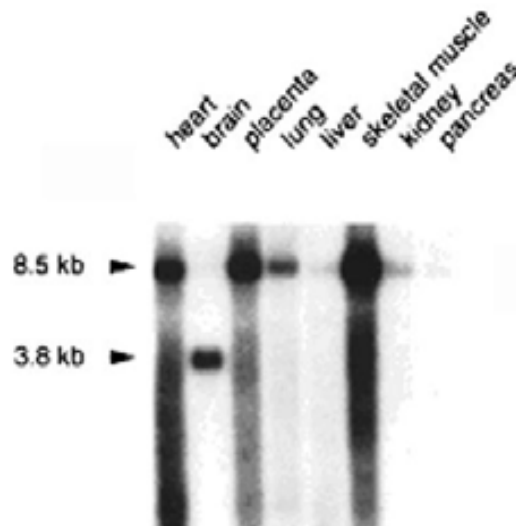


Figura 9. Northern-blot hibridat amb una sonda contra el mRNA de la disferlina. Extret de “Liu, J. et al., Nature genetics, 1998”[44].

5.1 Funcions de la disferlina

Diversos estudis demostren que la disferlina té un paper important en la reparació del sarcolemma després d'un dany [61,62]. També s'ha demostrat el seu paper en la diferenciació muscular *in vitro* [63] i *in vivo* [64]. A més a més, s'ha pogut relacionar amb altres funcions, com ara el compartiment endocític [65,66,67] o la estabilització i integritat de la membrana plasmàtica [65,68].

Es va poder observar, en un model murí deficient en disferlina, que sobreexpressa mioferlina, una altra proteïna de la família de les ferlines, que la reparació de membrana no estava afecte, però el fenotip distròfic del teixit muscular no millorava [69]. Aquests resultats indiquen que, tot i que la reparació de membrana sigui la funció més acceptada i estudiada de la disferlina, aquesta proteïna realitza altres funcions necessàries per a l'homeòstasi del múscul esquelètic. A més, es coneix molt poc sobre les seves funcions en altres teixits [67,70].

Les funcions de la disferlina en monòcits són menys conegudes. Ja que les disferlinopaties presenten infiltrats inflamatoris al múscul, compostos bàsicament per macròfags, existeix el debat sobre si la inflamació és deguda a la falta de disferlina al múscul o en els macròfags. Un laboratori ha generat ratolins transgènics que expressen disferlina només al teixit muscular, i han observat

que els animals no presenten inflamació muscular, tot i ser deficientes en disferlina en sang perifèrica [71]. També s'ha demostrat que els músculs deficientes en disferlina expressen trombospondina-1, un quimioattractant de macròfags, cosa que no passa en els músculs amb nivells normals de disferlina [59]. Aquests resultats indiquen que la inflamació muscular és deguda a l'absència de disferlina en el múscul. Per altre banda, altres autors han demostrat que els macròfags deficientes en disferlina mostren una activitat fagocítica més agressiva [60] relacionant aquesta proteïna amb aquest procés. Es varen estudiar l'expressió de diferents proteïnes implicades en endocitosi i fagocitosi per tal de veure quin era el procés afectat, podent veure una regulació a l'alça de la família de les GTPases petites tipus Rho, proteïnes de senyalització crucials per la fagocitosi. També es va poder observar un augment de l'expressió de proteïnes relacionades amb l'endocitosi, com ara la clatrina o l'adaptina, en macròfags deficientes en disferlina, tant humans com murins. Els autors hipotetitzen que la falta de disferlina provoca un augment d'altres vies implicades en l'endocitosi, per tal de compensar la funció [60].

Reparació de la membrana plasmàtica o teoria del “patch repair”

La disferlina és una proteïna que mostra una gran homologia amb la proteïna Fer-1 de *C. elegans* [45]. De fet, el nom de disferlina es deu a que la seva deficiència provoca una distròfia muscular (“dis”) i per la seva homologia amb fer-1 (“fer”). Fer-1 és un factor d'espermatogènesi que s'expressa específicament en els espermatòcits. Mutacions en Fer-1 causen infertilitat en *C. elegans*, ja que es veuen alterats els processos de fusió de grans vesícules amb la membrana plasmàtica [72,73]. Això va fer pensar als autors que van clonar la disferlina que aquesta tindria una funció relacionada amb la fusió de membranes.

Molts estudis donen suport a aquesta teoria, com ara els estudis de microscòpia electrònica, que mostren irregularitats a la membrana plasmàtica de pacients amb mutacions al gen DYSF, que inclouen una reducció de la lamina basal i l'acumulació subsarcolemmal de petites vesícules [74]. A més, els dominis d'unió a calci C2 són anàlegs als de la sinaptotagmina, proteïna encarregada de la fusió de vesícules sinàptiques [75].

Tots els tipus cel·lulars tenen mecanismes basals de reparació de membrana mediat per la bicapa lipídica [76]. Però alguns teixits, com ara la musculatura esquelètica, tenen més tendència, per la seva funció, a patir trencaments a la membrana. Per això, en aquests teixits hi ha mecanismes alternatius de reparació. S'ha observat, que perquè aquests mecanismes de reparació tinguin lloc, es requereix d'una font de endomembranes i d'uns nivells mínims de calci [77].

Primer hi ha un influx de calci a través de la lesió que eleva ràpidament les concentracions intracel·lulars d'aquest ió, provocant una resposta exocítica. Els filaments d'actina circumdants a la lesió es col·lapsen, deixant un espai lliure pel pas de les endomembranes necessàries per tancar la

lesió [78]. Les vesícules són transportades activament al lloc de lesió mitjançant les proteïnes motores kinesina i miosina [79,80], a on s'agreguen i fusionen formant un pegat hidrofòbic que segellarà la ruptura de la membrana [81].

S'han proposat diversos tipus vesiculars com a font d'endomembrana per segellar la lesió de la membrana plasmàtica. Es suposa que el tipus de vesícules implicades depèn del tipus cel·lular i la mida de la lesió [82]. Tot hi així, els lisosomes i enlargeosomes són les vesícules considerades com a principals fonts d'endomembrana [83,84,85].

L'estructura de la disferlina suggereix que aquesta proteïna té com a funció la fusió de l'endomembrana amb la membrana plasmàtica en un procés dependent de calci. A més, s'ha observat la localització de la disferlina en el lloc de lesió del sarcolemma [86]. Es suposa que la disferlina actua com a part d'un complex proteic en aquest procés, i això ha dut a l'estudi de les seves interaccions.

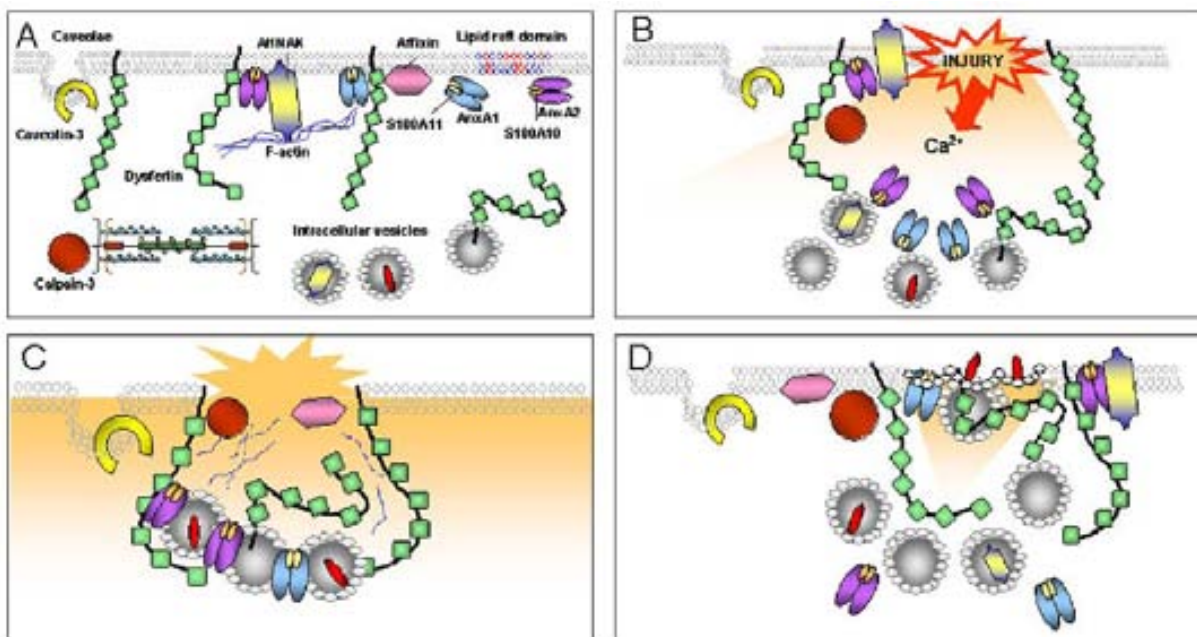


Figura 10. Reparació de la membrana plasmàtica o teoria del "patch repair" Extret de "Glover, L. et al, Traffic, 2007"[53].

5.2 Interaccions de la disferlina

Caveolina-3

La caveolina-3 és una proteïna que s'expressa específicament al teixit muscular esquelètic i cardíac, on és essencial per a la formació de caveoles i la correcta disposició del citoesquelet. Les caveoles són zones de basses lipídiques (*lipid rafts*) especials que es presenten com petites invaginacions de la membrana plasmàtica. Aquestes estructures membranoses estan relacionades amb l'endocitosi clatrina-independent.

A l'any 1998 es va descriure que mutacions en el gen de la caveolina-3 causaven la distròfia de cintures tipus 1C (LGMD1C) [87]. Aquesta distròfia es presenta de forma dominant, ja que les molècules de caveolina-3 mutades queden retingudes a l'aparell de Golgi, retenint també les molècules de caveolina-3 sense mutació, provocant la degradació d'aquestes [88]. La simptomatologia dels pacients amb LGMD1C es caracteritza per la hipertròfia de bessons i una debilitat muscular proximal, i en alguns casos, pel fenomen de ondulació de la musculatura (fenomen de *rippling*). Alguns pacients presenten com a únic símptoma la hiperCKèmia. Els músculs dels pacients amb LGMD1C presenten nivells reduïts de caveolina-3 i, en alguns casos, de forma secundària de disferlina [21,89]. Això es creu que és degut al fet que certes mutacions en la caveolina-3 retenen la disferlina a l'aparell de Golgi, reduint així el seu transport cap a la membrana plasmàtica [90]. Per una altra banda, els mateixos autors van descriure un augment de l'endocitosi de la disferlina en les cèl·lules que presenten mutacions en caveolina-3. Així doncs, es va poder descriure que un paper important de la caveolina-3 és la retenció de la disferlina a la membrana plasmàtica [91].

La interacció entre la caveolina-3 i la disferlina va ser descrita l'any 2001. Els autors varen co-immunoprecipitar ambdues proteïnes, i varen descriure la reducció parcial i secundària de disferlina en pacients de LGMD1C. Al estudiar la seqüència de la disferlina, es van localitzar set llocs d'unió als motius bastida (*scaffold*) de la caveolina, i una regió susceptible de interaccionar amb el motiu WW d'aquesta [21]. Més tard es va descriure la interacció de la caveolina-3 amb la proteïna Trim72/MG53 i amb la disferlina, demostrant que aquestes tres proteïnes formen part d'un mateix complex implicat en la reparació de membrana [92].

La disferlina i la caveolina-3 no només colocalitzen a la membrana plasmàtica, sinó també als túbulos T, junt amb el DHPR [93].

Per últim, la caveolina-3, així com la disferlina, té un paper en la diferenciació muscular, concretament en el procés de fusió de mioblasts per la formació de miotubs [94].

Annexines

Les annexines són una família de proteïnes d'unió a calci i a fosfolípids, implicades en el tràfic de vesícules entre les membranes de diferents compartiments cel·lulars, l'activitat dels canals transmembrana i la inhibició de la fosfolipasa A2 [95].

S'ha demostrat que les annexines A1 i A2 estan implicades en l'agregació de vesícules intracel·lulars i els *lipid rafts* de manera calci-dependent a la cara citosòlica de les membranes plasmàtiques de diversos tipus cel·lulars [96,97].

Al 2003, Lennon et al. varen descriure la interacció directe de la disferlina amb les annexines A1 i A2, mitjançant la tecnologia de visualització de la vida mitja de la fluorescència per ressonància de

la transferència d'energia de Förster (*"Fluorescence Lifetime Imaging- Förster (fluorescence) resonance energy transfer "*, FLIM-FRET). Els autors, demostren la interacció directe d'aquestes dues proteïnes amb la disferlina en la presència de calci, i que la unió disferlina-annexina A1 es veu interrompuda després d'un dany al sarcolemma [98].

Aquestes troballes relacionen així, la disferlina a la agregació i fusió de vesícules en resposta a un dany al sarcolemma [98].

AHNAK

L'AHNAK (també anomenada desmoyokina) és una proteïna gegant i un marcador d'enlargeosomes [99]. Els enlargeosomes són petites vesícules no secretores excitades al augmentar les concentracions de calci intracel·lular [100,101,102]. Aquestes vesícules estan relacionades amb la diferenciació cel·lular i la reparació de membrana [99]. L'AHNAK participa en el tràfic de vesícules, l'acoblament excitació-contracció en el múscul esquelètic i en la reparació de membrana [99,103,104].

L'AHNAK colocaliza amb la disferlina a la membrana plasmàtica i en absència de disferlina, els nivells d'AHNAK es veuen reduïts al sarcolemma. A més, ambdues proteïnes co-immunoprecipiten. S'ha descrit que la interacció entre ambdues proteïnes està mediada pel domini C2A de la disferlina i el domini carboxi-terminal de l'AHNAK [85]. La interacció és independent de calci i està regulada per una reacció de proteòlisi mediada per la proteïna calpaïna-3 [105].

Calpaïna-3

La calpaïna-3 és una cisteïna-proteasa no lisosomal específica de múscul [106]. Està implicada en la proteòlisi de moltes proteïnes musculars, com ara les annexines A1 i A2, la filamina A, la importina-7, la vimentina o la mateixa calpaïna-3. També proteolitza l'AHNAK, mitjançant així la seva interacció amb la disferlina. Per això es considera una proteïna del complex de la disferlina, tot hi que no interacciona amb aquesta, sinó que media la seva funció. A més, s'ha descrit que després de que es produeixi un dany a la membrana cel·lular, la calpaïna-3 i la disferlina colocalitzen al lloc de lesió [107]. Tot hi així, no s'ha observat una disminució de la integritat de les membranes cel·lulars en els models animals de calpainopatia [108]. La calpaïna-3 interacciona amb la titina [109]. Es creu que la titina actua com a estabilitzador de la calpaïna [110], suprimint així la seva acció proteolítica [111].

Per una altra banda, les mutacions en aquest gen estan associades amb la distròfia de cintures tipus 2A (LGMD2A). La fisiopatologia de les calpainopaties no es coneix amb exactitud. La debilitat en aquests pacients sol començar a la musculatura de la cintura pèlvica, sent aquesta la més afectada al llarg de la malaltia inclús en aquells pacients amb inici a les extremitats superiors [112].

A més, s'ha descrit un dèficit secundari d'aquesta proteïna en la LGMD2B [113] així com una reducció secundària de disferlina en els pacients amb LGMD2A [114,115].

Afixina

L'afixina, anomenada també β -parvina, és una proteïna expressada de manera ubíqua però en major grau al múscul esquelètic i al múscul cardíac. Aquesta proteïna interacciona amb la quinasa d'unió a integrina (ILK) i es troba a les adhesions focals. Es creu que esta relacionada amb la senyalització cel·lular via integrines [116]. L'any 2005 es va relacionar per primer cop a la disferlina amb el complex integrines, mitjançant la descripció de la seva interacció amb l'afixina. Es va descriure la colocalització i co-immunoprecipitació d'ambdues proteïnes, així com una aparent reducció d'afixina en les biòpsies de pacients amb mutacions al gen DYSF [68]. Això suggereix altres funcions per a la disferlina, diferents a la reparació de membrana, com ara la integritat del sarcolemma col·laborant en la unió d'aquest a la matriu extracel·lular.

Vinculina

La vinculina és una proteïna de les adhesions focals relacionada amb la unió de les integrines al citoesquelet d'actina [117].

La vinculina s'ha relacionat amb la disferlina mitjançant estudis de co-immunoprecipitació. Es va observar que la interacció entre ambdues proteïnes és dinàmica, ja que disminueix al augmentar la diferenciació de les cèl·lules musculars.

La interacció entre aquestes dues proteïnes dona suport al possible paper de la disferlina en la integritat de les adhesions focals, i en la seva implicació en la diferenciació, ja que les vies de senyalització relacionades amb les adhesions focals estan implicades en la fusió de mioblastes [118].

Trim72/MG53

Al 2009 es va descriure una altre proteïna implicada en processos de tràfic de vesícules i miogènesi, la trim72 o mitsugumina 53 (MG53) [119,120,121]. Posteriorment es va veure que el model murí KO per aquest gen presentava una miopatia progressiva deguda a un defecte en la reparació de membrana de les cèl·lules musculars. Aquesta proteïna actua de manera calci independent, activada per l'entrada a la cèl·lula d'agents oxidants [119]. La MG53 és de la família de les proteïnes que presenten un motiu tripartit (TRIM, *tripartite containing motif protein*), i no presenta cap segment transmembrana, tot i que s'ha observat la seva associació a vesícules intracel·lulars [120]. Cai i col·laboradors hipotetitzen que la proteïna trim72/MG53 s'activa per la entrada d'agents oxidants a la cèl·lula al lesionar-se, reclutant vesícules ràpidament al lloc de la

lesió, i que posteriorment, gràcies a l'entrada de calci, la disferlina fusiona aquestes vesícules al sarcolemma per tal de segellar la membrana [119]. S'ha descrit la interacció de la Trim72/MG53 amb la disferlina [122] i amb la caveolina-3 [92], donant així més força a la hipòtesi. A més, en un estudi proteòmic comparant varies distròfies musculars, es va observar que Trim72/MG53 mostrava una expressió augmentada en pacients amb mutacions al gen DYSF [64]. És possible que aquest augment indiqués un intent de compensar el dèficit de disferlina en aquests pacients.

Per altra banda, s'ha descrit el paper d'aquesta proteïna com a un regulador negatiu de la miogènesi. La sobreexpressió de Trim72/MG53 en la línia cel·lular C2C12 abolia la miogènesi. Al silenciar el gen TRIM72, varen comprovar com s'augmentava aquest procés [121].

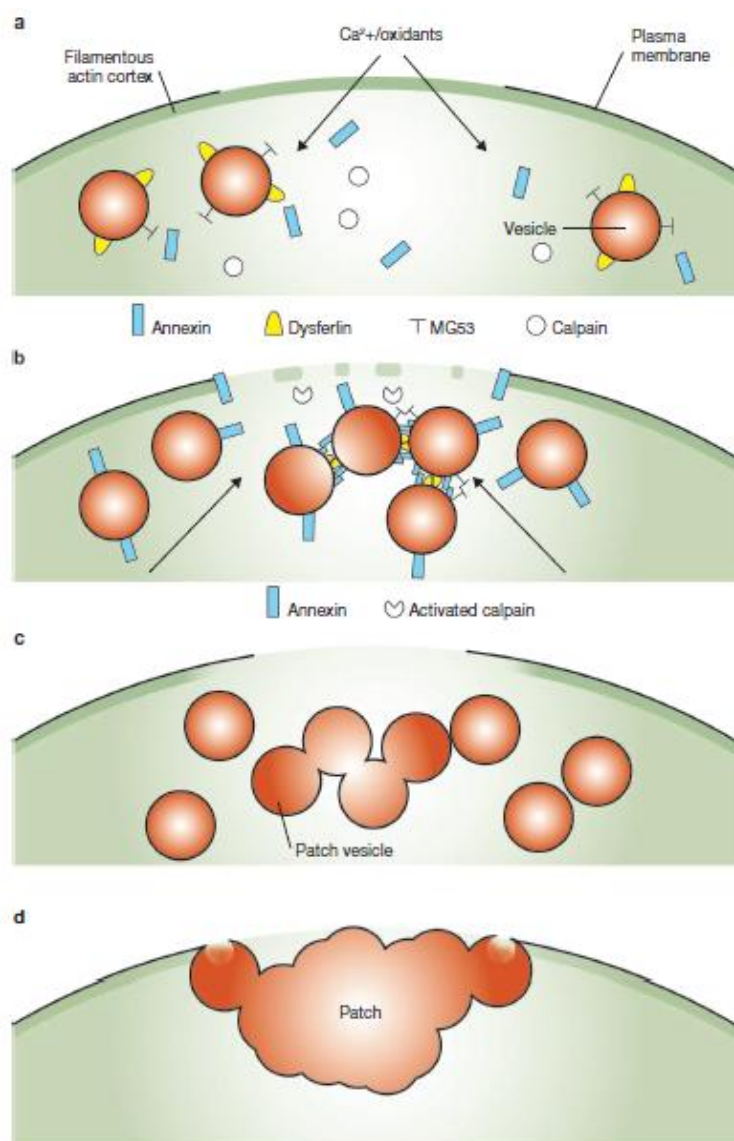


Figura 11. Integració de la proteïna Trim72/MG53 en la teoria del patch repair. Extret de "McNeil, et al., Nature Cell Biol, 2009"[123].

PTRF

La “Polimerasa I i factor de d’alliberament de transcrits” (PTRF) és una proteïna relacionada amb les caveoles que també es troba present al complex de la disferlina. La seva interacció amb la disferlina és va descriure mitjançant algorismes basats en xarxes gèniques, i es va confirmar la interacció mitjançant immunoprecipitació [124].

Posteriorment també s’ha descrit la interacció de la Trim72/MG53 amb la PTRF. Es creu que aquesta proteïna media el tràfic de la Trim72/MG53 al lloc de lesió de la membrana [125].

Tubulina i deacetilasa de les histones 6

Molt recentment s’ha descrit que la disferlina interacciona amb la tubulina [126] i la deacetilasa d’histones 6 (HDAC6) mitjançant tècniques d’immunoprecipitació [127]. Aquestes interaccions s’han relacionat amb la diferenciació muscular ja que els autors varen demostrar que la disferlina evita la deacetilació de la tubulina per part de la HDAC6, unint simultàniament ambdues proteïnes. Es requereix un alt nivell d’acetilació de la α -tubulina per a la elongació i la estabilització dels microtúbuls, procés necessari per a la miogènesi i el creixement dels miofibres [127].

Complex d’integrines

De Morrée i col·laboradors han demostrat recentment la interacció de la disferlina amb la vinculina, una proteïna de les adhesions focals [65]. Les integrines són proteïnes heterodimèriques formades per cadenes α i β i que són la base de les adhesions focals. A més, les integrines també s’han relacionat amb els contactes cèl·lula-cèl·lula. Han estudiat l’associació de la disferlina amb les integrines. Han observat que els monòcits de pacients amb disferlinopatia presenten una expressió disregulada de fibronectina, integrina $\alpha 5$, αV , $\beta 1$ i $\beta 3$. La disferlina colocalitza amb les integrines a la membrana plasmàtica. Al estimular les integrines, les subunitats d’aquestes són endocitades junt amb la disferlina. Per altra banda, han demostrat com la línia cel·lular THP1, després de depleccionar-li la disferlina, presenta problemes en la diferenciació i com a conseqüència de la desregulació de les integrines, s’adhereixen menys eficientment a les superfícies [128] (veure annexa 3).

Altres interaccions

La disferlina també s’ha relacionat amb altres proteïnes com ara la moesina [124] o la talina [65]. S’han realitzat diversos estudis *in silico* que relacionen la disferlina amb diferents vies, com ara les vies d’endocitosi [65].

També s’han posat a punt diferents algorismes per tal de trobar possibles interaccions entre proteïnes musculars, com ara algorismes basats en la bibliografia [129] o en xarxes gèniques [124].

6. Models per l'estudi de les disferlinopaties

6.1 Models cel·lulars

Per l'estudi de les malalties monogèniques és de gran utilitat l'ús de models cel·lulars per l'estudi *in vitro* de la funció del gen afectat. En el cas de les disferlinopaties no disposem de gaires models cel·lulars, però freqüentment s'usen cultius primaris de múscul provinents de pacients amb mutacions al gen DYSF. Tot i així, és difícil per molts centres de recerca la obtenció d'aquestes cèl·lules. El grup del Dr. Mouly ha dissenyat un protocol per a immortalitzar mioblastes de pacients amb diferents distròfies musculars, incloent cèl·lules provinents de pacients amb disferlinopatia, la qual cosa facilita l'estudi d'aquestes malalties [130].

A més a més, també disposem de línies cel·lulars murines deficientes en disferlina com ara les cèl·lules GREG [131] i les C2C12 amb expressió estable de un plàsmid que conté un silenciador pel gen DYSF (Jain Foundation).

6.2 Models animals

Per tal de testar les diferents possibles teràpies i/o per conèixer millor la fisiopatologia de les diferents distròfies musculars, és molt comú l'ús de models animals que presenten mutacions als mateixos gens que els pacients. En el cas de les disferlinopaties només disposem de models murins, tot i que alguns estudis s'han realitzat en peixos zebra amb la disferlina silenciada [86,132]. El primer model murí de disferlinopatia descrit va ser la soca SJL/J. Aquesta soca s'usa com a model de malalties autoimmunes induïdes com per exemple d'encefalitis autoimmune experimental (EAE). Al 1999 es va descriure que aquest model presenta inflamació al múscul esquelètic i debilitat muscular predominant en la musculatura proximal degut a que presenta una deleció de 141 parells de bases (pb) que engloben una seqüència repetida en tàndem, alterant així la regió 3' d'*splicing*, provocant la eliminació de l'exó 45 de la disferlina. Aquesta mutació causa una reducció significativa de la proteïna disferlina. Així doncs, aquest és un model natural de la distròfia de cintures tipus 2B (LGMD2B) [133].

A l'any 2004, es va descriure un altre model natural de LGMD2B, la soca A/J, que presenta la inserció d'un retrotransposó a l'intró 4 generant un al·lel nul. Aquest model es caracteritza per l'absència d'expressió de la proteïna disferlina, tot i que la histologia és menys patològica que en el model SJL/J [134].

Tot i així, la recerca amb aquests models animals es veu dificultada pel lleu fenotip que presenten i la falta d'una soca control sense mutacions però amb el mateix fons genètic. Per aquest motiu, s'han generat diverses soques mitjançant enginyeria genètica per tal de tenir les mutacions dels models SJL/J o A/J en un fons genètic diferent, com ara el fons dels ratolins C57Bl/6 [61,135,136].

7.Terapies

7.1 Teràpies en distròfies musculars

S'ha avançat molt en el disseny de teràpies en el camp de les distròfies musculars. Tot hi que no s'ha trobat una teràpia definitiva per cap distròfia, en aquests moments hi ha en marxa diversos assaigs clínics prometedors. Els principals estudis s'estan centrant en tres tipus diferents de teràpia: la teràpia cel·lular, la teràpia gènica i la teràpia farmacològica.

Teràpia cel·lular en distròfies musculars

La teràpia cel·lular és aquella que es basa en la introducció de noves cèl·lules sanes per tal d'intentar restaurar una determinada funció en un teixit que presenta una patologia concreta.

S'han assajat diversos tipus de teràpies cel·lulars en les distròfies musculars. La majoria d'estudis s'han realitzat amb models de distròfia muscular de Duchenne (DMD). Els principals requisits perquè una teràpia cel·lular sigui efectiva en el camp de les distròfies musculars són: l'àmplia distribució de les cèl·lules trasplantades, ja que el teixit muscular és molt extens i està àmpliament distribuït; la capacitat de les cèl·lules trasplantades per fusionar-se amb el múscul esquelètic i reprogramar-se per tal de sintetitzar proteïnes específicament musculars; la capacitat de les cèl·lules trasplantades de diferenciar a cèl·lules satèl·lit per tal de col·laborar en la regeneració muscular a llarg terme; i no presentar capacitat tumorigènica ni provocar una reacció immunològica al receptor.

La teràpia cel·lular més estudiada en el camp de les distròfies musculars és la teràpia amb cèl·lules satèl·lit o amb mioblastes. Diversos estudis han demostrat la capacitat regenerativa del trasplantament de cèl·lules miogèniques [137,138,139] i la seva capacitat per recuperar l'expressió de distrofina, la proteïna afectada a la DMD [140]. La teràpia amb cèl·lules satèl·lit seria la teràpia cel·lular idònia, ja que aquestes cèl·lules poden diferenciar a múscul i a més poden repoblar el compartiment de les cèl·lules satèl·lits, assegurant així una teràpia efectiva a llarg terme. Però l'inconvenient que presenta aquesta teràpia la fa inviable, ja que les cèl·lules satèl·lit *in vitro* perden certes característiques diferenciant-se així a mioblastes. El fet de que el nombre de cèl·lules que es poden obtenir a partir del teixit muscular adult és molt reduït fa invalida aquesta teràpia [141]. Per aquest motiu, s'ha estudiat la teràpia amb mioblastes com a alternativa a les cèl·lules satèl·lit.

Molts estudis han corroborat la capacitat regenerativa tant de mioblastes murins de neonats [142] o de ratolins adults [143,144], així com de mioblastes humans [145,146] en el model murí mdx per la DMD. S'ha demostrat la seva capacitat per regenerar grans parts de múscul esquelètic amb un baix potencial tumorigènic [147,148]. Tot i així, la majoria d'intents de teràpia per la DMD amb

mioblastes han fracassat en corregir el fenotip distròfic. A més, aquesta teràpia cel·lular presenta diversos inconvenients, com ara la baixa migració dels mioblastes dins el teixit, i el requeriment de múltiples injeccions periòdiques per tal de tractar grans àrees de múscul. Per altre banda, els mioblastes no contribueixen a la reparació muscular a llarg terme, fent aquesta teràpia menys prometedora en el camp de les distròfies musculars. A més, estudis posteriors han demostrat que es produeix una reacció immunològica en els receptors contra els mioblastes del donant, disminuint la supervivència d'aquestes [149,150].

Unes altres cèl·lules mare presents al múscul que s'han estudiat són les anomenades “*side population*” (SP). Aquestes cèl·lules presenten unes característiques determinades, com per exemple l'expressió de Bcrp1/ABCG2, i es poden extreure de diversos teixits [151], entre els quals el múscul esquelètic (mSP) o el moll d'os (bmSP). Poden diferenciar a múscul *in vitro*, i si són injectades intramuscularment *in vivo* poden diferenciar a cèl·lules satèl·lit i mioblastes [152,153]. S'han fet estudis comparant la capacitat regenerativa de les mSP i les bmSP després de ser trasplantades mitjançant una injecció intravenosa, mostrant ambdós tipus cel·lulars un nivell de regeneració muscular similar, però es va observar la incapacitat de les mSP de reconstituir el compartiment hematopoyètic en ratolins irradiats [153]. Es va observar que les mSP són capaces de migrar des de el torrent sanguini al múscul, però la seva capacitat d'empeltament és només d'un 1%. Mitjançant el lliurament intra-arterial d'aquestes cèl·lules, es varen aconseguir nivells d'empeltament del 5-8% [154,155].

Una altra teràpia cel·lular que s'ha assajat en una distròfia muscular és el trasplantament de moll d'os, en el model murí mdx de DMD [153,156]. El trasplantament de moll d'os és un procediment molt estandarditzat i en cas d'obtenir resultats positius, la seva translació a la teràpia en humans seria més senzilla. En els dos casos referenciats, es va comprovar que una part de les cèl·lules trasplantades eren capaces de fusionar amb el múscul esquelètic, tot hi que fracassaven en la restauració de l'expressió de distrofina. Aquestes resultats podrien explicar-se per una falta de reprogramació dels nuclis fusionats per tal d'expressar proteïnes musculars.

La teràpia cel·lular que ha demostrat ser més prometedora fins al moment, és la basada en la utilització de mesoangioblastes (MABs). El MABs són cèl·lules progenitores pluripotents associades als vasos que poden ser aïllades tant de teixits embrionaris com de teixits adults [157,158]. Aquestes cèl·lules poden diferenciar a molts tipus cel·lulars diferents, entre els quals es troben les cèl·lules del múscul esquelètic. De fet, s'ha demostrat la seva eficiència per colonitzar el múscul esquelètic *in vivo* després de ser injectades intra-arterialment tant en el model murí de sarcoglicanopatia Sgca-null [159] com en el model caní GRMD per la DMD [160]. Per altra banda, aquestes cèl·lules també s'han relacionat amb la regeneració muscular de forma fisiològica [161].

Teràpia gènica en distròfies musculars

La teràpia gènica compren un conjunt de tècniques per a la inserció de gens funcionals en un individu amb una malaltia genèticament determinada. Ara per ara, aquests tipus de teràpies només s'apliquen en assaigs clínics, ja que aquestes metodologies encara estan en desenvolupament.

Tot i així, la teràpia gènica constitueix una de les teràpies més prometedores per a les distròfies musculars i les malalties monogèniques en general.

En el camp de les distròfies musculars, la teràpia gènica té dos problemes principals. El primer és la gran mida de la majoria de gens causants de distròfia muscular. El segon, la distribució del vector al teixit diana, ja que la musculatura esquelètica representa aproximadament el 40% del pes total del cos i està distribuïda al llarg d'aquest.

Tot i així, hi ha algunes aproximacions de teràpia gènica que ha mostrat alguns resultats preliminars prometedors en algunes distròfies musculars que passaré a descriure a continuació amb més detall.

- Omissió de l'exó o Exon skipping

L'*exon skipping* o omissió de l'exó és una teràpia prometedora per malalties com ara la DMD. Aquesta distròfia és deguda a mutacions en el gen de la distrofina (gen DYS), el gen més gran del genoma. És un gen que consta de 79 exons, codificants per tres regions diferents: la N-terminal, la C-terminal i la zona d'unió, anomenada *rod*, que consta de repeticions de dominis tipus espectrina. Les mutacions en el gen DYS poden provocar dos fenotips. La DMD és un fenotip greu de distròfia infantil que causa la mort per parada cardio-respiratòria a la tercera dècada de vida aproximadament, i la distròfia muscular de Becker (BMD) que és un fenotip més lleu d'inici en edat adulta. Aquests dos fenotips diferenciats estan associats al tipus de mutació. Les delecions que canvien el marc de lectura o les mutacions que causen un codó stop, causen la no expressió de distrofina, provocant així un fenotip greu tipus DMD. En canvi, els pacients amb BMD, presenten delecions sense canvi en el marc de lectura o mutacions puntuals i certs nivells d'expressió de la proteïna distrofina, tot i que sol ser una forma truncada d'aquesta que no és funcional al 100%.

L'omissió d'exó es basa en la introducció d'oligonucleòtids antisentit (AOs) que hibriden amb el mRNA de la distrofina, generant un lloc d'*splicing* concret que eliminarà l'exó que porta la mutació. Així doncs, aquesta teràpia no representa la cura de la malaltia, però pot esdevenir una teràpia efectiva que comporti una millora en els pacients portant-los a expressar un fenotip més lleu.

Avui en dia els principals estudis sobre la teràpia d'*exon skipping* s'estan duent a terme amb AOs amb diferents composicions químiques per tal de millorar la seva entrada als teixits. La composició química més usada és la del 2'O-metilfosforotioat modificat (2'OMePS). Aquesta modificació

produeix resistència a la degradació per part de les nucleases i dona càrrega negativa a la molècula per tal de facilitar el lliurament d'aquesta a sistemes de cultiu cel·lular per part de la majoria d'agents transfectants [162]. L'eficàcia d'aquesta molècula ha estat demostrada via intramuscular en els ratolins mdx [163,164] i posteriorment en pacients amb DMD [165,166]. En el primer estudi en humans realitzat amb aquesta molècula, es va administrar de manera sistèmica obtenint una recuperació de l'expressió de distrofina en $\leq 5\%$ [166]. En el segon estudi, es va administrar el 2'OMePS via subcutània, obtenint així uns millors resultats, tot hi que l'expressió mitja de distrofina en els pacients va ser només d'un 15% [165].

Paral·lelament, l'ús dels morfolinos oligòmers fosfodiàmidat (PMO) està sent estudiat com a teràpia per la DMD. Els PMOs tenen càrrega neutra i són refractaris a la degradació. Tot i que la seva càrrega neutra fa difícil la seva incorporació per part de cèl·lules cultivades *in vitro*, s'ha demostrat que tenen una millor entrada als teixits *in vivo* en el model mdx. Injeccions intravenoses setmanals de PMO indueixen fins a un 50% de l'expressió normal de distrofina en el model murí mdx, millorant la patologia d'aquests animals, augmentant també la seva força muscular [167,168]. Tot i així, els músculs requereixen estar lesionats per tenir una bona proporció d'entrada tant de 2'OMePS com de PMOs. Com això seria contraproductiu per un tractament a llarg terme, s'estan estudiant altres metodologies per a facilitar l'entrada dels AOs al teixit muscular. Una aproximació que facilita l'entrada dels AOs és l'ús de pèptids senyalitzadors d'entrada, com a mètode per a provocar l'entrada activa dels AOs a les cèl·lules. S'ha demostrat que un pèptid ric en arginines millora significativament l'entrada dels AOs en cèl·lules en cultiu i en teixit després de una injecció intramuscular. Però l'ús d'aquests pèptids té inconvenients, com el fet de que poden provocar una resposta immunològica. Per això, també s'han desenvolupat alternatives no-peptídiques, per exemple els polímers, com el anomenat Vivo-PMO. Amb l'ús del Vivo-PMO, la dosi que produeix el 50% d'expressió, és 50 vegades inferior que si tractem al model mdx amb PMO no conjugats amb aquest polímer [169,170].

Una aproximació testada en el model GRMD de gos per la DMD és l'omissió de múltiples exons, concretament del 45 al 55, generant així una forma truncada de la distrofina associada a fenotips molt lleus o pacients asimptomàtics [171].

De fet, un dels motius pels quals aquesta teràpia no és aplicable a altres malalties, com per exemple les disferlinopaties, és el fet de que la distrofina té dominis N-terminals, C-terminals, però la seqüència de unió d'aquests dos, el que s'anomena zona *rod*, és altament repetitiva, permetent així l'omissió d'exons codificants per aquesta regió central sense una pèrdua important de funcionalitat de la proteïna.

Però totes aquestes metodologies requereixen una infusió constant dels AOs per mantenir el seu efecte, ja que aquestes molècules acaben sent degradades. L'ideal pel tractament, seria que les

pròpies cèl·lules de l'individu produïssin aquests AOs. Per aquest motiu, també s'estan realitzant molts estudis en els quals s'usen virus com a vectors.

- Virus

L'ús de virus per tal de introduir gens dins de cèl·lules receptores presenta alguns problemes dins de camp de les distròfies musculars. La majoria dels virus amb expressió estable del transgen no presenten capacitat suficient per empaquetar gens grans. Per tant, aquesta teràpia només és viable per distròfies musculars on el gen afecte és petit. A més també s'ha usat per transduir gens no afectes en una patologia, però la sobreexpressió dels quals té efectes positius sobre patologies musculars, com ara el gen SERCA2a [172].

Com ja hem dit, el gen *DYS* és el més gran del genoma, ocupant una regió de 2,4Mb. Això fa inviable la seva incorporació dins de vectors vírics per tal de ser introduïts a les cèl·lules hostes. Per això, les teràpies gèniques basades en l'ús de vectors vírics en DMD es centren en la introducció de formes truncades de la distrofina o de AOs.

La majoria d'estudis utilitzen els adenovirus associats (AAV), que ofereixen l'avantatge d'una expressió estable a llarg termini. Per altre banda, també s'ha estudiat l'ús de AAVs per la introducció de mini o midi-distrofines en models animals de la DMD. Per exemple, s'ha demostrat la millora funcional i de l'esperança de vida d'un model murí deficient en distrofina i utrofina després de l'administració sistèmica d'una forma truncada de la distrofina (mini-distrofina) mitjançant AAVs [173].

Per altra banda, amb l'ús de vectors virals portadors de AOs s'ha aconseguit una expressió de distrofina en el model murí *mdx* pròxima als valors d'expressió normals d'aquesta proteïna [174].

Teràpia farmacològica en distròfies musculars

Dins del camp de les distròfies musculars, la majoria dels tractaments farmacològics es centren en alleujar la simptomatologia. Però en la DMD, la distròfia infantil més comú i per tant la més estudiada, s'estan desenvolupant diversos fàrmacs amb el propòsit de restablir l'expressió de la proteïna o augmentar l'expressió d'una altre proteïna amb capacitat per suplir la seva funció. Aquest és el cas del BMN195/SMTC1100, un compost que actua sobre el promotor de la utrofina-A augmentant l'expressió d'aquesta. La utrofina-A és una proteïna ortòloga a la distrofina, amb la mateixa funció però que s'expressa principalment en el teixit muscular en desenvolupament. L'expressió d'aquesta proteïna en pacients amb DMD es troba augmentada, i és capaç de restablir l'expressió normal dels membres del DGC i alleujar la patologia distròfica [175,176]. Per aquest motiu s'estan desenvolupant diferents fàrmacs amb la capacitat d'augmentar l'expressió d'aquesta proteïna en el múscul esquelètic. S'han obtingut resultats prometedors en el model murí

mdx [177]. Tot i així, la concentració d'utrofina a la membrana a l'estudi clínic no va assolir els nivells necessaris degut a una pobre biodisponibilitat de la molècula. Per això, s'estan desenvolupant altres molècules candidates que evitin aquest problema.

Altres grups han reportat altres aproximacions per tal d'augmentar els nivells d'utrofina, com ara la inhibició de la calpaïna [178], o l'increment d'expressió de les integrines [179,180] o la ADAM12 [181]. L'avantatge d'aquests tipus de teràpia és el fet de que seria aplicable a tots els pacients amb DMD, independentment de les seves mutacions.

Per altre banda, una estratègia diferent dins les teràpies farmacològiques és l'ús de la gentamicina o la PTC124 (també anomenat Ataluren). Aquests fàrmacs tenen la capacitat de provocar el salt dels codons stop prematurs per part dels ribosomes, produint així una proteïna completa. S'ha demostrat *in vitro* i *in vivo* (en el model murí mdx) que aquests fàrmacs provoquen la producció de la distrofina completa i que aquesta es localitza correctament dins la cèl·lula [182,183]. Tot i així, els assaigs clínics no han pogut demostrar una millora en la patologia dels pacients [184,185]. A més, en aquest cas la teràpia només seria efectiva en pacients amb mutacions concretes.

7.2 Teràpies en disferlinopaties

En el cas de les miopaties per dèficit de disferlina, s'han assajat teràpies cel·lulars, gèniques i farmacològiques.

Teràpies cel·lulars

S'han assajat diverses teràpies cel·lulars en models de disferlinopatia. A l'any 2002 es va reportar un estudi on es tractava el model murí SJL/J amb mioblastes murins procedents de donants transgènics Tnl-LacZ1/29. Aquests donants expressen la disferlina de manera normal i contenen el gen LacZ sota el control del promotor de la troponina I ràpida, expressant així la β -galactosidasa al citoplasma de les fibres musculars. Els mioblastes dels donants es varen injectar intramuscularment als tibials anteriors (TAs) de ratolins SJL/J. Un mes després de la injecció, es va poder observar un 20-30% de fibres que expressaven disferlina. Totes aquestes fibres positives per l'expressió de disferlina també expressaven β -galactosidasa [186].

A l'any 2004 es va reportar un estudi utilitzant cèl·lules de la sang del cordó umbilical humanes (HUCB) en el model murí de disferlinopatia SJL/J [187]. En aquest estudi es van analitzar 3 grups experimentals, un d'animals trasplantats amb les cèl·lules HUCB, un altre trasplantat amb una subpoblació LIN- CD34+/- de les cèl·lules HUCB, i un tercer grup trasplantat amb cèl·lules obtingudes de melses irradiades. Tots els animals trasplantats varen ser immunosuprimits mitjançant d'utilització de compostos químics durant tot l'estudi. Dos animals de cada grup van ser eutanasiats a les 2, 4, 8 o 12 setmanes post-trasplantament. Per determinar l'empeltament de les

cèl·lules trasplantades en el múscul esquelètic dels ratolins, es van usar tècniques immunohistoquímiques per a la detecció dels antígens específics humans NuMA i distrofina. Es va detectar l'expressió de NuMA en tots els ratolins tractats amb cèl·lules HUCB en tots els temps estudiats, però no en els trasplantats amb cèl·lules de la melsa. També es va estudiar l'expressió de disferlina en el teixit, observant una colocalització entre l'expressió de NuMA i disferlina, i entre l'expressió de distrofina i disferlina, conclouent així els autors, que la disferlina detectada era provinent de les cèl·lules trasplantades. Tot hi així, només es va detectar expressió de disferlina en < 1% de les cèl·lules NuMA positives, i només després de 12 setmanes post-transplantament. A més, l'empeltament de les cèl·lules trasplantades va ser molt baix tant en el grup tractat amb HUCB totals, com en el grup tractat amb HUCB fraccionades.

En un altre estudi es varen utilitzar cèl·lules estromals humanes derivades de teixit adipós (hASC) obtingudes de liposuccions [188]. Les hASCs obtingudes es van caracteritzar mitjançant citometria de flux i es van expandir *in vitro*. Es va estudiar la seva capacitat adipogènica, osteogènica, condrogènica, i miogènica. En aquest estudi es van tractar 3 grups de ratolins de dos mesos d'edat de la soca SJL/J. El primer grup d'animals va ser trasplantat amb hASC, el segon amb hASC diferenciades *in vitro* a llinatge miogènic durant 10 dies i el tercer grup es va usar com a animals control no trasplantats. Als animals trasplantats se'ls van subministrar les cèl·lules via endovenosa per la vena caudal durant 6 mesos, de manera setmanal durant el primer mes, i mensual durant els 5 mesos següents. Els animals varen ser eutanasiats pel seu estudi 2 mesos després de l'última administració de cèl·lules. Per avaluar l'empeltament de les cèl·lules trasplantades en els animals tractats, es va procedir a detectar DNA humà en el músculs dels ratolins, mitjançant la tècnica de PCR. Es van obtenir resultats positius en tots els animals trasplantats amb hASC no diferenciades, i en la majoria de casos, en tots els músculs de les extremitats superiors i inferiors. En canvi, no es va detectar DNA humà en cap animal trasplantat amb hASC diferenciades cap a llinatge miogènic. Per avaluar la capacitat de les cèl·lules hASC no diferenciades *in vitro*, per diferenciar a múscul esquelètic *in vivo*, es va procedir a la detecció de disferlina humana mitjançant PCR a temps real i la detecció de distrofina humana mitjançant immunohistoquímica i western blot. Es va observar una expressió de disferlina humana variable entre els diferents animals, anant del 14% al 26%. En el cas de l'estudi de l'expressió de distrofina humana, es van observar bandes per western blot als músculs proximals i distals de totes les extremitats. Mitjançant immunohistoquímica es va observar un 50%±2% de fibres positives en els animals trasplantats. Els autors, també varen estudiar la presència de limfòcits T en els músculs de tots els animals, no observant diferències entre grups. Per tant, el trasplantament de hASC ni augmenta ni disminueix la inflamació en aquest model murí. Per últim, els animals no trasplantats i trasplantats amb cèl·lules hASC van ser avaluats funcionalment mitjançant tests d'habilitat motora estandarditzats, tant a l'inici de l'estudi (2 mesos

d'edat), com prèviament a l'eutanàsia (9 mesos d'edat). Es va observar una millora del 15,2%±7% en els animals tractats amb hASC, mentre els animals no tractats, presentaven un empitjorament del 6,12%±6%. Així doncs, les hASC, tot i que són capaces de diferenciar a múscul esquelètic, no provoquen una millora important en la soca murina SJL/J. A més, tot i que augmenten l'expressió de disferlina en múscul esquelètic, aquest augment no és gaire alt i per tant sense efecte en la funció muscular, com ja s'ha observat en alguns pacients de disferlinopatia que també presenten nivells baixos d'expressió d'aquesta proteïna i tot i així presenten la malaltia.

Una altre possible teràpia cel·lular és la utilització de MABs, com ja s'ha comentat anteriorment en l'apartat general de teràpies cel·lulars en distròfies musculars. En el cas de les disferlinopaties, aquestes cèl·lules es varen testar com a possible teràpia en el model murí AJ/SCID [62]. Les cèl·lules varen ser injectades als animals o bé per via intrarterial, o intramuscular, en animals lesionats prèviament amb cardiotoxina al múscul tibial anterior (TA) i en animals no lesionats. Per tal de poder monitoritzar les cèl·lules injectades, aquestes estaven marcades amb el transgen de la β -galactosidasa. En el cas dels animals injectats via intrarterial, es va poder observar un mínim nombre de cèl·lules del donant al TA, que es veia molt augmentat en el cas dels músculs lesionats amb cardiotoxina. Tot i que el nombre de cèl·lules era baix, es detectava una mínima expressió de disferlina mitjançant western blot. En canvi, els MABs injectats via intramuscular varen colonitzar els músculs no tractats amb cardiotoxina, i especialment, els músculs lesionats amb la toxina. En el cas dels animals injectats intramuscularment, es va observar una important recuperació de l'expressió de disferlina en múscul.

Teràpia gènica en disferlinopaties

S'estan estudiant diferents opcions de cara a un possible tractament de les disferlinopaties mitjançant teràpia gènica. La majoria d'estratègies encaminades a la restauració del gen de la disferlina es basen en l'ús de virus adeno-associats (rAAV) recombinants. No obstant això, a causa de que la disferlina té un mRNA molt superior a la capacitat d'empaquetament natural dels rAAV, la transferència d'aquest gen és problemàtica. Per tal d'evadir aquesta dificultat, diversos grups han estudiat diferents opcions per mediar la recuperació de l'expressió de disferlina en models murins de disferlinopatia.

Per una banda, el grup de la Dra. Richard, ha ideat una estratègia en la qual, s'introdueix el gen sencer de la disferlina però mitjançant l'ús de dos vectors vírics. Els AAV tenen la capacitat de concatemeritzar, fent possible l'ús de més de un vector per a la introducció d'un gen no mutat en un individu *Dysf*^{-/-}. En aquest estudi, es va proposar la combinació de 2 AAV com a vectors per transfectar el cDNA complet de la *Dysf* a un model murí amb mutacions en el gen *DYSF*. En un AAV es va introduir el cDNA 5' fins a l'exó 28, i es va incloure una part de l'intró 28 amb un lloc donador

d'*splicing* ("splice site donor"). En un altre AAV es va introduir un tros d'intró amb un lloc acceptor d'*splicing* ("acceptor splice site") més el cDNA 3' del gen DYSF. Amb aquesta metodologia es va observar que, després d'una injecció intramuscular al TA amb els dos AAV, aquest múscul expressava la disferlina sencera *in vivo*. A més, es va associar l'expressió del transgen amb una millora en la histologia i en la capacitat de reparació de membrana dels músculs tractats. Per una altra banda, després d'una administració sistèmica dual dels vectors, també es va poder observar una millora en la histologia i la funció del múscul [136].

Recentment, també s'ha realitzat un estudi on s'introdueix la seqüència completa de la disferlina mitjançant un rAAV tipus 5. Aquest serotip de AAV és capaç d'infectar el múscul, tot i que amb menys eficiència que els serotips 1, 2, 6, 8, 9. Però té l'avantatge de que té un volum d'empaquetament superior, permetent la introducció de tota la seqüència de la disferlina. Aquesta teràpia es va provar en dos models murins de disferlinopatia, els ratolins A/J i els SJL/J, obtenint nivells d'expressió de disferlina suficients per corregir els dèficits funcionals al diafragma i en la reparació de membrana del múscul esquelètic [189].

- Exon skipping

La disferlina, a diferència de la distrofina, no consta de cap segment redundant. Tot i així, l'omissió d'exó es pot considerar com una possible teràpia per les disferlinopaties, ja que s'ha descrit una pacient amb un fenotip molt lleu, amb dues mutacions, una de les quals causa una ommissió d'exó natural. Aquesta mutació puntual es trobava al "*ariat branch*" de l'intró 31, causant una ommissió d'exó dins del marc de lectura de l'exó 32 [190]. Segons la base de dades UMD, el 4% dels pacients amb disferlinopatia presenten mutacions en aquest exó, convertint l'ommissió de l'exó 32 en una possible teràpia per aquesta malaltia. Mitjançant la tecnologia dels AOs, s'ha aconseguit ometre l'exó 32 en mioblastes derivats de fibroblasts provinents de pacients amb disferlinopatia i d'individus sans [191].

- Minidisferlines

El grup del Dr. Lévy, ha estudiat la possibilitat d'introduir una forma truncada de la disferlina mitjançant també un rAAV. En un pacient amb un fenotip lleu de disferlinopatia d'aparició tardana, varen identificar una deleció homozigòtica gran, que condueix a la producció d'una minidisferlina natural. La transferència d'aquesta minidisferlina al múscul esquelètic d'un model murí de disferlinopatia va demostrar la localització d'aquesta a la membrana plasmàtica de les cèl·lules musculars, i la reparació eficient de les lesions del sarcolemma. Així, com ja s'ha demostrat en el cas de la distrofina, una forma truncada del gen de la disferlina també és funcional, el que

suggereix que l'estructura de la disferlina podria ser modular i això facilitaria la teràpia gènica [192].

Per altre banda, el grup del Dr. Sinnreich, va realitzar un estudi funcional amb diverses formes truncades de la disferlina (mini- i midi- disferlines) per tal de constatar quins dominis C2 de la proteïna son indispensables per la seva funció i la seva localització a la membrana i quins són redundants. D'aquesta manera, es podria plantejar una teràpia gènica amb aquestes formes truncades, molt més fàcilment empaquetables en virus o altres vectors. De totes les formes truncades de disferlina estudiades, varen constatar que només aquelles amb els dominis C2A, C2F i C2G intactes es localitzaven a la membrana plasmàtica. Per estudiar la funcionalitat d'aquestes mini i midi-disferlines, varen transfectar amb els diferents constructes la línia de mioblastes humans deficientes en disferlina ULM1/01. Mitjançant un estudi de lesió amb laser varen observar que només reparaven aquelles cèl·lules transfectades amb formes amb els dominis C2A, C2F o C2G intactes. També varen observar que, tot hi que la minidisferlina amb aquests dominis intactes però sense el domini C2D era capaç de localitzar-se a la membrana plasmàtica, no reparava amb la mateixa eficiència, demostrant així que aquest domini és requerit per la reparació de membrana [193].

Teràpia farmacològica

- PTC124

El PTC124 és un fàrmac que s'ha demostrat que provoca que la maquinaria de traducció no detecti els codons stop prematurs [182]. Aquesta droga s'està assajant pel tractament de diverses patologies, tot hi que només és útil en els pacients amb mutacions de tipus "nonsense". Wang i col·laboradors varen realitzar un estudi l'any 2010 amb aquest fàrmac en cultius de miotubs de pacients amb disferlinopatia que presentaven aquest tipus de mutacions. Després del tractament dels miotubs amb el PTC124, varen observar una expressió de disferlina del 15% aproximadament. Varen realitzar també un estudi funcional d'aquesta proteïna, observant que la disferlina produïda era capaç de reparar la membrana cel·lular [194].

- Dantrolen

A l'any 2007 es varen descriure dos germans que presentaven mutacions en el gen DYSF i varen ser tractats amb Dantrolen degut a un error de diagnòstic inicial en el qual se'ls va diagnosticar de polimiositis. El Dantrolen és un relaxant muscular que actua abolint l'acoblament excitació-contracció, al impedir la sortida de calci del SR mitjançant la inhibició del RyR. A un dels germans se li va suspendre el tractament per problemes hepàtics. Quan se'ls va diagnosticar de miopatia de Miyoshi, es varen comparar els nivells de CKs en sang d'ambdós germans i varen detectar nivells

reduïts en el germà que seguia amb tractament amb Dantrolen. Probablement l'efecte positiu del Dantrolen en aquests pacients és degut a la disminució de lesions sarcolemals per una reducció de l'activitat contràctil [195].

- Rituximab

El Rituximab és un fàrmac que depleciona els limfòcits B. S'usa en el tractament de pacients afectes de polimiositis, una patologia muscular sovint diagnosticada per error en pacients amb disferlinopatia, degut a les seves similituds en la inflamació muscular. L'any 2010 es varen reportar dos pacients amb disferlinopatia, prèviament diagnosticats de polimiositis, que presentaven una millora en la força muscular després de ser tractats amb Rituximab. Es va estudiar el nombre de cèl·lules B presents en sang, i el pic on la millora funcional era màxima coincidia amb el pic mínim de limfòcits B en sang perifèrica [196]. Tot hi així, no s'ha demostrat la implicació de les cèl·lules B en la fisiopatologia de les disferlinopaties, i probablement, el tractament amb rituximab no és efectiu en la majoria dels pacients.

-.Anti-TNF

De forma anàloga al que s'ha comentat sobre la teràpia amb Rituximab, una línia de recerca en teràpies per les disferlinopaties es basa en el fet de que aquesta patologia presenta inflamació al múscul. Aquests infiltrats inflamatoris podrien tenir relació amb la presència de citoquines alliberades per les fibres danyades, que podrien augmentar la necrosi. Nemoto i col·laboradors varen tractar el model murí SJL/J amb Etanercept, un fàrmac bloquejant del factor de necrosi tumoral (TNF), una citoquina pro-inflamatòria. Després del tractament, aquests ratolins presentaven una reducció dels infiltrats inflamatoris, de la necrosi i una disminució de la formació de teixit fibrós i adipós en el múscul esquelètic. Aquests resultats indiquen que el TNF podria tenir un paper en les disferlinopaties i que bloquejar aquest factor podria ser una teràpia potencial [197].

-.Activitat anti-proteosoma

Una altra aproximació farmacològica per la teràpia de les disferlinopaties és l'ús del Lactacystin o el Bortezomib (Velcade). Aquests dos fàrmacs són capaços d'inhibir la degradació proteica per la via del proteosoma. S'ha descrit l'existència de dues vies de degradació de la disferlina. La majoritària és la via de la ubiquitina/proteosoma [198]. Quan un pacient presenta una mutació *missense* en la disferlina, la proteïna generada es degrada ràpidament per aquesta via. Amb aquestes dades, Azakir i col·laboradors, es varen plantejar el tractament de pacients amb inhibidors del proteosoma. Varen realitzar un estudi amb mioblastes humans sense mutacions a la disferlina, cèl·lules amb mutacions *missense* i cèl·lules amb al·lels nuls. Les varen tractar amb

inhibidors del proteosoma i inhibidors lisosomals, observant expressió de disferlina únicament en els controls i les cèl·lules amb mutacions de tipus *missense* després del tractament amb inhibidors del proteosoma. A més, varen comprovar que aquestes cèl·lules que re-expressaven disferlina eren capaces de segellar la membrana cel·lular i de formar miotubs [199].

-Vitamina D₃

La vitamina D₃ és un heterolípid insaponificable del grup dels esteroides. Aquesta vitamina provoca la diferenciació a monòcit de la línia cel·lular premyelocítica HL60 [200,201]. Aquestes cèl·lules diferenciades passen a expressar nivells alts de disferlina. Hi ha altres compostos que promouen la diferenciació d'aquesta línia cel·lular, però l'expressió de disferlina és menor. Per aquest motiu, es va decidir estudiar l'efecte de la vitamina D₃ sobre l'expressió de disferlina tant en múscul com en monòcits de sang perifèrica. Es va observar que la vitamina D₃ augmentava l'expressió *in vitro* de disferlina tant en miotubs com en monòcits d'individus portadors d'una única mutació al gen DYSF. Per aquest motiu es va dissenyar un assaig clínic en el que es van administrar 16.000-32.000 UI de vitamina D₃ via oral en individus portadors de disferlinopatia que presenten nivells reduïts de disferlina en monòcits de sang perifèrica. Al cap d'un any de tractament, els portadors de disferlinopatia tractats amb vitamina D₃ presentaven un augment significatiu de l'expressió de disferlina en monòcits de sang perifèrica [202]. Així doncs, el tractament amb vitamina D₃ podria administrar-se en combinació amb les altres teràpies que ja hem comentat, incrementant encara més els nivells d'expressió de la proteïna i millorant per tant la seva eficàcia.

HIPÒTESIS I OBJECTIUS

Hipòtesis:

Diversos estudis de teràpia cel·lular en distròfies musculars han demostrat que diferents tipus cel·lulars de la línia hematopoyètica són capaços de fusionar-se amb el múscul esquelètic i/o de millorar el fenotip. L'inconvenient d'aquestes teràpies és la incapacitat d'aquestes cèl·lules de expressar proteïnes musculars. Com s'ha descrit, la disferlina és una proteïna muscular que també s'expressa en els monòcits de sang perifèrica i en els macròfags. Per tant, una teràpia cel·lular amb cèl·lules hematopoyètiques podria ser eficaç en el tractament de les disferlinopaties.

Per altra banda, tot i que s'ha reportat que la disferlina té un paper en la reparació de membrana després d'un dany, diferents estudis suggereixen que té altres funcions. La nostra hipòtesi és que l'estudi de l'interactoma pot ser d'utilitat per a conèixer millor la funció de la proteïna.

Objectius:

- 1- Desenvolupar diferents assaigs *in vitro* utilitzant cultius primaris de múscul esquelètic humà així com monòcits de sang perifèrica humans que ens permetin avaluar la seva cinètica de reparació de membrana o d'altres possibles funcions de la disferlina.
- 2- Estudiar les interaccions de la disferlina en múscul esquelètic per tal de comprendre millor les seves funcions.
- 3.- Demostrar la capacitat de fusió entre línies monocítiques i cultius primaris de cèl·lules musculars humanes.
- 4- Avaluar el potencial efecte terapèutic del trasplantament de moll d'os en un model de ratolí amb dèficit per disferlina amb moll d'os d'un donant amb expressió normal de disferlina.

MATERIAL I MÈTODES

1. Mostres

1.1 Cultiu cel·lular

Cultiu primari de cèl·lules musculars

Els estudis *in vitro* es van realitzar amb cultius primaris de múscul esquelètic humà, provinents de biòpsies de pacients de traumatologia, sense malalties neuromusculars, o de pacients amb patologia muscular coneguda provinents del departament de neurologia de l'Hospital de Sant Pau. Tots els pacients havien signat un consentiment informat per a utilitzar les seves mostres de múscul per a projectes de recerca. Les cèl·lules es van obtenir a partir d'explants de múscul tal i com va descriure prèviament el Dr. Askanas [203], i posteriorment es van purificar mitjançant el mètode de separació cel·lular de Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemanya) basat en el marcatge dels mioblastes amb un anticòs contra CD56 marcat amb boles magnètiques. Les cèl·lules es van incubar en medi de proliferació per mioblastes humans a base de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) complementat amb un 10% de sèrum boví fetal (FBS), glutamina, antibiòtics i factors de creixement (EGF i b-FGF). Per la seva diferenciació a miotubs es va usar el mateix medi sense factors de creixement i amb un 2% de FBS.

Cultiu de la línia cel·lular HL60

Degut a la dificultat del cultiu *in vitro* de monòcits/macròfags primaris humans i de la dificultat de seva obtenció, les cèl·lules monocítiques usades en alguns dels experiments d'aquest treball provenien de l'estimulació de la línia cel·lular premyelocítica HL60, amb capacitat per diferenciar a monòcit/macròfag després d'un tractament amb vitamina D₃ (Sigma, St. Louis, MO, USA) a una concentració de 100nM durant 72h [200,201]. Aquestes cèl·lules es van proliferar amb medi *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMIM) complementat amb un 20% de FBS i antibiòtics.

Cultiu de monòcits/macròfags humans

Es van cultivar cèl·lules monocítiques humanes de sang perifèrica de 5 pacients i 5 controls sans. Per l'obtenció d'aquestes es van usar els tubs Vacutainer CPT (Becton Dickinson, Basilea, Suïssa), i a partir de una mostra de sang total es va procedir a separar la fracció CD14+.

Mostra	num. de cèl·lules estudiades
control 1	7
control 2	5
control 3	2
control 4	2
control 5	1
pacient 1	3
pacient 2	8
pacient 3	5
pacient 4	4
pacient 5	9

Taula 4. Pacients i controls usats pels estudis *in vitro* de macròfags.

-Separació de monòcits CD14+ de sang perifèrica

Es van recol·lectar les mostres de sang dels pacients i els controls sans en tubs CPTs. Els tubs CPT presenten una resina que permet la separació de la línia blanca mononuclear de la resta mitjançant al centrifugació.

Un cop centrifugats els tubs a 2790rpm durant 20 minuts a temperatura ambient, es varen separar les cèl·lules que presentaven l'antigen CD14, mitjançant el mètode Easysep (Stemcell technologies, Grenoble, França) per la selecció negativa d'aquest marcador. Aquest mètode es basa en un còctel d'anticossos contra diferents marcadors cel·lulars present en les cèl·lules sanguínies. Mitjançant un sistema de boles magnètiques podem retenir totes les cèl·lules marcades amb un iman, separant així la fracció CD14+, que és la única que no ha estat marcada.

Les cèl·lules obtingudes mitjançant aquest mètode varen ser cultivades durant 6 dies amb un medi a base de *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1640) complementat amb el 10% de FBS, 1% glutamina, 1% piruvat sòdic, penicilina-streptomina i fungizona, i aminoàcids. Aquest medi també tenia el factor de creixement GM-CSF a una concentració de 50 ng/ml (Peprotech, London, UK) per tal de diferenciar els monòcits a macròfags. Les cèl·lules es varen créixer en plaques Lumox (Sartedt, Nümbrecht, Alemanya) coatades amb poli-D-lisina.

1.2 Models animals

Pels estudis *in vivo*, es va usar el model murí de distròfia muscular per dèficit de disferlina A/J *Dysf^{prmd}* (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) [134]. Aquest model no expressa disferlina degut a la inserció de un retrotransposó en l'intró 4 del gen *DYSF* que causa un *splicing* aberrant. Com a control sà i donant de moll d'os, es va usar la soca de ratolí A/J (Harlan Iberica, Sant Feliu de Codines, Espanya), que presenta el mateix fons genètic sense mutacions en el gen *DYSF*. Així doncs, aquestes dues soques són completament histocompatibles.

Tots els procediments realitzats en animals d'aquest estudi van ser revisats i aprovats pel Comitè d'Experimentació Animal de l'Hospital Vall d'Hebrón i de la Universitat Autònoma de Barcelona.

1.3 Biòpsies

Tots els estudis d'aquesta tesi realitzats amb teixit muscular adult humà es van realitzar a partir de biòpsies de controls sans provinents del departament de traumatologia o de biòpsies de pacients de distròfies musculars provinents del servei de neurologia. Tots els pacients varen signar un consentiment informat i el projecte va ser aprovat per el comitè ètic de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (codi 12/2009).

2. Procediments *in vitro*

2.1 Transfecció cel·lular

Transfecció de la línia HL60

Per la transfecció de la línia cel·lular HL60 diferenciada a monòcit es va usar el kit Amaxa Cell Line Nucleofector V (Lonza, Allendale, NJ, USA), el qual ja incorpora un plàsmid pmaxGFP amb expressió constitutiva de la proteïna verd fluorescent. La transfecció es va realitzar en un aparell d'electroporació Nucleofector II en les condicions establertes pel fabricant (Lonza). La línia HL60 es va transfectar prèviament a la seva diferenciació amb vitamina D₃.

2.2 Lesió de miotubs en cultiu

Per la lesió de cèl·lules musculars *in vitro*, es van usar cultius primaris humans de múscul esquelètic diferenciats. Aquestes cèl·lules van ser lesionades a 37°C durant 2' amb un medi Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) complementat amb 1,8mM Ca²⁺ i 0,25mM de SDS o durant 5' amb HBSS complementat amb 1,8mM Ca²⁺ i 10mM de ionomicina (Sigma). Després de la lesió, les cèl·lules van ser rentades amb el mateix medi sense SDS ni ionomicina però amb Ca²⁺. Com a control, es va usar un cultiu de miotubs no lesionats tractats amb HBSS 1,8mM Ca²⁺.

2.3 Co-cultiu de miotubs i HL60 marcada i anàlisi de l'índex de fusió

Un cop lesionades les cèl·lules musculars i marcada la línia HL60, es va procedir al co-cultiu dels dos tipus cel·lulars. El co-cultiu es va realitzar per duplicat en cambres de 4 pous en suport de vidre (Millipore, Darmstadt, Alemanya) adequats per microscopia de fluorescència. En tots els pous es van sembrar 20.000 mioblastes/cm² que un cop diferenciats a miotubs es van incubar amb 300.000 cèl·lules HL60 per pou.

Per l'anàlisi de la fusió entre miotubs i HL60 marcades amb GFP, es va procedir a valorar visualment l'aparició de miotubs de color verd, mitjançant un microscopi invertit de fluorescència Olympus CKX41 (Olympus, Tokyo, Japó) a les 48h de co-cultiu, amb l'objectiu de 10X. Es van contar tots els miotubs verds de cada pou, i es va fer la mitja entre rèpliques. Les fotografies van ser adquirides amb una càmera Olympus DP20.

3. Procediments *in vivo*

3.1 Trasplantament de moll d'os

Obtenció del moll d'os

El moll d'os dels donants va ser obtingut post-mórtem mitjançant la tècnica del rentat (*flushing*) del húmer, tibia i peroné de 3 ratolins mascles A/J $Dysf^{prmd}$ i de 3 ratolins mascles A/J $Dysf^{+/+}$. Les cèl·lules obtingudes van ser contades i resuspeses en serum fisiològic a una concentració de $3 \cdot 10^6$ cèl·lules en 200 μ L.

Mieloablació

Els ratolins receptors del primer trasplantament van rebre una dosi letal d'irradiació gamma provinent d'un nucli de Cesi. Aquesta irradiació els va ser aplicada en dues tandes de 4'5Gy en l'espai de temps d'una hora.

Els ratolins receptors del segon trasplantament van rebre una dosi subletal d'irradiació gamma provinent d'un nucli de Cesi. Aquesta irradiació els va ser aplicada en una única tanda de 4,5Gy.

Trasplantament

Posteriorment es va procedir a la injecció 3.000.000 cèl·lules resuspeses en 200 μ L de sèrum fisiològic a cada ratolí receptor mitjançant una injecció a la vena caudal o en el seu defecte, per via intraperitoneal.

Tots els ratolins es van mantenir en racks ventilats i en condicions d'esterilitat durant tot l'estudi. Addicionalment, se'ls va administrar antibiòtics durant els 7 dies anteriors al trasplantament i durant un mes post-trasplantament.

3.2 Lesió amb cardiotoxina

A un mes post-trasplantament, els animals trasplantats autòlogament i heteròlogament del segon trasplantament van ser lesionats amb l'administració intramuscular de 25 μ L de cardiotoxina (CTX) 10^{-5} M (Latoxan, Valence, França) al llarg de tot el múscul tibial anterior (TA) [62]. El procediment

es va realitzar sota anestèsia general i els animals van rebre una dosi de 1mg/kg de Meloxicam abans de l'operació i durant els 3 dies següents.

3.3 Tests funcionals

Electromiografia

Per la realització dels test de conducció nerviosa es va seguir un protocol estandarditzat, el nervi ciàtic va ser estimulat percutàniament amb polsos individuals de 0,02ms (Grass S88) lliurats a través d'un parell d'elèctrodes d'agulla que es van col·locar en l'osca ciàtica. Els estudis de conducció motora i els potencials d'acció (ona M) van ser enregistrats del TA i dels músculs plantars (interossis) amb elèctrodes de microagulla [204,205]. Es va mesurar la latència inicial (el temps transcorregut entre l'estímul i l'aparició de la primera desviació negativa) i la màxima amplitud de l'ona M. Tots els potencials es varen amplificar i visualitzar en un oscil·loscopi digital (Tektronix 450S, Beaverton, Oregon, USA). Per assegurar la reproductibilitat, les agulles es van col·locar sota un microscopi, guiats per punts de referència anatòmics, per tal d'assegurar que es situaven en la mateixa posició en tots els animals. Durant les proves, la temperatura corporal dels ratolins es va mantenir constant entre 34-36 °C gràcies a un coixí amb calefacció i termòstat.

Després de les proves de conducció nerviosa, amb els ratolins sota anestèsia lleugera, es van obtenir enregistraments electromiogràfics (EMG) dels potencials d'acció de les unitats motores (MUAPs) dels músculs TA i plantar seguint un protocol similar al descrit prèviament a ratolins mdx [204].

Els registres es van obtenir en condicions de repòs després d'aplicar estímuls nocius subministrats en forma de lleugeres punxades a la cua per provocar esclats d'activitat electromiogràfica. Les senyals varen ser digitalitzades (Powerlab 6T, ADInstruments, Spechbach, Alemanya) i introduïdes en un software gràfic per tal de realitzar l'anàlisi estadístic posthoc.

De cada ratolí dels quatre grups, els MUAPs registrats van ser dividits en amplitud petita, mitjana i gran i almenys sis MUAPs diferents de cada classe es van seleccionar per l'anàlisi. Els següents paràmetres de durada, amplitud i nombre de fases dels MUAP van ser mesurats.

Aquest estudi va ser realitzat al laboratori del Dr. Xavier Navarro al departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Digigait

L'anàlisi de la motilitat es va realitzar utilitzant un sistema de imatge DigiGait (Mouse Specifics, Quincy, MA, USA). Les imatges de vídeo digitals de les passes dels ratolins es van recol·lectar amb

una càmera de vídeo d'alta velocitat (80 fotogrames per segon) des de sota d'una cinta transparent motoritzada. Tots els ratolins van passar un període per tal d'habituar-se a la cinta i a les condicions de la prova. Cada ratolí va poder explorar l'aparell amb la velocitat del motor a zero, durant 5 minuts. Després, la velocitat del motor es va fixar a 20cm/s per tal de realitzar la prova. Es van recol·lectar un mínim de 200 imatges per cada ratolí durant la marxa, de manera que almenys 5-7 passes varen ser monitoritzades. Cada vídeo representant 12.5 ms va ser digitalitzat i l'àrea de la petjada (en píxels) va ser calculada amb el software DigiGait [206,207,208].

Aquest estudi va ser realitzat al laboratori del Dr. Xavier Navarro al departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de l'Institut de Neurociències de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.4 Eutanàsia dels animals i extracció de mostres

En el primer trasplantament, es va procedir a l'eutanàsia i extracció de mostra als 3 mesos i 10 mesos post-trasplantament. L'eutanàsia es va realitzar mitjançant sobredosis d'anestèsic (isofluorà). Es van extreure mostres de quàdriceps, gastrocnemi, tibial anterior (TA) i melsa. L'expressió de disferlina va ser estudiada en aquestes mostres mitjançant western blot i immunohistoquímica.

Els animals tractats amb cardiotoxina del segon trasplantament, van ser eutanasiats de la mateixa manera 6 setmanes després de la lesió amb la toxina, i es va procedir a l'extracció de mostra de quàdriceps, gastrocnemi, tibial anterior i melsa a una setmana.

Totes les mostres es van congelar en metilbutà refredat amb nitrogen líquid durant 25 segons, i es van emmagatzemar en tancs de nitrogen líquid fins al seu ús.

4. Tractament de mostres

4.1 Tècniques de manipulació de DNA

Obtenció de DNA per el genotipatge de ratolins

Tots els ratolins d'aquest estudi han estat genotipats prèviament al trasplantament. El DNA es va obtenir d'una porció de pell de l'orella dels animals mitjançant un kit d'extracció Danapure Turbo per teixits i cèl·lules (GeneDan, Barcelona, Espanya).

Genotipat

Amb el DNA obtingut es van fer 3 PCRs per cada animal, una amb els encebadors *Forward* (F) i *Reverse* (R) que amplifiquen 207pb de l'intró 4, una altre amb l'encebador *Forward* i l'encebador ETnoR que hibrida amb el retrotransposó, amplificant una regió de l'intró 4 i una regió del

retrotransposó de 234bp, i una altre amb els encebadors Reverse i el ETnR2, que hibrida per l'altre extrem del retrotransposó, produint un fragment de DNA de 416pb. Així doncs, en el cas dels ratolins control, només hem d'obtenir una banda de 207bp en la combinació F/R, i en els ratolins A/J *DYSF*^{prmd} hem d'obtenir bandes de 234bp i 416bp en les dues PCRs que impliquen al retrotransposó [134].

Els productes de PCR es van córrer en gels d'agarosa al 3%. Les imatges es van adquirir amb sistema de fotodocumentació GelDoc (BioRad, Hercules, CA, USA).

4.2 Tècniques de manipulació de RNA

Obtenció de RNA

En aquest estudi es varen extreure mostres de RNA dels músculs de ratolins per tal de realitzar un anàlisi de l'expressió gènica per la tècnica de PCR a temps real.

El RNA es va obtenir mitjançant la homogeneïtzació del teixit amb Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc, Houston, TX, USA) i la separació d'aquests amb cloroform. El RNA es va precipitar amb isopropanol i es va resuspendre en aigua destil·lada. Totes les mostres es van quantificar amb un Nanodrop model ND1000 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

PCR a Temps Real (*Real Time-PCR*)

Les mostres de RNA total (1250 ng) de 5-6 animals de cada grup de tractament varen ser transcrites reversament a cDNA utilitzant la transcriptasa reversa MultiScribe (Applied Biosystems, Warrington, UK). Es va realitzar la quantificació de l'expressió del gen *DYSF* i per tal de normalitzar l'expressió d'aquests, també es va quantificar la del gen *GAPDH*. La quantificació del mRNA codificant d'aquests dos gens es va realitzar utilitzant la tecnologia TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). La PCR quantitativa es va realitzar en un volum final de 12µL per pou. Els encebadors utilitzats per amplificar el cDNA per PCR a temps real van ser dissenyats per Applied Biosystems (*DYSF*, Mm00458042_m1, *GAPD*, 4352932E). Es va usar el mètode comparatiu CT ($\Delta\Delta CT$) per tal de quantificar relativament l'expressió genètica [63], ja que tant el gen diana com el normalitzador presenten una dinàmica similar.

Els experiments de PCR a temps real es varen realitzar en plaques de 384 pous en un aparell "*Fast Real-Time PCR System*" d'Applied Biosystems model 7900HT. Els estudis de PCR a temps real es van fer en tres rèpliques, en dos experiments independents.

4.3 Tècniques de manipulació de proteïnes

En aquest treball les mostres de proteïna es varen analitzar per diverses tècniques: western blot, immunoprecipitació i blue native. Per cada tècnica, la preparació de la mostra es va realitzar mitjançant un protocol diferent.

Preparació d'extracte de proteïna per western blot

L'obtenció de proteïna per l'anàlisi mitjançant western blot es va realitzar amb el tampó de Nicholson ((0.125 mol/L de Tris/HCl a pH 6.4, 10% de glicerol, 4% de SDS, 4 mol/L d'urea, 10% of mercaptoetanol, i 0.001% of bromofenol blau) [209]. Es varen pesar les mostres i es va afegir 19ul de tampó/mg de teixit, obtenint així una extracte a 200ug de proteïna per cada 30ul. El teixit muscular es va homogeneïtzar mecànicament amb un "pellet pestle". Les mostres de cèl·lules en cultiu es varen homogeneïtzar per sonicació amb un sonicador Misonix (Farmingdale, NY, USA) i, en el cas de les cèl·lules monocítiques (monòcits, HL60 o THP1) per mitja de cicles de congelació/descongelació per tal de degradar les altes quantitats de DNA presents a la mostra.

Preparació d'extracte de proteïna per immunoprecipitació

Els assaigs d'immunoprecipitació realitzats en aquests treball es varen fer a partir d'extractes de proteïna obtinguts de múscul humà adult i de cultius primaris de miotubs humans.

Aquests extractes proteics es varen obtenir mitjançant la utilització d'un tampó de lisi que contenia 50 mM Tris HCl a un pH de 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% de Tritó X100 i 1x còctel d'inhibidor de proteases (GE Healthcare Lifesciences, Freiburg, Alemanya) en gel. Tots els extractes varen ser sonicats. Els lisats es varen centrifugar a 13.000rpm i a 4°C, durant 30 min.

Obtenció de proteïna per Blue Native

En aquest estudi la tècnica de Blue Native es va realitzar a partir de mostres de biòpsies musculars. Les mostres es van preparar amb el tampó de mostra NativePage Sample buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) afegint-li un 2% de digitonina (ràtio detergent: proteïna 2:1) i barrejant per inversió i pipeteig amunt i avall. Després les mostres es varen incubar durant 15 minuts en gel i es van centrifugar a 20.000 x g durant 30 minuts a 4°C.

Just abans de carregar les mostres als gels NativePAGE™ Novex Bis-Tris , es va afegir l'additiu NativePAGE™ 5% G-250 obtenint una concentració final d'aquests de una ¼ part de la concentració de detergent.

4.4 Tècniques de manipulació de teixits

Talls citostàtics

Per a la realització de tots els estudis immunohistoquímics i histoquímics d'aquest treball, tant en mostres de biòpsies humanes com de ratolí, es van usar crioseccions de 7µm, realitzades amb un criòstat Leica CM3050 (Nussloch, Alemanya).

Histoquímiques

Per a la descripció histològica de les mostres extretes es va procedir a la tinció pel mètode estàndard de hematoxilina & eosina (H&E) [210].

4.5 Tècniques per l'estudi de proteïnes

Immunodetecció

En aquest treball s'han usat diverses tècniques per la immunodetecció de proteïnes. Els anticossos usats es mostren a les taula 5 i 6.

Antigen	epítóp/ especificitat	tipus d'anticòs	Companyia	Tècnica d'ús	dilució
Disferlina (Hamlet)	aa 1999-2016	MoAb/ mouse IgG1	Novocastra	FLIM, WB, IHQ	1/20-1/300
Disferlina	C-terminal	PoAb/ Rabbit polyclonal	AbCam	FLIM	1/20
Disferlina (Romeo)	123-142	MoAb/ Rabbit monoclonal IgG	Epitomics	IHQ	1/20
Disferlina	N-terminal	Llama-derived	*	IP	20ug/ml
Trim72	aa 1-269	MoAb/ mouse polyclonal IgG	AbCam	FLIM	1/20
Trim72	aa 288-337	PoAb/ rabbit IgG	AbCam	FLIM, IHQ, WB	1/20-1/300
AHNAK	N-terminal	MoAb/ Mouse IgG1	AbCam	FLIM	1/100
Caveolina-3	aa 3-24	MoAb/Mouse IgG1	BD	FLIM	1/10
HGF	aa 108-157	PoAb/Rabbit IgG	AbCam	WB	1/500
F4/80	Proteïna completa	PoAb/ Rat IgG2a	Acris	IHQ	1/300
CD206	Proteïna quimèrica	MoAb/ Rat IgG2a	LifeSpan Biosciences	IHQ	1/20
CD11b	desconegut	PoAb/ Rat IgG2b	LifeSpan Biosciences	IHQ	1/20
CD68	desconegut	MoAb IgG1	Sigma	ICQ	1/20
tubulina	C-terminal	MoAb/ Mouse IgG1	Sigma	WB	1/2000
β-actina	desconegut	MoAb/ Mouse IgG1	Sigma	WB	1/2000
Dineïna	Proteïna completa	MoAb/ Mouse IgG2ak	Sigma	FLIM, WB, IHQ, IP	1/20- 1/300
Annexina A1	Proteïna completa	PoAb/ rabbit polyclonal	Invitrogen	FLIM	1/20
Annexina A2	aa 1-50	PoAb/ Rabbit policlonal IgG	Santa Cruz	FLIM	1/20
Miomesina-2	N-terminal	PoAb/ goat polyclonal	Santa Cruz	FLIM	1/10
Miomesina-2	N-terminal	PoAb/ goat polyclonal	Santa Cruz	FLIM	1/10

Calseqüestrina-1	aa 31-90	PoAb/ rabbit polyclonal	Santa Cruz	FLIM	1/40
Distrofina	C-terminal	MoAb	Novocastra	FLIM	1/8
Distrofina	aa 3661-3677	PoAb/rabbit polyclonal IgG	AbCam	FLIM	1/100
Lamp1	desconegut	MoAb/ Mouse IgG1	AbCam	ICQ, IHQ	1/20

Taula 5. Anticossos primaris usats en aquest treball. ICQ, immunocitoquímica; IHQ, immunohistoquímica; WB, western blot; IP, Immunoprecipitació; FLIM, fluorescence lifetime imaging microscope.

Anticòs	Origen	Antigen	Marca	Marcatge	Tècnica	Dilució
GAM Fluor Alexa 488	cabra	ratolí	Invitrogen	fluorescent	IHQ, ICQ	1/200
GAR Fluor Alexa 594	cabra	conill	Invitrogen	fluorescent	IHQ, ICQ	1/200
DAM Fluor Alexa 488	ase	ratolí	Invitrogen	fluorescent	FLIM-FRET	1/200
DAR Fluor Alexa 555	ase	conill	Invitrogen	fluorescent	FLIM-FRET	1/200
DAG Fluor Alexa 555	ase	cabra	Invitrogen	fluorescent	FLIM-FRET	1/200
GAM 800	cabra	ratolí	Li-Cor	infrarroig	WB	1/7500
GAR 680	cabra	conill	Li-Cor	infrarroig	WB	1/7500
GAM-HRP	cabra	ratolí	Jackson	HRP	BN-wb	1/300
GAR-HRP	cabra	conill	Jackson	HRP	IHQ	1/50
GARat-HRP	cabra	rata	Jackson	HRP	IHQ	1/50

Taula 6. Anticossos secundaris usats en aquest treball. HRP, peroxidasa de rave; IHQ, immunohistoquímica; ICQ, immunocitoquímica; FLIM-FRET, fluorescence lifetime imaging microscope-fluorescence resonance energy transfer; BN, Blue Native

- Immunohistoquímica

Totes les immunohistoquímiques d'aquest estudi es van realitzar en 4 passos principals: fixació de la mostra, bloqueig, incubació d'un anticòs primari específic contra la proteïna d'interès i incubació d'un anticòs secundari específic contra la fracció constant de l'anticòs primari. Per a la visualització de les immunohistoquímiques es varen usar dos procediments: l'ús d'anticossos secundaris marcats amb un fluorocrom, o l'ús d'anticossos secundaris marcats amb un enzim. En el cas de les IHQ realitzades amb secundaris marcats enzimàticament, es va requerir d'un darrer pas de revelat.

Fixació: tots els talls d'aquest estudi varen ser fixats amb acetona durant 5 minuts.

Bloqueig: En el cas de usar anticossos secundaris marcats amb peroxidasa de rave (HRP), el primer pas es bloquejar les peroxidases internes del teixit. Això es va fer usant una solució de H₂O₂ diluïda 1/20 aplicada sobre el teixit durant 30'. En totes les IHQ d'aquest estudi es va realitzar un bloqueig de 30-45' amb una solució a base de tampó salí amb tris, al 2% d'albumina, 10% de sèrum humà normal i al 5% de sèrum normal de cabra o d'ase. Aquesta solució satura els llocs d'unió inespecífics del teixit, eliminant els falsos positius.

Incubació de l'anticòs primari: els anticossos primaris es varen diluir a la concentració adequada (veure taula 5) en tampó de bloqueig i es varen incubar durant 1-2h a temperatura ambient (RT).

Incubació de l'anticòs secundari: després de realitzar diversos rentats amb solució salina tamponada amb tris, es va incubar l'anticòs secundari a la dilució adequada (veure taula 6) en tampó de bloqueig durant 1h a RT.

Revelat: En el cas d'haver usat un anticòs secundari marcat amb HRP, aquesta es revelava mitjançant l'aplicació del seu substrat (H_2O_2) amb el kit DAB (Vector Laboratories, Peterborough, UK).

Les IHQ marcades amb fluorescència es van muntar amb Fluoprep (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França). Les marcades amb HRP es van muntar amb Aquatex (Merck chemicals, Darmstadt, Alemanya).

- Immunocitoquímica

Totes les ICQ d'aquest estudi es van realitzar usant el següent protocol:

Fixació: posteriorment al rentat de les cèl·lules, aquestes varen ser fixades amb metanol a 4°C durant 10', en el cas de voler permeabilitzar les cèl·lules, o amb paraformaldehid al 4% durant 5 minuts a TA, en el cas de no voler permeabilitzar-les.

Bloqueig: En totes les ICQ d'aquest estudi es va realitzar un bloqueig de 45' amb un tampó de bloqueig a base de salí tamponat amb tris, 2% d'albumina, 10% de sèrum humà normal i al 5% de sèrum normal d'ase o de cabra. En el cas de voler permeabilitzar les cèl·lules, el tampó de bloqueig es va complementar amb un 0,01% del detergent Tritó X100, per tal de permeabilitat millor les membranes.

Incubació de l'anticòs primari: els anticossos primaris es varen diluir a la concentració adequada (veure taula 5) en tampó de bloqueig i es varen incubar durant 2h RT.

Incubació de l'anticòs secundari: després de realitzar diversos rentats amb solució salina amb tris, es va incubar l'anticòs secundari marcat amb fluorescència a la dilució adequada (veure taula 6) en tampó de bloqueig sempre sense detergent durant 1h a RT.

Marcatge nuclear: en el cas d'aquelles immunohistoquímiques on volíem visualitzar els nuclis, es va realitzar una tinció amb Hoechst 33342 (Invitrogen) diluït 1/1000 en tampó de rentat durant 5 minuts a RT.

Totes les ICQ es van montar amb Fluoprep (Biomérieux).

- Immunocitoquímiques per anàlisi de FLIM/FRET

Per l'estudi de les interaccions proteiques mitjançant la tècnica de FLIM/FRET, es varen realitzar immunomarcats dobles en cèl·lules crescudes en cambres de 8 pous en suport de vidre (Millipore) seguint el protocol estàndard de ICQ amb les següents modificacions: es varen

combinar 2 anticossos primaris de diferents espècies per detectar simultàniament dos proteïnes. Els anticossos primaris combinats van ser incubats alhora, mentre que els secundaris varen ser incubats seqüencialment, aplicant sempre primer el anticòs secundari marcat amb el fluorocrom donant (Alexa Fluor 488, verd).

- Western-Blot

Per l'anàlisi dels nivells de proteïna, els extractes proteics van ser analitzats mitjançant Western-blot en gels d'acrilamida. Tots els gels constaven de un gel concentrador (al 4% d'acrilamida) i un gel separador (al 8-10% d'acrilamida). Les mostres es varen córrer en un sistema miniprotean (BioRad), a 20-40mA constants durant 1-2h. Per tal de immunodetectar les proteïnes d'interès, els gels van ser transferits a membranes de nitrocel·lulosa PROTRAN (WHATMAN, Dassel, Alemanya) a 70mA constants durant tota la nit a 4°C.

Els llocs d'unió inespecífics van ser bloquejats amb tampó de bloqueig Odyssey (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) durant 1h a RT.

Per a la immunodetecció de la proteïna d'interès es varen incubar anticossos primaris diversos (veure taula 5) diluïts en tampó Odyssey a la dilució adequada durant 1-2h a RT. Per tal de poder normalitzar l'expressió de la proteïna d'interès, en tots els WB es va immunodetectar una segona proteïna com a control de càrrega, que sempre va ser la tubulina. Després de rentar l'excés d'anticòs primari, aquest es va detectar usant un anticòs secundari marcat amb el sistema IRDye (Li-Cor). Les bandes fluorescents corresponents a les proteïnes immunodetectades van ser adquirides i analitzades amb Odyssey Infrared Imaging System i amb el software Odyssey 2.1 (Li-Cor). En alguns casos les bandes es varen quantificar amb el software Odyssey 2.1. Tots els immunoblots van ser realitzats com a mínim dues vegades.

Tècniques per l'estudi de l'interactoma

- Assaigs d'immunoprecipitació

Els assaigs d'immunoprecipitació (IP) d'aquest estudi es varen realitzar amb proteïna A sefarosa. La Proteïna A sefarosa CL-4B (GE Healthcare Lifesciences) va ser preparada seguint les instruccions del fabricant. Es va aplicar la Proteïna A sefarosa als extractes durant 1h a 4°C en agitació per tal d'eliminar les proteïnes que s'hi uneixen inespecíficament. Després d'eliminar la proteïna A sefarosa, les mostres varen ser incubades amb 20µg d'anticòs primari contra la proteïna d'interès a 4°C en agitació durant tota la nit.

Per immunoprecipitar la disferlina es va usar l'anticòs F4, un anticòs monoclonal derivat de llama, amablement cedit pel laboratori del Dr. Van der Mareel.

Per immunoprecipitar altres proteïnes del complex de la disferlina es varen usar els següents anticossos monoclonals de ratolí comercials: anti-dineina citoplasmàtica (Sigma), anti-Trim72/MG53 (AbCam, Cambridge, UK) i anti-annexina I (BD).

Com a control d'unions inespecífiques es varen usar controls d'isotip, que varen ser IgG1 totals de ratolí o un anticòs anti- β -amiloid produït en llama.

Els immunocomplexes varen ser precipitats mitjançant l'addició de proteïna A sefarosa, incubant-la amb l'extracte durant 2h a 4°C i en agitació.

Els immunocomplexes es varen eluir bullint les mostres durant 5 minuts en el tampó d'elució Laemmli 2x (Bio-Rad).

Els immunocomplexes varen ser analitzats en gels SDS-PAGE al 10% d'acrilamida, tenyits posteriorment amb la tinció de plata tal i com està descrit a la bibliografia [211].

Es varen retallar les bandes d'interès i es varen seqüenciar per espectrometria de masses.

Cada experiment va ser realitzat com a mínim dues vegades.

Alguns dels resultats varen ser confirmats per western blot.

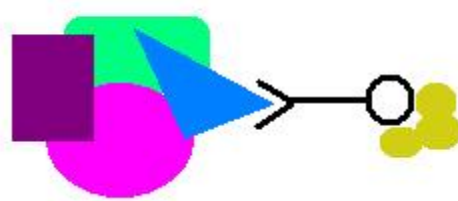


Figura 12. Dibuix esquemàtic del procés de immunoprecipitació. En groc les boles de sefarosa A, en negre l'anticòs específic contra la proteïna d'interès (en blau). En lila, rosa i verd, proteïnes que interaccionen amb la proteïna d'interès.

- Blue Native (BN)

L'electroforesi de blue native és una tècnica que ens permet la separació de complexes dins un extracte proteic. Es basa en la separació electroforètica en condicions no desnaturitzants d'un extracte proteic obtingut amb un tampó amb baixes concentracions de detergents. Les baixes concentracions de detergents disgreguen les membranes però no separen les unions entre proteïnes, permetent-nos visualitzar els complexos proteics com una única banda. Els extractes es separen mitjançant un gel sense SDS.

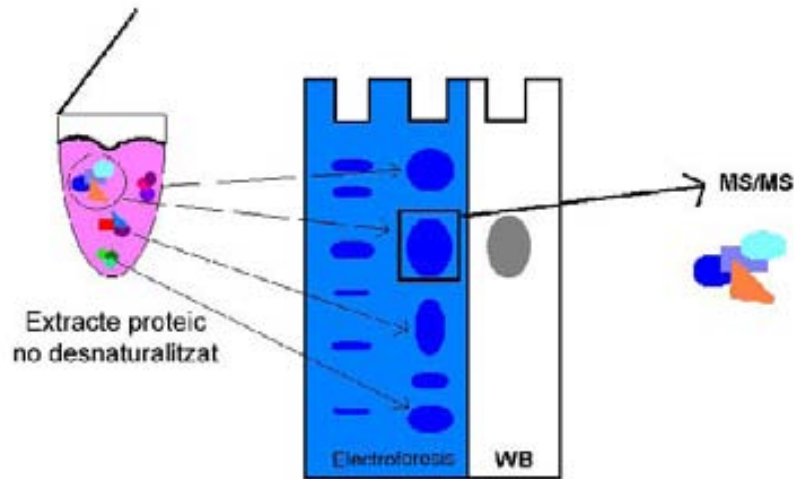


Figura 13. Dibuix esquemàtic del procediment de Blue Native (BN). L'extracte no desnaturalitzat es corre en un gel sense SDS, on es tallarà la banda corresponent al complex d'interès posteriorment a la seva immunodetecció per WB en un carril transferit a una membrana de PVDF. La banda retallada es seqüenciarà per MS/MS.

Les mostres es van córrer en gels de gradient prefabricats, del 4-12% d'acrilamida (Invitrogen). Per córrer els gels es varen usar un tampó per l'ànode i un pel càtode. El tampó ànode es va fer diluint el tampó carrera NativePAGETM 20x (Invitrogen). El tampó càtode es va fer barrejant el tampó carrera NativePAGETM 1x amb l'additiu pel tampó càtode "comassie blue G-250 dye" (Invitrogen), d'acord amb les instruccions del fabricant.

Per realitzar BN-PAGE amb proteïnes de membrana es recomana una concentració de tint blau de 0,02% (w/v). L'electroforesi es va dur a terme durant 3h aproximadament a 100-200V. Els gels es varen tenyir amb el kit "Colloidal Blue Staining" (Invitrogen).

Alguns carrils es varen guardar a -80°C i els altres es varen transferir a membranes de PVDF per tal de realitzar un immunoblot per detectar el complex de la disferlina.

El WB dels estudis de BN es va realitzar de manera diferent als altres WBs d'aquest estudi. Els llocs d'unió inespecífics es varen bloquejar utilitzant un tampó salí fosfat (PBS) al 5% de llet desnatada en pols. Per la immunodetecció es varen usar l'anticòs monoclonal anti-disferlina Hamlet I (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK) i l'anticòs monoclonal anti-Trim72 (AbCam). Després d'eliminar i rentar l'excés d'anticòs primari, aquest es va detectar amb un secundari goat anti-mouse conjugat amb HRP, que es va revelar amb el sistema supersignal (Thermo Fisher Scientific). Després de immunodetectar el complex de la disferlina, es va retallar la banda corresponent en els carrils guardats a -80°C i aquesta es va seqüenciar per digestió en el gel i anàlisi d'espectrometria de masses (MS/MS). Aquests experiments es van realitzar en dos experiments independents.

- Digestió en el gel i anàlisi d'espectrometria de masses (MS/MS)

Les bandes de proteïna seleccionades tant de les IPs com dels gels de Blue Native es varen tallar i tripsinitzar seguint el protocol ja descrit [212] deixant fora la reducció i l'alquilació. Els pèptids extrets es varen analitzar amb un espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) equipat amb una font de nanospray (Proxeon, Thermo Scientific). La mostra s'havia separat prèviament per cromatografia líquida (nanoLC) utilitzant un sistema de nano-fluxe Agilent 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Els pèptids varen ser separats en columnes de fase reversa de 100µm x 150mm (Nikkyo Technos Co., Tokyo, Japó) amb un gradient 2.4 a 36% ACN amb 0.1% FA en 24 min amb un fluxe de 0.5µL/min. El LTQ-Orbitrap XL es va usar en mode de ions positius amb un voltatge del nanospray de 2.2 kV i una font de temperatura de 275°C. L'instrument va ser calibrat externament utilitzant una solució de calibració Ultramark 1621 per al analitzador de masses FT. Per a la calibració interna es va analitzar la senyal de fons de ions de la polisiloxà a una ràtio massa/carrega (m/z) de 445,120025 com a calibrant. L'instrument es va usar en un mode d'anàlisi dependent de les dades (DDA). En tots els experiments es varen adquirir els escanejos de les MS totals per sobre d'un rang de masses de m/z 350-2000 amb detecció amb un analitzador de masses Orbitrap amb una resolució fixada de 60,000.

L'espectre d'ions fragmentats produïts per dissociació induïda per col·lisió (CID) es va adquirir amb l'analitzador de masses LTQ. A cada cicle d'anàlisi DDA, després de cada avaluació, els cinc ions més intensos van ser escanejats per sobre d'un llindar de recompte de ió de 5000 i van ser seleccionats per a la fragmentació amb energia de col·lisió normalitzada al 35%. Totes les dades van ser adquirides amb el software Xcalibur 2,1. La identificació de proteïnes es va realitzar utilitzant MASCOT (Matrix Science, Londres, UK) com a eina de cerca.

Les dades es van processar i es van realitzar recerques en la base de dades SwissProt. L'oxidació de la metionina es va establir com a variable de modificacions,. La tolerància de pèptids va ser de 7 ppm en MS i 0.5 Da en mode MS / MS, i el nombre màxim de fragmentacions perdudes es va fixar en 2.

Els estudis de MS/MS es varen realitzar al Servei de Proteòmica de l'Institut de Recerca del Vall d'Hebrón.

- Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Per tal de determinar la possible relació funcional entre els membres del complex de la disferlina descrits en aquest treball, varem realitzar un anàlisi bioinformàtic mitjançant el software IPA (ingenuity pathway analysis) (www.ingenuity.com). Es va importar al programa el llistat de proteïnes de la taula 7. El software IPA produeix diagrames amb les proteïnes donades i amb

proteïnes afegides pel programa per tal d'acabar d'unir la xarxa. El software calcula una ràtio que ens indica la fiabilitat d'associació amb una via canònica.

5. Microscopia

5.1 Microscopi de fluorescència

Les imatges de microscopia de fluorescència de les immunohistoquímiques i histoquímiques es varen obtenir amb una càmera Olympus DP72 acoblada a un microscopi Olympus BX51, usant el software Cell[^]D d'Olympus.

5.2 Microscopi invertit de fluorescència per la visualització de cultius cel·lulars

Per tal de visualitzar cèl·lules en cultiu es va usar un microscopi invertit de fluorescència Olympus CKX41. Per realitzar fotografies dels cultius, es va usar una càmera Olympus DP20 acoblada a aquest microscopi.

5.3 Microscopia confocal

Adquisició d'imatges amb microscopia confocal

Totes les imatges i vídeos obtinguts amb microscopia confocal es varen realitzar amb un microscopi Leica TCS SP5-AOBS (Leica).

Vídeos de cèl·lules *in vivo*

Els macròfags varen ser gravats en un microscopi confocal durant 18h a 37°C i al 5% de CO₂. Els vídeos es varen analitzar amb el software Leica LAS AF. La distancia recorreguda per cada cèl·lula analitzada es va mesurar cada 30min. La velocitat de les cèl·lules es va mesurar com a distancia en µm/hora, per tal de poder comparar també les cèl·lules que no es mantenien en la pantalla durant tota la gravació.

Fluorescence-lifetime imaging microscopy- Förster (Fluorescence) resonance energy transfer (FLIM-FRET)

- Principi de la tècnica

La tècnica de FLIM-FRET s'usa, entre d'altres coses, per visualitzar les interaccions proteïna-proteïna. La tècnica es basa en l'observació de canvis en el temps de vida mig de la fluorescència (el temps d'emissió del fluoròfor després d'una breu excitació mesurat en picosegons) d'un fluoròfor donant en presència d'un fluoròfor acceptor. Per la realització d'aquesta tècnica hem de seleccionar dos fluorocroms que presentin espectres solapats, és a dir, que la longitud d'ona

d'emissió del donant es solapi amb la longitud d'ona d'excitació de l'acceptor. Si els dos fluorocroms es troben a una distància igual o inferior a 10nm (la distància establerta per les interaccions proteiques directes [213], es produeix una transferència d'energia del donant excitat a l'acceptor, ja que la longitud d'ona d'emissió d'un es correspon a la d'excitació de l'altre, disminuint així el temps de vida de fluorescència del donant i augmentant la vida de la fluorescència de l'acceptor.

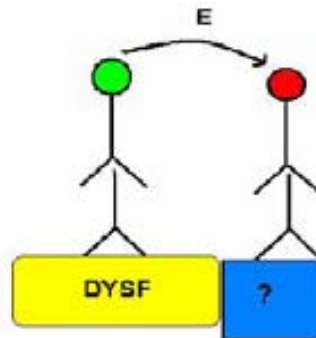


Figura 14. Dibuix esquemàtic on es representa el principi bàsic de la tècnica de FLIM/FRET.

- Aplicació de la tècnica

En aquest estudi hem usat el parell de fluorocroms Alexa Fluor 488 (donant) i Alexa Fluor 555 (acceptor).

Per a l'estudi de les interaccions de la disferlina, la tècnica de FLIM-FRET es va realitzar amb un microscopi confocal invertit amb escàner per laser Leica TCS SP5-AOBS, equipat amb un mòdul PicoQuant LSM Upgrade Kit per FLIM i FCS. Les mostres varen ser excitades usant un làser polsant de 470 nm amb una freqüència de repetició de 40MHz, i la fluorescència emesa es va detectar amb un detector d'únic fotó correlacionat amb el temps.

Es va usar un filtre de fluorescència de 500-550nm per tal de limitar la detecció de la fluorescència del fluorocrom donant (Alexa Fluor 488). El software SymPhoTime es va usar per tal de mesurar el temps de vida de la fluorescència en un anàlisi píxel a píxel amb una alta resolució espacial. Els temps de vida de la fluorescència del fluoròfor donant es va representar en una corba de la caiguda de la fluorescència usant un model matemàtic de dos components. D'aquesta manera es varen poder calcular la fracció de fluoròfors donants dins de cada píxel que interaccionaven o no amb el fluoròfor receptor. Els temps de vida mig es varen mapejar en imatges pseudocolorejades basades en les dades obtingudes píxel a píxel.

- Validació de la tècnica

Per tal de validar els resultats de la tècnica de FLIM es requereixen diversos controls positius i negatius. En els nostres experiments es varen usar els següents controls:

1. Com a control negatiu 1, es va mesurar el temps de vida mig del fluoròfor donant en absència de l'acceptor.
2. Com a control negatiu 2, es va realitzar el doble immunomarcatge disferlina-distrofina, dues proteïnes que tot i colocalitzar, se sap que no formen part del mateix complex.
3. Com a control positiu 1, es va realitzar el doble immunomarcatge disferlina-annexina A1, proteïnes la interacció directa de les quals ja estava descrita per FLIM.
4. Com a control positiu 2 es va realitzar un doble marcatge de la disferlina, on s'immunodetectava exclusivament la disferlina, però aquesta es marcava amb dos anticossos secundaris marcats amb diferents fluorocroms, el donant i l'acceptor.

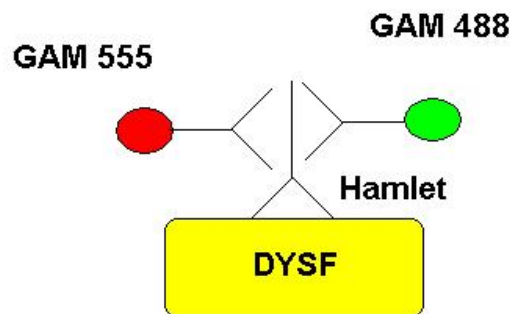


Figura 15. Dibuix esquemàtic del doble marcatge de la disferlina com a control positiu de la tècnica de FLIM/FRET.

5. Per últim, usant un control positiu, es va seleccionar una area a on, mitjançant un làser, es va cremar el fluorocrom acceptor. Es va mesurar el temps de vida mig del donant en aquesta area, observant que aquest havia recuperat aquest paràmetre.

Tots els experiments es van realitzar amb els controls establerts i en un mínim de 30 cèl·lules provinents demínim 3 experiments independents.

6. Estadística

Per tal d'analitzar les diferències entre grups en els estudis funcionals, la quantificació dels infiltrats inflamatoris en els ratolins, la quantificació dels nivells de HGF per WB, i l'expressió gènica de disferlina per Real-Time PCR es va usar un test de la variància d'un sol factor (ANOVA) seguit un anàlisi posthoc de Bonferroni. La significació estadística es va establir en $p < 0,05$.

Per tal d'analitzar les diferències entre els temps de vida mig de la fluorescència del donant (488) sol, amb el donant en presència del acceptor (555) es va usar un test de la variància de dos factors (ANOVA). La significació estadística es va establir en $p < 0,05$.

La comparació entre la motilitat dels macròfags disferlina^{-/-} i els disferlina^{+/+} es va realitzar mitjançant una t-Student. La significació estadística es va establir en $p < 0,05$.

RESULTATS

1. Assaigs funcionals per l'estudi de minidisferlines com a possible teràpia gènica

1.1 Identificació del marcador lisosomal Lamp-1 com a marcador de reparació de membrana plasmàtica en múscul esquelètic

La principal font d'endomembrana proposada a la teoria del “*patch repair*” per part de la disferlina són els lisosomes i els enlargeosomes [83,84,85]. Per aquest motiu varem estudiar el marcador lisosomal Lamp-1 en biòpsies de controls i pacients amb LGMD2B/MM.

Per tal de determinar la localització d'aquests marcadors, varem realitzar un doble marcatge per distrofina i Lamp-1, trobant que ambdues proteïnes colocalitzen. Això ens deixa hipotetitzar que en els músculs de pacients amb disferlinopatia hi ha un cúmul de lisosomes subsarcolemmals o una sobreexpressió d'aquest marcador a la membrana plasmàtica, confirmant la teoria de que els lisosomes són els orgànuls cel·lulars donants de endomembrana per la reparació dels danys al sarcolemma (fig. 16).

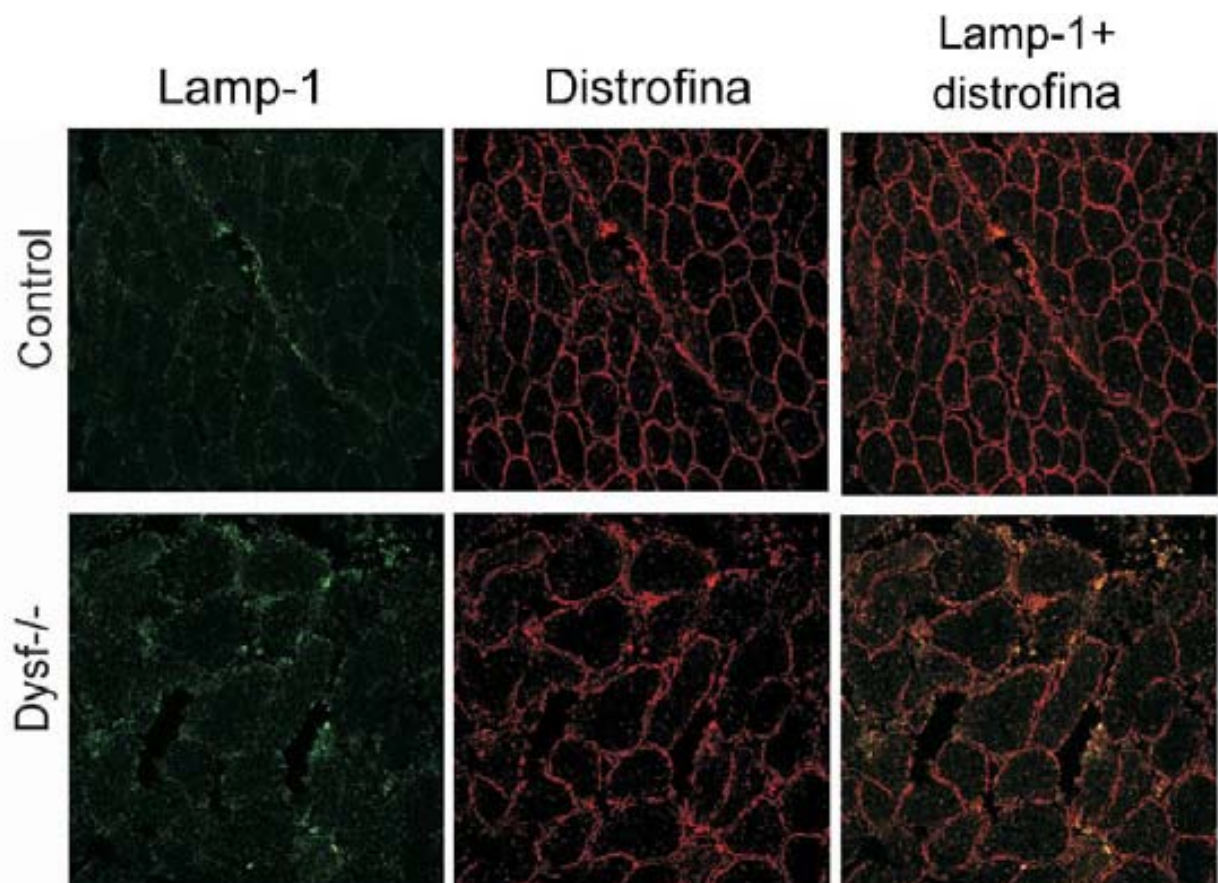


Figura 16. Expressió de Lamp-1 i distrofina en biòpsies de pacients de LGMD2B/MM i controls sans.

1.2 Estudi de la localització de Lamp-1 com a test funcional de el procés de reparació de membrana

Per tal de corroborar si l'acumulació de lisosomes a nivell subsarcolemmal era un bon test per tal de comprovar la restauració de les funcions de la disferlina després de la teràpia gènica, varem dissenyar un test *in vitro* comparant miotubs provinents de biòpsies control amb miotubs de pacients amb disferlinopatia. L'assaig es basava en el tractament de les cèl·lules amb ionomicina al 10mM a 37°C durant 5 minuts. La ionomicina és un compost que fa porus a la membrana plasmàtica provocant l'entrada de calci [214]. Aquesta entrada de calci, teòricament activa el complex de la disferlina per tal de segellar els porus a la membrana. Després del tractament amb ionomicina les cèl·lules varen ser fixades sense permeabilitzar i varem estudiar la localització del marcador Lamp-1, podent observar una clara sobreexpressió a la membrana d'aquest marcador en les cèl·lules deficientes en disferlina tractades amb ionomicina (fig. 17).

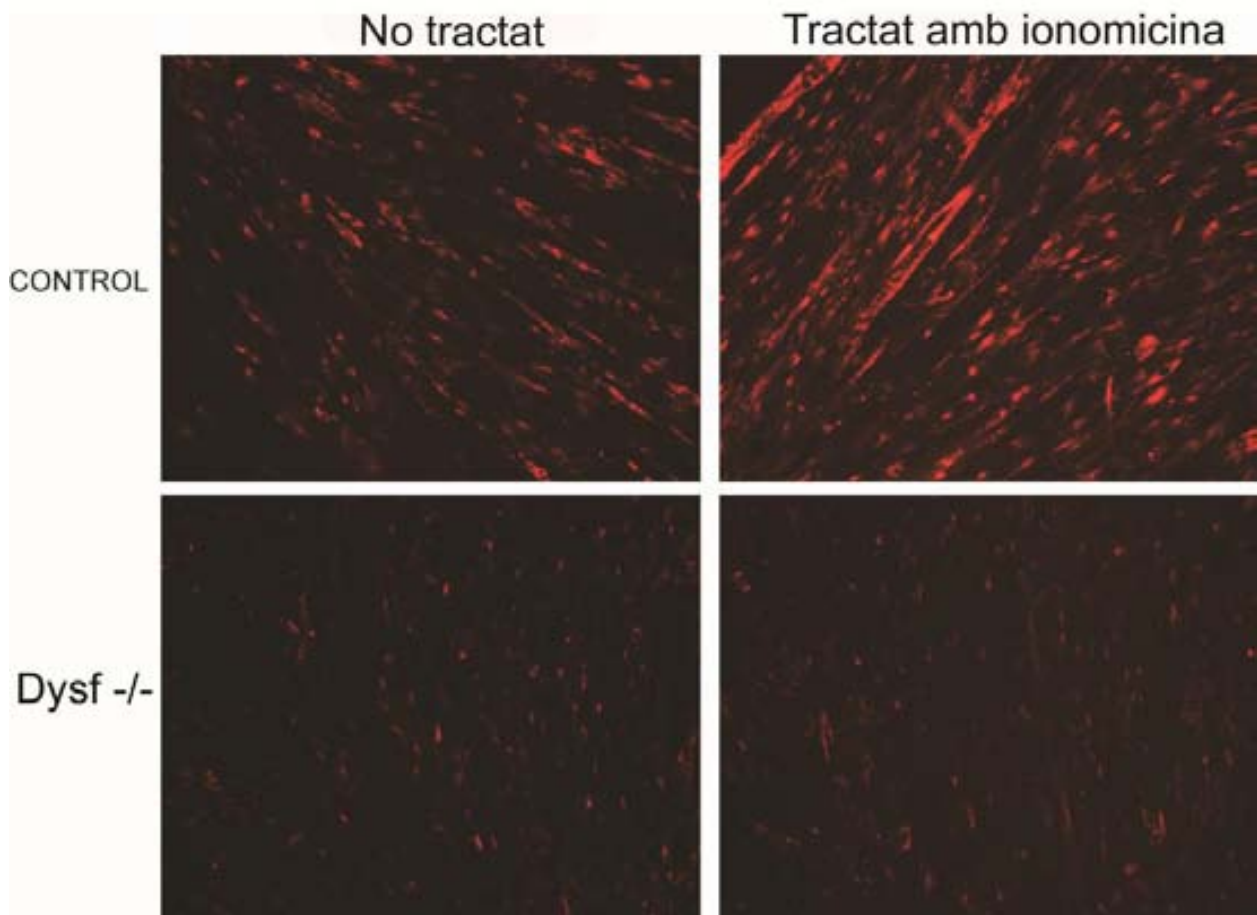


Figura 17. Immunomarcatge del marcador lisosomal Lamp-1 en miotubs control i $Dysf^{-/-}$ tractats i no tractats amb ionomicina.

1.3 Assaig de reparació amb Iodur de Propidi

Per altre banda, ens varem proposar dissenyar un test per tal d'avaluar la cinètica de reparació de miotubs en cultiu després d'una lesió. Varem basar el test en la incorporació de iodur de propidi per part dels nuclis de les cèl·lules lesionades a diferents temps. Per aquest motiu, les cèl·lules eren lesionades i tractades amb iodur de propidi a diferents temps, per tal de poder calcular el grau de lesió a la membrana plasmàtica.

Es varen assajar diversos productes químics per tal de lesionar les cèl·lules, com ara la ionomicina i el SDS, i alguns agents que provocaven una lesió mecànica, com ara l'ús de microboles de vidre o la realització de una lesió amb un bisturí.

En els estudis realitzats mitjançant lesions mecàniques, els danys als miotubs eren tan grans que no varem poder avaluar el test.

En l'estudi de les lesions químiques, varem comprovar que el dany amb ionomicina es reparava molt ràpidament, ja que no causa grans forats a la membrana sinó petits porus, fent invàlid el test. En canvi, el dany amb una solució al 0,25mM de SDS ens permetia veure la cinètica de reparació en miotubs control. Aquesta cinètica de reparació es va realitzar observant el nombre de nuclis positius per iodur de propidi a 0', 2', 5' i 10' post-lesió en relació als nuclis Hoechst positius.

Un cop posat a punt el test, es varen comparar miotubs control provinents de diferents biòpsies d'individus sans i miotubs de diferents pacients amb disferlinopatia. No es varen observar grans diferències en la cinètica de reparació entre controls i pacients, però si una gran diferència en el nombre de nuclis iodur de propidi positius en cada punt (fig. 18 i fig. 19). Així doncs, els pacients amb disferlinopatia presentaven un nombre major de nuclis positius, significant això un major grau de lesió en aquestes cèl·lules en comparació amb els controls.

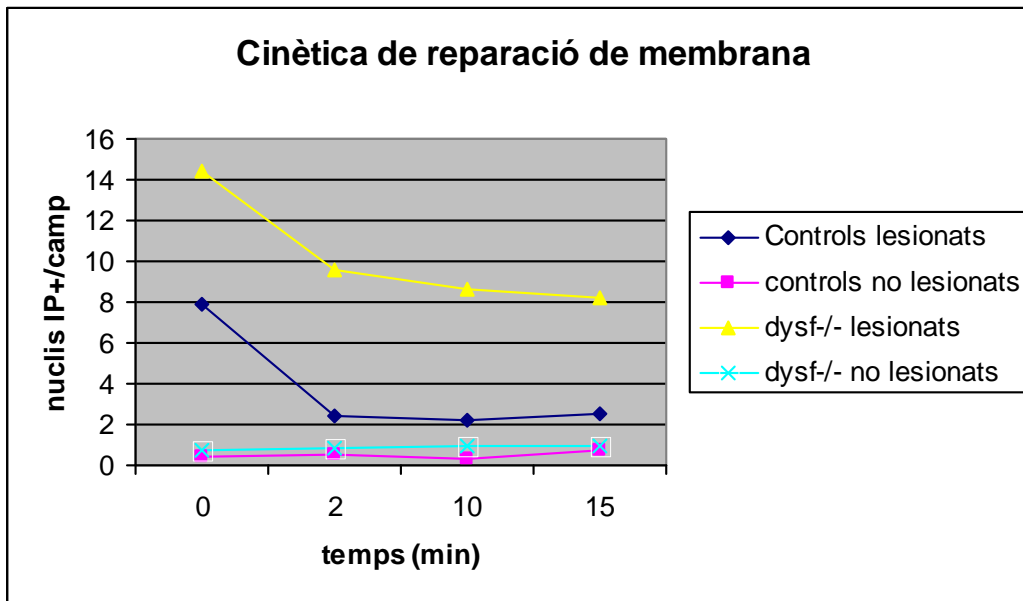


Figura 18. Representació gràfica de els nuclis iodur de propidi positius respecte el temps en miotubs lesionats i no lesionats de controls i pacients *Dysf*^{-/-} (mitges de set experiments independents)

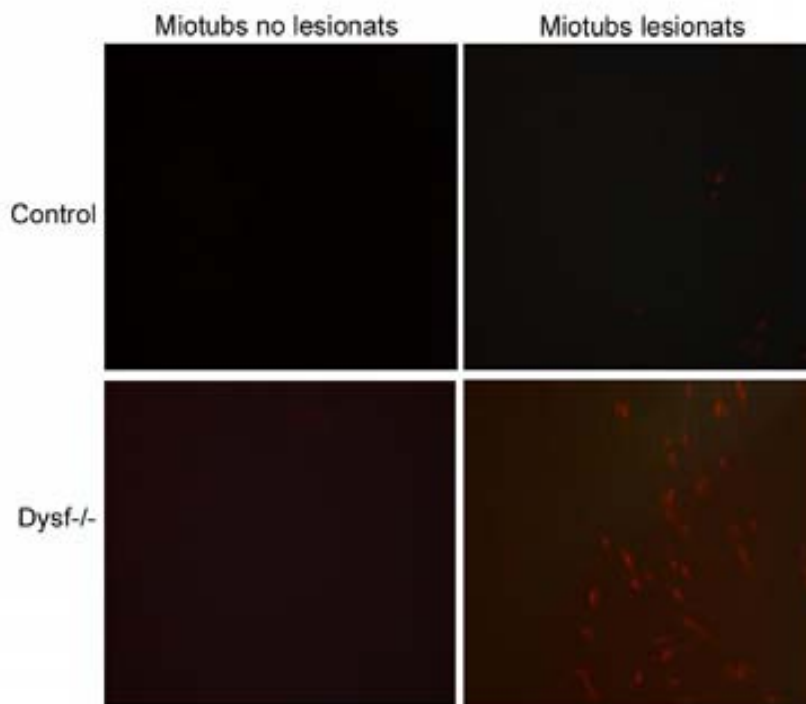


Figura 19. Imatge representativa de miotubs control i provinents d'un pacient *dysf*^{-/-} tractats i no tractats amb SDS al 0,25mM prèviament al marcatge amb iodur de propidi (vermell).

2. Estudi de la motilitat de monòcits de pacients amb dèficit de disferlina

En base als estudis de De Morrée i col·laboradors sobre la relació entre la disferlina i el complex d'integrines [128], ens varem plantejar realitzar un estudi de motilitat en macròfags deficients en disferlina i macròfags control.

Per tal de comprovar el possible efecte de la disferlina en les unions mitjançant integrines, varem estudiar la motilitat dels macròfags. Per això, varem gravar durant 18h macròfags control i macròfags deficients en disferlina en un microscopi confocal. Les distàncies recorregudes es varen mesurar en μm mitjançant el software LAS AF de Leica, cada 30 minuts (Fig. 30C). Es varen comparar les distàncies i les velocitats de 17 macròfags control de 5 individus diferents amb 29 macròfags disferlina negatius de 5 pacients diferents.

Per tal d'assegurar la puresa del cultiu, es caracteritzar totes les cèl·lules com a CD68+ mitjançant ICQ (Fig. 30A).

Al comparar les distàncies recorregudes pels macròfags sans i els deficients en disferlina, varem observar que els macròfags de pacients recorrien aproximadament el doble de distància en el mateix temps. A més, es podria considerar que el recorregut realitzat en les 18h de gravació era més erràtic. La mitja de la distància recorreguda pels monòcits deficients en disferlina va ser de $13,85 \mu\text{m/h}$ (desviació estàndard de $4,42\mu\text{m}$), mentre la dels controls va ser de $8,71 \mu\text{m/h}$ (desviació estàndard de $1,62\mu\text{m}$). Al comparar els resultats, el test T-student ens diu que ambdós grups són significativament diferents amb un p-valor de 0,00009 (fig. 30B).

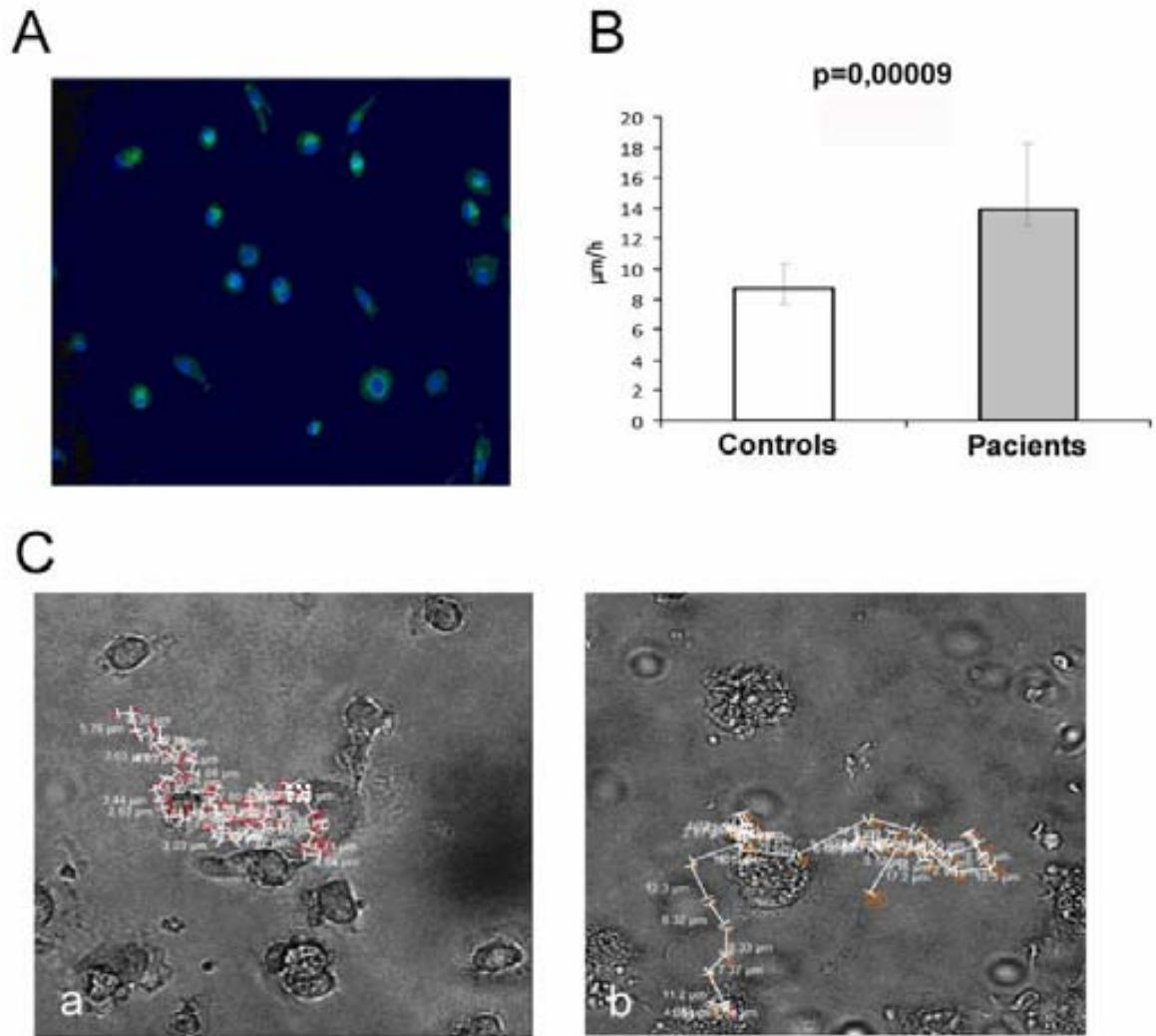


Figura 30. Estudi de la motilitat de macròfags de pacients amb dèficits en disferlina. A) Immunocitoquímica per el marcador de macròfags CD68 i Hoechst (200x). B) Gràfica representant la velocitat mitja i la desviació estàndard en $\mu\text{m/h}$ de macròfags en cultiu de controls i pacients amb dèficit de disferlina ($p=0,00009$). C) Imatge del recorregut realitzat per les diferents cèl·lules d'un cultiu de macròfags control (a) i macròfags deficients en disferlina (b) (200x).

3. Estudi del complex de la disferlina

Per tal de comprendre millor les diferents funcions que pot realitzar la disferlina, ens varem proposar l'estudi del seu complex. Per altra banda, això també seria útil per tal de comprovar, després de una teràpia de reemplaçament gènic si la disferlina expressada *de novo* compleix amb totes les seves funcions.

La majoria d'estudis d'interacció de proteïnes musculars s'han basat en la tècnica d'immunoprecipitació [21,65]. Aquesta tècnica és molt útil per tal de determinar quines proteïnes estan relacionades, però no ens permet discernir si la interacció entre elles és directe o indirecte. Per aquest motiu ens varem proposar una nova estratègia que ens dones més informació sobre la naturalesa de les interaccions de la disferlina, a més d'uns resultats més robusts. Per això, en aquests estudi ens varem proposar la combinació de diferents tècniques, com són les immunoprecipitacions, l'electroforesi en condicions natives (blue Native electrophoresis) i la visualització del temps de vida mig de la fluorescència basat en la transferència d'energia de Förster (FLIM-FRET). La combinació del BN i les IPs ens donen una idea de les proteïnes que formen el complex de la disferlina, i mitjançant el FLIM-FRET podem discernir entre les interaccions directes i les indirectes.

3.1 Blue Native

Es va estudiar el complex de la disferlina per BN en biòpsies provinents de traumatologia de pacients sense patologia muscular. Un cop separats els complexos per aquesta tècnica, es varen transferir a membranes de PVDF per tal de localitzar el complex de la disferlina mitjançant western blot (WB). El WB per disferlina va mostrar dues bandes (fig. 20), de pes molecular aproximat 480 KDa i 242 KDa. Al estudiar el complex on es troba la proteïna Trim72/MG53 mitjançant la mateixa tècnica, varem poder observar que aquesta proteïna només presentava una banda, coincidint amb la banda de pes molecular més alt en els complexos de disferlina (Fig. 20). Aquesta banda comú per les dues proteïnes va ser seleccionada i seqüenciada per espectrometria de masses (MS/MS). Aquest procés es va realitzar per duplicat amb dos músculs sans diferents, un semitendinós i un vaste lateral.

Un cop obtingut el llistat de proteïnes presents a la mostra es van seleccionar només les que presentaven un mascot score superior a 30 (taula 7). Es varen eliminar les queratines i demes proteïnes contaminants de la llista, i es varen seleccionar les proteïnes que havien estat identificades almenys en dos experiments.

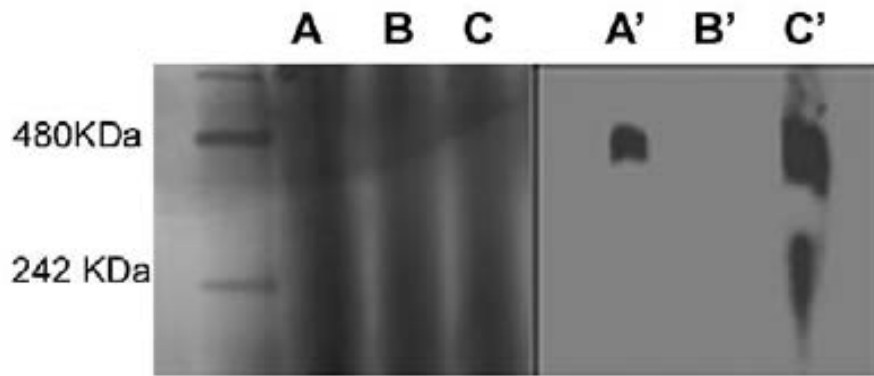


Figura 20. Blue native i imatge de WB mostrant les bandes positives pel complex de la disferlina i el complex de la proteïna trim72/MG53. Un extracte de múscul adult d'un pacient control es va córrer en un gel native-PAGE de gradient (4-12% acrilamida) en tots els carrils (A, B i C). Els carrils A i C es varen transferir a una membrana de PVDF, on es va immunodetectar la proteïna Trim72/MG53 (A') i la disferlina (C') amb anticossos comercials específics. El carril B es va usar per retallar la banda corresponent al immunomarcatge de la disferlina i de la Trim72/MG53 per tal de ser seqüenciat mitjançant espectrometria de masses.

3.2 Immunoprecipitacions

Paral·lelament, es van realitzar assaigs d' immunoprecipitació (IP) utilitzant extractes proteics de múscul humà adult (asm) o de cultius primaris de múscul esquelètic humà diferenciats a miotubs (mt), per tal de corroborar i comparar resultats, ja que la tècnica de Blue Native produeix un gran nombre de falsos positius donat que altres complexos proteics es poden trobar dins el mateix pes molecular.

Els assaigs d' IP es varen realitzar amb un anticòs específic contra la disferlina produït en llama (anticòs F4). Es van realitzar també estudis de IP amb un anticòs anti- β -amiloid produït en llama com a control d'isotip. Els extractes obtinguts es van córrer en gels d'acrilamida i es varen tenyir amb la tinció de plata. Es varen retallar les bandes que només estaven presents en els estudis d'IP amb l'anticòs F4, i no en les IPs realitzades amb el seu control d'isotip, per tal d'evitar les unions inespecífiques (fig.21). Les bandes retallades es van analitzar per espectrometria de masses.

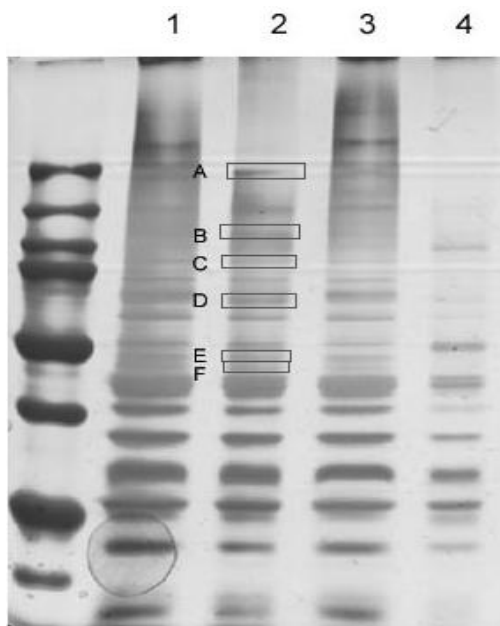


Figura 21. Tinció de plata d'un gel SDS-PAGE on s'observen les bandes obtingudes de la separació

d'extractes immunoprecipitats amb l'anticòs F4. El carril 2 mostra les bandes corresponents a les proteïnes immunoprecipitades amb l'anticòs monoclonal F4 específic per la disferlina a partir d'extractes de proteïna de miotubs humans. El carril 1 mostra el sobrenedant corresponent a la IP del carril 2. El carril 4 mostra les bandes obtingudes al separar les proteïnes immunoprecipitades amb un control d'isotip per l'anticòs F4, i el carril 3 mostra el seu sobrenedant corresponent. Les bandes A, B, C, D, E and F varen ser seqüenciades per MS/MS. La banda A correspon a les miosines 3, 9 i 10; la banda B correspon a la proteïna cadherina-11; la banda C correspon a la cadena intermèdia 2 de la dineïna citoplasmàtica 1; la banda D correspon als isoenzims M1/M2 de la piruvat quinasa; la banda E correspon a la proteïna Trim72/MG53 i la banda F correspon a la vimentina i la cadena beta de la tubulina.

Es van posar en comú les dues IPs realitzades amb múscul esquelètic adult i les dues realitzades amb miotubs, eliminant les coincidències amb proteïnes amb un mascot score inferior a 30. Finalment es van posar en comú tots els resultats de les diferents IPs.

Per altra banda, es varen realitzar IPs per algunes de les proteïnes trobades en el complex de la disferlina, com ara el Trim72/MG53, l'annexina 1 la dineïna citoplasmàtica, amb un control d'isotip per IgG de ratolí.

Es va analitzar per WB la presència de disferlina en les immunoprecipitacions realitzades amb anticossos específics contra el trim72/MG53 i la annexina 1 en múscul adult sà, trobant que la disferlina co-immunoprecipita amb ambdós proteïnes.

Per altra banda, es va estudiar la co-immunoprecipitació de la disferlina junt amb la dineïna citoplasmàtica en múscul adult de un pacient sà, un pacient amb disferlinopatia i un pacient amb caveolinopatia, trobant que aquestes dues proteïnes immunoprecipiten tant en un extracte de múscul control com en un múscul amb absència de caveolina-3, però, com era d'esperar, en els músculs que no expressen disferlina, aquesta proteïna no es va poder detectar en la IP amb dineïna citoplasmàtica.

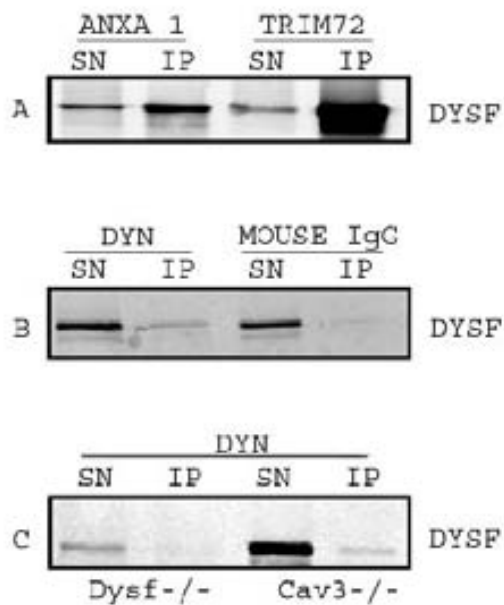


Figura 22. WB immunodetectant la disferlina en IPs de diferents músculs i amb diferents anticossos. La imatge A mostra els sobrenedants (SN) i les immunoprecipitacions (IP) amb anticossos monoclonals per annexina 1 (ANXA1) i trim72/MG53 (trim72) en múscul sà. La imatge B mostra els sobrenedants (SN) i immunoprecipitacions (IP) amb un anticòs monoclonal contra la dineina citoplasmàtica (Dyn) i amb un control d'isotip de IgGs de ratolí (mouse IgG). La imatge C mostra SN i IPs amb un anticòs monoclonal contra la dineina citoplasmàtica en múscul adult de un pacient amb disferlinopatia (*Dysf*^{-/-}) i un pacient amb caveolinopatia(*Cav3*^{-/-}).

3.3 Anàlisi combinat IP/BN

Per tal d'obtenir un llistats fiables de proteïnes corresponents al complex de la disferlina varem comparar els resultats obtinguts de l'espectrometria de masses de la banda pesada corresponent a la disferlina en els experiments de BN amb els resultats obtinguts de l'anàlisi de les bandes de les IPs tant en múscul esquelètic adult com en miotubs.

A la llista final de proteïnes es varen incloure només aquelles proteïnes detectades en més d'un experiment i amb un mascot score ≥ 30 . Finalment, el llistat obtingut es va comparar amb la bibliografia (Taula 7).

De totes les proteïnes de la taula 7 varem estudiar amb més detall el tipus d'interacció amb la disferlina d'algunes d'elles (en negreta a la taula 7). Els criteris per seleccionar les proteïnes estudiades per FLIM-FRET varen ser els següents: interaccions ja descrites, proteïnes trobades per les dues tècniques analitzades i en les diferents rèpliques i teixits, funció de la proteïna.

Accession number	Descripció	MW [kDa]	BN	Score	Coverage	mostra	IP	Coverage	Score	mostra	bibliografia
P08237	6-phosphofructokinase, muscle type	85,13	+	4034,01	40,00	asm	+	33,08	729,73	mt	[64]
P24752	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45,17	+	88,57	7,03	asm	+	37,94	546,48	mt	
P68133	Actin, alpha skeletal muscle	42,02	+	772,15	52,25	asm	+	62,07	6500,67	mt	
P61158	Actin-related protein 3	47,37	-	-	-	-	+	32,78	449,83	asm	[64]
Q86TX2	Acyl-coenzyme A thioesterase 1	46,25	+	59,13	6,65	asm	+	9,50	178,31	mt	
P30566	Adenylosuccinate lyase	54,85	+	338,34	25,83	asm	+	3,51	95,25	mt	[64]
P61163	Alpha-centractin	42,59	-	-	-	-	+	9,04	124,12	asm, mt	
P07355	Annexin A2	38,6	+	98,13	26,55	asm	-	-	-	-	[64,98,214]
P08758	Annexin A5	35,91	+	181,30	28,75	asm	+	4,69	56,51	mt	
P17174	Aspartate aminotransferase, cytoplasmic	46,22	+	246,15	21,07	asm	+	30,02	381,90	mt	
P13929	Beta-enolase	46,90	+	896,19	35,94	asm	+	29,95	445,27	asm	[64]
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	74,7	+	876,25	9,14	asm	+	7,67	241	asm	[64]
P17655	Calpain-2 catalytic subunit	79,96	+	57,44	2,14	asm	+	5,43	123,73	mt	[64]
P20807	Calpain-3	94,2	+	33,94	1,22	asm	-	-	-	-	[105]
P31415	Calsequestrin-1	44,47	+	403,18	22,31	asm		13,33	110,51	mt	

P14958	Calsequestrin-2	46,41	+	48,72	6,77	asm	+	31,06	479,22	asm	
P12277	Creatine kinase B-type	42,62	+	93,06	19,95	asm	+	7,09	122,86	mt	[64]
P06732	Creatine kinase M-type	43,07	+	1550,35	52,23	asm	+	54,07	4722,02	asm, mt	[64]
P17540	Creatine kinase S-type, mitochondrial	47,47	+	707,12	36,04	asm	+	14,80	198,95	mt	
Q13409	Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2	71,41	-	-	-	-	+	18,81	630	mt	[64,214]
P17661	Desmin	53,50	+	37,33	3,83	asm	+	28,30	455,82	mt	[64]
O75923	Dysferlin	237,14	+	129,18	2,40	asm	+	8,51	417,48	asm, mt	
P21333	Filamin-A	280,56	+	465,12	1,55	asm	+	1,44	66,39	asm	[64]
Q14315	Filamin-C	290,84	+	1001,73	24,81	asm	+	2,64	294,96	mt	[64]
Q13642	Four and a half LIM domains protein 1	36,24	+	1511,61	15,46	asm	+	3,72	62,52	mt	[64]
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	39,40	+	800,56	48,08	asm	+	38,74	569,75	mt	[64]
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36,03	+	1122,80	52,24	asm	+	23,28	261,14	mt	
Q14974	Importin subunit beta-1	97,11	+	172,98	2,85	asm	+	1,83	72,08	asm	
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	50,88	+	614,49	32,08	asm	-	35,18	617,11	asm, mt	
P54296	Myomesin-2	164,8	+	1013,33	17,06	asm	+	54,68	77	asm	
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNA K	628,7	+	66,82	7,52	asm	-	-	-	-	[64,84]

P00568	Phosphoglycerate kinase 1	44,69	+	218,29	29,98	asm	+	50,84	780,75	mt	[64,214]
Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor (PTRF)	43,4	+	190,02	14,62	asm	-	-	-		+(17, 23)
P23297	Protein S100-A1	10,5	+	73,11	22,34	asm	-	-	-	-	[214]
P21817	Ryanodine receptor 1	564,8	+	137,68	1,09	asm	-	6,53	-	-	[64]
O14983	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	110,18	+	886,07	32,47	asm	+	14,79	392,64	asm, mt	[64]
P38646	Stress-70 protein, mitochondrial	73,63	+	167,70	2,36	asm	+	-	46	mt	
Q6ZMU5	Tripartite motif-containing protein 72	52,70	+	559,89	42,56	asm	+	10,90	206,45	asm	[64,92,122]
P07437	Tubulin beta chain	49,64	+	501,19	38,96	asm	+	32,21	1825,15	asm, mt	[126]
Q13885	Tubulin beta-2A chain	49,87	+	589,94	37,98	asm	+	51,69	1736,27	asm	
Q8N6N5	Tubulin beta-2C chain	49,80	+	717,16	51,46	asm	+	33,26	1737,11	asm	
Q13509	Tubulin beta-3 chain	50,40	+	435,89	26,89	asm	+	20,22	1517,19	asm	
P04360	Tubulin beta-4 chain	49,55	+	439,28	44,37	asm	+	25,00	1458,79	asm	
Q8BUF5	Tubulin beta-6 chain	49,83	+	265,24	18,61	asm	+	33,63	1702,75	asm	
P08670	Vimentin	53,62	+	4376,83	4,08	asm	+	8,58	147,26	asm, mt	[64,214]
P18206	Vinculin isoform 1	1166,0	+	295,00	1,85	asm	-	-	-	-	[64]

Taula 7. Combinació dels resultats de els estudis de BNI i els assaigs d'IP. Asm, múscul esquelètic adult; mt, miotubs

3.4 Caracterització de les interaccions directes

La interacció Trim72/MG53-Disferlina

La proteïna Trim72/MG53 es va trobar al complex de la disferlina per Blue Native i per IP en múscul esquelètic adult (Fig. 21 banda E). Al immunoprecipitar proteïnes dels extractes amb anticossos anti-trim72 i estudiar els resultats per WB es va poder observar que la disferlina també co-IP amb el trim72 (fig. 22). Per tal d'estudiar el tipus de interacció entre aquesta proteïna i la disferlina, es va procedir a fer un anàlisi mitjançant la tècnica de FLIM-FRET. En els estudis de FLIM-FRET varem marcar la disferlina amb l'anticòs monoclonal Hamlet I, marcat amb un secundari unit a un fluoròfor donant (Alexa Fluor 488) i la proteïna Trim72/MG53 amb un anticòs policlonal detectat amb un secundari unit a un fluoròfor acceptor (Alexa Fluor 555). Al marcar simultàniament ambdues proteïnes, varem observar una reducció en el temps de vida mig del fluoròfor donant d'un 2,86% respecte al control sense acceptor. La diferència entre el temps de vida mig del fluoròfor donant en absència del fluoròfor i les mostres on havíem marcat la disferlina i el trim72/MG53 (donant i acceptor) va ser significativa ($p < 0,05$). El fluoròfor donant presentava un temps de vida mig de $\sim 3,2$ ns en absència del seu acceptor de FRET. Al realitzar el doble marcatge (donant i acceptor), varem poder observar, en algunes localitzacions cel·lulars on l'acceptor es trobava molt pròxim al donant (píxels blaus a les imatges pseudocolorejades, Fig. 23), el temps de vida mig del donant es va veure reduït de $\sim 3,2$ ns fins a $\sim 2,5$ ns (figura 23E) indicant així que aquestes dues proteïnes interaccionen directament en aquestes sublocalitzacions.

Al realitzar el mateix estudi en miotubs lesionats amb SDS 0,25mM, els resultats obtinguts varen ser molt similars. La reducció del temps de vida mig va ser del 2,66%, essent significativa la diferència entre el control negatiu (donant sol) i el parell donant-acceptor ($p < 0,05$).

Aquests resultats varen ser molt consistents i reproduïbles. Es varen confirmar utilitzant controls positius per FLIM-FRET. Els controls positius usats varen ser el parell disferlina-Annexina A1, del que la seva interacció directa mitjançant aquesta tècnica ja havia estat prèviament descrita, i el doble marcatge de la disferlina amb dos anticossos secundaris marcats un amb el fluoròfor acceptor i l'altre amb el fluoròfor donant.

Al estudiar la interacció disferlina-annexina A1 es va obtenir una caiguda del temps de vida mig del 8,95%, essent significativa la diferència entre el control negatiu (donant sol) i el parell donant-acceptor ($p < 0,05$) (Fig. 23K).

Com a control negatiu de la tècnica varem usar el parell disferlina-distrofina, on no varem poder observar reducció del temps de vida mig (reducció de -0,45%, $p > 0,05$), tal i com esperàvem per les dades d'altres estudis ja publicats [215](Fig. 23I).

La interacció AHNAK-Disferlina

El marcador d'enlargeosomes AHNAK també es va trobar al complex de la disferlina per BN. No es va trobar aquesta proteïna mitjançant els assaigs de immunoprecipitació, però això es degut, probablement, a la gran mida d'aquesta proteïna, ja que no es va retallar cap banda d'un pes molecular tant alt.

Tot i així, donat que la interacció disferlina-AHNAK ja havia estat descrita, varem decidir estudiar el tipus d'interacció entre ambdues proteïnes.

Al estudiar la interacció disferlina-AHNAK per FLIM-FRET, la caiguda del temps de vida mig de el fluoròfor donant va ser del 4,01%, sent significativa la diferència entre el temps de vida del donant sense acceptor i el donant junt amb l'acceptor ($p < 0,05$). La caiguda màxima del temps de vida mig, en aquest parell de proteïnes va ser de 2,4ns a 1,3ns (píxels blaus a la imatge pseudocolorejada, Fig. 23H).

La interacció Caveolina-3-Disferlina

S'ha descrit prèviament la interacció de la disferlina i la caveolina-3 mitjançant assaigs d' IP [21], però mai s'havia estudiat la naturalesa d'aquesta interacció. En els nostres experiments, varem trobar la caveolina-3 en el complex de la disferlina mitjançant BN, però no per IP. Varem estudiar la interacció d'aquestes dues proteïnes usant un anticòs que marca la part N-terminal de la caveolina-3 combinat amb un anticòs que marca la regió C-terminal de la disferlina, observant que no hi havia una reducció del temps de vida mig del fluoròfor donant ($p > 0,05$) (Fig. 23L). Per assegurar-nos que aquestes dues proteïnes no interaccionen per una altra regió, varem repetir els experiments usant un anticòs que reconeix la regió N-terminal de la disferlina, observant igualment que no es produïa una reducció en el temps de vida mig del fluoròfor donant.

Interacció Caveolina-3-Trim72/MG53

Donat que esta descrit que la disferlina forma un complex amb la caveolina-3 i la proteïna Trim72/MG53 [92] i els nostres experiments demostren que la caveolina-3 i la disferlina no interaccionen directament, ens varem proposar estudiar la interacció entre la caveolina-3 i el trim72/MG53, ja que aquesta última si que interacciona directament amb la disferlina i podria ser la connexió entre la caveolina-3 i la disferlina.

Al estudiar per FLIM-FRET la interacció entre el trim72/MG53 i la caveolina-3 varem observar una disminució en el temps de vida mig del fluoròfor donant d'aproximadament un 2,56% ($p < 0,05$), confirmant la nostra hipòtesi.

Interacció Miomesina-2-Disferlina

Les miomesines 2 i 3 van ser trobades per BN. A més, la miomesina-2 també es va trobar per IP en múscul esquelètic adult, tot hi que amb un índex (score) inferior a 30. Aquesta proteïna havia estat trobada

també en els estudis de De Morrée i col·laboradors [65], i per això varem decidir estudiar més en profunditat la seva interacció amb la disferlina. Al realitzar els estudis de FLIM-FRET varem observar una caiguda del temps de vida mig del fluoròfor donant del 3,68% ($p < 0,05$), mostrant així que la interacció entre la disferlina i la miomesina-2 és directe (Fig. 23N). La caiguda màxima del temps de vida mig va ser des de els 2,3ns en absència del fluoròfor acceptor, fins als 1,4ns en presència d'ambdós fluoròfors.

Interacció Calseqüestrina-1-Disferlina

La calseqüestrina-1 va ser trobada tant en els experiments de BN com en els d'IP, en teixit muscular adult. Aquesta és una proteïna dels túbuls T, relacionada també amb la DHPR [216]. Per aquest motiu varem estudiar la naturalesa de la seva interacció amb la disferlina mitjançant FLIM-FRET. La caiguda del temps de vida mig del fluoròfor donant en el parell disferlina-calseqüestrina-1 va ser del 3,58% ($p < 0,05$), mostrant una interacció directe entre aquestes dues proteïnes (Fig. 23C). La màxima caiguda va ser dels 2,3ns als 1,4ns.

Interacció dineina citoplasmàtica-disferlina

També varem trobar diverses subunitats de la dineina citoplasmàtica en els diferents experiments de BN i en els assaigs d'IP, tant en múscul adult com en miotubs. Es varen trobar la cadena intermèdia 2 i la cadena lleugera intermèdia 2 d'aquesta proteïna per IP, en miotubs i múscul adult respectivament. La cadena pesada es va trobar mitjançant BN.

Com a primera aproximació per tal d'estudiar la relació entre la dineina i la disferlina, varem realitzar un assaig d'IP utilitzant un anticòs anti-dineina, en extractes proteics de múscul esquelètic sà, i de pacients amb dèficit de disferlina o dèficit de caveolina-3. Varem constatar que la disferlina co-IP amb la dineina tant en músculs sans com en músculs deficients en caveolina-3. En el múscul deficient en disferlina no varem observar co-IP de disferlina (Fig. 22).

Al estudiar aquesta interacció (disferlina-dineina) mitjançant la tècnica de FLIM-FRET la caiguda del temps de vida mig del donant va ser del 2,76% ($p < 0,05$). La caiguda màxima va anar dels 2,1ns als 1,3ns, i aquesta caiguda es veia recuperada després de cremar el fluoròfor acceptor en una àrea determinada (ROI, Region Of Interest), confirmant així la interacció directe (Fig. 23O).

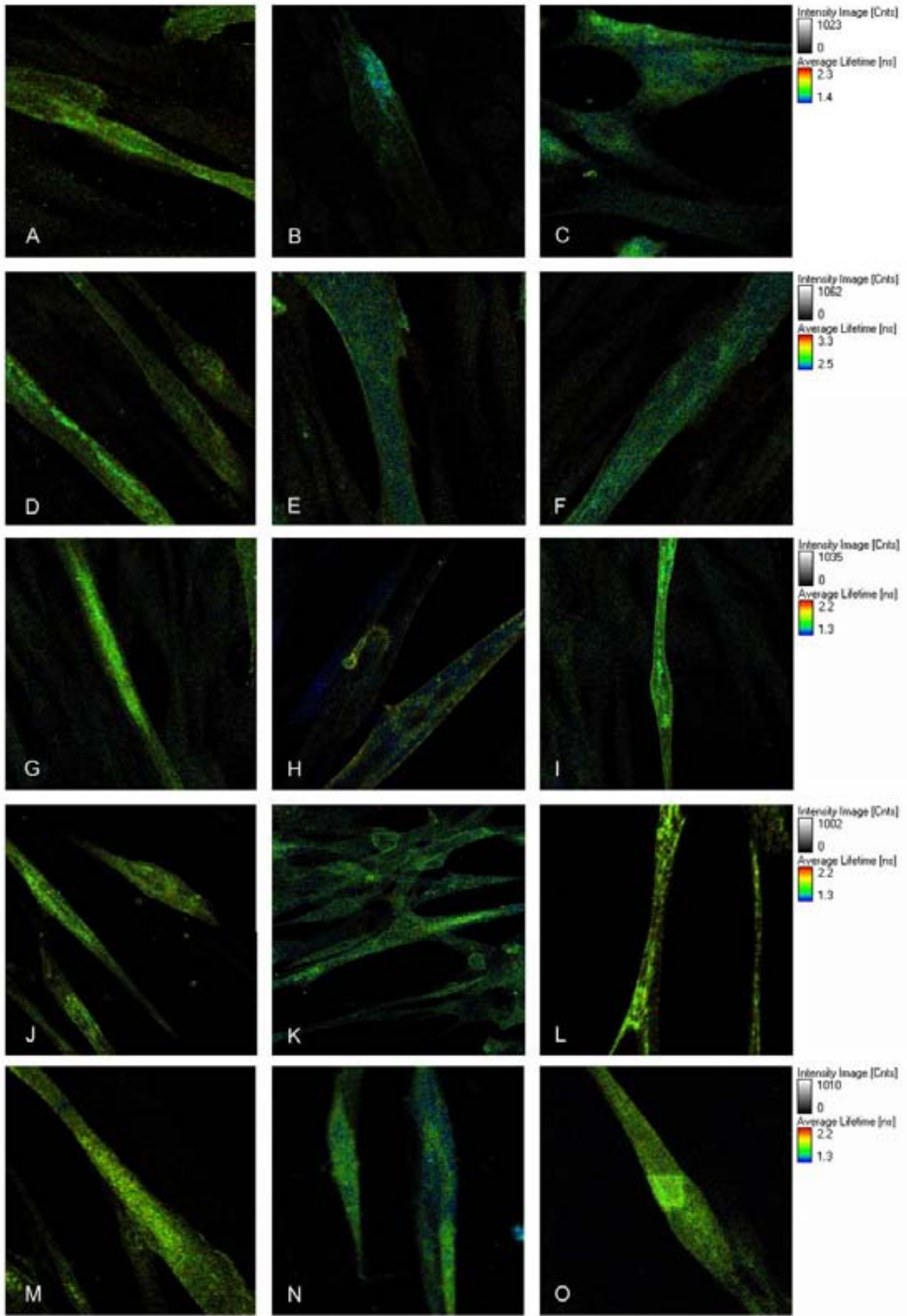


Figura 23. Anàlisi per FLIM-FRET en miotubs humans control. Només les proteïnes que es troben a una distància igual o inferior a 10nm mostren un escurçament del temps de vida mig (píxels blaus) en les imatges pseudocolorejades. L'escala colorimètrica mostra el temps de vida mig del fluoròfor donant (Alexa Fluor 488) en nanosegons. Les imatges A, D, G, J i M mostren els temps de vida mig del fluoròfor donant en absència del acceptor per cada experiment. B) control positiu detectant al disferlina amb dos anticossos diferents; C) interacció calseqüestrina-1/disferlina; E) interacció Trim72/disferlina en cèl·lules no lesionades; F) Interacció Trim 72/disferlina en cèl·lules lesionades; H) Interacció AHNAK/disferlina; I) interacció distrofina/disferlina; K) Interacció annexina A1/disferlina; L) Interacció caveolina-3/disferlina; N) Interacció Miomesina-2/disferlina i O) interacció dineina/disferlina després de cremar el fluoròfor acceptor en una determinada regió d'interès.

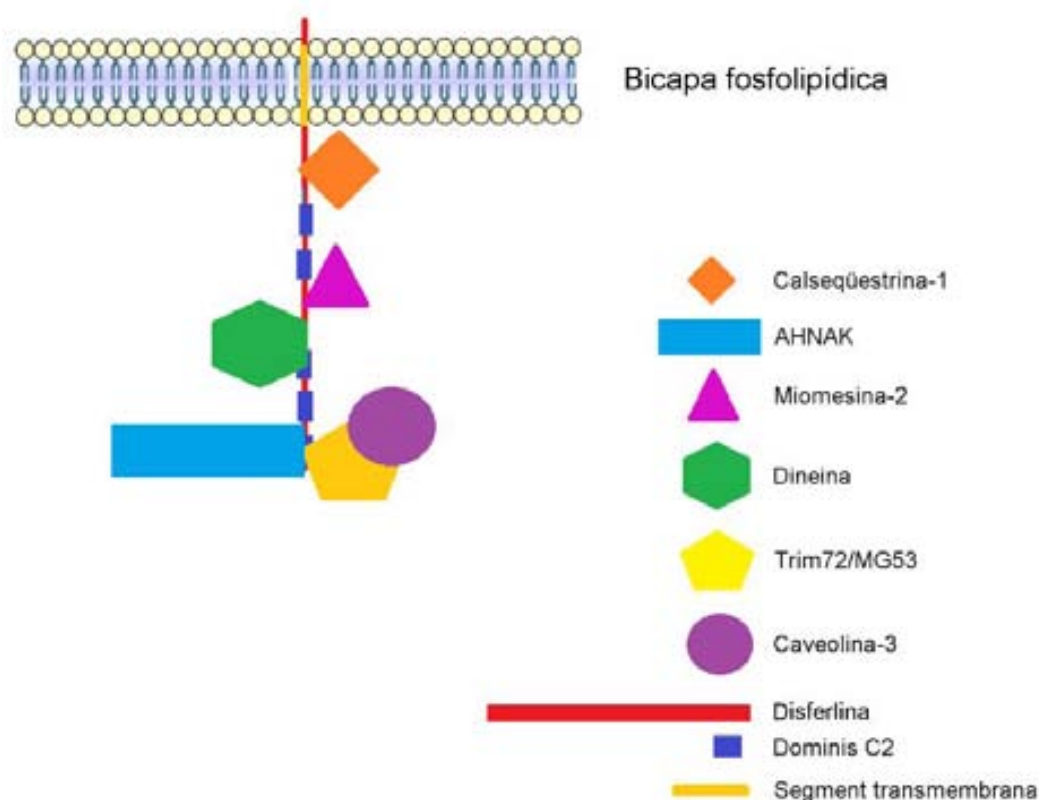


Figura 24. Dibuix esquemàtic representant les interaccions de la disferlina estudiades per FLIM-FRET en aquests estudi.

3.5 Anàlisi IPA

Les proteïnes de la taula 7 varen ser analitzades mitjançant el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Varem obtenir dues xarxes d'interaccions principals, on es varen poder incloure la majoria de les proteïnes de la taula 7. La xarxa amb major representació va ser la anomenada xarxa de “Malalties immunològiques, càncer i condicions i malalties dermatològiques” (“*Immunological Disease, Cancer, Dermatological Diseases and Conditions network*”), amb un score de 83 (representada a la Fig. 25), en la qual apareixien 34 de les 46 proteïnes de la taula 7 que varen ser analitzades.

La segona xarxa més representada a l'anàlisi IPA va ser l'anomenada “Metabolisme dels carbohidrats, Senyalització cel·lular i Transport molecular” (“*Carbohydrate Metabolism, Cell Signaling, Molecular Transport network*”), amb un score de 26, a on apareixien 14 de les 49 proteïnes analitzades.

A més, l'anàlisi IPA també agrupa les proteïnes segons les anomenades biofuncions, trobant relacions entre les proteïnes estudiades i la funció i estructura del múscul, malalties inflamatòries, transport molecular, etc. (Figura 26)

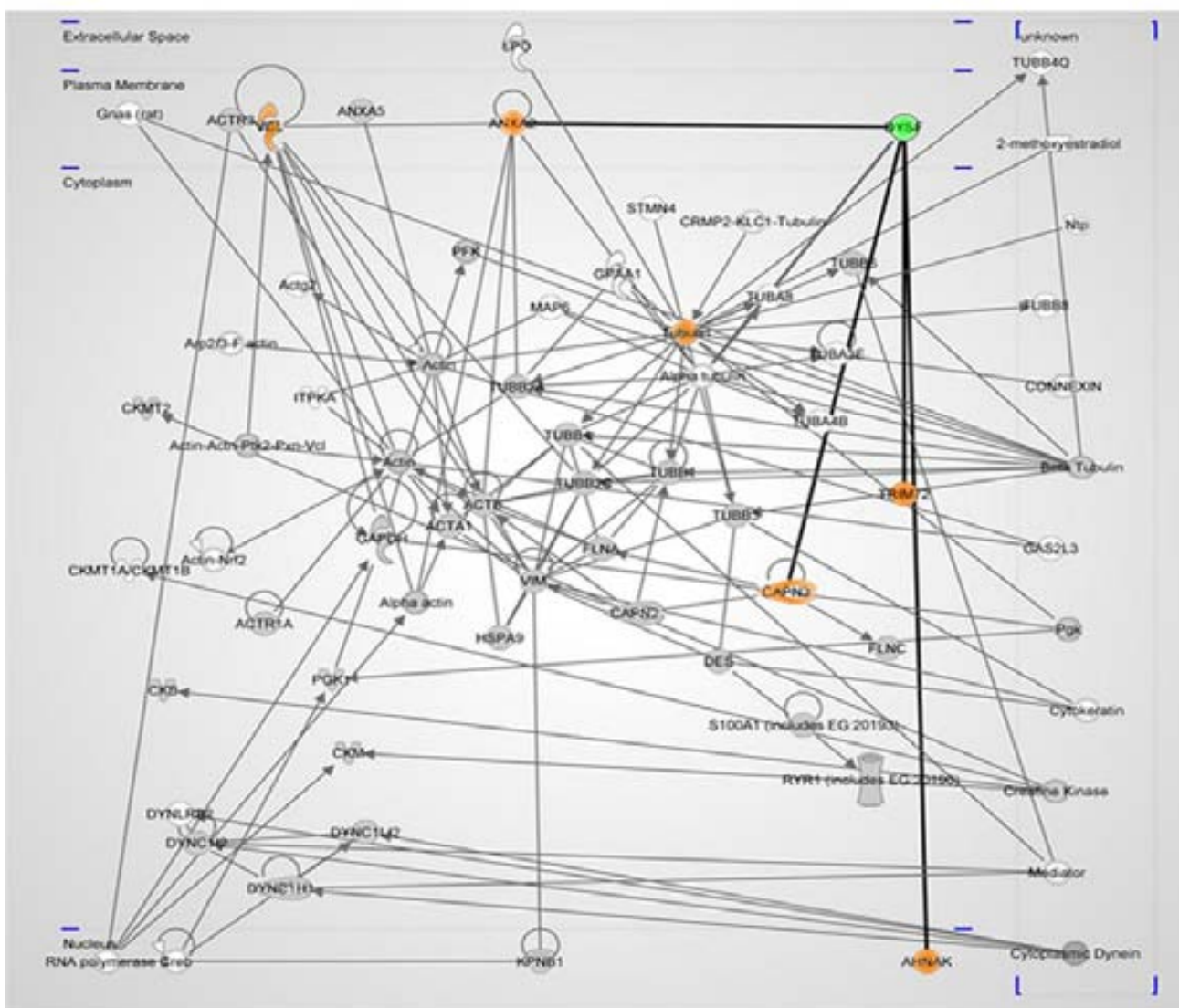


Figura 25. IPA Networking. Esquema de les interaccions descrites mitjançant el software IPA en la xarxa amb millor puntuació, que va ser la anomenada “malalties immunològiques, Càncer, malalties dermatològiques i condicions”. Les interaccions en negreta són les considerades com a interaccions directes pel software. Les proteïnes de la taula 7 (34/46) estan representades en gris. Les proteïnes afegides pel programa per completar la xarxa es mostren en blanc. La disferlina està representada en verd, i les proteïnes de les que ja es coneixia la seva interacció amb la disferlina, en taronja.

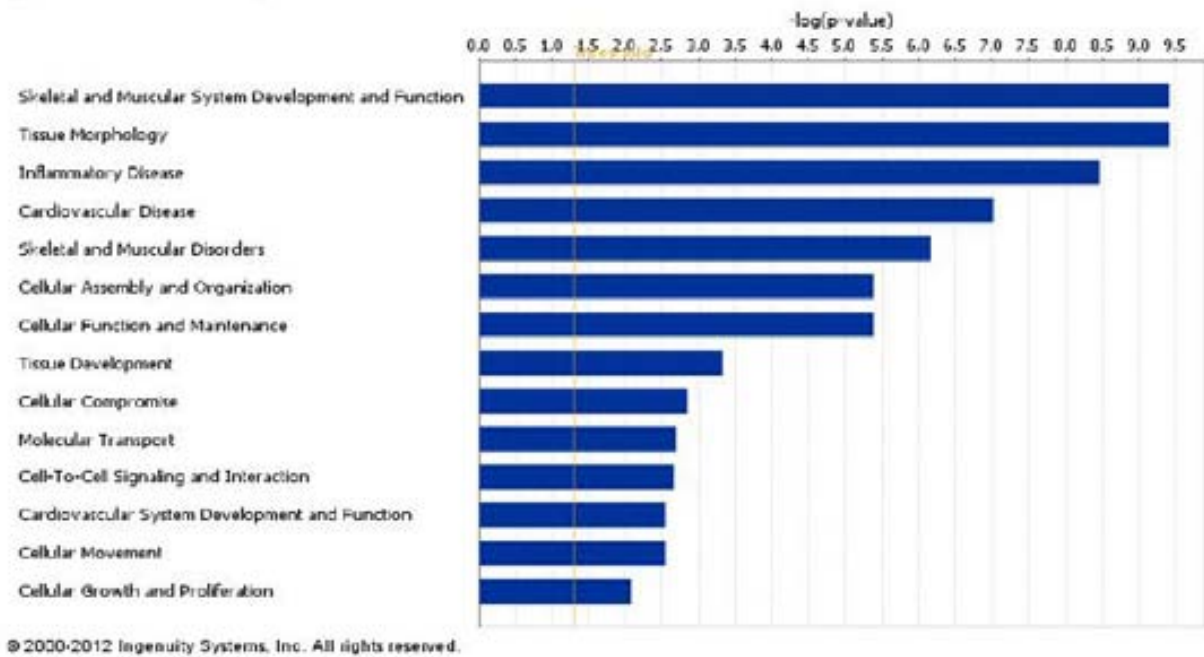


Figura 26. IPA networking. Biofuncions compatibles amb les proteïnes de la llista introduïda al software IPA (taula 7). La biofunció més important i comú entre les proteïnes introduïdes va ser la anomenada “desenvolupament i funció dels sistemes esquelètic i muscular”, seguida de “morfologia tissular”, “malalties inflamatòries”, “malalties cardiovasculars” i “malalties musculars i esquelètiques”.

3.6 Caracterització de l’expressió de les proteïnes del complex de la disferlina en pacients amb disferlinopatia

Expressió en miotubs humans en cultiu

Varem estudiar el patró d’expressió en miotubs en cultiu de diverses proteïnes identificades en els nostres experiments com a membres del complex de la disferlina. Primer varem comparar el patró d’expressió en miotubs controls provinents d’un recte intern i de un vaste lateral amb miotubs de dos pacients amb disferlinopatia (VM i ERP). Les proteïnes estudiades varen ser la dineïna citoplasmàtica, el trim72/MG53, l’AHNAK, caveolina-3, miomesina-2, calseqüestrina-1 i l’annexina A1 (fig. 27 i fig. 28).

No es varen observar diferències en la distribució de l’AHNAK, caveolina-3 ni en la miomesina-2.

En canvi, la resta de proteïnes presentaven un patró de localització diferent al comparar miotubs control amb els miotubs dels pacients. L’annexina A1 (A1) semblava sobreexpressada en els pacients amb mutacions al gen DYSF. Aquest augment d’expressió havia estat prèviament descrit mitjançant la tècnica de WB [217]. A més, mitjançant ICQ semblava que l’annexina A1, en els pacients amb dèficit de disferlina, presenta un patró subsarcolemmal més clar que en els miotubs control (fig. 27).

Les immunocitoquímiques per dineïna (DYN) en miotubs control, mostren que aquesta proteïna es situa al citoplasma de manera relativament homogènia, mostrant una espècie d’estructures vesiculars sense tinció a l’interior (fig. 28D). La tinció per dyn en miotubs provinents d’un pacient amb DMD, mostrava un

patró similar al del control (fig. 28F). En el cas de la tinció en miotubs disferlina negatius, aquestes estructures vesiculars semblaven més irregulars i d'una mida més gran, a més de mostrar un patró de tinció menys homogeni i aparentment reduït (fig. 28E).

Al estudiar el patró d'expressió de la proteïna Trim72/MG53 (trim72) en miotubs humans control i d'un pacient amb DMD, varem observar que aquesta proteïna s'expressa al citoplasma però sobretot, sembla localitzar-se a estructures vesiculars, marcant l'interior d'aquestes (fig. 28G i 28I respectivament). El patró d'expressió en miotubs de pacients de disferlinopatia mostrava una acumulació d'aquesta proteïna en forma de vesícules engrandides i una aparent disminució a nivell del citoplasma (fig. 28H).

Per últim, a l'estudiar la calseqüestrina-1 (CALQ1), aquesta presentava una tinció molt homogènia a nivell citoplasmàtic en els controls (fig. 28J), i una lleu acumulació subsarcolemmal en els pacients, pràcticament indetectable (fig. 28K). A més, varem observar una aparent reducció d'aquesta proteïna tant en els miotubs de pacients de disferlinopatia com en els de pacients de DMD (fig. 28L)

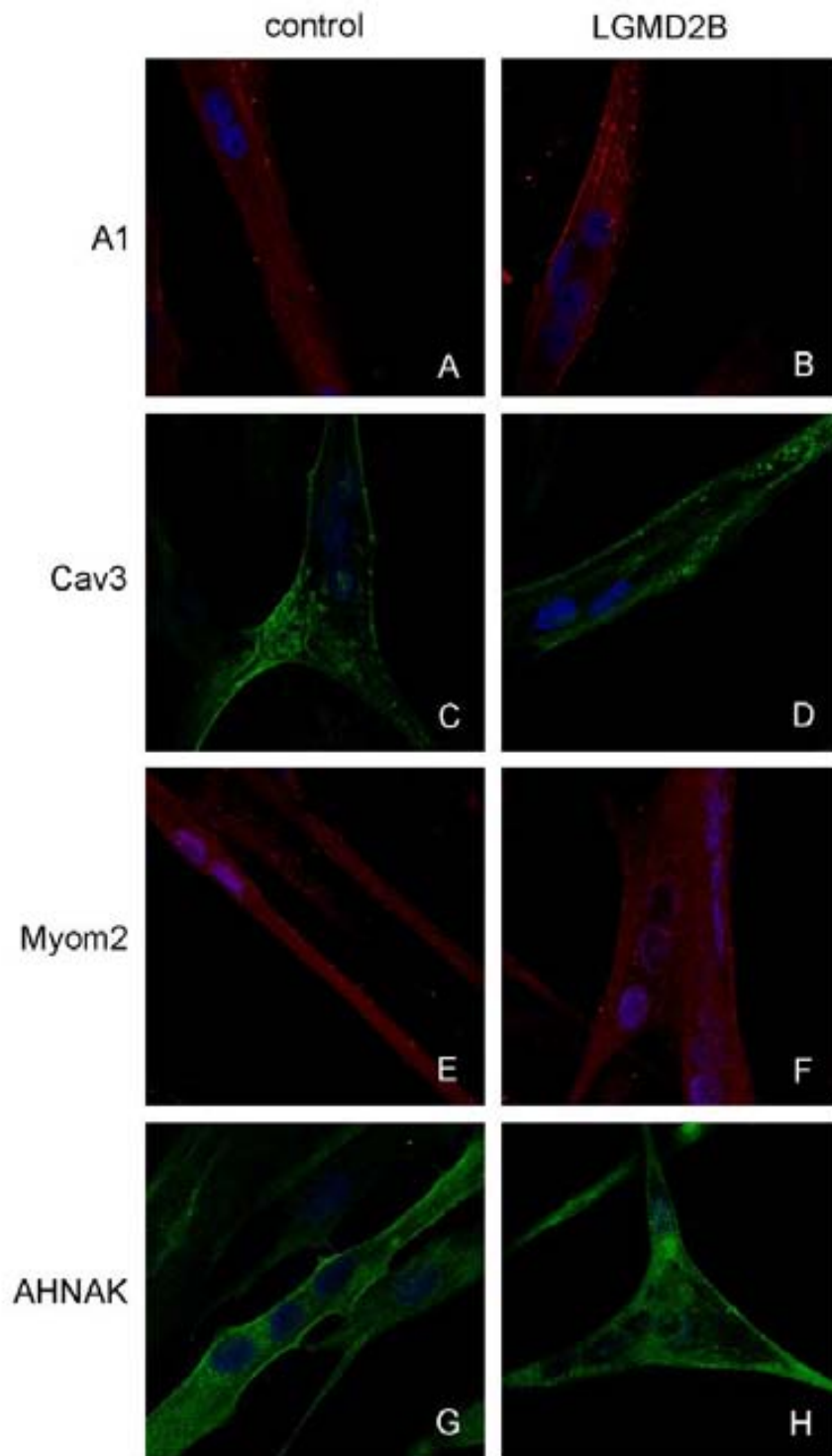


Figura 27. Immunocitoquímica en miotubs humans. Les imatges A, C, E i G mostren el patró normal d'expressió de l'annexina A1 (A1), la Caveolina-3 (Cav3), la Miomesina-2 (myom2) i AHNAK respectivament. Les imatges B, D, F i H mostren el patró d'expressió d'aquestes proteïnes en miotubs provinents d'un pacient amb disferlinopatia. El patró d'expressió es normal per totes aquestes proteïnes excepte per l'annexina A1, la qual esta lleugerament augmentada al sarcolemma i acumulada al citoplasma. Imatges preses a 630x.

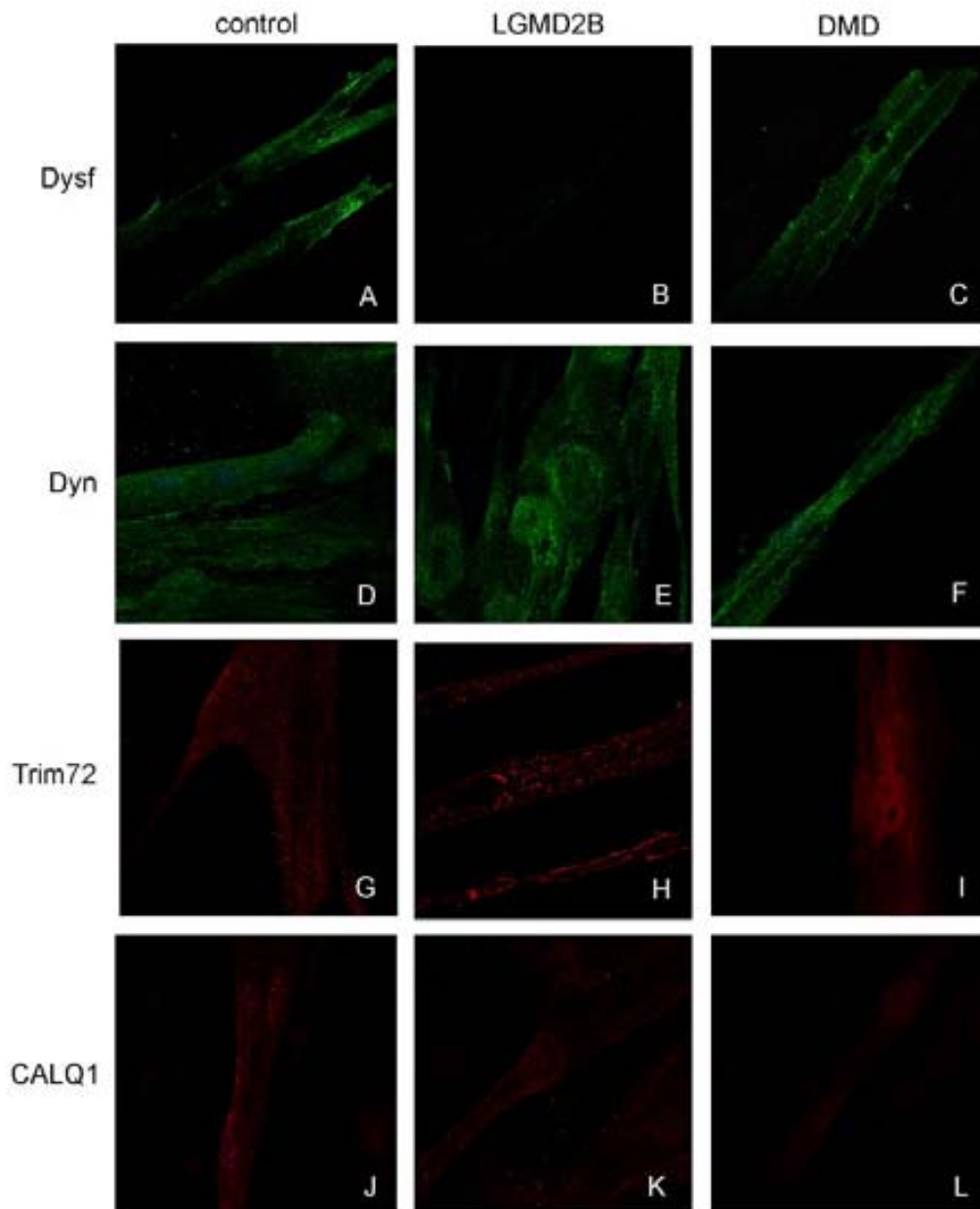


Figura 28. Immunocitoquímica de proteïnes del complex de la disferlina en miotubs. Marcatge de la disferlina (Dysf) en miotubs control (A), miotubs $Dysf^{+/}$ (B) i miotubs DMD (C); marcatge de la dineïna citoplasmàtica (Dyn) en miotubs control (D), miotubs $Dysf^{+/}$ (E) i miotubs DMD (F); marcatge de Trim72/MG53 (Trim72) en miotubs control (G), miotubs $Dysf^{+/}$ (H) i miotubs DMD (I); marcatge de la calseqüestrina-1 (CALQ1) en miotubs control (J), miotubs $Dysf^{+/}$ (K) i miotubs DMD (L). Imatges preses a 630x.

Expressió en biòpsies musculars de pacients

Es va estudiar l'expressió d'algunes proteïnes del complex de la disferlina en talls criostàtics de biòpsies musculars provinents de controls sans, pacients de disferlinopatia, pacients de distròfia fascio-scapulo-humeral (FSHD) i de calpainopatia (LGMD2A).

Al estudiar el patró d'expressió de la dineina citoplasmàtica (dyn), tant en els controls (fig. 29E) com en els pacients de FSHD (fig. 29G) i calpainopatia (fig. 29H), varem observar un patró similar al de tipus de fibra, i amb un patró d'agregats. En canvi, varem observar un patró molt diferent en els pacients de disferlinopatia, amb una reducció intracitoplasmàtica i una acumulació subsarcolemmal (fig. 29F). A més, no hi havia un aparent patró de tipus de fibra.

La tinció per la proteïna trim72/MG53 mostrava un patró difús al citoplasma amb la presència de pegats ("patches") al sarcolemma en fibres aïllades. Aquests pegats eren més freqüents en tots els pacients, però especialment en els pacients de disferlinopatia (fig. 29J). A més, el marcatge citoplasmàtic de trim72/MG53 en els pacients de disferlinopatia era més dèbil, com era d'esperar segons un estudi previ [217].

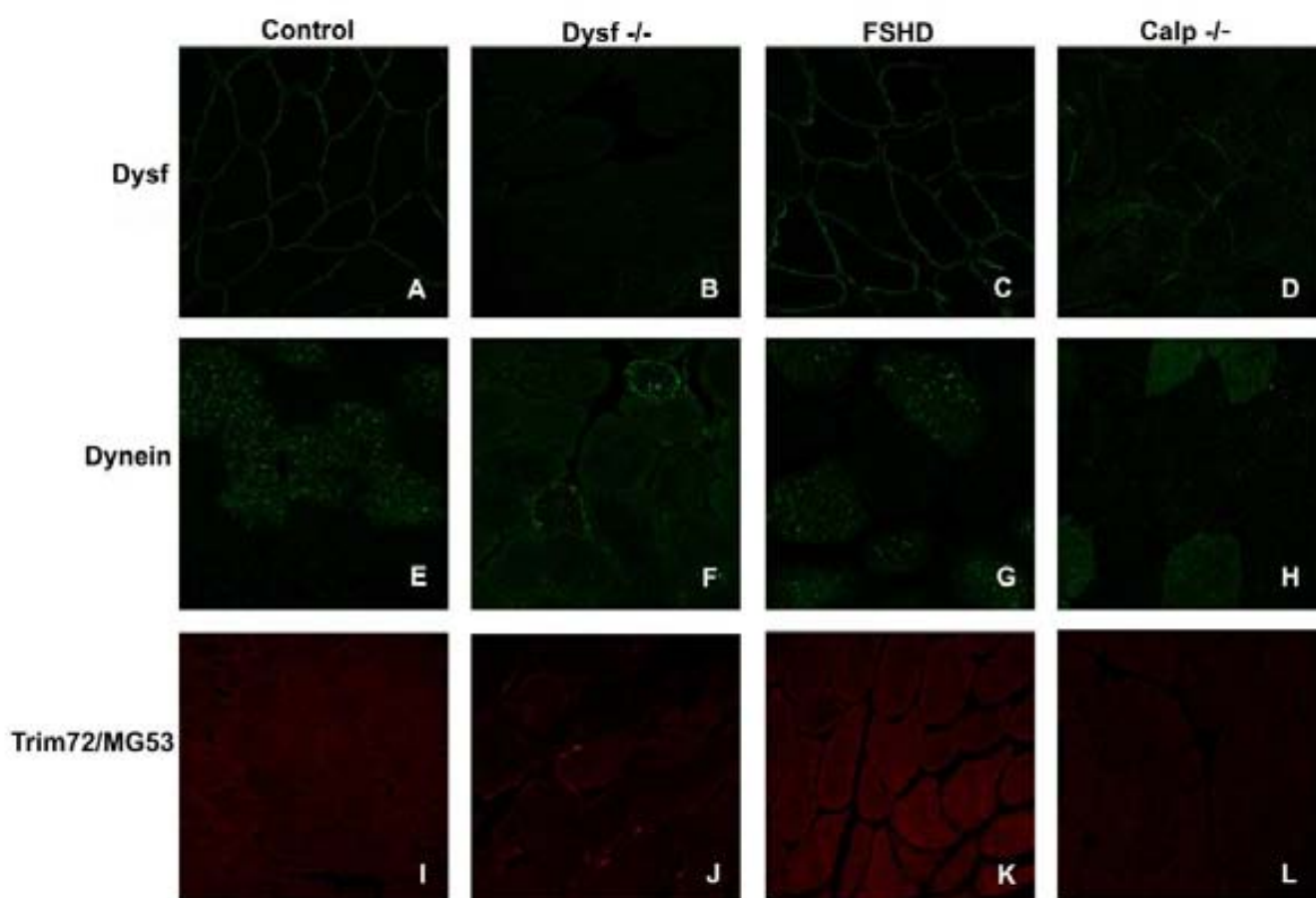


Figura 29. Immunohistoquímica en biòpsies humanes mostrant el patró d'expressió de la disferlina en un control sà (A), un pacient amb disferlinopatia (B), un pacient amb FSHD (C) i un pacient amb LGMD2A (Calp-/-) (D); el patró d'expressió de la dineina citoplasmàtica (dyn) en un control sà (E), un pacient amb disferlinopatia (F), un pacient amb FSHD (G) i un pacient amb LGMD2A (Calp-/-) (H); i el patró d'expressió de Trim72/MG53 en un control sà (I), un pacient amb disferlinopatia (J), un pacient amb FSHD (K) i un pacient amb LGMD2A (Calp-/-) (L). Les imatges A-H varen ser preses a 630x, les imatges I-L a 400x.

4. La línia cel·lular HL60 és capaç de fusionar amb miotubs *in vitro*

Per tal d'avaluar la capacitat de cèl·lules monocítiques de fusionar amb miotubs humans, varem realitzar estudis de co-cultiu de la línia premeilocítica HL60 amb miotubs humans. Per tal de poder monitoritzar la fusió entre ambdós tipus cel·lulars, les HL60 es van marcar mitjançant la transfecció amb un plàsmid comercial d'expressió constitutiva de pmaxGFP.

Després d'un co-cultiu de 24h de les HL60 GFP+ amb les cèl·lules musculars, es van poder observar alguns miotubs GFP+ tant en les cèl·lules lesionades com en les no lesionades.

A les 48h de co-cultiu, es va poder observar un increment en el nombre de miotubs GFP+, tant en les cèl·lules lesionades, com en les no lesionades (fig. 31). L'índex de fusió a les 48h de co-cultiu va resultar en $73,33 \pm 2,22$ fusions/cm² en el cas de les cèl·lules musculars lesionades, i de $37,77 \pm 5,55$ fusions/cm² en el cas del co-cultiu amb miotubs no lesionats. La relació de l'índex de fusió entre les dues condicions va resultar de 1,94 vegades més fusió en els cultius lesionats respecte els controls no lesionats. Per tant, podem afirmar que la línia HL60 diferenciada a monòcit és capaç de fusionar amb miotubs humans en cultiu i que la lesió muscular intensifica la fusió entre cèl·lules monocítiques i miotubs *in vitro*.

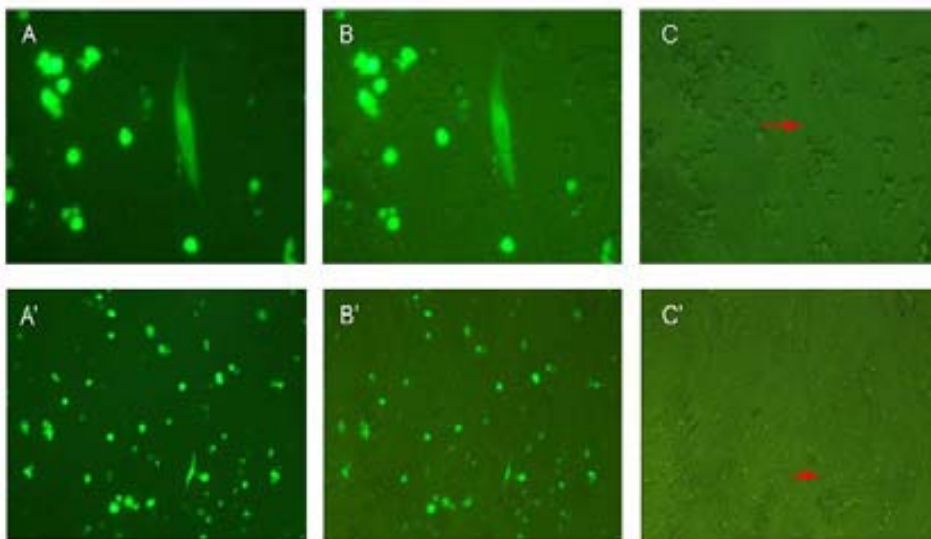


Figura 31. (A, A') Imatges de microscopia de fluorescència, (B, B') microscopia de fluorescència combinada amb camp clar, (C, C') microscopia en camp clar, amb una fletxa es senyala el miotubs que presenten fluorescència. A, B i C són fotografies d'un miotub fluorescent a 400X. A', B' i C' mostren un miotub expressant GFP a 100 X.

5. Estudi de la capacitat terapèutica del trasplantament de moll d'os en un model murí de disferlinopatia

Per tal de testar la fusió *in vivo* de cèl·lules de la línia hematopoiètica amb el teixit muscular i la seva potencialitat com a teràpia per les miopaties per dèficit de disferlina, varem realitzar un trasplantament de moll d'os en el model murí de disferlinopatia A/J $Dysf^{prmd}$. El principal problema en el disseny experimental va ser la falta de un model murí sense mutacions al gen DYSF però amb el mateix fons genètic que la soca A/J. Al realitzar una cerca bibliogràfica varem trobar que aquesta soca de ratolins era comercialitzada per dues companyies, Jackson laboratories i Harlan. La mutació al gen DYSF es va detectar a Jackson laboratories.

5.1 Identificació d'una soca de ratolins A/J sense mutacions al gen de la disferlina

L'any 2004 Ho i col·laboradors [134] varen descriure la inserció d'un retrotransposó a l'intró 4 del gen DYSF en la soca murina A/J comercialitzada per la companyia Jackson laboratories. Al proposar-nos realitzar aquest estudi de trasplantament de moll d'os, varem trobar que la companyia Harlan laboratories comercialitzava aquesta soca a Europa. Per aquest motiu varem comprar els animals a Harlan Laboratories. Al realitzar un estudi pilot, varem observar que tots els ratolins expressaven nivells normals de disferlina per WB i IHQ. Aquest resultat inesperat ens va decidir a genotipar tots els animals tal i com havien descrit Ho i col·laboradors[134]. Al genotipar la soca murina A/J provinent de Harlan Laboratoires, seguint el protocol prèviament descrit, no es va poder amplificar el retrotransposó que causa la falta d'expressió de disferlina en la soca A/J $Dysf^{prmd}$ (Fig. 32).

Ho i col·laboradors, varen descriure que la mutació al gen DYSF es va ocasionar entre el final dels anys 70 i el començament dels 80. Ens varem posar en contacte amb Harlan Laboratories, i aquests ens varen informar que varen comprar la soca A/J a Jackson laboratories a principis dels anys 70. Per tant, en aquest treball descrivim per primer cop una colònia de ratolins A/J sense la mutació en el gen DYSF prèviament descrita per Ho i col·laboradors Aquests ratolins presenten una expressió normal de disferlina tant en múscul com en monòcits de sang perifèrica i a la melsa.

Així doncs, per aquests estudi es varen obtenir ratolins d'ambdues companyies. Varem genotipar la mutació descrita en la soca A/J $Dysf^{prmd}$ en tots els animals, observant que només amplificàvem el retrotransposó inserit al gen DYSF en els ratolins provinents de Jackson Laboratories.

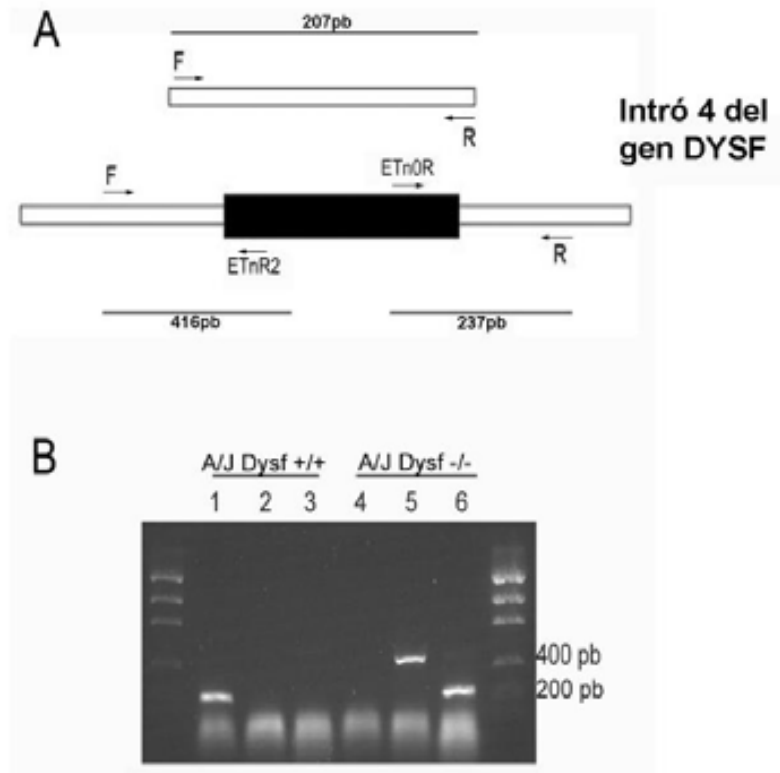


Figura 32. Identificació de la mutació al gen DYSF en la soca murina A/J.

A) Esquema de la regió genètica afecte per la inserció del retrotransposó (en negre) en la soca murina A/J $Dysf^{prmd}$, i els llocs d'unió dels encebadors usats per amplificar la regió.

B) Gel d'agarosa mostrant les bandes obtingudes al genotipar ratolins A/J $Dysf^{+/+}$ (carrils 1-3) i ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ (carrils 4-6). Als carrils 1 i 4, el DNA genòmic es va amplificar usant el parell d'encebadors F i R. Als carrils 2 i 5, el DNA genòmic es va amplificar usant el parell de cebadors F i EtnR2. Als carrils 3 i 6, el DNA genòmic es va amplificar amb el parell de cebadors R i EtnOR.

5.2 Trasplantament de moll d'os

En aquest estudi es van realitzar dos experiments de transplantament de moll d'os.

Primer transplantament de moll d'os (BMT1)

El disseny experimental del primer transplantament (BMT1) va ser el següent:

Grup A: Ratolins femella de 2 mesos d'edat no trasplantats A/J $Dysf^{+/+}$ (H-2^a). (n=20)

Grup B: Ratolins femella de 2 mesos d'edat no trasplantats A/J $Dysf^{prmd}$ (H-2^a). (n=20)

Grup C: Trasplantament singènic (5 ratolins mascles donants A/J $Dysf^{prmd}$) de moll d'os a ratolins femella de 2 mesos d'edat A/J $Dysf^{prmd}$ (H-2^a). (n=20).

Grup D: Trasplantament al·logènic (5 ratolins mascles donants A/J $Dysf^{+/+}$) de moll d'os a ratolins femella de 2 mesos d'edat A/J $Dysf^{prmd}$ (H-2^a). (n=20).

Els animals van ser tractats amb una dosi d'irradiació totalment mieloablativa prèviament a la injecció de 3.000.000 cèl·lules per via intraperitoneal. L'estudi es va plantejar per estudiar els animals 3 mesos i 10 mesos després del trasplantament.

Tres mesos després del trasplantament es va procedir a l'eutanàsia i extracció de mostra de 10 animals de cadascun dels 4 grups del procediment. Es varen extreure la melsa, el quàdriceps i el bessó per ser estudiats per WB i IHQ.

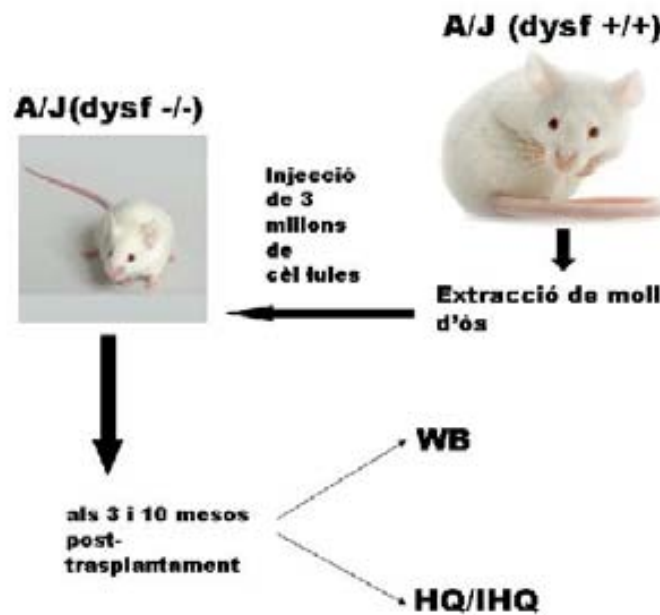


Figura 33. Esquema del disseny experimental del primer trasplantament de moll d'os.

La supervivència dels animals 10 mesos després del trasplantament de moll d'os va ser molt baixa, impedit l'estudi d'aquests. Per tant, tots els resultats reflectits a continuació es varen obtenir a partir dels ratolins eutanasiats als 3 mesos post-trasplantament.

- El trasplantament de moll d'os restaura l'expressió de disferlina en sang perifèrica

L'anàlisi mitjançant WB de disferlina en les cèl·lules de la melsa dels ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ tractats amb cèl·lules $Dysf^{+/+}$ va mostrar la recuperació de l'expressió d'aquesta proteïna (fig. 34). En contrast, els ratolins no tractats o trasplantats amb cèl·lules $Dysf^{-/-}$ no varen mostrar expressió de disferlina per WB.

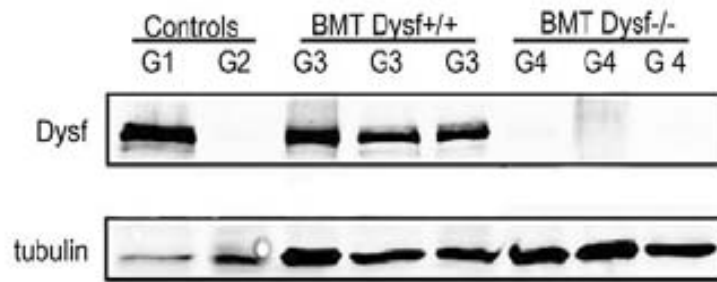


Figura 34. Anàlisi per western blot de les cèl·lules de la melsa. Experiment de trasplantament 1. G1: A/J Dysf^{f/+}; G2: A/J Dysf^{f^{prmd}}; carrils G3: A/J Dysf^{f^{prmd}} trasplantats amb cèl·lules de moll d'os Dysf^{f/+}; i G4: A/J Dysf^{f^{prmd}} trasplantats amb cèl·lules de moll d'os Dysf^{f/-}.

- El trasplantament de moll d'os no provoca l'expressió de disferlina en el múscul esquelètic de ratolins joves

A l'estudiar l'expressió de la proteïna en múscul per WB, varem observar una absència total de disferlina tant en els ratolins trasplantats de forma heteròloga com autòloga (fig. 35).

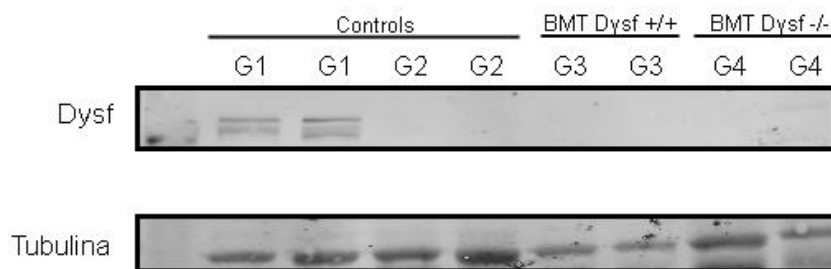


Figura 35. Anàlisi de l'expressió de disferlina en múscul esquelètic mitjançant WB. G1: A/J Dysf^{f/+}; G2 A/J Dysf^{f^{prmd}}; G3; A/J Dysf^{f^{prmd}} trasplantats amb moll d'os Dysf^{f/+} i G4: A/J Dysf^{f^{prmd}} trasplantats amb moll d'os Dysf^{f/-}.

En els estudis d'immunolocalització, es va poder observar l'absència de fibres positives en els ratolins trasplantats d'ambdós grups (fig. 36B), tot i que es van poder observar algun indici de l'expressió de disferlina en alguna fibra aïllada en els ratolins trasplantats heteròlogament (fig. 36C i 36D). Aquestes fibres mostraven un patró irregular, sent positives només en algunes zones de la membrana.

En l'estudi histològic d'aquest ratolins, varem observar que l'estat del teixit era aparentment similar entre els ratolins A/J Dysf^{f^{prmd}} trasplantats i els ratolins sense trasplantar, amb la presència de pocs nuclis centrals, amb diferències entre la mida de les fibres, algunes fibres partides (fenomen de *splitting*) però poca afectació en general. Varem observar la presència d'infiltrats inflamatoris a nivells similars entre els ratolins trasplantats autòlogament, els trasplantats heteròlogament i els no trasplantats (fig. 37B, 37C i 37D)

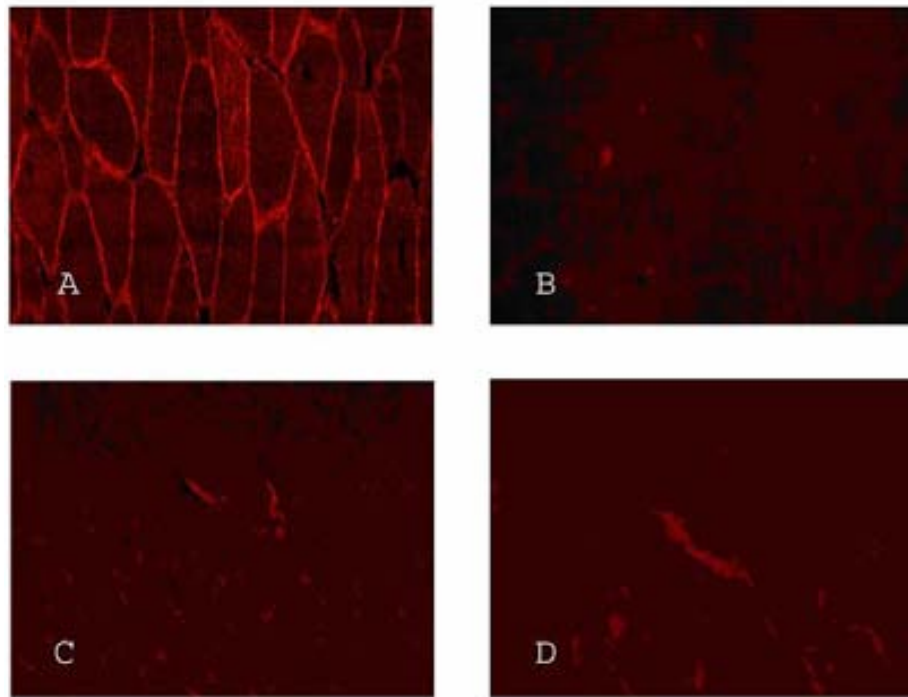


Figura 36. Immunohistoquímica de disferlina en múscul esquelètic. A) A/J Dysf^{+/+} (200x); B) A/J Dysf^{prmd} (200x); C) A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb moll d'os Dysf^{+/+} (200x) i D) visualització de el mateix camp que en la imatge C a 400x.

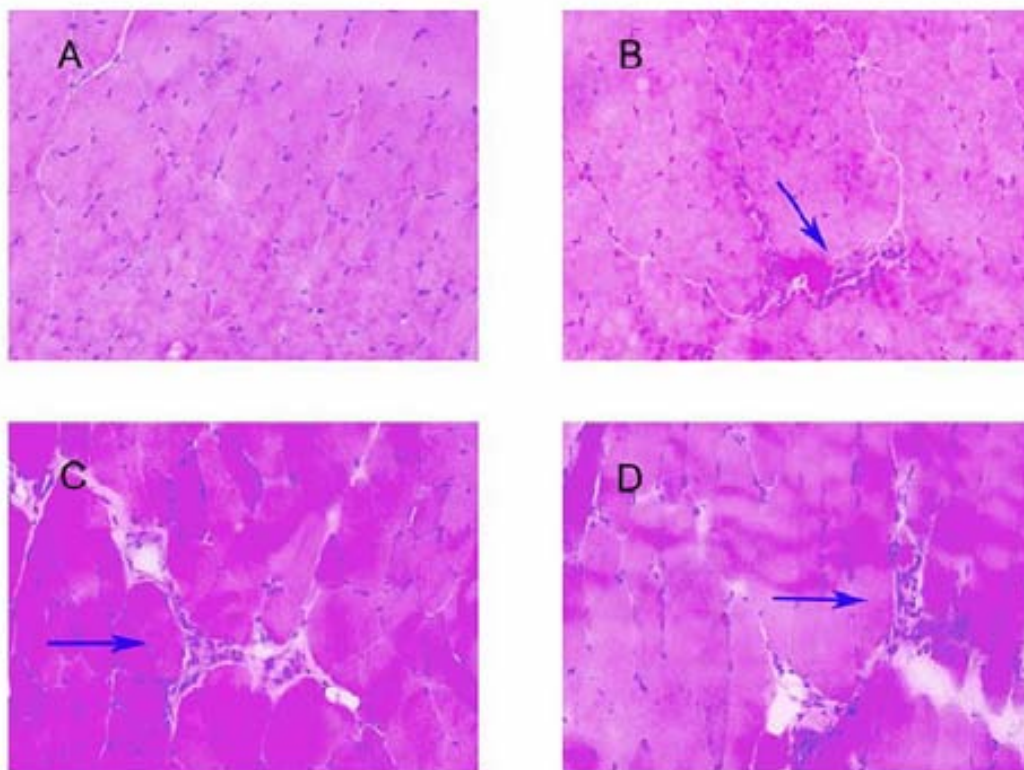


Figura 37. Anàlisi histològic del múscul esquelètic dels ratolins mitjançant la tinció H&E. Tinció H&E de múscul esquelètic d'un ratolí control A/J Dysf^{+/+} (A), un ratolí A/J Dysf^{prmd} (B), un ratolí A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb moll d'os Dysf^{+/+} (C) i un ratolí A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb moll d'os Dysf^{-/-} (D). Les fletxes indiquen infiltrats inflamatoris.

Segon trasplantament de moll d'os (BMT2)

En aquest estudi es va realitzar un segon trasplantament de moll d'os, amb la mateixa distribució de grups però amb una n=10 per cada grup.

Els animals van ser tractats amb una dosi d'irradiació parcialment mieloablative prèviament a la injecció de 3.000.000 cèl·lules per via intravenosa. L'estudi es va plantejar per estudiar els animals 10 setmanes després del trasplantament.

Quatre setmanes després del trasplantament es va procedir a lesionar amb cardiotoxina el tibial anterior i el bessó de la pota esquerra de tots els ratolins trasplantats. 6 setmanes després de la lesió es va procedir a la realització de tests funcionals, i un cop finalitzats aquests, a l'eutanàsia i extracció de mostra de tots els animals d'aquests segon estudi. Es varen extreure la melsa, el quàdriceps, els bessons esquerra i dret i els tibials anteriors esquerra i dret per ser estudiats per WB, IHQ i/o PCR a temps real.

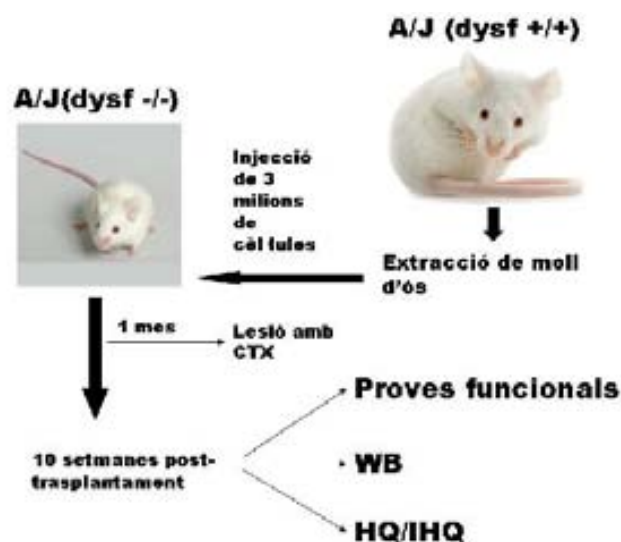


Figura 38. Esquema del disseny experimental del segon trasplantament de moll d'os.

- Millora funcional i histològica en els ratolins trasplantats heteròlogament amb cèl·lules de moll d'os *Dysf^{+/+}*

En aquests estudi varem realitzar tres proves funcionals a tots els ratolins: l'estudi de la conducció nerviosa, l'estudi per electromiografia i l'estudi de la locomoció mitjançant el Digigait. A més, també varem realitzar un estudi histològic.

Electromiografia i test de conducció nerviosa

No es varen observar canvis entre els ratolins de cap dels 4 grups estudiats en els tests de conducció nerviosa.

L'anàlisi dels registres d'EMG varen mostrar MUAPs amb amplituds reduïdes i un augment tant de la durada com del nombre de fases en els músculs dels ratolins *A/J Dysf^{pmmd}*, troballes

característiques d'una miopatia [218]. En els grups C, de ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ trasplantats amb cèl·lules $Dysf^{+/+}$ i D, de ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ trasplantats amb cèl·lules $Dysf^{-/-}$, la mitja de l'amplitud dels MUAPs es va mantenir similar a la dels controls, i la durada i les fases de les MUAPs varen millorar parcialment en tots els animals trasplantats, però sobretot en aquells trasplantats amb cèl·lules $Dysf^{+/+}$ (Taula 8, Fig. 39).

		Grup A	Grup B	Grup C	Grup D
MU petits	Durada (ms)	1.88 ± 0.08	6.10 ± 1.68*	2.31 ± 0.45 [#]	3.38 ± 0.41* [#]
	Amplitud (µV)	88.7 ± 4.0	56.8 ± 9.0*	90.7 ± 5.0 [#]	91.7 ± 6.1 [#]
	Fases	2.31 ± 0.12	2.92 ± 0.59*	2.38 ± 0.19 [#]	2.96 ± 0.09*
MU mitjans	Durada (ms)	2.07 ± 0.21	5.99 ± 1.77*	3.05 ± 0.31 [#]	3.76 ± 0.52* [#]
	Amplitud (µV)	305.5 ± 28.3	145.3 ± 28.5*	310.7 ± 28.2 [#]	305.7 ± 23.8 [#]
	Fases	2.23 ± 0.14	3.50 ± 0.97*	2.86 ± 0.21 [#]	3.25 ± 0.19*
MU grans	Durada (ms)	2.13 ± 0.15	6.44 ± 1.92*	2.96 ± 0.38 [#]	3.61 ± 0.63* [#]
	Amplitud (µV)	652.7 ± 38.9	305.7 ± 41.5*	643.1 ± 53.8 [#]	620.2 ± 24.6 [#]
	Fases	2.18 ± 0.08	3.62 ± 0.42*	3.05 ± 0.17* [#]	3.11 ± 0.28*

Taula 8. Anàlisi dels potencials d'acció de les unitats motores (MUAPs) dels ratolins A/J $Dysf^{+/+}$ (A), A/J $Dysf^{prmd}$ (B) i A/J $Dysf^{prmd}$ tractat amb cèl·lules $Dysf^{+/+}$ (C) o amb cèl·lules $Dysf^{-/-}$.

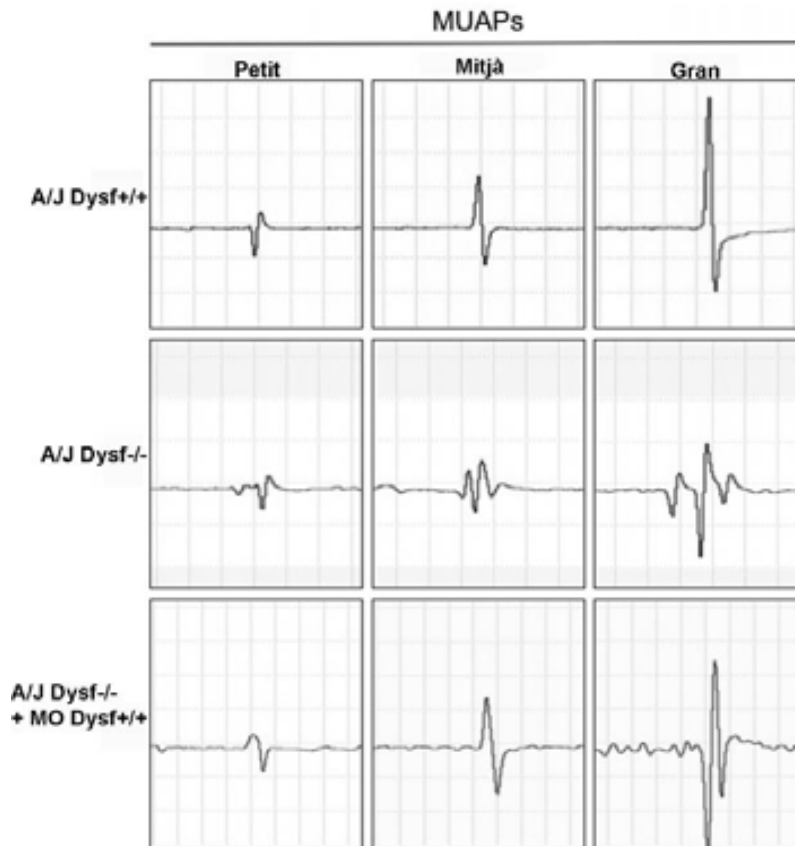


Figura 39. MUAPs representatius obtinguts dels tibials anteriors (TA) de ratolins de cada grup. Sensibilitat: 100 μ V/divisió; escala temporal: 2 ms/divisió.

Digigait

8/9 ratolins A/J Dysf^{prmd} no trasplantats varen ser capaços de mantenir un pas normal a la roda de caminar a una velocitat de 20 cm/s mentre el 100% dels animals trasplantats i els controls A/J Dysf^{+/+} varen ser-ne capaços (Fig. 40, % of animals). Aquest increment d'animals capaços de realitzar el test es pot considerar una millora en si mateix. L'anàlisi de les passes va mostrar lleus anomalies en la locomoció d'aquests animals, manifestada com a un augment significatiu de la durada de la gambada (Taula 9, Fig. 40, Stride duration) i l'angle d'obertura de les potes durant la locomoció activa (Taula 9, Fig. 40, step angle) amb respecte als animals A/J Dysf^{+/+}. L'augment en ambdós paràmetres esta relacionat amb una afectació de la musculatura proximal de les extremitats.

El grup de ratolins A/J Dysf^{prmd} trasplantats amb cèl·lules Dysf^{+/+} va mostrar una reducció en la durada de la gambada comparat amb els animals A/J Dysf^{prmd} no tractats, suggerint una lleu millora funcional en la marxa.

Per una altre banda, ambdós grups d'animals tractats van mostrar millores en l'angle d'obertura de les potes al caminar. Finalment, no es varen observar diferències en cap grup al estudiar l'amplada de la postura (taula 9, Fig. 40 Stance width).

	A/J Dysf ^{+/+} (n=10)	A/J Dysf ^{prmd} (n=9)	A/J Dysf ^{prmd} cèl·lules Dysf ^{+/+} (n=9)	A/J Dysf ^{prmd} cèl·lules Dysf ^{-/-} (n=8)
Animals (%)	100	89	100	100
Durada del pas (ms)	225.0 ± 2.4	247.1 ± 4.1	240.0 ± 3.4	247.5 ± 6.4
Angle d'obertura (°)	50.34 ± 2.27	63.56 ± 1.93	58.22 ± 2.23	55.83 ± 3.07
Amplada de la postura (mm)	28.6 ± 0.7	28.4 ± 1.2	27.0 ± 1.3	27.5 ± 1.2

Taula 9. Valors obtinguts a les proves funcionals de locomoció (Digigait). Resultats representats per les mitges ± SEM.

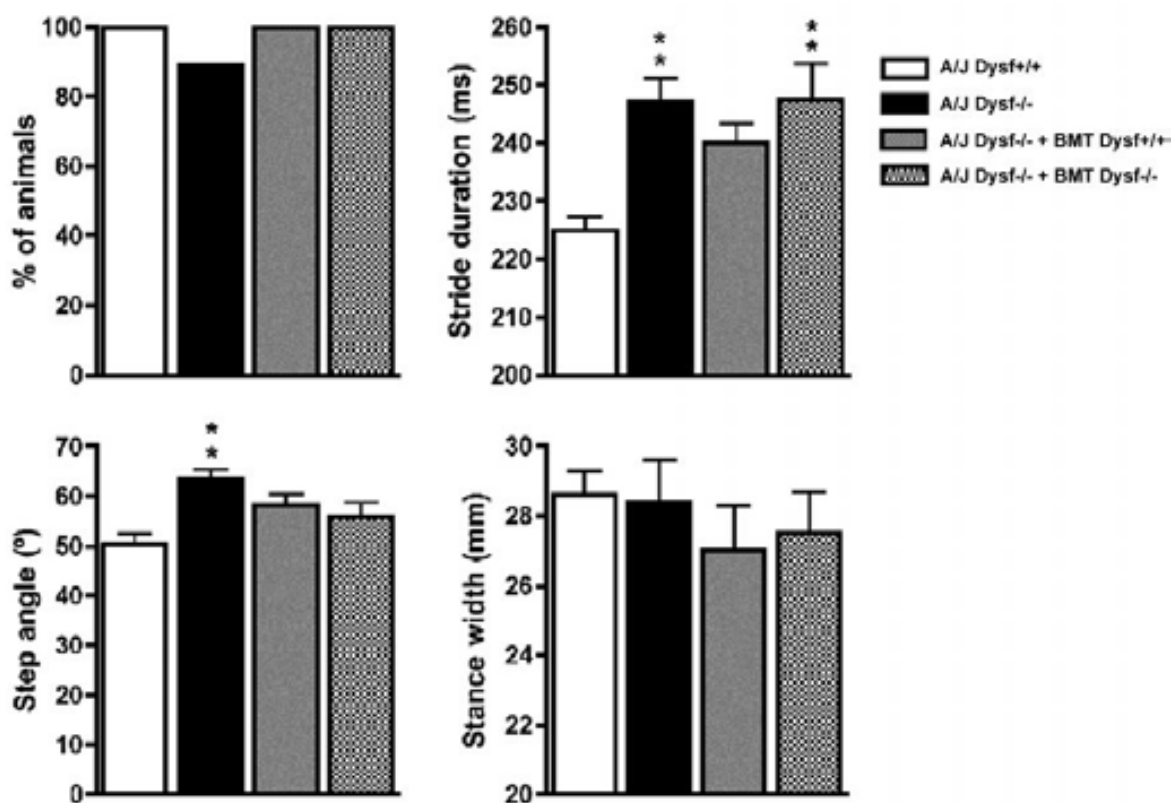


Figura 40. Resultats de l'anàlisi de locomoció (Digigait). Anormalitats manifestades per l'increment en la durada del pas (stride duration) i de l'angle del pas (step angle) del grup B (A/J Dysf^{prmd} no trasplantats) comparats amb els ratolins control (A/J Dysf^{+/+}) (**p<0,01 vs Dysf^{+/+}). (BMT= trasplantament de moll d'os)

- Estudi histològic

En l'estudi histològic d'aquest ratolins, varem observar que el teixit muscular dels ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ presentava una lleu afectació que es caracteritzava per la presència de pocs nuclis centrals, amb diferències entre la mida de les fibres i algunes fibres partides (*splitting*) (fig. 41). Al estudiar el nombre de nuclis centrals al teixit d'aquests animals, varem optar per realitzar l'estudi en músculs no lesionats amb CTX, per tal d'evitar un possible augment d'aquests degut a la regeneració post-lesió. Varem observar un major nombre de nuclis centrals en els ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ no trasplantats comparats amb els ratolins amb expressió normal de disferlina i amb els ratolins trasplantats d'ambdós grups. Aquesta diferència va resultar ser significativa ($p < 0,05$) (Fig. 42).

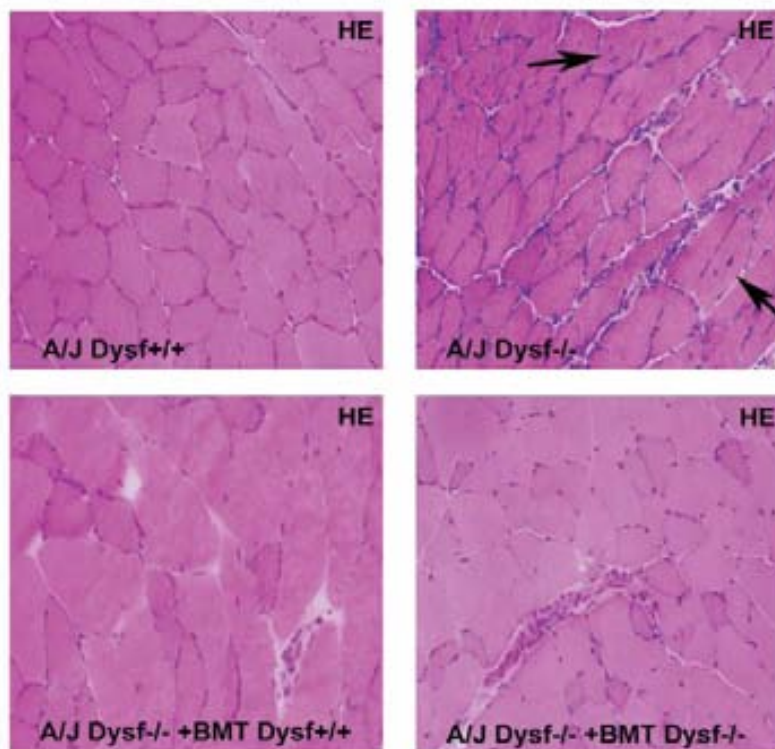


Figura 41. Anàlisi histològic del múscul esquelètic dels ratolins del segon trasplantament. Tinció H&E de múscul esquelètic d'un ratolí de cada grup (200x). Les fletxes senyalen alguns nuclis centrals. (BMT= trasplantament de moll d'os)

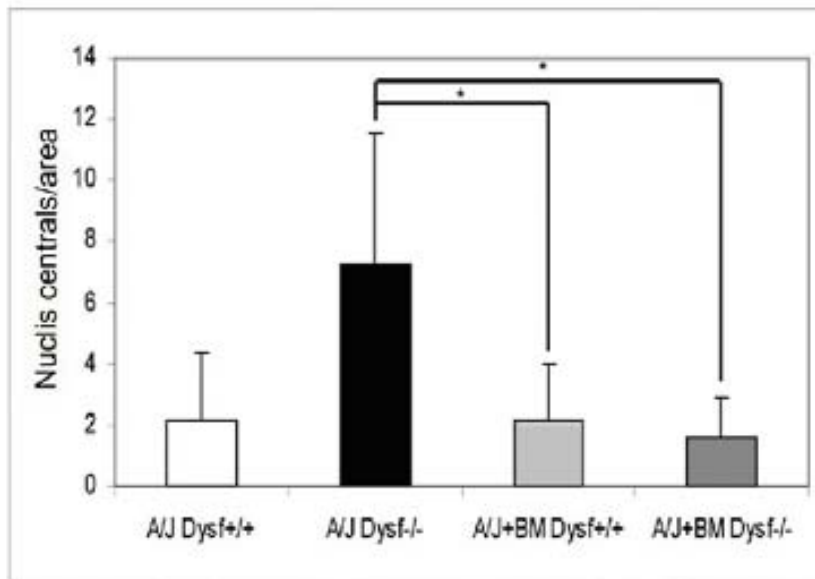


Figura 42. Representació gràfica del comptatge dels nuclis centrals en els 4 grups de ratolins. (* $p < 0,05$). (BM= moll d'os)

- El trasplantament de moll d'os restaura l'expressió de disferlina en sang perifèrica però no evita la inflamació al múscul esquelètic.

Les cèl·lules de la melsa dels ratolins A/J Dysf^{prmd} tractats amb una dosi parcialment mieloablativa i un trasplantament heteròleg de moll d'os varen mostrar una recuperació de l'expressió de disferlina, tot i que aquesta era del 9,2% respecte els controls (Fig. 43).

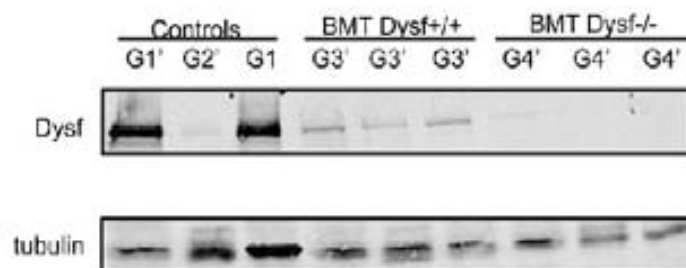


Figura 43. Anàlisi de l'expressió de disferlina en cèl·lules de la melsa mitjançant WB, segon trasplantament. G1': A/J Dysf^{+/+}; G2': A/J Dysf^{prmd}; G1: A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb moll d'os Dysf^{+/+} en el primer trasplantament; G3': A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb moll d'os Dysf^{+/+}; G4': A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb moll d'os Dysf^{-/-}.

En els estudis histològics es va observar que les característiques distròfiques del múscul encara no eren gaire presents a l'edat d'estudi dels ratolins. No obstant, es varen observar infiltrats inflamatoris prou destacables en tots els animals A/J Dysf^{prmd} tractats i no tractats amb trasplantament de moll d'os (Fig. 41) tant en presència de lesió amb cardiotoxina com no.

En aquest segon trasplantament els infiltrats inflamatoris van ser caracteritzats utilitzant el marcador general de macròfags F4/80 (Fig. 44) i el marcador de macròfags antiinflamatoris CD206 (Fig. 44) en els músculs no tractats amb cardiotoxina. No es van trobar diferències significatives en el nombre d'infiltrats totals F4/80⁺ entre els grups de ratolins A/J Dysf^{prmd}, trasplantats o no (Fig. 45) ($p \approx 1$). Al estudiar l'expressió de CD206, només algunes de les cèl·lules infiltrats eren positives per aquest marcador. Tampoc es van trobar diferències significatives entre grups (Fig. 45) ($p \approx 1$). Per altra banda, es va estudiar l'expressió de disferlina en aquestes cèl·lules infiltrats, observant que algunes d'aquestes eren positives per disferlina (figura 44).

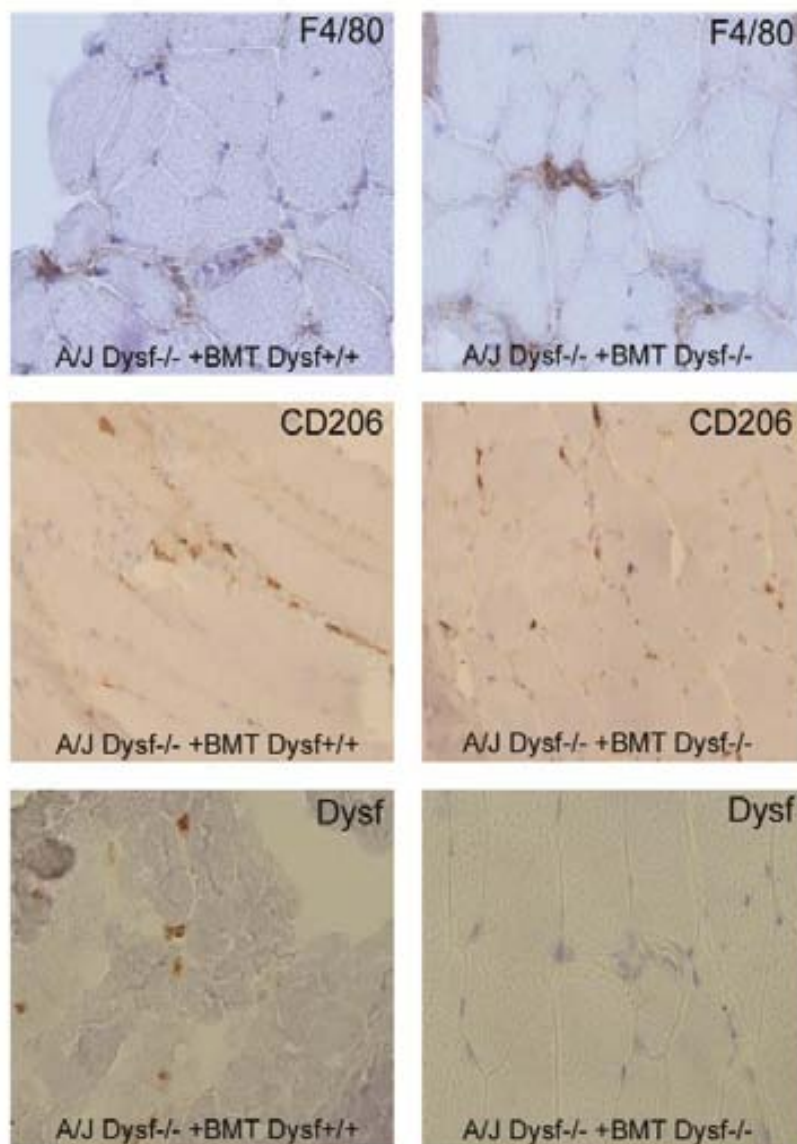


Figura 44. Estudi dels infiltrats inflamatoris presents al múscul esquelètic dels ratolins del segon trasplantament. Immunohistoquímiques detectant: l'antigen F4/80, marcador general de monòcits/macròfags (400x); l'antigen CD206, marcador de monòcits/macròfags antiinflamatoris (400x); o la disferlina. (BMT= trasplantament de moll d'os)

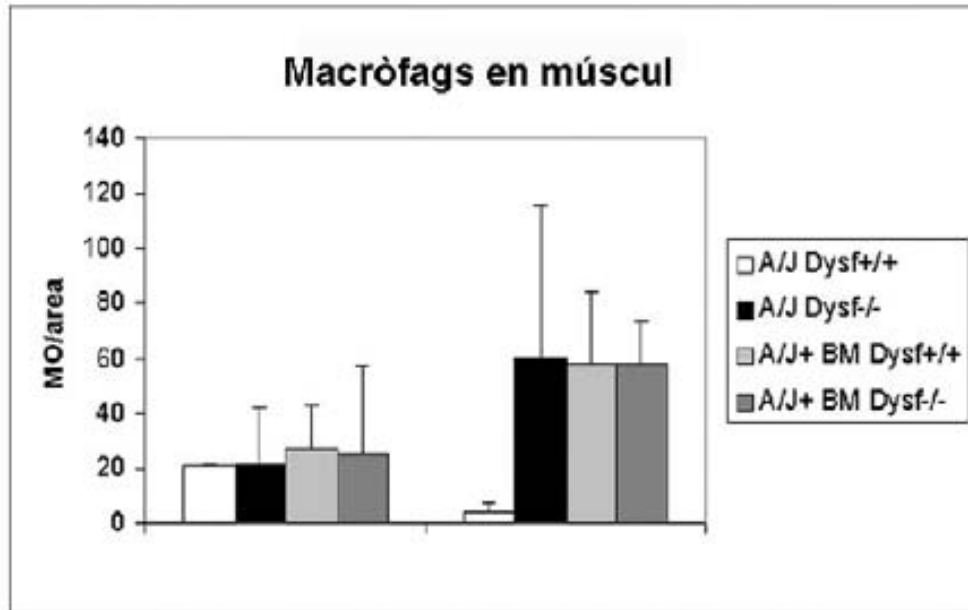


Figura 45. Contatge de macròfags. Gràfic de barres mostrant el contatge de cèl·lules F4/80 i CD206 positives en teixit muscular de ratolins de tots els grup. (BM= Moll d'os; MO= macròfags)

- El trasplantament de moll d'os no recupera l'expressió de disferlina en múscul esquelètic

Quan es van analitzar les mostres de múscul esquelètic del segon trasplantament de moll d'os, no es va poder observar expressió de disferlina per WB en cap dels músculs de cap grup de ratolins A/J Dysf^{prmd}, ja fossin tractats o no amb cardiotoxina (Fig. 46A).

No obstant, en els estudis de immunolocalització es van observar algunes fibres aïllades expressant disferlina en els ratolins tractats amb trasplantament de moll d'os heteròleg i cardiotoxina. Aquestes fibres mostraven un patró irregular, mostrant positivitat només en algunes zones de la membrana (Fig. 46B).

L'anàlisi de l'expressió del mRNA de la disferlina mitjançant la tècnica de PCR a temps real va mostrar nivells més elevats d'expressió de disferlina en els ratolins A/J Dysf^{prmd} tractats amb cèl·lules Dysf^{+/+}. Però aquesta diferència en l'expressió de mRNA no va ser estadísticament significativa (Fig. 46C).

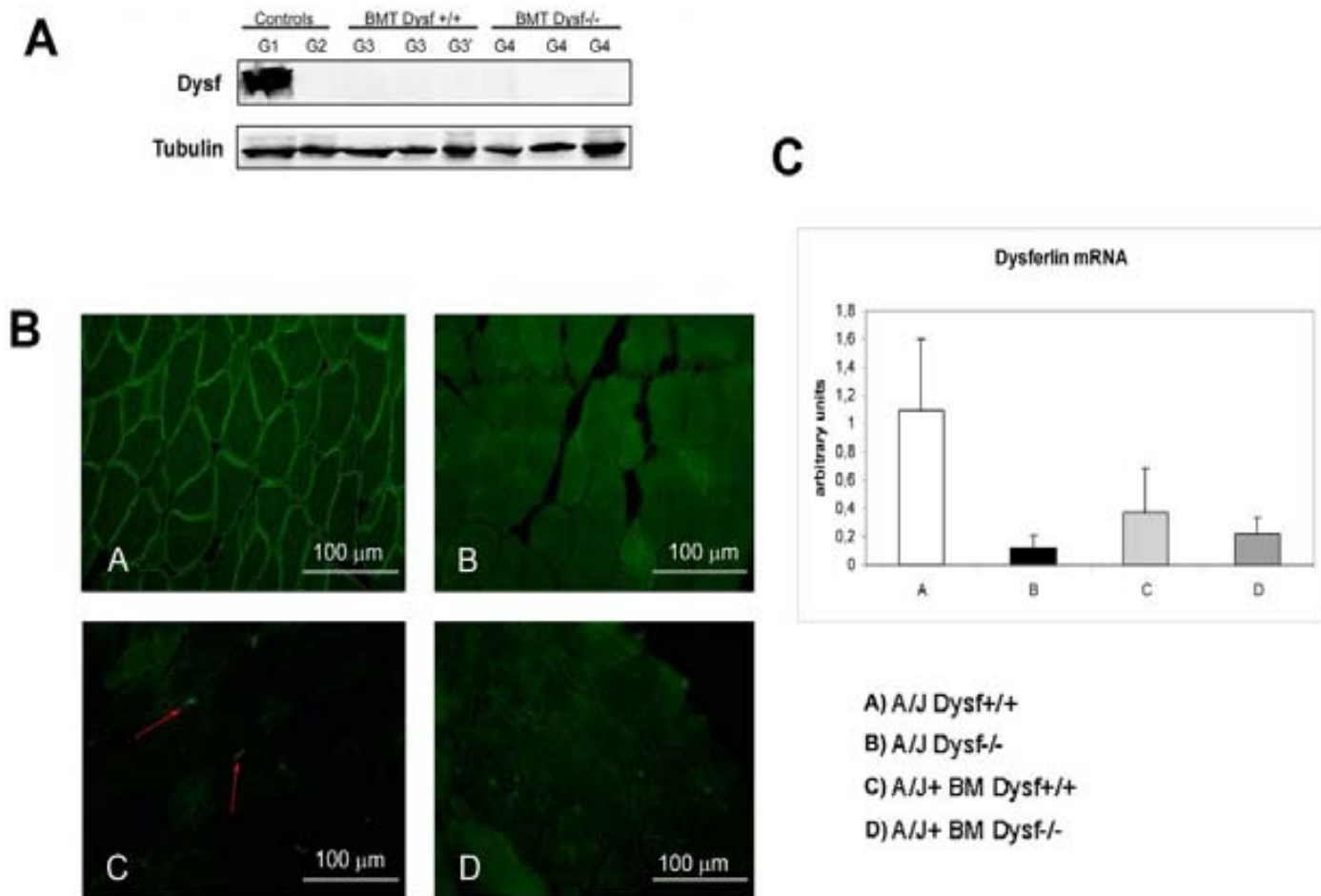


Figura 46. Expressió de disferlina en múscul esquelètic. A) WB. G1: A/J Dysf^{+/+}; G2: A/J Dysf^{prmd}; G3: A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb cèl·lules Dysf^{+/+}; G4: A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb cèl·lules Dysf^{-/-}. B) Immunohistoquímica detectant la disferlina en crioseccions de tibial anterior dels ratolins: A) A/J Dysf^{+/+} B) A/J Dysf^{prmd} C) A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb cèl·lules Dysf^{+/+} i D) A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb cèl·lules Dysf^{-/-} (200x). Les fletxes vermelles senyalen els pegats positius per disferlina observats només en els animals trasplantats amb cèl·lules Dysf^{+/+}. C) Anàlisi de l'expressió del gen DYSF per Real-Time PCR en: A) A/J Dysf^{+/+} B) A/J Dysf^{prmd} C) A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb cèl·lules Dysf^{+/+} i D) A/J Dysf^{prmd} trasplantat amb cèl·lules Dysf^{-/-}.

- L'expressió del Factor de Creixement Hepàtic (HGF) està reduïda en la soca murina A/J Dysf^{prmd} i es veu recuperada a nivells normals després de reconstituir parcialment l'expressió de disferlina en sang perifèrica

Ja que varem observar la millora funcional i histològica dels animals, però aquesta no podia ser explicada per l'augment de l'expressió de disferlina, varem decidir estudiar altres factors implicats en la millora del fenotip. Salah-Mohellibi i col·laboradors, varen descriure l'any 2006 [219], la millora funcional en un model murí d'atròfia muscular espinal després de un trasplantament de moll d'os. Aquest model murí també presenta patologia muscular, pel dèficit d'una proteïna anomenada SMN1. Després de trasplantar els animals, varen observar que no s'havia produït la recuperació d'aquesta proteïna en múscul, però tot i així els animals presentaven un fenotip més lleu comparats amb els no tractats. Al estudiar diferents factors, varen observar un increment dels nivells del factor de creixement hepàtic (HGF) [219]. Per aquest motiu, nosaltres ens varem plantejar estudiar aquest factor en els nostres animals. L'estudi de l'expressió de HGF per WB en els extractes proteics de quàdriceps va mostrar una dràstica reducció d'aquest factor als músculs dels ratolins A/J Dysf^{prmd} no tractats comparat amb els nivells de proteïna en els ratolins A/J Dysf^{+/+}. Al aplicar el test estadístic t-student, varem obtenir que la diferència era significativa ($p < 0,05$) (Fig. 47).

Al analitzar els animals tractats amb trasplantament de moll d'os varem poder observar una restauració a nivells normals de l'expressió de HGF en aquells animals que havien estat trasplantats amb cèl·lules Dysf^{+/+}. La quantitat de HGF a nivell d'expressió de proteïna en els animals trasplantats heteròlogament era similar a la dels animals A/J Dysf^{+/+} i significativament superior a la dels ratolins A/J Dysf^{prmd} no tractats ($p < 0,05$) o tractats amb un trasplantament de moll d'os autòleg ($p < 0,05$) segons el test de la variància d'un sol factor (ANOVA) seguit un anàlisi posthoc de Bonferroni (Fig. 47).

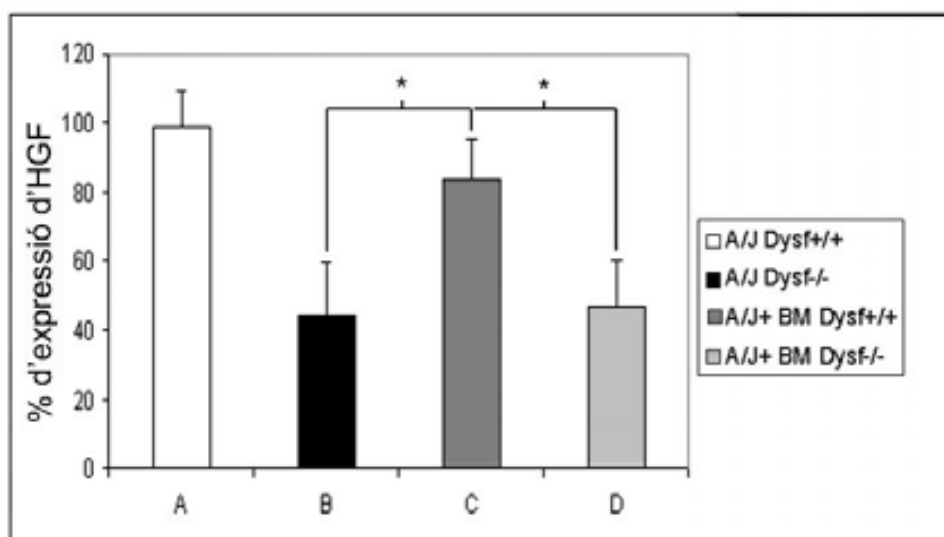


Figura 47. Expressió del factor de creixement hepàtic (HGF) en múscul esquelètic per WB. Representació gràfica dels nivells de la proteïna HGF en extractes proteics de múscul de ratolí analitzats per WB. Es va considerar 100% d'expressió la mitja dels controls analitzats (* $p < 0,05$).

Estudi de l'expressió de HGF en pacients de distròfia muscular per dèficit de disferlina

Per tal de corroborar si els resultats observats en els ratolins del nostre estudi eren aplicables a humans, varem estudiar els nivells de HGF en biòpsies musculars de pacients amb disferlinopatia. Per veure si l'efecte era específic del dèficit de disferlina o també es donava en altres distròfies musculars amb inflamació, varem comparar els pacients amb miopatia per dèficit de disferlina amb controls, pacients amb DMD/BMD i pacients amb FSHD. Per tal d'homogeneïtzar les mostres, varem usar només biòpsies de múscul tríceps, de 3 pacients de cada distròfia i quatre controls. Varem poder observar una reducció d'HGF en tots els pacients estudiats, que semblava especialment marcada en els pacients amb disferlinopatia. Tot i així, la desviació estàndard dels controls va resultar ser molt gran, per tant, els resultats no eren significatius ($p > 0,05$) (taula 10 i fig. 48).

Mostra	p-valors
Controls vs dysf	0,216909
Controls vs DMD	0,238375
Controls vs FSHD	0,344709
controls vs distròfies	0,071524

Taula 10. P-valors obtinguts després d'un anàlisi de la variància d'un sol factor (ANOVA) al comparar l'expressió de HGF en les diferents mostres.

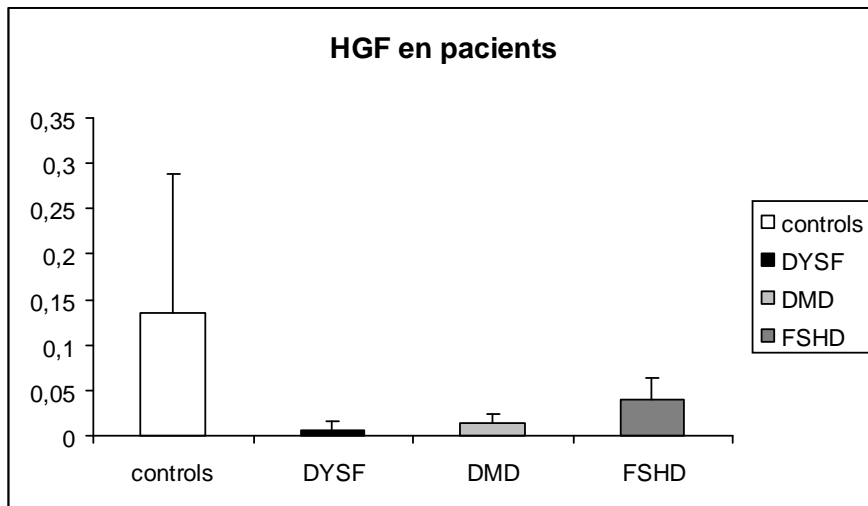


Figura 48. Representació gràfica de la quantificació de HGF en mostres de tríceps de pacients amb diferents patologies musculars.

DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

Mètodes per l'avaluació de l'eficàcia de possibles teràpies per les disferlinopaties

En els nostres treballs hem estudiat i identificat diferents eines i/o mètodes per a millorar la capacitat d'avaluació de possibles teràpies per a les disferlinopaties.

Per una banda, hem descrit l'existència d'un model murí A/J que no presenta mutacions al gen DYSF. Fins ara no es coneixia cap soca murina que pogués ser usada com a control positiu per l'expressió de disferlina i que presentes el mateix fons genètic que els ratolins amb mutacions al gen DYSF (soques A/J i SJL/J). Per tant, molts laboratoris han hagut de centrar els seus esforços en el creuament d'aquestes soques amb soques no portadores de mutacions al gen DYSF per tal d'obtenir un nou model que presentes aquestes mutacions amb un fons genètic diferent al de la soca original i compatible amb el d'una soca sense mutacions. La descripció d'una colònia de ratolins A/J no portadors de mutacions al gen DYSF facilitarà d'ara en endavant els estudis en aquest model animal, sobretot en els estudis de les possibles teràpies cel·lulars, genètiques i farmacològiques.

Per altra banda, els estudis d'EMG realitzats en aquest treball per tal d'avaluar la funció muscular dels ratolins són equivalents als estudis d'EMG realitzats als pacients amb miopatia. Recentment s'ha publicat un estudi en el que es demostra la falta de correlació entre els resultats obtinguts en assaigs de reparació de fibra aïllada *in vitro* i la millora dels canvis distròfics observats *in vivo* en models murins de disferlinopatia. Els autors conclouen l'estudi subratllant la importància de la elecció del mètode d'avaluació de l'eficiència d'un tractament en aquesta patologia [220]. Després dels resultats obtinguts en aquest estudi, creiem que els estudis de EMG podrien ser un bon mètode d'avaluació de l'eficàcia d'un determinat tractament en models animals de distròfia muscular en general.

Una altra part del nostre treball s'ha centrat en posar a punt diferents assaigs *in vitro* per tal d'avaluar la reconstitució de la funcionalitat de la disferlina després d'un tractament. Aquests assaigs han estat dissenyats especialment per a avaluar la correcta funcionalitat de possibles teràpies gèniques amb formes truncades de la disferlina. El gen DYSF és un gen molt gran i de difícil introducció a les cèl·lules musculars. Per tal de facilitar la teràpia gènica, diversos grups han estudiat la possibilitat d'introduir una forma truncada de la disferlina en el múscul [192,193]. El problema d'aquestes aproximacions terapèutiques és el fet de que encara no es coneixen totes les funcions de la disferlina, ni quins són els dominis implicats en aquestes funcions. Per tal d'avaluar tant la funcionalitat de les teràpies amb minidisferlines com per discernir quins dominis estan implicats en cada funció, hem dissenyat diferents assaigs funcionals que permetien avaluar no

només la capacitat de reparació de membrana sino també, per exemple, la recuperació dels nivells de miogenina o la reducció d'expressió de trombospondina-1.

En primer lloc hem cercat la manera d'avaluar l'eficàcia en la reparació de membrana dels miotubs. Avui en dia, diversos laboratoris han proposat assaigs per l'estudi de la reparació de membrana. El més emprat és l'assaig de reparació en fibra aïllada, que es basa en l'obtenció d'una fibra muscular aïllada i la lesió d'aquesta mitjançant un làser [62]. Com ja hem puntualitzat, recentment s'ha publicat un estudi desacreditant aquesta metodologia, ja que la millora en aquest test no correspon amb la millora funcional dels animals. En els nostres estudis hem pogut constatar que avaluar la cinètica de reparació de miotubs en cultiu no és un mètode fiable de la funcionalitat de la disferlina, ja que hem observat que la diferència en la cinètica de reparació de miotubs provinents de dos pacients deficients en disferlina es similar a la observada en miotubs control. El que sí hem pogut observar és que el nombre de nuclis positius per a iodur de propidi a temps zero com a reflex de la permeabilitat o inestabilitat del sarcolemma després d'una lesió és major en els miotubs de pacients amb disferlinopatia. Per tant, el comptatge de nuclis tenyits amb iodur de propidi o altres tincions de DNA podria ser d'utilitat per a avaluar una restauració de la capacitat de reparar la membrana després de transfectar formes truncades de la disferlina en miotubs. Per altra banda, hem descrit l'acumulació del marcador lisosomal LAMP-1 al sarcolemma de fibres musculars de pacients de disferlinopatia, probablement per un defecte de fusió dels lisosomes amb el sarcolemma. Hem dissenyat un test de lesió *in vitro* per tal d'avaluar la correcta funcionalitat de la disferlina que es basa en la visualització d'aquest marcador al sarcolemma mitjançant immunocitoquímica després de lesionar les cèl·lules. En els miotubs deficients en disferlina aquests nivells són anormalment baixos.

En segon lloc, al nostre laboratori s'han descrit diferents proteïnes i factors que presenten un patró diferent en els pacients amb disferlinopatia, la miogenina i la trombospondina-1 [59,63]. Es va descriure una associació entre el retard en la diferenciació dels mioblasts a miotubs humans de pacients amb mutacions al gen *DYSF* amb la reducció de l'expressió del factor de diferenciació muscular miogenina [63]. Per una altra banda, també s'ha descrit una major expressió de trombospondina-1 per part dels miotubs de pacients amb disferlinopatia, fet que es va relacionar amb el major reclutament de monòcits/macròfags per part del múscul d'aquests pacients en comparació a altres distròfies [59]. Tots els assaigs d'avaluació de la funció de la disferlina es basen en la reparació de membrana, funció principal de la proteïna. Però per avaluar la total correcció del fenotip, creiem indispensable l'observació de la reconstitució d'altres funcions de la proteïna, ja que cada cop hi ha més estudis suggerint altres papers de la disferlina en la fisiopatologia muscular [59,63,65]. Per això la normalització de l'expressió de la miogenina i la trombospondina-1 és de

gran interès per l'estudi de possibles teràpies, ja que aquests dos marcadors ens indiquen la reconstitució d'altres funcions de la proteïna com ara la diferenciació muscular.

Dins del disseny de nous mètodes per l'avaluació de la restauració de les funcions de la disferlina, varem creure interessant estudiar el seu paper en monòcits de sang perifèrica. En base als estudis de De Morrée i col·laboradors, en els quals descriuen la interacció de la disferlina amb el complex de les integrines, i la menor adherència a les superfícies per part de les cèl·lules disferlina negatives (article en revisió, veure annex 1), varem estudiar el patró de moviment dels macròfags de pacients amb mutacions al gen DYSF. Mitjançant al filmació del moviment d'aquestes cèl·lules hem pogut constatar el fet de que aquestes presenten una velocitat de moviment superior a la dels macròfags d'individus amb expressió normal de disferlina. Això, probablement és degut a la inestabilitat de les adhesions focals causada pel dèficit de disferlina. Aquesta major inestabilitat és causa directe d'un moviment més ràpid i aberrant de les cèl·lules. L'estudi de la motilitat dels macròfags és, junt amb un treball on s'avalua la capacitat de fagocitosi [60] el primer test en que s'avalua la funcionalitat de la disferlina en monòcits/macròfags humans.

Per últim, com a possible mètode d'avaluació de la funcionalitat de formes truncades de la disferlina, hem descrit un llistat de proteïnes que presenten una interacció, directe o indirecte, amb la disferlina. La disferlina es suposa part d'un complex multiproteic. Segurament forma part de més d'un complex. Probablement, per a poder dur a terme cadascuna de les seves funcions, la disferlina interacciona amb un conjunt de proteïnes o un altre. Per tant, el patró d'interacció de la disferlina o de les formes truncades de la disferlina ens pot donar una idea de quines funcions hem restablert i quines manquen per restablir després d'una intervenció terapèutica. Així doncs, l'estudi de les interaccions de la disferlina ens dona una visió important a l'hora d'assegurar la efectivitat d'una teràpia gènica amb una forma truncada de la disferlina.

Estudi de les funcions de la disferlina

Els nostres estudis del complex de la disferlina han estat molt informatius per tal de determinar possibles noves funcions d'aquesta proteïna així com perquè representen una important aportació a nivell metodològic.

S'ha reportat que una sobreexpressió de mioferlina pot recuperar la funció de la disferlina en la reparació del sarcolemma en un model murí, però que els músculs *dysf^{-/-}* que sobreexpressen aquesta proteïna, segueixen presentant un fenotip distròfic degut a la falta de disferlina. Això suggereix que la disferlina té altres funcions importants per la fisiologia del múscul esquelètic [69]. Amb el nostre estudi proposem altres possibles funcions de la disferlina, així com una nova estratègia per tal d'aclarir les funcions d'aquesta.

La metodologia emprada en els nostres estudis és novedosa. La majoria d'estudis d'interacció proteica es basen en una única tècnica, principalment la immunoprecipitació. Nosaltres descrivim la possibilitat de combinar diferents tècniques com ara el Blue Native (BN) i les immunoprecipitacions (IPs), i complementar els estudis definint la tipologia de la interacció entre dues proteïnes en cèl·lules no transfectades.

Els nostres resultats mostren que la combinació de diferents tècniques, com ara les IP, el BN, i el FLIM-FRET, és més informatiu i fidedigne per l'estudi dels complexos proteics. La IP és la tècnica més estesa en l'estudi de les interaccions entre proteïnes, però presenta certes limitacions, com la immunoprecipitació de proteïnes alienes al complex que s'uneixen de manera inespecífica als anticossos o a les boles de sefarosa. La tècnica de BN-PAGE ens permet l'estudi de complexos mutiproteics, tot i així, no podem descartar que diferents complexos proteics no relacionats es trobin dins del mateix rang de pes molecular. Conseqüentment, l'anàlisi per MS/MS detecta moltes proteïnes no relacionades amb el nostre complex d'interès. La identificació de les mateixes proteïnes dins un complex per diferents metodologies dona més solidesa als resultats. A més, tot hi que la IP i el BN són tècniques molt útils per mostrar la composició d'un complex proteic, és molt important l'ús d'altres tècniques, com ara l'anàlisi per FLIM-FRET, per tal de determinar si la interacció entre dues proteïnes és directe o indirecte, ja que aquest coneixement ens dur a una millor comprensió de les funcions de la proteïna d'interès dins del marc de la fisiologia cel·lular. La metodologia emprada en el nostre treball és extensible a l'estudi de múltiples complexos proteics, relacionats amb qualsevol camp d'estudi dins la biologia cel·lular.

A més, hem demostrat la possibilitat de realitzar la tècnica de FLIM-FRET en condicions natives, evitant l'ús de models cel·lulars que sobreexpressin les proteïnes d'interès. L'ús de vectors per tal de provocar l'expressió de les proteïnes d'interès amb un cua afegida que ens possibiliti la realització d'aquesta tècnica (ex GFP, RFP) pot ser molt informatiu, però no representa una situació real ja que la sobreexpressió de proteïnes pot causar una interacció inespecífica entre aquestes o esbiaixar el sistema.

Tot i que les caigudes dels temps de vida mig en el nostre estudi varen ser molt baixes, varen ser significatives. El baix tant per cent obtingut pot ser explicat pel fet de que, al estudiar les proteïnes natives, hem hagut d'usar anticossos per la detecció d'aquestes, afegint així certa distància molecular entre els parells de proteïnes estudiades. La tècnica de FLIM-FRET mostra si dues proteïnes es troben a una distància igual o inferior a 10nm, el que es considera que és una interacció directe. L'ús d'anticossos primaris i secundaris allarga les distàncies fent menys notable la reducció en els temps de vida mig del fluoròfor donant. Aquesta limitació es podria evitar usant proteïnes recombinants marcades, però varem considerar més interessant l'estudi de proteïnes

natives ja que així em pogut obtenir una informació més realista de la situació que es dona a les cèl·lules musculars. Per altra banda, amb la nostra metodologia, podem evitar els falsos negatius utilitzant diferents parells d'anticossos. En els nostres estudis, varem obtenir una reducció nul·la del temps de vida mig al estudiar el parell de proteïnes disferlina/caveolina-3. Com aquesta interacció havia estat prèviament descrita per IP per altres autors [21], varem decidir estudiar-la emprant altres anticossos primaris per tal d'assegurar-nos de que aquestes dues proteïnes no interaccionen directament. Estudiar la interacció de dues proteïnes marcant dominis diferents d'aquestes no és possible usant proteïnes recombinants amb cues com el GFP, ja que aquestes cues no es poden introduir als dominis centrals de la proteïna sense modificar-ne les propietats. Per tant, la nostra metodologia també millora l'estudi de les interaccions directes fent possible eliminar els falsos positius.

L'anàlisi mitjançant el software IPA va revelar que el conjunt de proteïnes del complex de la disferlina descrites en aquest treball podien ser agrupades segons la seva biofunció en: desenvolupament i funció del múscul esquelètic, morfologia tissular, malalties inflamatòries, malalties cardiovasculars i en malalties esquelètiques i musculars. S'ha reportat que la disferlina està implicada en diferents processos cel·lulars, com ara la reparació del sarcolemma, la fusió de membranes i la diferenciació muscular [61,63,221]. Alguns autors també han suggerit la possible alteració cardíaca en alguns pacients de dsferlinopatia [222,223]. Finalment, la inflamació és una característica típica dels músculs deficientes en disferlina [43,59,224,225]. De fet, en l'estudi amb el software IPA, el 69% de les proteïnes descrites en el nostre estudi es podien englobar dins de la xarxa d'interaccions proteiques relacionada amb les malalties immunològiques, donant això importància al paper dels monòcits/macròfags dins la malaltia.

La robustesa de la nostra estratègia és validada pel fet de que moltes de les proteïnes que hem trobat amb ella són proteïnes que ja s'havien descrit com a membres del complex de la disferlina. Per exemple l'AHNAK [85], la PTRF [124], el Trim72/MG53 [92] o la Vinculina [65], són proteïnes descrites a la bibliografia com a interactuants de la disferlina. La tecnologia de FLIM-FRET ens ha permès estudiar el tipus d'interacció d'algunes proteïnes amb la disferlina de forma més precisa, determinant si aquesta interacció era directe o indirecte. Això ens permet hipotetitzar sobre les funcions de la disferlina.

En el nostre estudi descrivim que la interacció de la disferlina i el Trim72/MG53 és directe, tant en miotubs lesionats com en miotubs sense lesionar. La proteïna Trim72/MG3 també s'ha relacionat amb la reparació de membrana en múscul esquelètic [119], per tant aquesta interacció reforça el paper de la disferlina en aquest procés de reparació. A més, situa l'acció d'aquestes dues proteïnes molt propera, dins el procés de reparació del sarcolemma. Per altra banda, el fet de trobar una

interacció directe entre ambdues proteïnes tant en miotubs lesionats com no lesionats, ens indica que aquestes dues proteïnes interaccionen abans i durant el procés de reparació. Podria ser que el complex disferlina-trim72/MG53 estigui sempre preparat per tal d'agilitzar el procés de reparació, o que aquestes dues proteïnes també estiguessin implicades conjuntament en altres processos cel·lulars. De fet, s'ha relacionat el trim72/MG53 amb la diferenciació muscular [121], igual que la disferlina [63].

Una altra troballa d'interès en el nostre estudi és el fet de que, tot i que s'ha descrit que la caveolina-3 també forma part del complex de la disferlina, i es creia que la interacció entre ambdues proteïnes era directe, i segons els nostres resultats de FLIM-FRET la interacció és indirecte.

Els nostres resultats suggereixen que la interacció caveolina-3/disferlina esta mediada per una altra proteïna del complex, com per exemple la trim72/MG53, ja que hem observat una interacció directe entre aquesta i la caveolina-3. Tot hi que no hem pogut comprovar-ho, en uns experiments de immunoprecipitació publicats per Cai et al. es va descriure que tant la caveolina-3 com la disferlina immunoprecipitaven amb la proteïna Trim72/MG53 [92]. Una altra opció és la proteïna PTRF, proteïna present a les caveoles igual que la caveolina-3, i descrita tant per nosaltres com per Cacciottolo et al. com a proteïna del complex de la disferlina [124]. A més, aquesta proteïna també interacciona amb Trim72/MG53, i es creu que media el seu transport a la zona on s'ha produït una lesió [125]. Per tant, ja que Trim72/MG53 es troba unida a la disferlina tant en condicions de lesió de membrana com no, probablement la PTRF també media el transport de la disferlina als llocs de lesió.

A més, la nostra estratègia (IP+BN+FLIM-FRET) ens ha permès trobar nous membres del complex de la disferlina, com ara la calseqüestrina-1, la miomesina-2, i la dineina citoplasmàtica. La seva interacció amb la disferlina no havia estat encara analitzada, tot i que aquestes proteïnes ja havien estat citades en llistats de gens o proteïnes relacionats amb la disferlina [65,226].

La calseqüestrina-1 és una proteïna d'emmagatzematge de calci localitzada a la llum del reticle sarcoplàsmic (RS) [227]. Aquesta proteïna actua com una proteïna esmorteïdora ajudant així a generar un gradient de calci per afavorir l'acció de l'ATPasa de calci sarcoplàsmica/endoplàsmica (SERCA) [228,229]. La calseqüestrina-1 no conté un domini transmembrana, tot hi que si té un domini que uneix la cara junctional de la membrana del RS [230]. Ja està descrit que la disferlina s'expressa al sistema dels túbuls T [231,232], sistema que forma una triada amb el RS. Ja que hem trobat una interacció directe entre la disferlina i la calseqüestrina-1, els nostres resultats

suggereixen que la disferlina també s'expressa al RS. Ja que la disferlina és un sensor de Ca^{2+} [57,231], aquesta podria tenir també un paper en la recaptació de calci per part del RS.

La miomesina-2 també interacciona directament amb la disferlina. Brulé i col·laboradors varen descriure que la miomesina-2 co-immunoprecipita amb la calpaïna-3 [233], una altra proteïna relacionada amb el complex de la disferlina [105]. La miomesina-2 és un membre de la família MYOM, i s'expressa principalment en les fibres de tipus 2, o fibres ràpides [135]. La família de proteïnes MYOM són components de la banda M, i actuen com a enllaçadors dels filaments de miosina [234,235] per tal de donar estabilitat als sarcòmers. Alguns autors han suggerit que la disferlina té un paper en la estabilitat de la membrana citoplasmàtica ja que l'han relacionat al complex d'integrines demostrant la seva interacció amb l'afixina i la vinculina [65,68]. La interacció disferlina/miomesina-2 suggereix que la disferlina participa, no només en la estabilitat del sarcolemma, sinó també en la de les miofibretes. Per altra banda, també s'ha relacionat la disferlina amb el tipus de fibra [64]. S'ha vist que els pacients amb disferlinopatia presenten una major proporció de fibres de tipus I. S'ha suggerit que aquesta major proporció de fibres lentes és un mecanisme de protecció de la malaltia, ja que aquestes fibres no es lesionen tant massivament. Per tant, es suposa que el múscul deficient en disferlina té la tendència a fer un canvi en el tipus de fibra cap a fibres tipus I o de contracció lenta [64].

Hem observat una interacció directe entre la disferlina i la dineïna citoplasmàtica. També hem observat una distribució anormal de la dineïna en les biòpsies de pacients amb mutacions al gen DYSF. Aquesta proteïna ja es va trobar que presentava una expressió reduïda en pacients de disferlinopatia en un microarray publicat l'any 2002 [226]. La dineïna és una proteïna motora relacionada principalment amb el transport retrògrad de vesícules i organel·les a través dels microtúbuls [236]. També està implicada en l'allargament dels microtúbuls, ja que és el motor responsable del transport anterògrad dels microtúbuls curts cap als extrems de creixement [237]. Els microtúbuls estan formats per monòmers d' α -tubulina. L'acetilació de l' α -tubulina provoca el reclutament de la dineïna citoplasmàtica cap als microtúbuls, afavorint el transport vesicular [238]. La dineïna citoplasmàtica va ser prèviament co-immunoprecipitada amb la disferlina en múscul esquelètic adult i en miotubs per altres autors [65]. En aquest estudi, els autors varen trobar un conjunt de proteïnes que immunoprecipitaven amb la disferlina, i que algunes d'aquestes proteïnes relacionades amb la disferlina estaven implicades en vies de transport de vesícules, majoritàriament en els processos d'endocitosis. Els nostres resultats indiquen que la disferlina participa en el transport cel·lular retrògrad tal i com suggereixen De Morrée i col·laboradors usant un anàlisi *in silico* [65]. A més, Demonbreun i col·laboradors varen descriure que els mioblasts deficients en disferlina presentaven un defecte en el compartiment endocític de reciclatge de receptors (RRC) [66]. Això subratlla la importància de la funció de la disferlina en el tràfic de

vesícules i la endocitosi. D'acord amb aquesta hipòtesi, recentment ha estat descrita la implicació de la disferlina en la regulació de l'acetilació de l' α -tubulina [127]. L'acetilació de l' α -tubulina està reduïda en els mio blasts *dysf*^{-/-}. Aquesta reducció de l'estat d'acetilació de l' α -tubulina disminueix el reclutament, per part d'aquesta, de la dineina citoplasmàtica cap als microtúbuls, que conseqüentment provoca una atenuació de la via de transport retrògrada i l'allargament dels microtúbuls [238]. Per altra banda, s'ha descrit que els inhibidors de la dineina citoplasmàtica interfereixen en la reorientació dels microtúbuls durant el procés de segellar la membrana plasmàtica de la línia de fibroblasts NIH3T3 [239]. Aquests resultats s'ajusten amb un possible paper de la dineina citoplasmàtica en el procés de reparació de membrana, reforçant la seva interacció amb la disferlina. Totes aquestes dades proporcionen evidències del paper de la disferlina en la remodelació i estabilitat del citoesquelet i en la integritat del sarcolemma. Per altra banda, una de les funcions de la dineina en nervi és la de notificar al nucli que s'ha produït una lesió, per tal de promoure l'activació de factors de transcripció i el procés de remodelació post-lesió [240]. S'ha vist que després d'una lesió en nervi, es sintetitza vimentina a partir d'un reservori de mRNA localitzat a les proximitats de la zona lesionada. Aquesta vimentina es tallada per la calpaïna per tal de generar fragments solubles de vimentina, que uniran la proteïna de senyalització ERK fosforilada, i junt amb la importina- β , seran transportats fins al nucli per part de la dineina [241]. En els nostres estudis, hem identificat també les proteïnes importina- β 1 i vimentina com a membres del complex de la disferlina, suggerint això que en múscul esquelètic aquesta via de senyalització al nucli es podria donar de la mateixa manera, i que la disferlina estaria implicada en aquest procés. Una dada més que reforça aquesta teoria és que s'ha descrit que els fibroblasts amb mutacions a la vimentina mostren la mateixa capacitat de reparació de membrana que els fibroblasts amb expressió normal de vimentina, però aquests fibroblasts presenten una supervivència menor 24h després de la lesió [242].

Per altra banda, el coneixement de les proteïnes formants del complex de la disferlina és rellevant ja que aquestes representen gens candidats per altres distròfies musculars no filiades. Per exemple, s'ha generat un model murí deficient en *trim72/MG53*, que mostra patologia muscular, presentada com a debilitat muscular i una histologia alterada, amb un increment de nuclis centrals i una mida reduïda de les fibres musculars [119]. També s'ha descrit que els pacients de la miopatia dels Samaritans, causada per mutacions en homozigosi del gen *RYR1*, presenten una alteració en l'expressió de disferlina [243]. El gen *RYR1* codifica per el receptor de rianodina 1, proteïna que ha estat identificada en el nostre estudi amb teixit muscular adult com a membre del complex de la disferlina. A més, els estudis d'immunofluorescència que hem realitzat mostren alteracions en el patró d'expressió d'algunes proteïnes identificades com a part del complex de la disferlina (per exemple la dineina citoplasmàtica o el *Trim72/MG53*) tant en múscul adult com en miotubs de

pacients amb mutacions al gen DYSF. Així doncs, aquestes proteïnes són potencials gens candidats d'altres distròfies musculars sense diagnòstic.

Per últim, els pacients amb mutacions al gen DYSF poden presentar una gran varietat de fenotips. Es creu que això pot ser degut a polimorfismes en altres proteïnes que, en part, poden contribuir a atenuar la malaltia en un determinat grup de músculs depenent del seu patró d'expressió. Ja s'ha demostrat que el perfil proteic és diferent depenent del múscul estudiat (de la torre et al. manuscrit en preparació) [244], per això, la diferent afectació muscular dels diferents fenotips podria ser deguda a diferències en aquest perfil proteic. Les proteïnes relacionades amb la disferlina, són doncs, possibles candidats a modular l'afectació muscular.

Teràpia cel·lular amb moll d'os

Els nostres estudis demostren que el trasplantament de moll d'os (TMO) millora certs paràmetres funcionals i histològics, com ara la durada i amplitud dels MUAPs, l'angle d'obertura de les potes al caminar i la durada de la passada durant la locomoció en el model murí A/J Dysf^{prmd} o el nombre de nuclis centrals al teixit muscular, tot i que aquesta teràpia no recupera l'expressió de disferlina en múscul esquelètic. Aquests resultats suggereixen que aquesta millora pot ser, en part, deguda al propi procés del trasplantament, ja que els animals trasplantats autòlogament també varen presentar certa millora funcional i histològica.

Diversos estudis mostren clarament que les cèl·lules derivades del moll d'os contribueixen a les fibres musculars esquelètiques. Ferrari i col·laboradors van realitzar uns experiments de TMO en ratolins a on varen demostrar per primer cop que el moll d'os conte cèl·lules capaces de ser reclutades cap al múscul lesionat [245]. Tot i així, els estudis realitzats per Chretien i col·laboradors i Gussoni i col·laboradors demostren que la contribució en la reconstitució de proteïnes musculars per part de les cèl·lules de moll d'os és molt baixa, tot i que aquestes cèl·lules tinguin capacitat de fusionar amb el múscul esquelètic [153,156]. Desafortunadament, en aquest estudi, els autors no varen realitzar cap test funcional als ratolins per tal de comprovar si el trasplantament provocava algun benefici en aquests animals. Els baixos nivells d'expressió de distrofina observats en aquest estudi deuen ser deguts al fet de que la línia hematopoyètica no esta programada per l'expressió d'aquesta proteïna. D'altre banda, s'ha descrit que les cèl·lules mieloides circulants, incloent macròfags i granulòcits, son capaces de incorporar-se al múscul esquelètic [246] tot i que aquest fet segueix sent polèmic [247].

Per altra banda, és sabut que almenys una fracció de la línia hematopoyètica, els monòcits/macròfags, expressen disferlina de manera habitual [47]. Això ens permet hipotetitzar que una teràpia cel·lular basada en el TMO seria més efectiva a l'hora de restaurar l'expressió de

disferlina en un model murí de disferlinopatia. Però tot i que el TMO és capaç de restaurar l'expressió de disferlina en sang perifèrica, no restaura l'expressió de disferlina en múscul esquelètic en el model murí A/J $Dysf^{prmd}$. Tot i així, en el nostre estudi varem observar, exclusivament en els animals trasplantats amb moll d'os $Dysf^{+/+}$, pegats dispersos de membrana amb tinció positiva per disferlina, que poden ser explicats per la fusió de cèl·lules de la línia hematopoyètica amb les fibres musculars.

Hem demostrat en els nostres assaigs *in vitro* que la línia cel·lular mieloide HL60 diferenciada a monòcit és capaç de fusionar amb miotubs en cultiu, tot i que ho faci amb un baix índex. Això, junt amb el fet demostrat de que algunes cèl·lules de la línia hematopoyètica són capaces de fusionar-se amb el múscul esquelètic, ens inclina a pensar que el baix nombre de pegats positius per disferlina en els nostres ratolins és degut a que les cèl·lules d'origen hematopoyètic amb major índex de fusió amb el múscul no són els monòcits/macròfags. Per tant, hi ha algun tipus cel·lular a la línia hematopoyètica amb major capacitat de fusió amb el múscul, però aquest tipus cel·lular, tal i com veiem nosaltres i com varem observar altres autors en altres models animals [153,156], no tenen capacitat de reprogramar el seu nucli per tal d'expressar proteïnes musculars.

Per altre banda, varem observar un augment de l'expressió del mRNA de la disferlina en el múscul d'aquests animals, probablement per la presència al múscul d'infiltrats inflamatoris disferlina positius.

L'origen de la inflamació en les disferlinopaties és un punt encara sota debat pels experts en el tema. Recentment, dos laboratoris diferents han generat ratolins transgènics que expressen la proteïna disferlina exclusivament en múscul esquelètic. Aquests ratolins no presentaven fenotip distròfic ni presència d'inflamació al múscul [71,248]. Això suggereix que la restauració de la disferlina al múscul esquelètic és suficient per evitar la infiltració de cèl·lules inflamatòries al múscul esquelètic. D'acord amb aquests estudis, els nostres resultats demostren que la restauració de disferlina en sang perifèrica exclusivament no és suficient per evitar la inflamació en la patologia deguda al dèficit de disferlina en múscul, ja que nosaltres varem observar infiltrats inflamatoris en tots els ratolins tractats, independentment de l'origen de les cèl·lules trasplantades.

No obstant això, varem observar evidències de millora histològica i funcional (locomoció i EMG) dels ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ trasplantats comparats amb els ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ no tractats. En els estudis funcionals de locomoció i EMG, la millora dels ratolins tractats amb cèl·lules $dysf^{+/+}$ comparats amb els ratolins tractats amb cèl·lules $dysf^{-/-}$ era més evident. Estudis anteriors realitzats per altres autors, poden explicar en part aquests resultats [60,219,249]. El grup del Dr. Nagaraju va demostrar que els monòcits $dysf^{-/-}$ presenten una activitat fagocítica augmentada, que podria tenir un paper rellevant en la patologia de les disferlinopaties [60]. Això podria explicar en part el fet de

que els ratolins trasplantats amb cèl·lules $dysf^{+/+}$ presentin una milloria més significativa que els trasplantats amb cèl·lules $dysf^{-/-}$, ja que els primers presentarien monòcits/macròfags menys agressius cap al teixit muscular. Arnold i col·laboradors, per altra banda, presenten resultats que indicarien un canvi del perfil dels macròfags reclutats pel múscul lesionat, suggerint que els macròfags presents al teixit muscular lesionat presenten característiques antiinflamatòries [249]. Ja que en el nostre estudi observem una proporció similar de macròfags antiinflamatoris (cèl·lules CD206) en tots els grups de ratolins A/J $Dysf^{prmd}$, no podem concloure que l'efecte beneficiat del TMO sigui un canvi en el perfil dels macròfags infiltrants.

Per últim, Salah-Mohellibi i col·laboradors varen realitzar un estudi similar al nostre on realitzaven un TMO en un model murí l'atròfia muscular espinal (AME) [219]. L'AME és una malaltia neuromuscular causada per mutacions en el gen del factor de supervivència de les motoneurons, el SMN1 [250]. La proteïna codificada per aquest gen s'expressa ubiquament, però principalment causa problemes a nivell de motoneurona i, segons alguns autors, del múscul esquelètic. Per aquest motiu, Cifuentes-Diaz i col·laboradors varen generar un model murí KO per aquesta proteïna específicament en múscul esquelètic, observant que aquest model presentava patologia muscular [251].

Salah-Mohellibi i col·laboradors varen observar una millora funcional i histològica en aquest model murí després d'un TMO. En aquests treball es varen estudiar els nivells del factor de creixement hepàtic (HGF), veien que els animals tractats amb TMO presentaven una regulació a la alça d'aquest factor [219]. Per aquest motiu ens varem proposar estudiar els nivells d'aquesta proteïna en els nostres animals, observant una clara reducció d'aquest factor en els ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ respecte als controls, i la restauració d'aquesta factor després del TMO només si les cèl·lules trasplantades eren $dysf^{+/+}$. L'HGF és un conegut activador de les cèl·lules satèl·lit [252,253,254,255] i un factor de mobilització de mesoangioblastes derivats de teixit [256], un tipus cel·lulars amb capacitat de regenerar el múscul esquelètic [160]. També s'ha reportat que l'absència de l'activador de l'HGF, l'activador de la plasminogen uroquinasa, empitjora el fenotip dels ratolins mdx [257], suggerint això un paper important de l'HGF en la patologia muscular. En el grup de ratolins A/J $Dysf^{prmd}$ tractats amb un trasplantament autòleg, els nivells d'HGF no es veien recuperats, suggerint que la diferència en l'expressió d'aquest factor és el motiu de la major recuperació fenotípica en els animals trasplantats heteròlogament. Tots aquests resultats indiquen que, l'HGF, probablement junt amb l'expressió d'altres factors que no hem estudiat, promouen la mobilització de cèl·lules satèl·lit, mesoangioblastes i potser d'altres tipus cel·lulars amb capacitat miogènica, i això contribueix a una millor reparació muscular. Tot hi que les cèl·lules trasplantades no provoquen l'expressió de disferlina en múscul esquelètic, aquesta teràpia pot contribuir a la reparació tissular a curt termini. La lleu millora en els animals trasplantats autòlogament podria ser

deguda als efectes del procediment dels trasplantament en si, que provoquin l'alliberament d'altres factors que afavoreixin la regeneració muscular.

CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquest treball, són les següents:

1. Els nivells d'expressió a membrana plasmàtica de Lamp-1 després d'una lesió poden ser un marcador per a avaluar l'eficàcia de teràpies destinades a restaurar l'expressió de disferlina en miotubs.
2. El nombre de nuclis positius per iodur de propidi als temps inicials d'un assaig de reparació utilitzant miotubs humans pot ser un bon test per a avaluar l'eficàcia de teràpies destinades a restaurar l'expressió de disferlina en miotubs.
3. El macròfags de pacients amb mutacions al gen DYSF mostren una alteració de la motilitat en cultiu respecte als d'individus sans que podria tenir un paper en la miopatia.
4. La combinació de diferents metodologies per l'estudi dels complexos proteics ens dona més informació i més robusta sobre l'interactoma d'una proteïna determinada.
5. La tècnica de FLIM-FRET es pot realitzar en condicions natives, aportant així una informació més propera a les condicions fisiològiques de la cèl·lula.
6. Els monòcits son capaços de fusionar amb miotubs en cultiu, però no són el principal tipus cel·lular dins de la línia hematopoyètica capaç de fusionar amb el teixit muscular.
7. El trasplantament de cèl·lules de moll d'os *dysf+/+* en un model murí de disferlinopatia no provoca l'expressió de disferlina en múscul esquelètic però si reconstitueix l'expressió d'aquesta proteïna en sang perifèrica.
8. El trasplantament de cèl·lules de moll d'os *dysf+/+* en un model murí de disferlinopatia no provoca una reducció de la inflamació o la infiltració de macròfags al múscul.
9. El trasplantament de moll d'os després de una irradiació subletal provoca una millora del nostre model murí en el nombre de nuclis centrals al teixit i en les proves funcionals, tant d'EMG com en els estudis de locomoció.
10. Aquesta millora funcional observada és més evident en els ratolins trasplantats amb cèl·lules *Dysf^{+/+}* suggerint que l'absència de disferlina en sang perifèrica també contribueix a la progressió de la malaltia.
11. La descripció del model murí A/J amb expressió normal de disferlina constitueix un control molt útil en futurs estudis destinats a avaluar possibles intervencions terapèutiques per a les disferlinopaties.

BIBLIOGRAFIA

1. Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, et al. (1988) MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242: 405-411.
2. Braun T, Bober E, Buschhausen-Denker G, Kohtz S, Grzeschik KH, et al. (1989) Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *EMBO J* 8: 3617-3625.
3. Braun T, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH (1989) A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J* 8: 701-709.
4. Montarras D, Lindon C, Pinset C, Domeyne P (2000) Cultured myf5 null and myoD null muscle precursor cells display distinct growth defects. *Biol Cell* 92: 565-572.
5. Olson EN (1992) Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev Biol* 154: 261-272.
6. Wright WE, Sassoon DA, Lin VK (1989) Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607-617.
7. Rhodes SJ, Konieczny SF (1989) Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* 3: 2050-2061.
8. Mauro A (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9: 493-495.
9. Seale P, Rudnicki MA (2000) A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218: 115-124.
10. Chen G, Quinn LS (1992) Partial characterization of skeletal myoblast mitogens in mouse crushed muscle extract. *J Cell Physiol* 153: 563-574.
11. Bischoff R (1997) Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn* 208: 505-515.
12. Shinin V, Gayraud-Morel B, Gomes D, Tajbakhsh S (2006) Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat Cell Biol* 8: 677-687.
13. Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM (2000) The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol* 150: 1209-1214.
14. Ervasti JM, Campbell KP (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122: 809-823.
15. Ahn AH, Kunkel LM (1995) Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 128: 363-371.
16. Miyagoe-Suzuki Y, Takeda SI (2001) Association of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) with alpha1-syntrophin at the sarcolemma. *Microsc Res Tech* 55: 164-170.
17. Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81: 209-237.
18. Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP (1997) Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities. *J Biol Chem* 272: 30429-30438.
19. Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J Biol Chem* 272: 28187-28190.
20. Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, et al. (2000) Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 275: 38048-38058.
21. Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, et al. (2001) The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 10: 1761-1766.

22. Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ (2000) Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* 10: 1295-1298.
23. Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12413-12418.
24. Chamberlain JS (2002) Gene therapy of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11: 2355-2362.
25. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science.
26. Franzini-Armstrong C, Porter KR (1964) Sarcolemmal Invaginations Constituting the T System in Fish Muscle Fibers. *J Cell Biol* 22: 675-696.
27. Porter KR, Palade GE (1957) Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol* 3: 269-300.
28. Berchtold MW, Brinkmeier H, Muntener M (2000) Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 80: 1215-1265.
29. Franzini-Armstrong C (2009) Architecture and regulation of the Ca²⁺ delivery system in muscle cells. *Appl Physiol Nutr Metab* 34: 323-327.
30. Tate CA, Hyek MF, Taffet GE (1991) The role of calcium in the energetics of contracting skeletal muscle. *Sports Med* 12: 208-217.
31. Ghosh A, Greenberg ME (1995) Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268: 239-247.
32. Kaye DM, Hoshijima M, Chien KR (2008) Reversing advanced heart failure by targeting Ca²⁺ cycling. *Annu Rev Med* 59: 13-28.
33. Frayn KN (1998) Regulación del Metabolismo una perspectiva humana. Llobera i Sande M, translator; Omega E, editor. Barcelona.
34. Dimauro S, Akman O, Hays AP (2007) Disorders of carbohydrate metabolism. *Handb Clin Neurol* 86: 167-182.
35. Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R, Rojas-Garcia R, Paradas C, et al. (2007) Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 68: 1284-1289.
36. Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, et al. (2001) Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 49: 130-134.
37. Miyoshi K, Kawai H, Iwasa M, Kusaka K, Nishino H (1986) Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* 109 (Pt 1): 31-54.
38. Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, et al. (2009) A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* 19: 21-25.
39. Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforet P, et al. (2007) Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64: 1176-1182.
40. Passos-Bueno MR, Bashir R, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, et al. (1995) Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD2B) in three families allows refinement of the candidate region. *Genomics* 27: 192-195.
41. Bashir R, Keers S, Strachan T, Passos-Bueno R, Zatz M, et al. (1996) Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. *Genomics* 33: 46-52.
42. Klinge L, Dean AF, Kress W, Dixon P, Charlton R, et al. (2008) Late onset in dysferlinopathy widens the clinical spectrum. *Neuromuscul Disord* 18: 288-290.

43. Gallardo E, Rojas-Garcia 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.
44. Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, et al. (1998) Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20: 31-36.
45. Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, et al. (1998) A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20: 37-42.
46. Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, De Luna N, et al. (2010) Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology* 75: 316-323.
47. Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, et al. (2002) A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 51: 129-133.
48. De Luna N, Freixas A, Gallano P, Caselles L, Rojas-Garcia R, et al. (2007) Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord* 17: 69-76.
49. Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, Gonzalez-Quereda L, et al. (2011) Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. *PLoS One* 6: e29061.
50. Pramono ZA, Tan CL, Seah IA, See JS, Kam SY, et al. (2009) Identification and characterisation of human dysferlin transcript variants: implications for dysferlin mutational screening and isoforms. *Hum Genet* 125: 413-420.
51. Foxton RM, Laval SH, Bushby KM (2004) Characterisation of the dysferlin skeletal muscle promoter. *Eur J Hum Genet* 12: 127-131.
52. Krahn M, Borges A, Navarro C, Schuit R, Stojkovic T, et al. (2009) Identification of different genomic deletions and one duplication in the dysferlin gene using multiplex ligation-dependent probe amplification and genomic quantitative PCR. *Genet Test Mol Biomarkers* 13: 439-442.
53. Glover L, Brown RH, Jr. (2007) Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic* 8: 785-794.
54. Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5: 2375-2390.
55. Sutton RB, Ernst JA, Brunger AT (1999) Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. *J Cell Biol* 147: 589-598.
56. Bai J, Chapman ER (2004) The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem Sci* 29: 143-151.
57. Therrien C, Di Fulvio S, Pickles S, Sinnreich M (2009) Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides. *Biochemistry* 48: 2377-2384.
58. Bansal D, Campbell KP (2004) Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 14: 206-213.
59. De Luna N, Gallardo E, Sonnet C, Chazaud B, Dominguez-Perles R, et al. (2010) Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 69: 643-653.
60. Nagaraju K, Rawat R, Veszolovszky E, Thapliyal R, Kesari A, et al. (2008) Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol* 172: 774-785.
61. Bansal D, Miyake K, Vogel SS, Groh S, Chen CC, et al. (2003) Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423: 168-172.

62. Diaz-Manera J, Touvier T, Dellavalle A, Tonlorenzi R, Tedesco FS, et al. (2010) Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy. *Cell Death Dis* 1: e61.
63. De Luna N, Gallardo E, Soriano M, Dominguez-Perles R, De la Torre C, et al. (2006) Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem* 281: 17092-17098.
64. De la Torre C, Illa I, Faulkner G, Soria L, Robles-Cedeno R, et al. (2009) Proteomics identification of differentially expressed proteins in the muscle of dysferlin myopathy patients. *Proteomics Clin Appl* 3: 486-497.
65. De Morree A, Hensbergen PJ, van Haagen HH, Dragan I, Deelder AM, et al. (2010) Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity. *PLoS One* 5: e13854.
66. Demonbreun AR, Fahrenbach JP, Deveaux K, Earley JU, Pytel P, et al. (2011) Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 20: 779-789.
67. Leung C, Utokaparch S, Sharma A, Yu C, Abraham T, et al. (2011) Proteomic identification of dysferlin-interacting protein complexes in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 415: 263-269.
68. Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, et al. (2005) Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 334-340.
69. Albrecht DE, Rufibach LE, Williams BA, Monnier N, Hwang E, et al. (2011) 5th Annual Dysferlin Conference 11-14 July 2011, Chicago, Illinois, USA. *Neuromuscul Disord* 22: 471-477.
70. Han WQ, Xia M, Xu M, Boini KM, Ritter JK, et al. (2012) Lysosome fusion to the cell membrane is mediated by the dysferlin C2A domain in coronary arterial endothelial cells. *J Cell Sci* 125: 1225-1234.
71. Han R, Frett EM, Levy JR, Rader EP, Lueck JD, et al. (2010) Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *J Clin Invest* 120: 4366-4374.
72. Achanzar WE, Ward S (1997) A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *J Cell Sci* 110 (Pt 9): 1073-1081.
73. Ward S, Argon Y, Nelson GA (1981) Sperm morphogenesis in wild-type and fertilization-defective mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 91: 26-44.
74. Selcen D, Stilling G, Engel AG (2001) The earliest pathologic alterations in dysferlinopathy. *Neurology* 56: 1472-1481.
75. Chapman ER (2002) Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 498-508.
76. Hoffman JF (1992) On red blood cells, hemolysis and resealed ghosts. *Adv Exp Med Biol* 326: 1-15.
77. McNeil PL, Miyake K, Vogel SS (2003) The endomembrane requirement for cell surface repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4592-4597.
78. McNeil PL, Terasaki M (2001) Coping with the inevitable: how cells repair a torn surface membrane. *Nat Cell Biol* 3: E124-129.
79. Bi GQ, Morris RL, Liao G, Alderton JM, Scholey JM, et al. (1997) Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca2+-regulated exocytosis. *J Cell Biol* 138: 999-1008.
80. Steinhardt RA, Bi G, Alderton JM (1994) Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science* 263: 390-393.
81. Miyake K, McNeil PL (1995) Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol* 131: 1737-1745.
82. McNeil A, McNeil PL (2005) Yolk granule tethering: a role in cell resealing and identification of several protein components. *J Cell Sci* 118: 4701-4708.

83. Reddy A, Caler EV, Andrews NW (2001) Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 106: 157-169.
84. Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Rupnik M, Meldolesi J (2004) Enlargeosome, an exocytic vesicle resistant to nonionic detergents, undergoes endocytosis via a nonacidic route. *Mol Biol Cell* 15: 5356-5368.
85. Huang Y, Laval SH, van Remoortere A, Baudier J, Benaud C, et al. (2007) AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J* 21: 732-742.
86. Roostalu U, Strahle U (2012) In vivo imaging of molecular interactions at damaged sarcolemma. *Dev Cell* 22: 515-529.
87. Minetti C, Sotgia F, Bruno C, Scartezzini P, Broda P, et al. (1998) Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 18: 365-368.
88. Galbiati F, Volonte D, Minetti C, Chu JB, Lisanti MP (1999) Phenotypic behavior of caveolin-3 mutations that cause autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy (LGMD-1C). Retention of LGMD-1C caveolin-3 mutants within the golgi complex. *J Biol Chem* 274: 25632-25641.
89. Walter MC, Braun C, Vorgerd M, Poppe M, Thirion C, et al. (2003) Variable reduction of caveolin-3 in patients with LGMD2B/MM. *J Neurol* 250: 1431-1438.
90. Hernandez-Deviez DJ, Martin S, Laval SH, Lo HP, Cooper ST, et al. (2006) Aberrant dysferlin trafficking in cells lacking caveolin or expressing dystrophy mutants of caveolin-3. *Hum Mol Genet* 15: 129-142.
91. Hernandez-Deviez DJ, Howes MT, Laval SH, Bushby K, Hancock JF, et al. (2008) Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin. *J Biol Chem* 283: 6476-6488.
92. Cai C, Weisleder N, Ko JK, Komazaki S, Sunada Y, et al. (2009) Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J Biol Chem* 284: 15894-15902.
93. Among BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S (2005) Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol* 24: 134-144.
94. Madaro L, Marrocco V, Fiore P, Aulino P, Smeriglio P, et al. (2011) PKC θ signaling is required for myoblast fusion by regulating the expression of caveolin-3 and beta1D integrin upstream focal adhesion kinase. *Mol Biol Cell* 22: 1409-1419.
95. Raynal P, Pollard HB (1994) Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1197: 63-93.
96. Babiychuk EB, Draeger A (2000) Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol* 150: 1113-1124.
97. Lambert O, Gerke V, Bader MF, Porte F, Brisson A (1997) Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 272: 42-55.
98. Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, et al. (2003) Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 278: 50466-50473.
99. Borgonovo B, Cocucci E, Racchetti G, Podini P, Bachi A, et al. (2002) Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system. *Nat Cell Biol* 4: 955-962.
100. Coorsen JR, Schmitt H, Almers W (1996) Ca²⁺ triggers massive exocytosis in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J* 15: 3787-3791.
101. Ninomiya Y, Kishimoto T, Miyashita Y, Kasai H (1996) Ca²⁺-dependent exocytotic pathways in Chinese hamster ovary fibroblasts revealed by a caged-Ca²⁺ compound. *J Biol Chem* 271: 17751-17754.

102. Kasai H, Kishimoto T, Liu TT, Miyashita Y, Podini P, et al. (1999) Multiple and diverse forms of regulated exocytosis in wild-type and defective PC12 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 945-949.
103. Haase H, Podzuweit T, Lutsch G, Hohaus A, Kostka S, et al. (1999) Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK. *FASEB J* 13: 2161-2172.
104. Hohaus A, Person V, Behlke J, Schaper J, Morano I, et al. (2002) The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca²⁺ channels and the actin-based cytoskeleton. *FASEB J* 16: 1205-1216.
105. Huang Y, de Morree 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.
106. 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.
107. Mellgren RL, Huang X (2007) Fetuin A stabilizes m-calpain and facilitates plasma membrane repair. *J Biol Chem* 282: 35868-35877.
108. Richard I, Roudaut C, Marchand S, Baghdiguian S, Herasse M, et al. (2000) Loss of calpain 3 proteolytic activity leads to muscular dystrophy and to apoptosis-associated I κ B α /nuclear factor κ B pathway perturbation in mice. *J Cell Biol* 151: 1583-1590.
109. Hayashi C, Ono Y, Doi N, Kitamura F, Tagami M, et al. (2008) Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* 283: 14801-14814.
110. Fougousse F, Gonin P, Durand M, Richard I, Raymackers JM (2003) Force impairment in calpain 3-deficient mice is not correlated with mechanical disruption. *Muscle Nerve* 27: 616-623.
111. Sorimachi H, Ono Y, Suzuki K (2000) Skeletal muscle-specific calpain, p94, and connectin/titin: their physiological functions and relationship to limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Adv Exp Med Biol* 481: 383-395; discussion 395-387.
112. Fardeau M (2006) Historical review on the researches on muscular dystrophies. *Rinsho Shinkeigaku* 46: 814.
113. Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, et al. (2000) Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 10: 553-559.
114. Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, et al. (2004) Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord* 14: 659-665.
115. Hermanova M, Zapletalova E, Sedlackova J, Chrobakova T, Letocha O, et al. (2006) Analysis of histopathologic and molecular pathologic findings in Czech LGMD2A patients. *Muscle Nerve* 33: 424-432.
116. Yamaji S, Suzuki A, Sugiyama Y, Koide Y, Yoshida M, et al. (2001) A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J Cell Biol* 153: 1251-1264.
117. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, et al. (2007) Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* 179: 1043-1057.
118. Quach NL, Biressi S, Reichardt LF, Keller C, Rando TA (2009) Focal adhesion kinase signaling regulates the expression of caveolin 3 and beta1 integrin, genes essential for normal myoblast fusion. *Mol Biol Cell* 20: 3422-3435.

119. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Matsuda N, Nishi M, et al. (2009) MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery. *Nat Cell Biol* 11: 56-64.
120. Cai C, Masumiya H, Weisleder N, Pan Z, Nishi M, et al. (2009) MG53 regulates membrane budding and exocytosis in muscle cells. *J Biol Chem* 284: 3314-3322.
121. Lee CS, Yi JS, Jung SY, Kim BW, Lee NR, et al. (2010) TRIM72 negatively regulates myogenesis via targeting insulin receptor substrate-1. *Cell Death Differ* 17: 1254-1265.
122. Matsuda C, Miyake K, Kameyama K, Keduka E, Takeshima H, et al. (2012) The C2A domain in dysferlin is important for association with MG53 (TRIM72). *PLoS Curr* 4: e5035add5038caff5034.
123. McNeil P (2009) Membrane repair redux: redox of MG53. *Nat Cell Biol* 11: 7-9.
124. Cacciottolo M, Belcastro V, Laval S, Bushby K, di Bernardo D, et al. (2011) Reverse engineering gene network identifies new dysferlin-interacting proteins. *J Biol Chem* 286: 5404-5413.
125. Zhu H, Lin P, De G, Choi KH, Takeshima H, et al. (2011) Polymerase transcriptase release factor (PTRF) anchors MG53 protein to cell injury site for initiation of membrane repair. *J Biol Chem* 286: 12820-12824.
126. Azakir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Sinnreich M (2010) Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One* 5: e10122.
127. Di Fulvio S, Azakir BA, Therrien C, Sinnreich M (2011) Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation. *PLoS One* 6: e28563.
128. Morrée AD (2011) Functional protein network unifying Limb Girdle Muscular Dystrophy.
129. van Haagen HH, t Hoen PA, Botelho Bovo A, de Morree A, van Mulligen EM, et al. (2009) Novel protein-protein interactions inferred from literature context. *PLoS One* 4: e7894.
130. Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, et al. (2011) Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet Muscle* 1: 34.
131. Humphrey GW, Mekhedov E, Blank PS, de Morree A, Pekkurnaz G, et al. (2012) GREG cells, a dysferlin-deficient myogenic mouse cell line. *Exp Cell Res* 318: 127-135.
132. Kawahara G, Serafini PR, Myers JA, Alexander MS, Kunkel LM (2011) Characterization of zebrafish dysferlin by morpholino knockdown. *Biochem Biophys Res Commun* 413: 358-363.
133. Bittner RE, Anderson LV, Burkhardt E, Bashir R, Vafiadaki E, et al. (1999) Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 23: 141-142.
134. Ho M, Post CM, Donahue LR, Lidov HG, Bronson RT, et al. (2004) Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet* 13: 1999-2010.
135. Agarkova I, Schoenauer R, Ehler E, Carlsson L, Carlsson E, et al. (2004) The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur J Cell Biol* 83: 193-204.
136. Lostal W, Bartoli M, Bourg N, Roudaut C, Bentaib A, et al. (2010) Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet* 19: 1897-1907.
137. Morgan JE (1988) Myogenicity in vitro and in vivo of mouse muscle cells separated on discontinuous Percoll gradients. *J Neurol Sci* 85: 197-207.
138. Morgan JE, Watt DJ, Sloper JC, Partridge TA (1988) Partial correction of an inherited biochemical defect of skeletal muscle by grafts of normal muscle precursor cells. *J Neurol Sci* 86: 137-147.
139. Watt DJ, Lambert K, Morgan JE, Partridge TA, Sloper JC (1982) Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse. *J Neurol Sci* 57: 319-331.

140. Bhagavati S, Xu W (2005) Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 644-649.
141. Yaffe D (1968) Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 477-483.
142. Morgan JE, Hoffman EP, Partridge TA (1990) Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse. *J Cell Biol* 111: 2437-2449.
143. Kinoshita I, Huard J, Tremblay JP (1994) Utilization of myoblasts from transgenic mice to evaluate the efficacy of myoblast transplantation. *Muscle Nerve* 17: 975-980.
144. Kinoshita I, Vilquin JT, Guerette B, Asselin I, Roy R, et al. (1994) Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression. *Muscle Nerve* 17: 1407-1415.
145. Huard J, Tremblay G, Verreault S, Labrecque C, Tremblay JP (1993) Utilization of an antibody specific for human dystrophin to follow myoblast transplantation in nude mice. *Cell Transplant* 2: 113-118.
146. Huard J, Verreault S, Roy R, Tremblay M, Tremblay JP (1994) High efficiency of muscle regeneration after human myoblast clone transplantation in SCID mice. *J Clin Invest* 93: 586-599.
147. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, et al. (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122: 289-301.
148. Kottlors M, Kirschner J (2010) Elevated satellite cell number in Duchenne muscular dystrophy. *Cell Tissue Res* 340: 541-548.
149. Cossu G (2004) Fusion of bone marrow-derived stem cells with striated muscle may not be sufficient to activate muscle genes. *J Clin Invest* 114: 1540-1543.
150. Maclean S, Khan WS, Malik AA, Anand S, Snow M (2012) The potential of stem cells in the treatment of skeletal muscle injury and disease. *Stem Cells Int* 2012: 282348.
151. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, et al. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 7: 1028-1034.
152. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA (2002) Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159: 123-134.
153. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, et al. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
154. Bachrach E, Li S, Perez AL, Schienda J, Liadaki K, et al. (2004) Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3581-3586.
155. Bachrach E, Perez AL, Choi YH, Illigens BM, Jun SJ, et al. (2006) Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve* 34: 44-52.
156. Chretien F, Dreyfus PA, Christov C, Caramelle P, Lagrange JL, et al. (2005) In vivo fusion of circulating fluorescent cells with dystrophin-deficient myofibers results in extensive sarcoplasmic fluorescence expression but limited dystrophin sarcolemmal expression. *Am J Pathol* 166: 1741-1748.
157. Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, et al. (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9: 255-267.
158. Cossu G, Sampaolesi M (2007) New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med* 13: 520-526.

159. Guttinger M, Tafi E, Battaglia M, Coletta M, Cossu G (2006) Allogeneic mesoangioblasts give rise to alpha-sarcoglycan expressing fibers when transplanted into dystrophic mice. *Exp Cell Res* 312: 3872-3879.
160. Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, et al. (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444: 574-579.
161. Diaz-Manera J, Gallardo E, de Luna N, Navas M, Soria L, et al. (2012) The increase of pericyte population in human neuromuscular disorders supports their role in muscle regeneration in vivo. *J Pathol*.
162. Lu QL, Yokota T, Takeda S, Garcia L, Muntoni F, et al. (2010) The status of exon skipping as a therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 19: 9-15.
163. Lu QL, Mann CJ, Lou F, Bou-Gharios G, Morris GE, et al. (2003) Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 9: 1009-1014.
164. Mann CJ, Honeyman K, Cheng AJ, Ly T, Lloyd F, et al. (2001) Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 42-47.
165. Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhart PF, et al. (2011) Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 364: 1513-1522.
166. van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, et al. (2007) Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* 357: 2677-2686.
167. Wu B, Lu P, Benrashid E, Malik S, Ashar J, et al. (2010) Dose-dependent restoration of dystrophin expression in cardiac muscle of dystrophic mice by systemically delivered morpholino. *Gene Ther* 17: 132-140.
168. Wu B, Moulton HM, Iversen PL, Jiang J, Li J, et al. (2008) Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14814-14819.
169. Yin H, Moulton HM, Seow Y, Boyd C, Boutilier J, et al. (2008) Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Hum Mol Genet* 17: 3909-3918.
170. Jearawiriyapaisarn N, Moulton HM, Sazani P, Kole R, Willis MS (2010) Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers. *Cardiovasc Res* 85: 444-453.
171. Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, Nakamura A, et al. (2009) Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* 65: 667-676.
172. Shin JH, Bostick B, Yue Y, Hajjar R, Duan D (2011) SERCA2a gene transfer improves electrocardiographic performance in aged mdx mice. *J Transl Med* 9: 132.
173. Wang B, Li J, Fu FH, Xiao X (2009) Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J Orthop Res* 27: 421-426.
174. Hoogaars W, Mouisel E, Pasternack A, Hulmi JJ, Relizani K, et al. (2012) Combined effect of AAV-U7-induced dystrophin exon skipping and soluble activin type IIB receptor in mdx mice. *Hum Gene Ther*.
175. Gilbert R, Nalbantoglu J, Petrof BJ, Ebihara S, Guibinga GH, et al. (1999) Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum Gene Ther* 10: 1299-1310.
176. Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, et al. (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384: 349-353.

177. Tinsley JM, Fairclough RJ, Storer R, Wilkes FJ, Potter AC, et al. (2011) Daily treatment with SMTc1100, a novel small molecule utrophin upregulator, dramatically reduces the dystrophic symptoms in the mdx mouse. *PLoS One* 6: e19189.
178. Briguët A, Erb M, Courdier-Fruh I, Barzaghi P, Santos G, et al. (2008) Effect of calpain and proteasome inhibition on Ca²⁺-dependent proteolysis and muscle histopathology in the mdx mouse. *FASEB J* 22: 4190-4200.
179. Burkin DJ, Wallace GQ, Nicol KJ, Kaufman DJ, Kaufman SJ (2001) Enhanced expression of the alpha 7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice. *J Cell Biol* 152: 1207-1218.
180. Rooney JE, Gurple PB, Burkin DJ (2009) Laminin-111 protein therapy prevents muscle disease in the mdx mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7991-7996.
181. Kronqvist P, Kawaguchi N, Albrechtsen R, Xu X, Schroder HD, et al. (2002) ADAM12 alleviates the skeletal muscle pathology in mdx dystrophic mice. *Am J Pathol* 161: 1535-1540.
182. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, et al. (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447: 87-91.
183. Barton-Davis ER, Cordier L, Shoturma DI, Leland SE, Sweeney HL (1999) Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest* 104: 375-381.
184. Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Wall C, King W, et al. (2010) Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 67: 771-780.
185. Finkel RS (2010) Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/ Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child Neurol* 25: 1158-1164.
186. Leriche-Guerin K, Anderson LV, Wrogemann K, Roy B, Goulet M, et al. (2002) Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice. *Neuromuscul Disord* 12: 167-173.
187. Kong KY, Ren J, Kraus M, Finklestein SP, Brown RH, Jr. (2004) Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells* 22: 981-993.
188. Vieira NM, Bueno CR, Jr., Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, et al. (2008) SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* 26: 2391-2398.
189. Grose WE, Clark KR, Griffin D, Malik V, Shontz KM, et al. (2012) Homologous recombination mediates functional recovery of dysferlin deficiency following AAV5 gene transfer. *PLoS One* 7: e39233.
190. Sinnreich M, Therrien C, Karpati G (2006) Lariat branch point mutation in the dysferlin gene with mild limb-girdle muscular dystrophy. *Neurology* 66: 1114-1116.
191. Wein N, Avril A, Bartoli M, Beley C, Chaouch S, et al. (2010) Efficient bypass of mutations in dysferlin deficient patient cells by antisense-induced exon skipping. *Hum Mutat* 31: 136-142.
192. Krahn M, Wein N, Bartoli M, Lostal W, Courrier S, et al. (2010) A naturally occurring human minidysferlin protein repairs sarcolemmal lesions in a mouse model of dysferlinopathy. *Sci Transl Med* 2: 50ra69.
193. Azakir BA, Di Fulvio S, Salomon S, Brockhoff M, Therrien C, et al. (2012) Modular Dispensability of Dysferlin C2 Domains Reveals Rational Design for Mini-dysferlin Molecules. *J Biol Chem* 287: 27629-27636.

194. Wang B, Yang Z, Brisson BK, Feng H, Zhang Z, et al. (2010) Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *J Appl Physiol* 109: 901-905.
195. Hattori H, Nagata E, Oya Y, Takahashi T, Aoki M, et al. (2007) A novel compound heterozygous dysferlin mutation in Miyoshi myopathy siblings responding to dantrolene. *Eur J Neurol* 14: 1288-1291.
196. Lerario A, Cogiamanian F, Marchesi C, Belicchi M, Bresolin N, et al. (2010) Effects of rituximab in two patients with dysferlin-deficient muscular dystrophy. *BMC Musculoskelet Disord* 11: 157.
197. Nemoto H, Konno S, Sugimoto H, Nakazora H, Nomoto N, et al. (2011) Anti-TNF therapy using etanercept suppresses degenerative and inflammatory changes in skeletal muscle of older SJL/J mice. *Exp Mol Pathol* 90: 264-270.
198. Fujita E, Kouroku Y, Isoai A, Kumagai H, Misutani A, et al. (2007) Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet* 16: 618-629.
199. Azakir BA, Di Fulvio S, Kinter J, Sinnreich M (2012) Proteasomal inhibition restores biological function of mis-sense mutated dysferlin in patient-derived muscle cells. *J Biol Chem* 287: 10344-10354.
200. Miyaura C, Abe E, Kuribayashi T, Tanaka H, Konno K, et al. (1981) 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 102: 937-943.
201. Tanaka H, Abe E, Miyaura C, Shiina Y, Suda T (1983) 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 117: 86-92.
202. Luna ND, Diaz-Manera J, Paradas C, Iturriaga C, Rojas-Garcia R, et al. (2012) 1alpha,25(OH)₂-Vitamin D₃ Increases Dysferlin Expression in vitro and in a Human Clinical Trial. *Mol Ther*.
203. Askanas V, Shafiq SA, Milhorat AT (1971) Normal and dystrophic chicken muscle at successive stages in tissue culture. *Arch Neurol* 24: 259-265.
204. Mancuso R, Santos-Nogueira E, Osta R, Navarro X (2011) Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* 122: 1660-1670.
205. Navarro X, Udina E (2009) Chapter 6: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part III-electrophysiological evaluation. *Int Rev Neurobiol* 87: 105-126.
206. Amende I, Kale A, McCue S, Glazier S, Morgan JP, et al. (2005) Gait dynamics in mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neuroeng Rehabil* 2: 20.
207. Hampton TG, Stasko MR, Kale A, Amende I, Costa AC (2004) Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome. *Physiol Behav* 82: 381-389.
208. Mancuso R, Olivan S, Osta R, Navarro X (2011) Evolution of gait abnormalities in SOD1(G93A) transgenic mice. *Brain Res* 1406: 65-73.
209. Nicholson LV, Davison K, Falkous G, Harwood C, O'Donnell E, et al. (1989) Dystrophin in skeletal muscle. I. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 94: 125-136.
210. Dubowitz V (1974) Muscle biopsy--technical and diagnostic aspects. *Ann Clin Res* 6: 69-79.
211. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T (2006) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* 1: 1852-1858.
212. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1: 2856-2860.

213. V.T. Förster VTM, E.V.; Greenbaum, E. ; Knox, R.S. (1948) Intermolecular energy migration and fluorescence (Translation of Förster, T., 1948). Biological physics, American Institute of Physics: 183–221.
214. Liu WC, Slusarchyk DS, Astle G, Trejo WH, Brown WE, et al. (1978) Ionomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* 31: 815-819.
215. Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP (2000) Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 48: 902-912.
216. Felder E, Protasi F, Hirsch R, Franzini-Armstrong C, Allen PD (2002) Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys J* 82: 3144-3149.
217. Waddell LB, Lemckert FA, Zheng XF, Tran J, Evesson FJ, et al. (2011) Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch. *J Neuropathol Exp Neurol* 70: 302-313.
218. Han JJ, Carter GT, Ra JJ, Abresch RT, Chamberlain JS, et al. (2006) Electromyographic studies in mdx and wild-type C57 mice. *Muscle Nerve* 33: 208-214.
219. Salah-Mohellibi N, Millet G, Andre-Schmutz I, Desforgues B, Olasso R, et al. (2006) Bone marrow transplantation attenuates the myopathic phenotype of a muscular mouse model of spinal muscular atrophy. *Stem Cells* 24: 2723-2732.
220. Lostal W, Bartoli M, Roudaut C, Bourg N, Krahn M, et al. (2012) Lack of correlation between outcomes of membrane repair assay and correction of dystrophic changes in experimental therapeutic strategy in dysferlinopathy. *PLoS One* 7: e38036.
221. Posey AD, Jr., Demonbreun A, McNally EM (2011) Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth. *Curr Top Dev Biol* 96: 203-230.
222. Han R, Bansal D, Miyake K, Muniz VP, Weiss RM, et al. (2007) Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J Clin Invest* 117: 1805-1813.
223. Wenzel K, Geier C, Qadri F, Hubner N, Schulz H, et al. (2007) Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med (Berl)* 85: 1203-1214.
224. Chiu YH, Hornsey MA, Klinge L, Jorgensen LH, Laval SH, et al. (2009) Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18: 1976-1989.
225. Rawat R, Cohen TV, Ampong B, Francia D, Henriques-Pons A, et al. (2010) Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am J Pathol* 176: 2891-2900.
226. 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.
227. Fliegel L, Ohnishi M, Carpenter MR, Khanna VK, Reithmeier RA, et al. (1987) Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1167-1171.
228. Murphy RM, Larkins NT, Mollica JP, Beard NA, Lamb GD (2009) Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat. *J Physiol* 587: 443-460.
229. Royer L, Rios E (2009) Deconstructing calsequestrin. Complex buffering in the calcium store of skeletal muscle. *J Physiol* 587: 3101-3111.
230. Collins JH, Tarcsafalvi A, Ikemoto N (1990) Identification of a region of calsequestrin that binds to the junctional face membrane of sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* 167: 189-193.

231. Klinge L, Harris J, Sewry C, Charlton R, Anderson L, et al. (2010) Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle. *Muscle Nerve* 41: 166-173.
232. Roche JA, Ru LW, O'Neill AM, Resneck WG, Lovering RM, et al. (2011) Unmasking potential intracellular roles for dysferlin through improved immunolabeling methods. *J Histochem Cytochem* 59: 964-975.
233. Brule C, Dargelos E, Diallo R, Listrat A, Bechet D, et al. (2010) Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging. *Biochimie* 92: 1923-1933.
234. Agarkova I, Ehler E, Lange S, Schoenauer R, Perriard JC (2003) M-band: a safeguard for sarcomere stability? *J Muscle Res Cell Motil* 24: 191-203.
235. Agarkova I, Perriard JC (2005) The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* 15: 477-485.
236. Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467-480.
237. Ahmad FJ, He Y, Myers KA, Hasaka TP, Francis F, et al. (2006) Effects of dynactin disruption and dynein depletion on axonal microtubules. *Traffic* 7: 524-537.
238. Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, et al. (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27: 3571-3583.
239. Dujardin DL, Barnhart LE, Stehman SA, Gomes ER, Gundersen GG, et al. (2003) A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* 163: 1205-1211.
240. Tuck E, Cavalli V (2010) Roles of membrane trafficking in nerve repair and regeneration. *Commun Integr Biol* 3: 209-214.
241. Perlson E, Hanz S, Ben-Yaakov K, Segal-Ruder Y, Seger R, et al. (2005) Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. *Neuron* 45: 715-726.
242. Mellgren RL (2010) A plasma membrane wound proteome: reversible externalization of intracellular proteins following reparable mechanical damage. *J Biol Chem* 285: 36597-36607.
243. Bohm J, Leshinsky-Silver E, Vassilopoulos S, Le Gras S, Lerman-Sagie T, et al. (2012) Samaritan myopathy, an ultimately benign congenital myopathy, is caused by a RYR1 mutation. *Acta Neuropathol* 124: 575-581.
244. de la Torre C, Domínguez-Perles R, de Luna N, Robles-Cedeño R, Rojas-García R, et al. (2007) **Estudio del patrón de expresión proteica específico de distintos músculos normales mediante técnicas de electroforesis bidimensional.** *Sociedad Española de Neurología: Neurología.*
245. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, et al. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.
246. Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA (2003) Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9: 1520-1527.
247. Doyonnas R, LaBarge MA, Sacco A, Charlton C, Blau HM (2004) Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13507-13512.
248. Millay DP, Maillet M, Roche JA, Sargent MA, McNally EM, et al. (2009) Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. *Am J Pathol* 175: 1817-1823.
249. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, et al. (2007) Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204: 1057-1069.

250. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165.
251. Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacene E, Roblot N, et al. (2001) Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152: 1107-1114.
252. Cornelison DD, Filla MS, Stanley HM, Rapraeger AC, Olwin BB (2001) Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* 239: 79-94.
253. Kastner S, Elias MC, Rivera AJ, Yablonka-Reuveni Z (2000) Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. *J Histochem Cytochem* 48: 1079-1096.
254. Sheehan SM, Tatsumi R, Temm-Grove CJ, Allen RE (2000) HGF is an autocrine growth factor for skeletal muscle satellite cells in vitro. *Muscle Nerve* 23: 239-245.
255. Tatsumi R, Allen RE (2004) Active hepatocyte growth factor is present in skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* 30: 654-658.
256. Iwasaki M, Koyanagi M, Kossmann H, Monsefi N, Rupp S, et al. (2011) Hepatocyte growth factor mobilizes non-bone marrow-derived circulating mesoangioblasts. *Eur Heart J* 32: 627-636.
257. Suelves M, Vidal B, Serrano AL, Tjwa M, Roma J, et al. (2007) uPA deficiency exacerbates muscular dystrophy in MDX mice. *J Cell Biol* 178: 1039-1051.

ANNEXES

Annex 1

Manuscripts elaborats amb els resultats de la tesi doctoral que es troben en procés de revisió en revistes especialitzades

Bone marrow transplantation in dysferlin deficient mice results in a mild functional improvement

Bàrbara Flix, Xavier Suárez-Calvet, Jordi Díaz-Manera, Eva Santos-Nogueira, Renzo Mancuso, Jordi Barquineró, Xavier Navarro, Isabel Illa, Eduard Gallardo

Unravelling the interactions between proteins constituting the dysferlin complex

Bàrbara Flix, Carolina de la Torre, Juan Castillo, Carme Casal, Isabel Illa, Eduard Gallardo

Dysferlin regulates cell adhesion in human monocytes

Antoine de Morrée, Bàrbara Flix, Ivana Bagaric, Jun Wang, Marlinde van den Boogaard, Laure Grand Moursel, Rune R Frants, Isabel Illa, Eduard Gallardo, Rene Toes, Silvère M van der Maarel

Bone marrow transplantation in dysferlin deficient mice results in a mild functional improvement

Bàrbara Flix ^{a, c}, Xavier Suárez-Calvet ^{a, c}, Jordi Díaz-Manera ^{b, c}, Eva Santos-Nogueira ^{c, d}, Renzo Mancuso ^{c, d}, Jordi Barquinero ^e, Xavier Navarro ^{c, d}, Isabel Illa ^{b, c}, Eduard Gallardo ^{a, c}.

^a Laboratori de Malalties Neuromusculars, Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain. ^b Servei de Neurologia, Hospital de Sant Pau, UAB, Barcelona Spain. ^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain. ^d Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Institut de Neurociències, UAB, Barcelona, Spain. ^e Departament de Teràpia Cel·lular, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

ABSTRACT

Dysferlinopathies are caused by mutations in the DYSF gene. Dysferlin is a protein mainly expressed in skeletal muscle and monocytes. Cell therapy constitutes a promising tool for the treatment of muscular dystrophies. The aim of our study was to evaluate the effect of bone marrow transplantation (BMT) using the A/J Dysfprmd mouse model of dysferlinopathy. For that purpose we studied dysferlin expression by Western blot (WB) and/or immunohistochemistry in transplanted mice and controls. Computerized analysis of locomotion and electrophysiological techniques were also performed to test functional improvement. We observed dysferlin expression in splenocytes but not in the skeletal muscle of the transplanted mice. However, locomotion analyses and electromyography studies showed an improvement in the transplanted mice that was more significant in the animals transplanted with dysferlin+/+ cells. In conclusion, although BMT restores dysferlin expression in monocytes but not in skeletal muscle, muscle function was partially recovered. We propose that the slight improvement observed in the functional studies could be related with changes in the inflammatory response due to dysferlin expression in monocytes and/or factors released by the transplanted cells.

Keywords: Dysferlin, Limb-girdle muscular dystrophy, Bone marrow transplantation, Monocytes/macrophages, A/J mice, Functional tests

INTRODUCTION

Dysferlin myopathies are caused by the absence or scarcity of the dysferlin protein, encoded by the DYSF gene (1, 2). It is an autosomal recessive disease which presents clinical heterogeneity (3-9), although a recent study demonstrated a similar magnetic resonance pattern (10) in both proximal and distal forms. These diseases are characterized by progressive degeneration and loss of skeletal muscle, high levels of creatine kinase (CKs) in blood and a dystrophic pattern and presence of inflammatory infiltrates in skeletal muscle (11).

Dysferlin is a type 2 protein of 2080 amino acids and a molecular weight of about 237KDa, which is expressed in different tissues such as kidney, heart, liver (1) and placenta (12). However, most research is focused in skeletal muscle (13) and monocytes (14-16).

Different studies have demonstrated a role of dysferlin in sarcolemma repair after injury

(17, 18), but it has also been shown to be involved in muscle differentiation *in vitro* (19) and *in vivo* (20).

The presence of inflammatory infiltrates, mainly constituted by macrophages, is a hallmark of dysferlinopathies (11). The presence of inflammation has been observed in other muscular dystrophies such as Duchenne muscular dystrophy (DMD) (21) and facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD) (11, 21, 22). The absence of dysferlin has also been reported to enhance phagocytosis in murine monocytes (16). These findings suggest that in dysferlinopathies muscle inflammatory infiltrates could worsen and perpetuate the dystrophic process.

Cell therapy has become an important research line for the treatment of muscular dystrophies. The use of human umbilical cord cells in the SJL mouse model (23) resulted in low engraftment and low levels of dysferlin expression in muscle (24). In another study human adipose-derived stromal cells were used in the same mouse

model with similar results (25). In yet another study the authors found that mesoangioblasts, a vessel-associated progenitor cell, can engraft and restore dysferlin expression in skeletal muscle in A/J mice (26), another mouse model of dysferlinopathy (18)

Bone marrow transplantation (BMT) constitutes a different approach of stem cell-based therapy in muscular dystrophies. Because allogeneic BMT has been extensively used for the treatment of different pathologies in humans, a possible beneficial effect in animal models of muscular dystrophy could be more easily translated to therapy in patients. The first BMT in a dystrophic animal was performed in the *mdx* mouse, a model for DMD (27, 28). The authors found that some transplanted cells were able to engraft in the skeletal muscle but not to express dystrophin. In another study, BMT was assessed in a muscular mouse model of spinal muscular atrophy which presents a mild dystrophic muscular phenotype (29). In view of their results the authors suggested that the biological activity of BM-derived cells was able to improve the myopathic phenotype by enhancing muscle regeneration.

It has been shown that BM-derived cells can fuse into skeletal muscle *in vivo* (30-32). However, those cells failed to express muscle specific proteins. In the case of dysferlin myopathies, this kind of cell therapy could be more effective given that some hematopoietic cells such as monocytes express dysferlin. Furthermore, monocytes were reported to be able to fuse and regenerate other tissues such as the liver (33). BMT has not been tested in animal models of dysferlinopathy,

The general aim of our study was to evaluate the therapeutic potential of syngeneic BMT in the A/J *Dysf^{prmd}* mouse model of dysferlinopathy.

MATERIAL AND METHODS

Mice

For this study the mouse model for dysferlinopathy A/J *Dysf^{prmd}* (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) (26) was used as BMT recipients. A/J *Dysf^{+/+}* (A/JOlaHsd) mice (Harlan Laboratories, Sant Feliu de Codines, Barcelona, Spain) were used as donors, and as positive controls for dysferlin expression. All animals were genotyped as previously described (26).

Bone marrow transplantation

Ten untreated A/J *Dysf^{+/+}* mice were used as positive controls (group A), ten untreated A/J *Dysf^{prmd}* mice were used as negative controls (group B) and twenty A/J *Dysf^{prmd}* animals were transplanted, ten with dysferlin^{+/+} cells (group C), and ten with dysferlin^{-/-} cells (group D). All animals were 12 weeks old at the time the BMT was performed.

The bone marrow cells of donor mice were obtained post-mortem by flushing the femorae (34, 35). After sublethal irradiation with 4.5 Gy, 3×10^6 cells were injected intraperitoneally in the receptor mice during the first hours.

Ten weeks after transplantation, electrophysiological and locomotion analyses were performed in all animals. After functional tests, all mice were sacrificed and samples from quadriceps, gastrocnemius and TA muscle and spleen were collected and frozen.

All the procedures using animals in this project were approved by the "Animal Experimentation Committees of the Vall D'Hebron Institut de Recerca, Barcelona, Spain and the Universitat Autònoma de Barcelona, Spain".

Electrophysiological tests

For motor nerve conduction tests, the sciatic nerve was stimulated percutaneously by means of single pulses of 0.02 ms duration (Grass S88) delivered through a pair of needle electrodes placed at the sciatic notch. The compound muscle action potentials (CMAP, M wave) were recorded from the TA and the plantar (interossei) muscles with microneedle electrodes (36, 37). The initial latency (the time from stimulus to the onset of the first negative deflection) and the maximal amplitude of the M wave were measured. All potentials were amplified and displayed on a digital oscilloscope (Tektronix 450S). To ensure reproducibility, the recording needles were placed under microscope to secure the same placement on all animals guided by anatomical landmarks. During the tests, the mice body temperature was kept constant between 34-36°C by a thermostated heating pad.

Following nerve conduction tests, with the mice under light anesthesia, electromyographic (EMG) recordings of MUAPs were obtained from the TA and plantar interossei muscles following a similar protocol to that previously described in *mdx* mice (38) Recordings were obtained

in rest conditions and following light noxious stimuli delivered as light pinches in the tail to provoke bursts of EMG activity. The signals were digitized (Powerlab 6T, ADInstruments) and fed into Chart software for posthoc analysis. From each mouse of the four groups, MUAPs were recorded and the duration, amplitude, and number of phases were measured. Furthermore, MUAPs were categorized into small, medium and high amplitude as a representation of the three main types of motor units (S, FR, FF) (39) and to facilitate the interpretation of the results. At least six distinct, repeatedly firing MUAPs from each class were selected for analysis.

Digigait analysis

Digigait analysis was performed using the Digigait Imaging system (Mouse Specifics, Quincy, MA). Briefly, digital video images of the underside of the mouse were collected with a high-speed video camera (80 frames per second) from below the transparent belt of a motorized treadmill. The mice were accustomed to the treadmill belt and the testing conditions before the recordings. Each mouse was allowed to explore the treadmill compartment, with the motor speed set to zero, for 5 min. Then, motor speed was set to 30 cm/s to collect the videos. A minimum of 200 images was collected for each walking mouse so that 5-7 strides were monitored in each run. Each video image representing 12.5 ms was digitized and the area (in pixels) of the paws was calculated with the DigiGait software (37, 40, 41).

Western-Blot (WB)

To study protein levels in muscle and spleen, samples were treated with Nicholson sample buffer (0.125 mol/L Tris/HCl, pH 6.4, 10% of glycerol, 4% SDS, 4 mol/L urea, 10% of mercaptoethanol, and 0.001% of bromophenol blue) (42). The protein extracts were analyzed in 8% SDS-PAGE gels transferred to PROTRAN (WHATMAN, Dassel, Germany) nitrocellulose membranes. The unspecific binding sites were blocked using odyssey blocking buffer (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). Dysferlin levels were detected using the Hamlet I monoclonal antibody (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK). Protein levels in mice were normalized with the immunodetection of beta-tubulin with monoclonal antibody (clone B-5-1-2) (Sigma, Saint Louis, MO). A goat-anti-

mouse conjugated with IRDye_800 (Li-Cor) was used for detection with Odyssey Infrared Imaging System and protein levels were analyzed with the Odyssey 2.1 software (Li-Cor).

Histochemistry and immunohistochemistry studies

For histological description of quadriceps, gastrocnemius and TA muscles, 7 μ M thick sections were stained with hematoxylin&eosin.

For dysferlin and the monocyte/macrophage markers (43, 44) immunodetection, 7 μ M thick sections were fixed with acetone and blocked with Tris buffer saline supplemented with 0.5% normal donkey serum. Dysferlin was detected using a rabbit monoclonal antibody (Epitomics, Burlingame, CA, USA), and macrophages using a rat anti-mouse F4/80 (Acris antibodies, Herford, Germany) and rat anti-CD206 (Lifespan biosciences, Seattle, WA) before using donkey anti-rabbit antibody conjugated to Fluor Alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), goat anti-rabbit-HRP or goat anti-rat-HRP (Jackson laboratories, West Grove, PA) in serial sections. Images were collected with an Olympus DP72 camera connected to a BX51 Olympus fluorescence microscope and analyzed with the Cell^{AD} software. To quantify the number of central nuclei or macrophages in muscle, four fields were photographed at 100x from hematoxylin and eosin stained frozen sections of at least three different animals per group.

RNA Extraction and Semiquantitative Retrotranscriptase Polymerase Chain Reaction

RNA from all animal groups (5-6 animals/group) was extracted using Ultraspec (Biotech Laboratories, Inc, Houston, TX, USA). Total RNA (1250 ng) of each RNA sample was reverse transcribed into cDNA using MultiScribe reverse transcriptase (Applied Biosystems, Warrington, UK). Quantification of the mRNA encoding DYSF, and GAPDH as internal standard was performed using TaqMan Universal Master Mix technology (Applied Biosystems). Quantitative polymerase chain reaction (PCR) was performed in a total reaction volume of 12 μ L per well. The primers used for retrotranscriptase (RT-) PCR were designed by Applied Biosystems (DYSF, Mm00458042_m1, GAPD, 4352932E). The

comparative CT method (CT) for relative quantification of gene expression was used as previously reported (19), since the target and normalizer (GAPDH) have similar dynamic ranges.

Statistical analysis

For all functional studies, central nuclei counting, macrophage quantification and real-time PCR, differences in results between groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni posthoc tests. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Genotyping of A/JOlaHsd mice showed lack of the $Dysf^{prmd}$ mutation

We discovered the existence A/J $Dysf^{+/+}$ (A/JOlaHsd) mice accidentally. We initially purchased these animals from Harlan Laboratories as A/J mice bearing the previously described DYSF mutation (26). However, when we performed a Western-blot analysis using a monoclonal antibody specific for dysferlin we found that they displayed normal levels of dysferlin. These results prompted us to genotype this strain. PCR analysis of genomic DNA isolated from A/J $Dysf^{+/+}$ mice and the A/J $Dysf^{prmd}$, using the indicated primer pairs, yielded the following results: the primer pair that flanked the ETn insertion (F and R) yielded a 207 bp PCR product in mice from Harlan Laboratories but not in A/J $Dysf^{prmd}$ from Jackson Laboratories. Conversely, only genomic DNA from the A/J $Dysf^{prmd}$ mice generated 416bp and 237bp products when primers specific for the ETn sequences were used (Fig. 1).

These results confirmed that these two murine models differ in the expression of dysferlin, as the A/J $Dysf^{+/+}$ lacks the insertion of a retrotransposon that disrupts the DYSF gene, resulting in the absence of this protein.

The mutation in the A/J strain must have occurred between the late 1970s and the early 1980s (26). When we checked with Harlan Laboratories about the origin of their mice they confirmed that they obtained their A/J strain in the early 1970s before the mutation was introduced.

Functional improvement was observed in animals treated with $Dysf^{+/+}$ syngeneic BM cells

We performed functional studies before the animals were euthanized for histological and dysferlin expression. The % of animals

represents the proportion of animals that were able to run at 20cm/s. We consider that the increased % of animals in the transplanted groups is a therapeutic improvement by itself (Fig. 2)(45). Gait analysis revealed that the transplant of both $Dysf^{+/+}$ and $Dysf^{-/-}$ cells improved the general locomotor performance of the animals in terms of supporting forced locomotion at 20cm/s. Moreover, detailed gait assessment showed mild abnormalities during locomotion in A/J $Dysf^{prmd}$ mice, manifested by a significant increase in stride duration and step angle during active locomotion with respect to A/J $Dysf^{+/+}$ mice. The increase in both parameters was likely due to involvement of proximal limb muscles. The group of A/J $Dysf^{prmd}$ mice transplanted with $Dysf^{+/+}$ cells showed a reduction in stride duration compared to non-treated A/J $Dysf^{prmd}$, suggesting a mild improvement in gait performance. Both groups of transplanted mice showed an improvement in step angle (Supplemental table and Fig. 2). Our results suggest that BMT had a beneficial effect that was more significant in mice transplanted with $Dysf^{+/+}$ cells.

Analysis of EMG recordings in muscles of the A/J $Dysf^{prmd}$ mice showed motor unit action potentials (MUAPs) of decreased amplitude and increased duration and number of phases, characteristics of myopathic condition (46). In group C, A/J $Dysf^{prmd}$ transplanted with $Dysf^{+/+}$, and in group D, A/J $Dysf^{prmd}$ transplanted with $Dysf^{-/-}$, the mean amplitude of MUAPS remained similar to normal. However, the MUAP duration and phases partially improved, slightly more so in group C (Table and supplemental Fig.).

Reconstitution of dysferlin expression in peripheral blood monocytes does not prevent inflammation in skeletal muscle

After functional tests were performed, mice were euthanized and tissue samples were collected to assess the efficacy of treatment. Western Blot (WB) analysis of spleen cells from A/J $Dysf^{prmd}$ mice treated with $Dysf^{+/+}$ showed expression of dysferlin (Fig. 3) with an average expression of 9.2% of normal values. In contrast, non-treated A/J $Dysf^{prmd}$ and A/J $Dysf^{prmd}$ mice transplanted with $Dysf^{-/-}$ BM cells showed no dysferlin expression. Histological studies showed presence of central nuclei in A/J $Dysf^{prmd}$ (Fig. 4). We observed a statistically significant decrease in the number of central nuclei in all treated mice compared

to non treated A/J $Dysf^{prmd}$ ($p < 0.05$) (Fig. 5). Prominent inflammatory infiltrates were also observed in all treated and not treated A/J $Dysf^{prmd}$ groups (Fig. 6). Some inflammatory cells were positive for dysferlin only in group C (Fig. 6).

The inflammatory infiltrates were characterized as macrophages using the F4/80 marker (Fig. 6). There were no significant differences between the number of F4/80⁺ infiltrates in each group of transplanted mice and the A/J $Dysf^{prmd}$ ($p > 0.05$) (Fig. 7). When we studied the expression of CD206, a marker of an anti-inflammatory subset of macrophages, only some infiltrating cells were positive. We found no statistically significant differences between the groups ($p > 0.05$) (Fig. 7).

BMT does not restore dysferlin expression in skeletal muscle

When we analyzed the skeletal muscle from treated mice by WB we did not find dysferlin expression in any group of A/J $Dysf^{prmd}$ mice either treated or not (Fig. 8A). However, in the immunolocalization studies we observed some isolated fibers showing a patchy expression of dysferlin in mice treated with dysferlin positive cells (Fig. 8B). The Real-Time PCR analysis for $Dysf$ mRNA expression showed increased levels in mice treated with $Dysf^{+/+}$ BMT. This increase in dysferlin mRNA expression was not statistically significant when compared to non-treated A/J $Dysf^{prmd}$ mice ($p > 0.05$) (Fig. 8C)

DISCUSSION

Our studies demonstrate that BMT improved functional and histological parameters in the A/J $Dysf^{prmd}$ mouse model even though the expression of dysferlin was not rescued in muscular tissue. These results suggest that the improvement is due in part to the BMT procedure since animals treated with BMT cells from A/J $Dysf^{prmd}$ mice also displayed some improvement.

We would like to point out that the EMG studies performed in our study to assess muscle function are equivalent to those performed to diagnose patients with a myopathy. In accordance with these results, it has been recently published that there is a lack of correlation between the results obtained *in vitro* using skeletal muscle membrane repair assays and the amelioration of dystrophic changes observed *in vivo* in the same mouse models of dysferlinopathy after different treatments.

The authors concluded that the selection of assays to demonstrate the efficiency of a treatment has to be done carefully (47). We believe that the use of EMG can become a test of choice in some experimental settings.

Although it needs to be further investigated, our results suggest that BMT enhanced skeletal muscle regeneration by a process likely mediated by a biological activity of BM-derived cells as proposed by other authors (29, 48).

In the mdx mouse model for DMD, BM-derived cells can fuse to skeletal muscle but this does not result in a significant increase in dystrophin expression (27, 28). Unfortunately, in these papers the authors did not perform functional studies to analyze if BMT produced any benefit to the animals. The low levels of dystrophin expression observed by these authors might be due to the fact that hematopoietic cells do not express dystrophin. However, it has been shown that at least some BM-derived cells including monocytes/macrophages express dysferlin (15). This led us to hypothesize that BMT could be more effective in restoring dysferlin expression in muscle in a dysferlinopathy mouse model. Although BMT rescued dysferlin expression in spleen cells, it did not restore dysferlin expression in skeletal muscle in our model. Only in animals transplanted with $Dysf^{+/+}$ BM cells we found scattered patches of dysferlin positive sarcolemma that could be explained by fusion of transplanted cells with muscle fibers. Although we observed an increased expression of dysferlin mRNA in the muscle of mice treated with $Dysf^{+/+}$ BM cells, these results could be explained mainly by the presence of BM-derived $Dysf^{+/+}$ macrophages infiltrating the muscle.

The origin of inflammation in dysferlinopathies is still under debate. Two laboratories have generated transgenic mice expressing dysferlin only in skeletal muscle. These mice do not present dystrophic features and interestingly, they do not show inflammation. This suggests that restoring dysferlin expression in skeletal muscle could be sufficient to avoid inflammatory cells infiltrating muscle tissue (49, 50). Accordingly, our results demonstrate that reconstitution of dysferlin expression only in hematopoietic cells is not sufficient to avoid inflammation in dysferlin-deficient skeletal muscle, as we observed inflammatory infiltrates in all treated mice

regardless of the origin of BM cells transplanted.

Nevertheless, we observed evidence of functional and EMG recovery in A/J Dysf^{prmd} treated with dysferlin positive cells compared to non-treated mice. Autologously treated mice also improved but to a lesser extent. Previous reports by other authors could explain, at least in part, these findings (16, 29, 51). Nagaraju *et al.* demonstrated that dysferlin-deficient monocytes have increased phagocytic activity and that this could play a relevant role in the disease (16). Our immunohistochemistry experiments showed dysferlin positive macrophages, i.e. with normal phagocytic activity, in the muscle of mice transplanted with dysferlin +/+ BM. However, muscle infiltrates in mice transplanted autologously, showed dysferlin -/- macrophages, i.e. with increased phagocytic activity. These results could explain the milder improvement observed in this group of mice. As we observed similar numbers of anti-inflammatory macrophages (CD206 positive cells) in all AJ Dysf^{prmd} animal groups, based on these results we can not conclude that the beneficial effect of BMT is due to infiltrating macrophages switching to an anti-inflammatory profile.

Finally, an additional relevant contribution of our study is the description of A/J mice that do not bear the mutation previously described in DYSF (26). Consequently, this local strain can be used as a suitable parental control for the AXB and BXA RI strains (26) and as a control for A/J Dysf^{prmd} mice in future studies, since they share all their genetic background except for the mutation in DYSF.

We conclude that: 1) BMT does not reduce skeletal muscle inflammation; 2) BMT after sublethal irradiation improves MUAPs, locomotion studies and histopathological features in our mouse model for dysferlinopathy; 3) This improvement is better in animals transplanted with Dysf^{+/+} cells, suggesting that the absence of dysferlin in peripheral blood may also contribute to disease progression; and 4) The description of A/J mice with normal dysferlin is a useful control for future studies using A/J dysferlin deficient mice. 5) Autologous BMT in patients with dysferlinopathy may be of some clinical benefit.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from "Fundación Isabel Gemio" and "Ministerio

de Sanidad del Gobierno de España" (FIS 09/1944)" and TERCEL funds (FIS, Spain). We thank Carolyn Newey for editorial support and Dr. Rojas-Garcia for his insightful comments.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

Authors have nothing to disclose.

REFERENCES

1. Liu J, M Aoki, I Illa, C Wu, M Fardeau, C Angelini, C Serrano, JA Urtizberea, F Hentati, MB Hamida, S Bohlega, EJ Culper, AA Amato, K Bossie, J Oeltjen, K Bejaoui, D McKenna-Yasek, BA Hosler, E Schurr, K Arahata, PJ de Jong and RH Brown, Jr. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20:31-36.
2. Bashir R, S Britton, T Strachan, S Keers, E Vafiadaki, M Lako, I Richard, S Marchand, N Bourg, Z Argov, M Sadeh, I Mahjneh, G Marconi, MR Passos-Bueno, S Moreira Ede, M Zatz, JS Beckmann and K Bushby. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20:37-42.
3. Illa I, N De Luna, R Dominguez-Perles, R Rojas-Garcia, C Paradas, J Palmer, C Marquez, P Gallano and E Gallardo. (2007). Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 68:1284-1289.
4. Illa I, C Serrano-Munuera, E Gallardo, A Lasa, R Rojas-Garcia, J Palmer, P Gallano, M Baiget, C Matsuda and RH Brown. (2001). Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 49:130-134.
5. Nguyen K, G Bassez, M Krahn, R Bernard, P Laforet, V Labelle, JA Urtizberea, D Figarella-Branger, N Romero, S Attarian, F Leturcq, J Pouget, N Levy and B Eymard. (2007). Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64:1176-1182.
6. Paradas C, L Gonzalez-Quereda, N De Luna, E Gallardo, I Garcia-Consuegra, H Gomez, A Cabello, I Illa and P Gallano. (2009). A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* 19:21-25.
7. Passos-Bueno MR, R Bashir, ES Moreira, M Vainzof, SK Marie, L Vasquez, P Iughetti, E Bakker, S Keers, A

- Stephenson and et al. (1995). Confirmation of the 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD2B) in three families allows refinement of the candidate region. *Genomics* 27:192-195.
8. Miyoshi K, H Kawai, M Iwasa, K Kusaka and H Nishino. (1986). Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain* 109 (Pt 1):31-54.
 9. Bashir R, S Keers, T Strachan, R Passos-Bueno, M Zatz, J Weissenbach, D Le Paslier, M Meisler and K Bushby. (1996). Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p. *Genomics* 33:46-52.
 10. Paradas C, J Llauger, J Diaz-Manera, R Rojas-Garcia, N De Luna, C Iturriaga, C Marquez, M Uson, K Hankiewicz, E Gallardo and I Illa. (2010). Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology* 75:316-323.
 11. Gallardo E, R Rojas-Garcia, N de Luna, A Pou, RH Brown, Jr. and I Illa. (2001). Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology* 57:2136-2138.
 12. Vandre DD, WEt Ackerman, DA Kniss, AK Tewari, M Mori, T Takizawa and JM Robinson. (2007). Dysferlin is expressed in human placenta but does not associate with caveolin. *Biol Reprod* 77:533-542.
 13. Bansal D and KP Campbell. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends Cell Biol* 14:206-213.
 14. De Luna N, A Freixas, P Gallano, L Caselles, R Rojas-Garcia, C Paradas, G Nogales, R Dominguez-Perles, L Gonzalez-Quereda, JJ Vilchez, C Marquez, J Bautista, A Guerrero, JA Salazar, A Pou, I Illa and E Gallardo. (2007). Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord* 17:69-76.
 15. Ho M, E Gallardo, D McKenna-Yasek, N De Luna, I Illa and RH Brown Jr. (2002). A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 51:129-133.
 16. Nagaraju K, R Rawat, E Veszelovszky, R Thapliyal, A Kesari, S Sparks, N Raben, P Plotz and EP Hoffman. (2008). Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol* 172:774-785.
 17. Bansal D, K Miyake, SS Vogel, S Groh, CC Chen, R Williamson, PL McNeil and KP Campbell. (2003). Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature* 423:168-172.
 18. Diaz-Manera J, T Touvier, A Dellavalle, R Tonlorenzi, FS Tedesco, G Messina, M Meregalli, C Navarro, L Perani, C Bonfanti, I Illa, Y Torrente and G Cossu. (2010). Partial dysferlin reconstitution by adult murine mesoangioblasts is sufficient for full functional recovery in a murine model of dysferlinopathy. *Cell Death Dis* 1:e61.
 19. de Luna N, E Gallardo, M Soriano, R Dominguez-Perles, C de la Torre, R Rojas-Garcia, JM Garcia-Verdugo and I Illa. (2006). Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro". *J Biol Chem* 281:17092-17098.
 20. De la Torre C, I Illa, G Faulkner, L Soria, R Robles-Cedeno, R Dominguez-Perles, N De Luna and E Gallardo. (2009). Proteomics identification of differentially expressed proteins in the muscle of dysferlin myopathy patients. *Proteomics Clin Appl* 3:486-497.
 21. Arahata K and AG Engel. (1984). Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann Neurol* 16:193-208.
 22. Arahata K, T Ishihara, H Fukunaga, S Orimo, JH Lee, K Goto and I Nonaka. (1995). Inflammatory response in facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): immunocytochemical and genetic analyses. *Muscle Nerve* 2:S56-66.
 23. Bittner RE, LV Anderson, E Burkhardt, R Bashir, E Vafiadaki, S Ivanova, T Raffelsberger, I Maerk, H Hoger, M Jung, M Karbasiyan, M Storch, H Lassmann, JA Moss, K Davison, R Harrison, KM Bushby and A Reis. (1999). Dysferlin deletion in SJL mice (SJL-Dysf) defines a natural model for limb girdle muscular dystrophy 2B. *Nat Genet* 23:141-142.
 24. Kong KY, J Ren, M Kraus, SP Finklestein and RH Brown, Jr. (2004). Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice. *Stem Cells* 22:981-993.

25. Vieira NM, CR Bueno, Jr., V Brandalise, LV Moraes, E Zucconi, M Secco, MF Suzuki, MM Camargo, P Bartolini, PC Brum, M Vainzof and M Zatz. (2008). SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells* 26:2391-2398.
26. Ho M, CM Post, LR Donahue, HG Lidov, RT Bronson, H Goolsby, SC Watkins, GA Cox and RH Brown, Jr. (2004). Disruption of muscle membrane and phenotype divergence in two novel mouse models of dysferlin deficiency. *Hum Mol Genet* 13:1999-2010.
27. Gussoni E, Y Soneoka, CD Strickland, EA Buzney, MK Khan, AF Flint, LM Kunkel and RC Mulligan. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401:390-394.
28. Chretien F, PA Dreyfus, C Christov, P Caramelle, JL Lagrange, B Chazaud and RK Gherardi. (2005). In vivo fusion of circulating fluorescent cells with dystrophin-deficient myofibers results in extensive sarcoplasmic fluorescence expression but limited dystrophin sarcolemmal expression. *Am J Pathol* 166:1741-1748.
29. Salah-Mohellibi N, G Millet, I Andre-Schmutz, B Desforges, R Olaso, N Roblot, S Courageot, G Bensimon, M Cavazzana-Calvo and J Melki. (2006). Bone marrow transplantation attenuates the myopathic phenotype of a muscular mouse model of spinal muscular atrophy. *Stem Cells* 24:2723-2732.
30. Ferrari G, G Cusella-De Angelis, M Coletta, E Paolucci, A Stornaiuolo, G Cossu and F Mavilio. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530.
31. Terada N, T Hamazaki, M Oka, M Hoki, DM Mastalerz, Y Nakano, EM Meyer, L Morel, BE Petersen and EW Scott. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545.
32. Ferrari G and F Mavilio. (2002). Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 12 Suppl 1:S7-10.
33. Willenbring H, AS Bailey, M Foster, Y Akkari, C Dorrell, S Olson, M Finegold, WH Fleming and M Grompe. (2004). Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 10:744-748.
34. Puig T, E Kadar, A Limon, JA Cancelas, H Eixarch, L Luquin, M Garcia and J Barquinero. (2002). Myeloablation enhances engraftment of transduced murine hematopoietic cells, but does not influence long-term expression of the transgene. *Gene Ther* 9:1472-1479.
35. Matsuda R, M Yoshikawa, H Kimura, Y Ouji, H Nakase, F Nishimura, J Nonaka, H Toriumi, S Yamada, M Nishiofuku, K Moriya, S Ishizaka, M Nakamura and T Sakaki. (2009). Cotransplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development. *Cell Transplant* 18:39-54.
36. Navarro X and E Udina. (2009). Chapter 6: Methods and protocols in peripheral nerve regeneration experimental research: part III-electrophysiological evaluation. *Int Rev Neurobiol* 87:105-126.
37. Mancuso R, E Santos-Nogueira, R Osta and X Navarro. (2011). Electrophysiological analysis of a murine model of motoneuron disease. *Clin Neurophysiol* 122:1660-1670.
38. Mancuso R, S Olivan, R Osta and X Navarro. (2011). Evolution of gait abnormalities in SOD1(G93A) transgenic mice. *Brain Res* 1406:65-73.
39. Gordon T, CK Thomas, JB Munson and RB Stein. (2004). The resilience of the size principle in the organization of motor unit properties in normal and reinnervated adult skeletal muscles. *Can J Physiol Pharmacol* 82:645-661.
40. Hampton TG, MR Stasko, A Kale, I Amende and AC Costa. (2004). Gait dynamics in trisomic mice: quantitative neurological traits of Down syndrome. *Physiol Behav* 82:381-389.
41. Amende I, A Kale, S McCue, S Glazier, JP Morgan and TG Hampton. (2005). Gait dynamics in mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *J Neuroeng Rehabil* 2:20.
42. Nicholson LV, K Davison, G Falkous, C Harwood, E O'Donnell, CR Slater and JB Harris. (1989). Dystrophin in skeletal muscle. I. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 94:125-136.
43. Villalta SA, HX Nguyen, B Deng, T Gotoh and JG Tidball. (2009). Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in

- muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 18:482-496.
44. Leite PE, J Lagrota-Candido, L Moraes, L D'Elia, DF Pinheiro, RF da Silva, EN Yamasaki and T Quirico-Santos. (2010). Nicotinic acetylcholine receptor activation reduces skeletal muscle inflammation of mdx mice. *J Neuroimmunol* 227:44-51.
45. Mancuso R, S Olivan, A Rando, C Casas, R Osta and X Navarro. (2012). Sigma-1R agonist improves motor function and motoneuron survival in ALS mice. *Neurotherapeutics* 9:814-826.
46. Han JJ, GT Carter, JJ Ra, RT Abresch, JS Chamberlain and LR Robinson. (2006). Electromyographic studies in mdx and wild-type C57 mice. *Muscle Nerve* 33:208-214.
47. Lostal W, M Bartoli, C Roudaut, N Bourg, M Krahn, M Pryadkina, P Borel, L Suel, JA Roche, D Stockholm, RJ Bloch, N Levy, R Bashir and I Richard. (2012). Lack of Correlation between Outcomes of Membrane Repair Assay and Correction of Dystrophic Changes in Experimental Therapeutic Strategy in Dysferlinopathy. *PLoS One* 7:e38036.
48. Pastor D, M Viso-Leon, A Botella-Lopez, J Jaramillo-Merchan, JM Moraleda, J Jones and S Martinez. Bone marrow transplantation in hindlimb muscles of motoneuron degenerative mice reduces neuronal death and improves motor function. *Stem Cells Dev.*
49. Millay DP, M Maillet, JA Roche, MA Sargent, EM McNally, RJ Bloch and JD Molkentin. (2009). Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. *Am J Pathol* 175:1817-1823.
50. Han R, EM Frett, JR Levy, EP Rader, JD Lueck, D Bansal, SA Moore, R Ng, D Beltran-Valero de Bernabe, JA Faulkner and KP Campbell. (2010). Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *J Clin Invest* 120:4366-4374.
51. Arnold L, A Henry, F Poron, Y Baba-Amer, N van Rooijen, A Plonquet, RK Gherardi and B Chazaud. (2007). Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* 204:1057-1069.

Figures and Legends

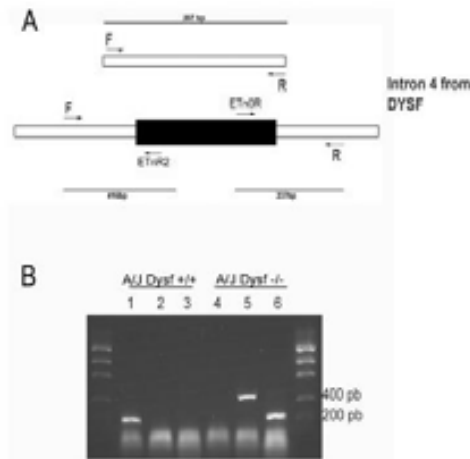


Figure 1. Identification of the dysferlin mutation in the A/J mice.

A) Scheme of the genetic region affected by the retrotransposon insertion (in black) in the A/J $Dysf^{prmd}$ mouse model, and the binding sites for the primers used.

B) Agarose gel showing the genotyping for A/J $Dysf^{+/+}$ (lanes 1-3) and A/J $Dysf^{prmd}$ (lanes 4-6). In lanes 1 and 4 genomic DNA was amplified using the F and R primer pairs. In lanes 2 and 5 genomic DNA was amplified using the F and EtnR2 primer pairs. In lanes 3 and 6 genomic DNA was amplified using the R and EtnOR primer pair.

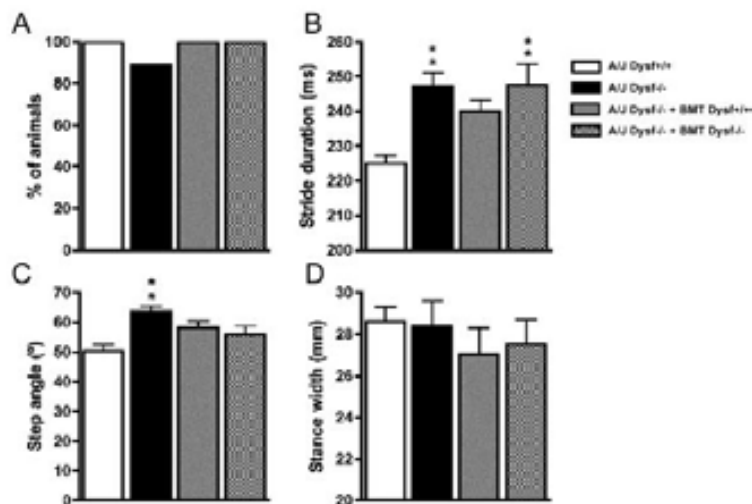


Figure 2. Results of locomotion analysis (Digigait). Abnormalities manifested by reduction of general locomotion (A), increase in stride phase duration (B) and in step angle (C) in A/J $Dysf^{prmd}$ mice compared to controls (** $p < 0.01$ vs $Dysf^{+/+}$ control group). No differences could be observed in the stance width parameter (D). A/J $Dysf^{+/+}$ mice as control group for normal dysferlin expression, A/J $Dysf^{-/-}$, as control group for dysferlin deficiency (A/J $Dysf^{prmd}$), A/J $Dysf^{-/-}$ + BMT $Dysf^{+/+}$ as A/J $Dysf^{prmd}$ transplanted with $Dysf^{+/+}$ BM cells and A/J $Dysf^{-/-}$ + BMT $Dysf^{-/-}$ as A/J $Dysf^{prmd}$ transplanted with $Dysf^{-/-}$ BM cells.

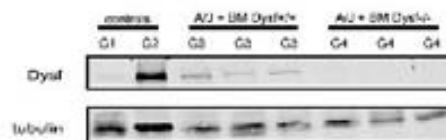


Figure 3. WB analysis of dysferlin expression in spleen cells. G1: A/J $Dysf^{prmd}$; G2: A/J $Dysf^{+/+}$; G3: A/J $Dysf^{prmd}$ transplanted with $Dysf^{+/+}$ BM cells; G4: A/J $Dysf^{prmd}$ transplanted with $Dysf^{-/-}$ BM cells.

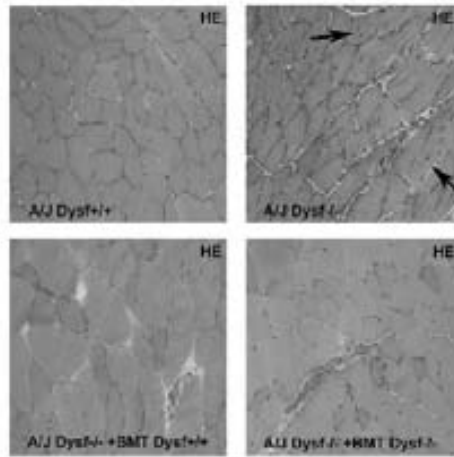


Figure 4. Histological analysis of skeletal muscle from 6 months old mice of all groups. HE (Hematoxylin&Eosin staining) of skeletal muscle from each group (200x). Arrows show central nuclei.

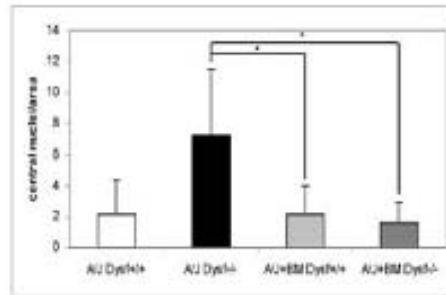


Figure 5. Central nuclei quantification. Bar graph showing the number of central nuclei/area in all animal groups (*p<0.05). The number of central nuclei is reduced in all treated animals.

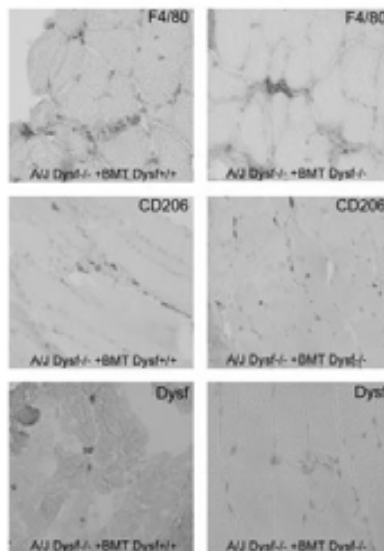


Figure 6. Characterization of infiltrating cells in skeletal muscle. A) Immunohistochemistry of F4/80, a general monocyte/macrophage marker (400x) and CD206 immunostaining, an anti-inflammatory monocyte/macrophage marker (400x). Dysferlin immunostaining in transplanted mice showing positive inflammatory cells (400x) only in those animals transplanted with dysferlin +/+ cells.

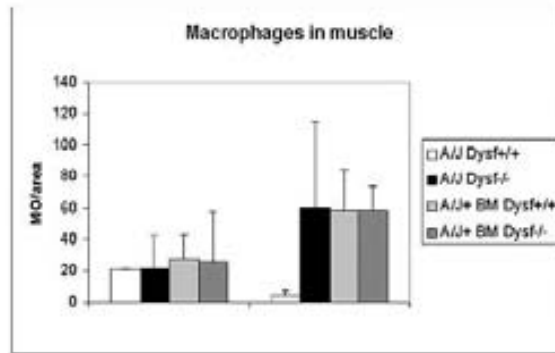


Figure 7. Macrophages quantification. Bar graph showing F4/80 and CD206 positive cell counting in the muscle tissue inflammatory infiltrates from skeletal muscle of all the experimental groups.

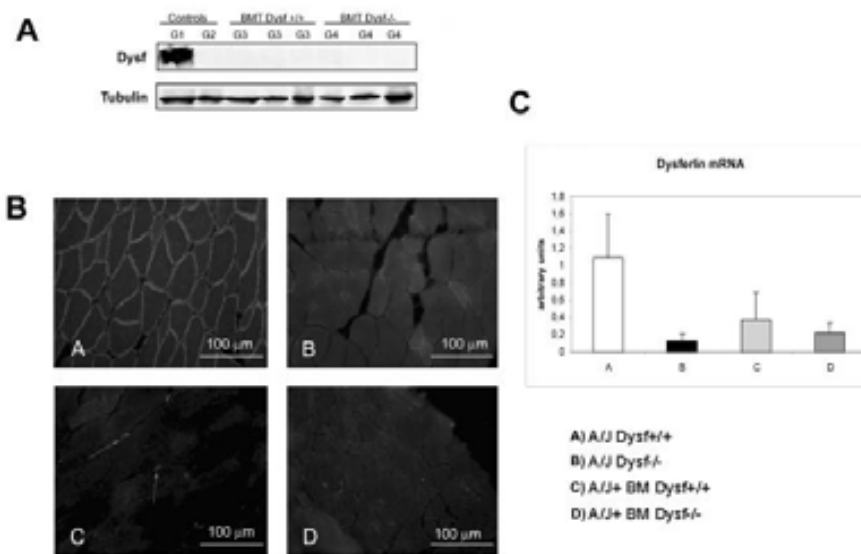


Figure 8. Dysferlin expression in skeletal muscle. **A) WB.** G1: A/J Dysf^{+/+}; G2: A/J Dysf^{prmd}; G3: A/J Dysf^{prmd} transplanted with Dysf^{+/+} BM cells and G4: A/J Dysf^{prmd} transplanted with Dysf^{-/-} BM cells **B) Immunohistochemistry** for dysferlin in the tibialis anterior from animals of A) A/J Dysf^{+/+} B) A/J Dysf^{prmd} C) A/J Dysf^{prmd} transplanted with Dysf^{+/+} BM cells and D) A/J Dysf^{prmd} transplanted with Dysf^{-/-} BM cells (200x). Arrows show dysferlin positive patches only in animals transplanted Dysf^{+/+} BM cells. **C) Real-Time PCR** gene expression analysis of A) A/J Dysf^{+/+} B) A/J Dysf^{prmd} C) A/J Dysf^{prmd} transplanted with Dysf^{+/+} BM cells and D) A/J Dysf^{prmd} transplanted with Dysf^{-/-} BM cells.

Unravelling the interactions between proteins constituting the dysferlin complex

Bàrbara Flix¹, Carolina de la Torre², Juan Castillo¹, Carme Casal³, Isabel Illa¹, Eduard Gallardo¹

¹Servei de Neurologia, Laboratori de Neurologia Experimental, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, C/ S.A.M. Claret 167, 08025, Barcelona, Spain, Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED).

²Plataforma de serveis científic-tècnics de l'Hospital de Vall d'Hebron, Servei de proteòmica, Passeig de la Vall d'Hebron, 119, 08035, Barcelona, Spain.

³Plataforma de serveis científic-tècnics del HSCSP, Servei de microscopia, C/ S.A.M. Claret 167, 08025, Barcelona, Spain.

Abstract

Dysferlinopathies are a group of progressive muscular dystrophies characterized by mutations in the gene *DYSF*. These mutations cause scarcity or complete absence of the protein dysferlin which is mainly expressed in skeletal muscle and has a role in membrane repair. Our objective was to unravel the proteins that constitute the dysferlin complex and their interaction within the complex using immunoprecipitation assays (IP), Blue Native gel electrophoresis (BN) in healthy adult skeletal muscle and healthy cultured myotubes, and fluorescence lifetime imaging-fluorescence resonance energy transfer (FLIM-FRET) analysis in healthy myotubes. The combination of IP/BN allowed us to identify previously reported partners of dysferlin -- such as caveolin-3, AHNAK, annexins, or Trim72/MG53 -- and new interacting partners. FLIM-FRET showed a direct interaction of dysferlin with Trim72/MG53, AHNAK, cytoplasmic dynein, myomesin-2 and calsequestrin-1, but not with caveolin-3 and dystrophin. In conclusion, although IP and BN are useful tools to identify proteins within a complex, other techniques such as FLIM-FRET analysis are needed to determine direct and indirect interactions within the complex. This knowledge may help us to better understand the roles of dysferlin in muscle tissue and identify new genes involved in other muscular dystrophies in which the responsible gene is unknown.

Keywords: dysferlin, FLIM-FRET analysis, protein-protein interaction, Blue Native, cytoplasmic dynein, Trim72/MG53.

1. Introduction

Dysferlinopathies, also called dysferlin myopathies, are a heterogeneous group of progressive muscular dystrophies characterized by mutations in the *DYSF* gene [1, 2]. These mutations produce reduced or null expression of the dysferlin protein and can cause different phenotypes [3-7], such as limb girdle muscular dystrophy type 2B (LGMD2B) [8] or Miyoshi myopathy (MM) [9]. Dysferlin myopathies present with muscular weakness, high levels of creatinin kinase in serum, and a muscle biopsy with dystrophic features and presence of inflammatory infiltrates. However, there is no correlation between

the kind of mutation and a particular phenotype [10]. Moreover, a similar MRI pattern has been shown for all phenotypes [11].

Dysferlin is a type II protein with a short extracellular tail. It is expressed in different tissues such as monocytes, heart, placenta, liver, lungs, pancreas and kidney [2], but most studies are focused in skeletal muscle, where it has been shown that dysferlin has an important role in sarcolemma repair [12]. Within skeletal muscle, dysferlin is expressed in the sarcolemma, in intracellular vesicles and in t-tubules [13].

The analysis of proteins interacting with dysferlin has been addressed in several studies. Most such studies are based on co-immunoprecipitation assays (IP). Co-IP assays have led to discover several dysferlin partners such as AHNAK [14], Trim72/MG53 [15], Caveolin-3 (Cav-3) [16] or Vinculin [17]. These techniques are used to determine which proteins belong to a certain complex but they do not add information on direct or indirect interactions, as two proteins that co-IP do not necessarily interact directly.

AHNAK, an enlargeosome marker, colocalizes with dysferlin at the plasma membrane and in the absence of dysferlin, levels of AHNAK are decreased at the sarcolemma. AHNAK participates in membrane repair, vesicle trafficking, and excitation-contraction coupling in skeletal muscle and other tissues [18-20]. The interaction is calcium-independent and mediated by calpain 3 proteolysis [21].

Another known partner for dysferlin is Trim72/MG53, a protein that has an important role in rapid repair of wounded membrane in a Ca²⁺ independent manner [22]. It has been reported that Trim72/Mg53 trafficking to the membrane injury site requires polymerase I and transcript release factor (PTRF) [23]. PTRF is a protein related to caveolae that is also present in the dysferlin complex [24]. Cav-3 is also present in caveolae [16] and its absence causes LGMD1C [25]. This dominant muscular dystrophy presents reduced levels of Cav-3 in the muscle biopsy, and in some cases, it also shows a secondary reduction of dysferlin [16], possibly because mutations in CAV3 gene increase dysferlin endocytosis [26]. It has been shown that Cav-3 co-IP not only with dysferlin but also with Trim72/MG53 and that this complex has an important role for membrane repair [15]. Dysferlin and Cav-3 are also present in the t-tubules, where they colocalize with the dihydropyridine receptor (DHPR) [27]. In addition, dysferlin and cav-3 participate in myoblast fusion to form myotubes [28-30], a process that requires integrins. Along the same lines, it has been shown that dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) and vinculin. These two proteins link dysferlin to integrins and support the role of dysferlin in sarcolemma integrity [17, 31].

In a very recent work, it was shown that dysferlin interacts with tubulin [32] and histone deacetylase 6 (HDAC6) [33]. The authors related this interaction to muscle

differentiation as they observed that dysferlin promoted alpha-tubulin acetylation, preventing HDAC6 activity by binding both proteins. It has previously been reported that a high acetylation state of alpha-tubulin is required for microtubule elongation and stabilization, necessary for myogenesis and myotube elongation [33].

Fluorescence Lifetime Imaging-fluorescence resonance energy transfer (FLIM-FRET) analysis is the most robust way to demonstrate direct interactions between two different proteins [34-37]. Until now, only a direct interaction between dysferlin and annexins A1 and A2 has been demonstrated using FLIM-FRET analysis [37]. The authors showed that Annexin A1 and A2 interact directly with dysferlin in human myotubes in the presence of calcium, and that the interaction of annexin A1 and dysferlin is disrupted after sarcolemmal injury.

Although many members of the dysferlin complex are known, roles of this protein other than membrane repair are still controversial. To really understand the different mechanisms where dysferlin is implicated in muscle physiology it is necessary to clarify the other proteins working with it. Moreover, dysferlin partners are putative genes causing non-filiated dystrophies and could help to understand the phenotypic variability in dysferlinopathies.

The aims of our study were, first, to find new members of the dysferlin interactome by combining three techniques: IP, blue native electrophoresis (BN), and FRET-FLIM analysis; and second, to distinguish whether proteins in the dysferlin complex interact directly or indirectly.

2. Materials and methods

2.1 Primary muscle cultures

Human muscle biopsies were minced and cultured in monolayer following the method described by Dr. Askanas [38] with some modifications [29]. The culture media for myoblast proliferation contains 75% DMEM and 25% M199, complemented with 10% FBS, 10ug/ml insulin, 2mM glutamine and penicillin-streptomycin-fungizone, 10ng/ml epidermal growth factor and 25ng/ml fibroblast growth factor. Cells were grown to 80% confluence. The culture media was then substituted for one without growth factors and with only 2% of FBS.

To injured cells, myotubes were treated with 0.25mM SDS during 2 minutes at 37°C

and fixed with cold methanol for 10 minutes.

2.2 Muscle biopsies

Blue native experiments were performed using a muscle biopsy from the semitendinous muscle of a healthy patient. The immunoprecipitation assays were performed using muscle biopsies from a vastus externus and a fascia lata from healthy patients. All patients signed an informed consent and the project was approved by the Ethics Committee at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (code 12/2009).

2.3 Immunoprecipitation assays

Protein extracts from myotubes and adult skeletal muscle were obtained by sonication in a lysis buffer containing 50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X100 and 1x protease inhibitor cocktail (GE Healthcare Lifesciences, Freiburg, Germany) on ice. The lysates were spun down at maximum speed, at 4°C for 30 min. Protein A sepharose CL-4B (GE Healthcare Lifesciences) was prepared following the manufacturer's instructions and used to pre-clear the homogenates for at least 1h, at 4°C while tumbling. After removing the Protein A sepharose, samples were incubated with 20 µg of antibody at 4°C overnight in a head-over-head shaker. Dysferlin immunoprecipitation (IP) was performed using F4 antibody, a monoclonal llama-derived antibody (kindly provided by Dr. Van der Mareel) or commercial antibodies against different dysferlin partners (mouse anti-cytoplasmic dynein (Sigma, Saint Louis, MO) or mouse anti-Trim72/MG53 (AbCam, Cambridge, UK). As a control for non-specific unions, a control isotype antibody was used. The immunocomplexes were precipitated by adding protein A sepharose incubated for at least 2h at 4°C while tumbling. The immunoprecipitated complexes were eluted by boiling in sample buffer 2x, and analysed in a SDS-PAGE at 10% acrylamide treated with silver staining. The bands obtained were sequenced by MS/MS. Each experiment was performed at least twice. Some of these results were confirmed by western blot, transferring the proteins to a nitrocellulose membrane (Whatman, Dassel, Germany) that was blocked using the Odyssey blocking reagent (Li-COR, Lincoln, Nebraska, USA). For the immunodetection of dysferlin, the Hamlet I monoclonal antibody (Novocastra,

Newcastle Upon Tyne, UK) was used, and was revealed using a goat-anti-mouse IR_Dye 800 (Li-COR). The membrane was visualized using the Odyssey infrared scanner (Li-COR).

2.4 Blue Native (BN)

BN experiments were performed with muscle biopsies and cultured myotubes. Samples were prepared with NativePAGE™ Sample buffer (Invitrogen, Carlsbad CA) adding 2% digitonin, obtaining a lysate with a protein:detergent ratio of 1:2. Samples were incubated in ice for 15 minutes and centrifuge at 20.000 x g for 30 minutes at 4°C. Just prior to loading samples onto NativePAGE™ Novex Bis-Tris Gels (Invitrogen), a 5% NativePAGE™ G-250 Sample Additive (Invitrogen) were added to the samples. 4-10mg of protein extracts were run in gradient 4-12% acrylamide precast gels (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. For our BN-PAGE experiments, the concentration of blue dye was 0.02% (w/v). Electrophoresis was performed at 150 volts for one hour and a half followed by another two hours approximately, at 250V. After electrophoresis, the gel was stained using the Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) following manufacturer instructions.

Some lanes of each gel were stored at -80°C and others were transferred to a PVDF membrane to perform a western blot. Non-specific binding sites were blocked with 5% skimmed milk in phosphate saline buffer (PBS). For the immunodetection, we used the monoclonal antibody Hamlet (Novocastra) for dysferlin and a rabbit monoclonal antibody to detect Trim72/MG53 (AbCam, Cambridge, UK). After washing the non-bound primary antibody, membranes were incubated with a secondary antibody goat anti-mouse or goat-anti-rabbit, conjugated with horseradish peroxidase and developed using supersignal (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

After the western blot was probed with an anti-dysferlin, the lanes stored at -80°C were stained with colloidal blue (Invitrogen) and the positive bands for dysferlin were cut for peptide sequencing with MS/MS. This experiment was performed twice.

2.5 In-gel digestion and MS analysis

The protein bands of interest were excised and trypsinized following the protocol previously described,[39] leaving out reduction and alkylation. Extracted peptides

were analyzed on a LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) fitted with a nanospray source (Proxeon, Thermo Fisher Scientific) previous nanoLC separation in a Agilent 1200 nano flow system (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Peptides were separated in a reverse phase column, 100 μ m x 150mm (Nikkyo Technos Co., Ltd., Tokyo, Japan) with a gradient of 2.4 to 36% ACN with 0.1% FA in 24 min at a flow of 0.5 μ L/min. The LTQ-Orbitrap XL was operated in positive ion mode with nanospray voltage set at 2.2 kV and source temperature at 275°C. The instrument was externally calibrated using Ultramark 1621 for the FT mass analyzer. An internal calibration was performed using the background polysiloxane ion signal at m/z 445.120025 as the calibrant. The instrument was operated in data dependent analysis mode (DDA). In all experiments full MS scans were acquired over a mass range of m/z 350-2000 with detection in the Orbitrap mass analyzer at a resolution setting of 60,000. Fragment ion spectra produced via collision induced dissociation (CID) were acquired in the LTQ mass analyzer. In each cycle of DDA analysis, following each survey, the top five most intense ions were scanned above a threshold ion count of 5000 and were selected for fragmentation at normalized collision energy of 35%. All data were acquired with Xcalibur 2.1 software. Protein identification was performed using MASCOT (Matrix Science, London, UK) as search engine.

Data were processed and searched against swissprot human database. Oxidation of methionine was set as variable modifications. Peptide tolerance was 7ppm in MS and 0.5Da in MS/MS mode, maximum number of missed cleavages was set at 2.

2.6 Immunocytochemistry

Immunocytochemistry for the FLIM/FRET analyses was performed in control myotubes cultured in LabTek chamber slides (Nunc Nalge, Roskilde, Denmark) in the culture conditions indicated in the primary cultures section. Immunocytochemistry for protein localization studies was performed in myotubes from control, patients with dysferlin myopathy and a patient with Duchenne muscular dystrophy.

Cells were fixed in cold methanol for 10 minutes at 4°C and blocked with Tris buffer saline supplemented with 1% BSA, 1%

normal human serum, 0.5% donkey serum and 0.01% Triton X100.

Primary antibodies (Table 1) were incubated for 2h at room temperature and labeled with Alexa Fluor 488 or 555 donkey secondary antibodies (Invitrogen).

2.7 Immunohistochemistry on human muscle frozen sections

Tissue sections were fixed in acetone for 5 minutes at 4°C and blocked with Tris buffer saline supplemented with 1% BSA, 1% normal human serum, 0.5% donkey serum and 0.01% Triton X100.

Primary antibodies (Table 1) were incubated for 2h at room temperature and labeled with Alexa Fluor 488 or 594 donkey secondary antibodies (Invitrogen).

All pictures were acquired with a Laser Scanning Confocal Inverted Microscope Leica TCS SP5-AOBS.

2.8 Confocal microscopy

All pictures were acquired with a Laser Scanning Confocal Inverted Microscope Leica TCS SP5-AOBS, equipped with PicoQuant LSM Upgrade Kit for FLIM and FCS which was used to perform FLIM-FRET experiments.

2.9 Quantitative FRET efficiency through fluorescence lifetime analysis (FLIM)

FLIM-FRET is used to image direct protein-protein interactions in cells. The technique is based on the observation of fluorescence lifetime (the time of fluorophore emission after brief excitation, measured in picoseconds) of a donor fluorophore in the presence of an acceptor fluorophore. While transferring energy from an excited donor to an acceptor, FRET decreases the donor fluorescence lifetime and increases the acceptor fluorescence lifetime. Because the energy transfer is highly distance dependent, detection of FRET requires that the two fluorophores must be within 1-10 nm, the distance typically found for directly interacting proteins [40]. In this study we used Alexa Fluor 488 as a donor and Alexa Fluor 555 as an acceptor and we measured changes in the fluorescence lifetime of the donor.

The sample was excited using 470 nm pulsed laser with 40 MHz repetition rate and was detected using a time-correlated single photon counting detector. A fluorescence filter (500-550 nm) limited the detection of the donor fluorescence only (Alexa Fluor 488). SymPhoTime software was used to measure fluorescence lifetimes

on a pixel-by-pixel basis with high spatial resolution. Donor fluorophore lifetimes were fit to two exponential decay curves to calculate the fraction of fluorophores within each pixel that either interact or do not interact with an acceptor. These lifetimes were then mapped by pseudocolor on a pixel-by-pixel basis over the entire image. All pictures were acquired with a Laser Scanning Confocal Inverted Microscope Leica TCS SP5-AOBS, equipped with PicoQuant LSM Upgrade Kit for FLIM and FCS which was used to perform FLIM-FRET experiments.

2.9.1 FLIM assay set up

The following controls were used to establish and validate the FLIM assay: A) As a negative control, Alexa Fluor 488 lifetime (dysferlin) was measured in the absence of the acceptor; B) As a positive control, cells were immunostained for dysferlin that was visualized with two different secondary antibodies, a donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 and a donkey anti-mouse Alexa Fluor 555; C) In cells in which FLIM-FRET analysis was positive, we selected an area within the cell in which Alexa Fluor 555 acceptor was photobleached. The resulting FLIM image showed an increase in Alexa fluor 488 fluorescence lifetime within this area, that was identical to Alexa Fluor 488 lifetime in the absence of an acceptor; D) The same cells were immunostained with an antibody predicted to colocalize but not interact with Dysferlin. Double immunostaining shows that Dysferlin (Alexa Fluor 488) colocalizes with Dystrophin (Alexa Fluor 555) at the sarcolemma. However, despite colocalization, Alexa Fluor 488 lifetime was the same as in the negative control A), suggesting that Dystrophin does not interact with Dysferlin. All experiments were performed at least in 3 independent assays and on 30 different cells.

2.10 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

We performed a bioinformatic analysis using IPA software (www.ingenuity.com) to check for potential functional interactions between the proteins identified by the combination of IP, BN and/or FLIM/FRET. Data imported to the software are shown in table 2. The analysis was carried out using manufacturer's recommendations. The IPA software produces network diagrams with both the proteins in the data set and proteins which could be part of the network as determined by the analysis. IPA also

calculates a ratio that indicates the strength of association with a canonical pathway.

3. Results

3.1 Dysferlin Complex analysis

BN analysis of human skeletal muscle from muscle biopsies combined with WB, revealed 2 bands that were positive with antibodies anti-dysferlin (Fig. 1). We used the same extract to perform a WB using an anti-trim72/MG53 antibody (Fig. 1). We detected a single band corresponding to the heaviest band observed on the WB probed with an anti-dysferlin antibody that was selected for mass spectrometry studies. In parallel, we performed IP assays using adult skeletal muscle and human myotubes extracts to assess these results (Fig. 2), as other proteins or protein complexes could be present at the same molecular weight as our complex of interest.

Each BN and IP experiment was performed at least twice. To obtain a reliable list of proteins corresponding to the dysferlin complex we matched the mass spectrometry results from the heaviest band on BN experiments with IP experiments both in adult skeletal muscle tissue and myotubes. To the final list of proteins we included only those detected in more than one experiment. All proteins listed had a mascot score > 30. Finally we compared our list with published data (Table 2).

Some proteins detected by both IP and BN were selected for FLIM-FRET analysis to confirm the type of interaction between them and dysferlin.

As expected, the positive control for FLIM-FRET analysis of dysferlin using two different secondary antibodies showed a decrease in Alexa fluor 488 fluorescence lifetime in presence of Alexa Fluor 555 (9.32%, maximum decay from 2.3ns to 1.4ns, Fig. 3B).

3.2 Trim72/MG53 and AHNAK are directly interacting with dysferlin

Trim72/MG53 was found in the dysferlin complex by BN and was co-IP with dysferlin in adult skeletal muscle extract (Fig. 2 band E). This co-IP was also observed when we immunoprecipitate for Trim72/MG53 protein as we could observe dysferlin by WB (Fig. 4A). AHNAK was also found within the dysferlin complex by BN using adult skeletal muscle extracts.

To assess whether their interaction was direct or indirect we performed FLIM-FRET analysis. We observed a lifetime average decay of 2.86% ($p=0.005$) for the dysferlin-

Trim72/MG53 protein pair. The donor fluorophore (Alexa Fluor 488, dysferlin) had a fluorescence lifetime average of ~3.2 ns in the absence of a FRET acceptor. In cell areas where the acceptor (Alexa Fluor 555, Trim72/MG53) was close to the donor (blue pixels in the pseudo-colored image, Fig. 3), the lifetime was shortened to ~2.5 ns (Fig. 3E) indicating interaction between both proteins on those sites. When we studied this interaction in injured cells, we could not observe differences as the lifetime average decay was 2.66% ($p=0.02$) (Fig. 3F)

When we studied dysferlin-AHNAK interaction by FLIM-FRET analysis, the lifetime average decay was of 4.01% ($p=0.001$), showing direct interaction between those two proteins (Fig. 3H). The maximum lifetime decay was from 2.4ns to 1.3ns.

These findings were further confirmed by using a positive control for FLIM-FRET analysis, that was dysferlin-annexin-A1 protein pair, an already known interaction [37], obtaining a lifetime average decay of approx 8.95% ($p=0.00001$) (Fig. 3K). As a negative control, we performed FLIM-FRET analysis of the dysferlin-dystrophin pair, that showed no interaction, as expected from the bibliography [41] as the lifetime average decay was about 0.46% ($p=0.19$) (Fig. 3I) and no blue pixels in the pseudo-colored image were observed.

3.3 Caveolin-3 does not interact directly with dysferlin

It has been reported that dysferlin and caveolin-3 co-IP [16]. In our experiments, Cav-3 was found in the dysferlin complex by BN. We performed FLIM-FRET experiments with a monoclonal antibody against caveolin-3 which binds the N-terminus of the protein, and with two different antibodies for dysferlin, an antibody which stains N-terminus, and another one that stains the C-terminus of the protein. All these experiments showed no lifetime decay (Fig. 3L), indicating that this interaction is not direct.

As it has been reported that caveolin-3 form a complex with dysferlin and Trim72/MG53, we decided to study caveolin-3 interaction with Trim72/MG53 by FLIM-FRET analysis, observing a direct interaction between those two proteins as they showed a lifetime average decay about 2.56% ($p=0.0003$) (Data not shown).

3.4 Myomesin-2, calsequestrin-1 and cytoplasmic dynein display a direct interaction with dysferlin

Calsequestrin-1 and myomesin-2 were found by BN and IP in adult skeletal muscle. We also found different subunits of the cytoplasmic dynein in the dysferlin complex by BN in adult skeletal muscle. Cytoplasmic dynein was also found by IP of dysferlin both in adult skeletal muscle and myotubes.

As a first approach to study if dysferlin-dynein interaction was direct, we performed a co-IP assay using an anti-dynein antibody and adult skeletal muscle extracts from a healthy control, a patient with dysferlin-deficiency and a patient with caveolin-3 deficiency. Dysferlin co-IP with dynein both in healthy control and caveolin-3-/- muscle extracts but not in dysferlin deficient muscle (Fig. 4), indicating that the absence of caveolin-3 does not interfere with dynein-dysferlin interaction.

To further analyze the interaction of these proteins with dysferlin we performed FLIM-FRET analysis. The lifetime average decay for the dysferlin-calsequestrin-1 protein pair was of 3.58% ($p=0.007$), showing direct interaction between those two proteins (Fig. 3C). The maximum lifetime decay was from 2.3 ns to 1.4 ns.

The lifetime average decay for dysferlin-myomesin-2 protein pair was of 3.68% ($p=0.0008$), showing direct interaction between those two proteins (Fig. 3N). The maximum lifetime decay was from 2.3 ns to 1.4 ns.

The FLIM-FRET analysis of the dysferlin-dynein interaction was performed using an antibody against the cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2 (DYNC1LI2), that was the subunit more frequently detected in our IP and BN experiments. The lifetime average decay for this protein pair was 2.76% ($p=0.01$). The maximum lifetime decay was from 2.1 to 1.3ns that was recovered in a given region of interest after photobleaching (Fig. 3O) confirming the interaction.

3.5 Immunolocalization studies on muscle biopsies and human myotubes

We studied the expression pattern of all the proteins analysed using FLIM-FRET analysis in muscle biopsies and human myotubes from controls, patients with dysferlinopathy and patients with other muscular dystrophies. Staining with Trim72/MG53 in muscle biopsies showed accumulation of the protein in patches at

the sarcolemma that were more abundant in patients with dysferlinopathy than in those with fascio-scapulo-humeral dystrophy (FSHD). Furthermore, staining of the sarcoplasm was weaker in patients with dysferlinopathy (Fig. 5H). Similar results were observed in a previous study [42]. In myotubes from patients with dysferlinopathy we observed aggregates of Trim72/MG53 in the sarcoplasm (fig 6H). Immunohistochemistry for dynein also show a different pattern in the muscle biopsies of patients with dysferlinopathy in which an accumulation of the protein at the subsarcolemma was observed while staining of the sarcoplasm was reduced (Fig 5E). Dynein accumulated around the nuclei in myotubes from patients with dysferlinopathy (fig 6E) and showed a diffuse staining of the sarcoplasm in controls (fig 6D) and Duchenne muscular dystrophy (DMD) (fig 6F).

Calsequestrin-1 expression in human biopsies was similar in control, dysferlin-deficient and FSHD patients (data not shown). However, the expression of calsequestrin-1 was reduced in human myotubes from dysferlin-deficient and DMD patients (fig 6K and 6L).

Expression of AHNAK, Caveolin-3 and myomesin-2 was similar in all the samples studied, except for annexin A1 where we observed cytoplasmic aggregates (fig suppl 1).

3.6 IPA analysis

Proteins listed in table 2 were also analyzed using the IPA software. We obtained two main networks in which the majority of proteins identified could be mapped. On one side an Immunological Disease, Cancer, Dermatological Diseases and Conditions network with a score of 83 (represented in supplemental Fig. 2), in which 34 out of the 49 proteins identified in our study were present. On the other side a Carbohydrate Metabolism, Cell Signaling, Molecular Transport network with a score of 26, appearing 14 out of 49.

The IPA analysis also grouped the proteins according to biofunctions as shown in Fig. 7. Among the top ranking biofunctions we found the skeletal muscle system development and function, tissue morphology, inflammatory disease, cardiovascular disease and skeletal and muscular disorders.

4. Discussion

Our results show that the combination of techniques used in this study, IP, BN, and FLIM-FRET, is more informative and reliable to study the composition and interactions of different proteins within a complex than a single technique. IP is an extensively used technique to determine protein-protein interactions but it has some limitations such as pulling down proteins that bind nonspecifically to the antibodies. BN-PAGE allows us to study protein complexes, however, several complexes can be found at the same molecular weight. Consequently, the MS/MS analysis detects many proteins that are not part of our complex of interest. Our results indicate that the identification of the same proteins using different techniques strengthens the idea that they belong to the same complex. In addition, although IP and BN are useful tools to show proteins within a complex, it is very important to perform other techniques, such as FLIM-FRET analysis, to determine whether interactions within a complex are direct or indirect. A deeper knowledge of the interactions of proteins within a complex would help us understand their role in cell physiology.

The IPA analysis revealed that most of the proteins that we found could be grouped according to their biofunctions in skeletal muscle system development and function, tissue morphology, inflammatory disease, cardiovascular disease and skeletal and muscular disorders. Interestingly, it has been reported that dysferlin has different functions in skeletal muscle including sarcolemma repair, membrane fusion and muscle differentiation [30, 43, 44]. Also, involvement of heart muscle in dysferlin myopathy has been proposed by some authors [45, 46]. Finally, inflammation in skeletal muscle is one of the hallmarks in the muscle biopsy of patients with dysferlin myopathy [47-50]. In fact, the IPA analysis also showed that 69% of the proteins identified in our study could be included with the highest score in the network corresponding to Immunological Disease.

We also demonstrate that FLIM-FRET analysis can be performed in cells in native conditions, avoiding the use of cell models overexpressing the proteins of interest. Although the use of vectors encoding for specific proteins tagged with GFP and RFP can be very informative, it does not represent a real situation since the overexpression of two proteins in a cell system can lead to non-specific interactions

or can bias the system towards a single interaction.

Although the lifetime decay values in our experiments were low, they were statistically significant. This low percentage could be explained by the fact that we used antibodies to perform the FLIM-FRET analysis and not labeled proteins. FLIM-FRET technique shows a positive interaction between two molecules if they are less than 10nm apart. The use of primary and secondary antibodies adds molecular distance between the two proteins under study. Although this effect can be minimized using tagged recombinant proteins, all our experiments were conducted using human skeletal muscle where proteins are present in their native form and consequently, the results reflect a more realistic situation.

The robustness of our strategy is validated by the fact that some of the partners of dysferlin found in our study, such as AHNAK, PTRF, Trim72/MG53 or Vinculin, have already been described in the literature [14, 15, 17, 24]. The FLIM-FRET technology allowed us to study some of those previously reported interactions in more detail. We observed a direct interaction of dysferlin and trim72/MG53 in injured and non injured cells, suggesting that those two proteins are interacting before and during the repair process.

Another finding of interest is that although cav-3 is part of the dysferlin complex, as suggested by other authors [16], it does not interact directly with this protein. Our results suggest that cav-3 binds to some other proteins, as trim72/MG53 that in turn interact directly with dysferlin.

Our strategy (IP+BN+FLIM-FRET) allowed us to find new members of the dysferlin complex such as calsequestrin-1, myomesin-2, and cytoplasmic dynein. Their interaction with dysferlin has not been analysed to date although they have been cited amid a list of genes and/or proteins in other studies [17, 51].

Calsequestrin-1 is a calcium storage protein located in the lumen of sarcoplasmic reticulum (SR) that acts as a buffering protein helping sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) in calcium uptake [52, 53]. Calsequestrin does not contain a transmembrane domain, and is believed to be located within the lumen of the SR [54], although a domain of the protein binds to the junctional face of SR membrane [55]. It is already known that dysferlin is expressed in the t-tubule system

[56, 57], which forms a triad with the SR. As we found a direct interaction between dysferlin and calsequestrin-1, our results suggest that dysferlin is also expressed in the SR. As dysferlin is a Ca²⁺ sensor [58, 59], it could also have a role in calcium reuptake by the SR.

Myomesin-2 also interacts directly with dysferlin. Brule et al. found that myomesin 2 co-IP with Calpain-3, another protein related to the dysferlin complex [60]. Myomesin-2 is a member of the MYOM family, mainly expressed in fast fibers [61]. The MYOM family of proteins are components of the M-band, and act as crosslinkers of myosin filaments [62, 63] to give stability to the sarcomere. Dysferlin has been suggested to have a role in cell membrane stability by other authors as it is related to integrins through vinculin and affixin [17, 31]. The dysferlin/myomesin-2 interaction, suggests that dysferlin participates not only in the integrity of the sarcolemma but also in myofibril stability.

We found that cytoplasmic dynein interacts directly with dysferlin. We also observed an abnormal distribution of dynein expression in the muscle biopsies of patients with dysferlin myopathy. Dynein is a motor protein related to retrograde vesicle transport along the microtubules [64]. It is also involved in microtubules elongation being responsible for the anterograde transport of short microtubules into the growing ends [65]. Microtubules are formed by monomers of alpha-tubulin. Acetylation of alpha-tubulin leads to recruitment of cytoplasmic dynein to microtubules, enhancing vesicle transport [66]. Cytoplasmic dynein has been previously co-IP with dysferlin in adult skeletal muscle and myotubes by other authors [17]. In that study, the authors found that some of the proteins interacting with dysferlin participate in different vesicle transport pathways being endocytosis the most relevant. Our results indicate that dysferlin participates in retrograde cellular transport as suggested by De Morre et al. using in silico analysis [17]. In addition, Demonbreun et al. described that dysf-null myoblasts have a defect in the endocytic receptor recycling compartment (RRC). This underlines dysferlin's function in vesicle trafficking and endocytic recycling [67]. In agreement with this hypothesis it has been recently reported that dysferlin regulates the acetylation state of alpha-tubulin [33]. In dysf-null myoblasts, the acetylation state of alpha-tubulin is reduced. This reduction of

the acetylation state of alpha-tubulin diminishes the recruitment of cytoplasmic dynein to microtubules which in turn attenuates the retrograde pathway and microtubule elongation[66]. Finally, it has also been reported that dynein inhibitors interfere with the reorientation of the microtubule cytoskeleton during healing of wounded NIH3T3 cells[68]. These results are in accordance with a possible role of cytoplasmic dynein in membrane resealing, reinforcing its interaction with dysferlin. All these data furnish evidence of a role of dysferlin in cytoskeleton remodelling and stability and sarcolemmal integrity.

It has been shown that an over-expression of myoferlin can rescue dysferlin function in membrane resealing, but muscles still display a dystrophic phenotype, suggesting other important roles for dysferlin in muscle [69].

In another hand, the knowledge of dysferlin interacting proteins is important as those proteins could be mutated in other muscular dystrophies. For example, the *mg53*^{-/-} mouse model shows skeletal muscle pathology, presented with muscular weakness and an altered histology with an increased number of central nuclei and a reduced fiber size [22]. It has also been reported that dysferlin was abnormally expressed in a patient with Samaritan myopathy and a homozygous mutation in the *RYR1* gene [70] and we found *RYR1* in the dysferlin complex in some experiments performed in adult skeletal muscle. In addition, immunofluorescence showed abnormal expression of some of the proteins that we found as part of the dysferlin complex (cytoplasmic dynein and Trim72/MG53) both in muscle biopsies and myotubes. Again, these proteins are potential target genes in other undiagnosed muscular dystrophies.

5. Conclusions

In conclusion, our data and those of other authors suggest that membrane resealing is not the only function of dysferlin, and that this protein probably has multiple roles in skeletal muscle physiology. The characterization of dysferlin partners may be very useful to understand not only other dysferlin functions, but also the phenotypic variability observed in dysferlinopathy patients and may lead us to identify new genes involved in other muscular dystrophies in which the responsible gene is unknown.

6. Acknowledgements

This work was supported by grants from "Fundación Isabel Gemio" and "Ministerio de Sanidad del Gobierno de España" (FIS 09/1944). We thank Carolyn Newey for editorial support and Ignasi Gich for advice in the statistical analysis.

7. Bibliography

- [1] R. Bashir, S. Britton, T. Strachan, S. Keers, E. Vafiadaki, M. Lako, I. Richard, S. Marchand, N. Bourg, Z. Argov, M. Sadeh, I. Mahjneh, G. Marconi, M.R. Passos-Bueno, S. Moreira Ede, M. Zatz, J.S. Beckmann, K. Bushby, A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B, *Nat Genet* 20 (1998) 37-42.
- [2] J. Liu, M. Aoki, I. Illa, C. Wu, M. Fardeau, C. Angelini, C. Serrano, J.A. Urtizberea, F. Hentati, M.B. Hamida, S. Bohlega, E.J. Culper, A.A. Amato, K. Bossie, J. Oeltjen, K. Bejaoui, D. McKenna-Yasek, B.A. Hosler, E. Schurr, K. Arahata, P.J. de Jong, R.H. Brown, Jr., Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy, *Nat Genet* 20 (1998) 31-36.
- [3] I. Illa, N. De Luna, R. Dominguez-Perles, R. Rojas-Garcia, C. Paradas, J. Palmer, C. Marquez, P. Gallano, E. Gallardo, Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases, *Neurology* 68 (2007) 1284-1289.
- [4] I. Illa, C. Serrano-Munuera, E. Gallardo, A. Lasa, R. Rojas-Garcia, J. Palmer, P. Gallano, M. Baiget, C. Matsuda, R.H. Brown, Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype, *Ann Neurol* 49 (2001) 130-134.
- [5] K. Nguyen, G. Bassez, M. Krahn, R. Bernard, P. Laforet, V. Labelle, J.A. Urtizberea, D. Figarella-Branger, N. Romero, S. Attarian, F. Leturcq, J. Pouget, N. Levy, B. Eymard, Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes, *Arch Neurol* 64 (2007) 1176-1182.
- [6] C. Paradas, L. Gonzalez-Quereda, N. De Luna, E. Gallardo, I. Garcia-Consuegra, H. Gomez, A. Cabello, I. Illa, P. Gallano, A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset, *Neuromuscul Disord* 19 (2009) 21-25.
- [7] M.R. Passos-Bueno, R. Bashir, E.S. Moreira, M. Vainzof, S.K. Marie, L. Vasquez, P. Iughetti, E. Bakker, S. Keers, A. Stephenson, et al., Confirmation of the

- 2p locus for the mild autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy gene (LGMD2B) in three families allows refinement of the candidate region, *Genomics* 27 (1995) 192-195.
- [8] R. Bashir, S. Keers, T. Strachan, R. Passos-Bueno, M. Zatz, J. Weissenbach, D. Le Paslier, M. Meisler, K. Bushby, Genetic and physical mapping at the limb-girdle muscular dystrophy locus (LGMD2B) on chromosome 2p, *Genomics* 33 (1996) 46-52.
- [9] K. Miyoshi, H. Kawai, M. Iwasa, K. Kusaka, H. Nishino, Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case, *Brain* 109 (Pt 1) (1986) 31-54.
- [10] M. Krahn, C. Beroud, V. Labelle, K. Nguyen, R. Bernard, G. Bassez, D. Figarella-Branger, C. Fernandez, J. Bouvenot, I. Richard, E. Ollagnon-Roman, J.A. Bevilacqua, E. Salvo, S. Attarian, F. Chapon, J.F. Pellissier, J. Pouget, H. Hammouda el, P. Laforet, J.A. Urtizbera, B. Eymard, F. Leturcq, N. Levy, Analysis of the DYSF mutational spectrum in a large cohort of patients, *Hum Mutat* 30 (2009) E345-375.
- [11] C. Paradas, J. Llauger, J. Diaz-Manera, R. Rojas-Garcia, N. De Luna, C. Iturriaga, C. Marquez, M. Uson, K. Hankiewicz, E. Gallardo, I. Illa, Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies, *Neurology* 75 (2010) 316-323.
- [12] D. Bansal, K.P. Campbell, Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy, *Trends Cell Biol* 14 (2004) 206-213.
- [13] L. Glover, R.H. Brown, Jr., Dysferlin in membrane trafficking and patch repair, *Traffic* 8 (2007) 785-794.
- [14] Y. Huang, S.H. Laval, A. van Remoortere, J. Baudier, C. Benaud, L.V. Anderson, V. Straub, A. Deelder, R.R. Frants, J.T. den Dunnen, K. Bushby, S.M. van der Maarel, AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration, *FASEB J* 21 (2007) 732-742.
- [15] C. Cai, N. Weisleder, J.K. Ko, S. Komazaki, Y. Sunada, M. Nishi, H. Takeshima, J. Ma, Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin, *J Biol Chem* 284 (2009) 15894-15902.
- [16] C. Matsuda, Y.K. Hayashi, M. Ogawa, M. Aoki, K. Murayama, I. Nishino, I. Nonaka, K. Arahata, R.H. Brown, Jr., The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 1761-1766.
- [17] A. de Morree, P.J. Hensbergen, H.H. van Haagen, I. Dragan, A.M. Deelder, P.A. t Hoen, R.R. Frants, S.M. van der Maarel, Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity, *PLoS One* 5 (2010) e13854.
- [18] B. Borgonovo, E. Cocucci, G. Racchetti, P. Podini, A. Bachi, J. Meldolesi, Regulated exocytosis: a novel, widely expressed system, *Nat Cell Biol* 4 (2002) 955-962.
- [19] H. Haase, T. Podzuweit, G. Lutsch, A. Hohaus, S. Kostka, C. Lindschau, M. Kott, R. Kraft, I. Morano, Signaling from beta-adrenoceptor to L-type calcium channel: identification of a novel cardiac protein kinase A target possessing similarities to AHNAK, *FASEB J* 13 (1999) 2161-2172.
- [20] A. Hohaus, V. Person, J. Behlke, J. Schaper, I. Morano, H. Haase, The carboxyl-terminal region of ahnak provides a link between cardiac L-type Ca²⁺ channels and the actin-based cytoskeleton, *FASEB J* 16 (2002) 1205-1216.
- [21] Y. Huang, A. de Morree, A. van Remoortere, K. Bushby, R.R. Frants, J.T. Dunnen, S.M. van der Maarel, Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle, *Hum Mol Genet* 17 (2008) 1855-1866.
- [22] C. Cai, H. Masumiya, N. Weisleder, N. Matsuda, M. Nishi, M. Hwang, J.K. Ko, P. Lin, A. Thornton, X. Zhao, Z. Pan, S. Komazaki, M. Brotto, H. Takeshima, J. Ma, MG53 nucleates assembly of cell membrane repair machinery, *Nat Cell Biol* 11 (2009) 56-64.
- [23] H. Zhu, P. Lin, G. De, K.H. Choi, H. Takeshima, N. Weisleder, J. Ma, Polymerase transcriptase release factor (PTRF) anchors MG53 protein to cell injury site for initiation of membrane repair, *J Biol Chem* 286 (2011) 12820-12824.
- [24] M. Cacciottolo, V. Belcastro, S. Laval, K. Bushby, D. di Bernardo, V. Nigro, Reverse engineering gene network identifies new dysferlin-interacting proteins, *J Biol Chem* 286 (2010) 5404-5413.
- [25] C. Minetti, F. Sotgia, C. Bruno, P. Scartezzini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, M. Mazzocco, A. Egeo, M.A. Donati, D. Volonte, F. Galbiati, G. Cordone, F.D.

- Bricarelli, M.P. Lisanti, F. Zara, Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy, *Nat Genet* 18 (1998) 365-368.
- [26] D.J. Hernandez-Deviez, M.T. Howes, S.H. Laval, K. Bushby, J.F. Hancock, R.G. Parton, Caveolin regulates endocytosis of the muscle repair protein, dysferlin, *J Biol Chem* 283 (2008) 6476-6488.
- [27] B.N. Ampong, M. Imamura, T. Matsumiya, M. Yoshida, S. Takeda, Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor, *Acta Myol* 24 (2005) 134-144.
- [28] L. Madaro, V. Marrocco, P. Fiore, P. Aulino, P. Smeriglio, S. Adamo, M. Molinaro, M. Bouche, PKC θ signaling is required for myoblast fusion by regulating the expression of caveolin-3 and beta1D integrin upstream focal adhesion kinase, *Mol Biol Cell* 22 (2011) 1409-1419.
- [29] N. De Luna, E. Gallardo, I. Illa, In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells, *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (2004) 1104-1113.
- [30] N. de Luna, E. Gallardo, M. Soriano, R. Dominguez-Perles, C. de la Torre, R. Rojas-Garcia, J.M. Garcia-Verdugo, I. Illa, Absence of dysferlin alters myogenin expression and delays human muscle differentiation "in vitro", *J Biol Chem* 281 (2006) 17092-17098.
- [31] C. Matsuda, K. Kameyama, K. Tagawa, M. Ogawa, A. Suzuki, S. Yamaji, H. Okamoto, I. Nishino, Y.K. Hayashi, Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma, *J Neuropathol Exp Neurol* 64 (2005) 334-340.
- [32] B.A. Azakir, S. Di Fulvio, C. Therrien, M. Sinnreich, Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle, *PLoS One* 5 (2010) e10122.
- [33] S. Di Fulvio, B.A. Azakir, C. Therrien, M. Sinnreich, Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation, *PLoS One* 6 (2011) e28563.
- [34] Y. Sun, N.M. Hays, A. Periasamy, M.W. Davidson, R.N. Day, Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy, *Methods Enzymol* 504 (2011) 371-391.
- [35] N. Badiola, R.M. de Oliveira, F. Herrera, C. Guardia-Laguarta, S.A. Goncalves, M. Pera, M. Suarez-Calvet, J. Clarimon, T.F. Outeiro, A. Lleo, Tau enhances alpha-synuclein aggregation and toxicity in cellular models of synucleinopathy, *PLoS One* 6 (2011) e26609.
- [36] C. Guardia-Laguarta, M. Coma, M. Pera, J. Clarimon, L. Sereno, J.M. Agullo, L. Molina-Porcel, E. Gallardo, A. Deng, O. Berezovska, B.T. Hyman, R. Blesa, T. Gomez-Isla, A. Lleo, Mild cholesterol depletion reduces amyloid-beta production by impairing APP trafficking to the cell surface, *J Neurochem* 110 (2009) 220-230.
- [37] N.J. Lennon, A. Kho, B.J. Bacskai, S.L. Perlmutter, B.T. Hyman, R.H. Brown, Jr., Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing, *J Biol Chem* 278 (2003) 50466-50473.
- [38] V. Askanas, S.A. Shafiq, A.T. Milhorat, Normal and dystrophic chicken muscle at successive stages in tissue culture, *Arch Neurol* 24 (1971) 259-265.
- [39] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J.V. Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat Protoc* 1 (2006) 2856-2860.
- [40] V.T.M. Förster, E.V.; Greenbaum, E. ; Knox, R.S., Intermolecular energy migration and fluorescence (Translation of Förster, T., 1948), *Biological physics*, American Institute of Physics (1948) 183-221.
- [41] F. Piccolo, S.A. Moore, G.C. Ford, K.P. Campbell, Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies, *Ann Neurol* 48 (2000) 902-912.
- [42] L.B. Waddell, F.A. Lemckert, X.F. Zheng, J. Tran, F.J. Evesson, J.M. Hawkes, A. Lek, N.E. Street, P. Lin, N.F. Clarke, A.P. Landstrom, M.J. Ackerman, N. Weisleder, J. Ma, K.N. North, S.T. Cooper, Dysferlin, annexin A1, and mitsugumin 53 are upregulated in muscular dystrophy and localize to longitudinal tubules of the T-system with stretch, *J Neuropathol Exp Neurol* 70 (2011) 302-313.
- [43] D. Bansal, K. Miyake, S.S. Vogel, S. Groh, C.C. Chen, R. Williamson, P.L. McNeil, K.P. Campbell, Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy, *Nature* 423 (2003) 168-172.
- [44] A.D. Posey, Jr., A. Demonbreun, E.M. McNally, Ferlin proteins in myoblast fusion and muscle growth, *Curr Top Dev Biol* 96 203-230.
- [45] R. Han, D. Bansal, K. Miyake, V.P. Muniz, R.M. Weiss, P.L. McNeil, K.P. Campbell, Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-

- induced left ventricular injury, *J Clin Invest* 117 (2007) 1805-1813.
- [46] K. Wenzel, C. Geier, F. Qadri, N. Hubner, H. Schulz, B. Erdmann, V. Gross, D. Bauer, R. Dechend, R. Dietz, K.J. Osterziel, S. Spuler, C. Ozcelik, Dysfunction of dysferlin-deficient hearts, *J Mol Med (Berl)* 85 (2007) 1203-1214.
- [47] E. Gallardo, R. Rojas-Garcia, N. de Luna, A. Pou, R.H. Brown, Jr., I. Illa, Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients, *Neurology* 57 (2001) 2136-2138.
- [48] Y.H. Chiu, M.A. Hornsey, L. Klinge, L.H. Jorgensen, S.H. Laval, R. Charlton, R. Barresi, V. Straub, H. Lochmuller, K. Bushby, Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy, *Hum Mol Genet* 18 (2009) 1976-1989.
- [49] R. Rawat, T.V. Cohen, B. Ampong, D. Francia, A. Henriques-Pons, E.P. Hoffman, K. Nagaraju, Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle, *Am J Pathol* 176 (2010) 2891-2900.
- [50] N. De Luna, E. Gallardo, C. Sonnet, B. Chazaud, R. Dominguez-Perles, X. Suarez-Calvet, R.K. Gherardi, I. Illa, Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy, *J Neuropathol Exp Neurol* 69 (2010) 643-653.
- [51] S. Campanaro, C. Romualdi, M. Fanin, B. Celegato, B. Pacchioni, S. Trevisan, P. Laveder, C. De Pitta, E. Pegoraro, Y.K. Hayashi, G. Valle, C. Angelini, G. Lanfranchi, Gene expression profiling in dysferlinopathies using a dedicated muscle microarray, *Hum Mol Genet* 11 (2002) 3283-3298.
- [52] R.M. Murphy, N.T. Larkins, J.P. Mollica, N.A. Beard, G.D. Lamb, Calsequestrin content and SERCA determine normal and maximal Ca²⁺ storage levels in sarcoplasmic reticulum of fast- and slow-twitch fibres of rat, *J Physiol* 587 (2009) 443-460.
- [53] L. Royer, E. Rios, Deconstructing calsequestrin. Complex buffering in the calcium store of skeletal muscle, *J Physiol* 587 (2009) 3101-3111.
- [54] L. Fliegel, M. Ohnishi, M.R. Carpenter, V.K. Khanna, R.A. Reithmeier, D.H. MacLennan, Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 1167-1171.
- [55] J.H. Collins, A. Tarcsafalvi, N. Ikemoto, Identification of a region of calsequestrin that binds to the junctional face membrane of sarcoplasmic reticulum, *Biochem Biophys Res Commun* 167 (1990) 189-193.
- [56] L. Klinge, J. Harris, C. Sewry, R. Charlton, L. Anderson, S. Laval, Y.H. Chiu, M. Hornsey, V. Straub, R. Barresi, H. Lochmuller, K. Bushby, Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle, *Muscle Nerve* 41 (2010) 166-173.
- [57] J.A. Roche, L.W. Ru, A.M. O'Neill, W.G. Resneck, R.M. Lovering, R.J. Bloch, Unmasking potential intracellular roles for dysferlin through improved immunolabeling methods, *J Histochem Cytochem* 59 (2011) 964-975.
- [58] C. Therrien, S. Di Fulvio, S. Pickles, M. Sinnreich, Characterization of lipid binding specificities of dysferlin C2 domains reveals novel interactions with phosphoinositides, *Biochemistry* 48 (2009) 2377-2384.
- [59] D.B. Davis, K.R. Doherty, A.J. Delmonte, E.M. McNally, Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains, *J Biol Chem* 277 (2002) 22883-22888.
- [60] C. Brule, E. Dargelos, R. Diallo, A. Listrat, D. Bechet, P. Cottin, S. Poussard, Proteomic study of calpain interacting proteins during skeletal muscle aging, *Biochimie* 92 (2010) 1923-1933.
- [61] I. Agarkova, R. Schoenauer, E. Ehler, L. Carlsson, E. Carlsson, L.E. Thornell, J.C. Perriard, The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type, *Eur J Cell Biol* 83 (2004) 193-204.
- [62] I. Agarkova, E. Ehler, S. Lange, R. Schoenauer, J.C. Perriard, M-band: a safeguard for sarcomere stability?, *J Muscle Res Cell Motil* 24 (2003) 191-203.
- [63] I. Agarkova, J.C. Perriard, The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere, *Trends Cell Biol* 15 (2005) 477-485.
- [64] R.D. Vale, The molecular motor toolbox for intracellular transport, *Cell* 112 (2003) 467-480.
- [65] F.J. Ahmad, Y. He, K.A. Myers, T.P. Hasaka, F. Francis, M.M. Black, P.W. Baas, Effects of dynactin disruption and dynein depletion on axonal microtubules, *Traffic* 7 (2006) 524-537.
- [66] J.P. Dompierre, J.D. Godin, B.C. Charrin, F.P. Cordelieres, S.J. King, S. Humbert, F. Saudou, Histone deacetylase 6

inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation, *J Neurosci* 27 (2007) 3571-3583.

[67] A.R. Demonbreun, J.P. Fahrenbach, K. Deveaux, J.U. Earley, P. Pytel, E.M. McNally, Impaired muscle growth and response to insulin-like growth factor 1 in dysferlin-mediated muscular dystrophy, *Hum Mol Genet* 20 (2010) 779-789.

[68] D.L. Dujardin, L.E. Barnhart, S.A. Stehman, E.R. Gomes, G.G. Gundersen, R.B. Vallee, A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement, *J Cell Biol* 163 (2003) 1205-1211.

[69] D.E. Albrecht, N. Garg, L.E. Rufibach, B.A. Williams, N. Monnier, E. Hwang, P. Mittal, 4th Annual Dysferlin Conference 11-14 September 2010, Washington, USA, *Neuromuscul Disord* 21 (2010) 304-310.

[70] J. Bohm, E. Leshinsky-Silver, S. Vassilopoulos, S. Le Gras, T. Lerman-Sagie, M. Ginzberg, B. Jost, D. Lev, J. Laporte, Samaritan myopathy, an ultimately benign congenital myopathy, is caused by a RYR1 mutation, *Acta Neuropathol* (2012).

8. Figures and legends

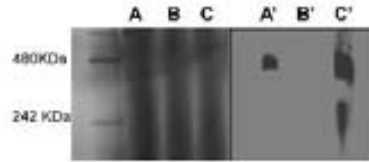


Figure 1: Blue native and WB image showing bands for dysferlin complex and trim72/MG53 complex. Adult skeletal muscle extract from healthy patient was run in a native-PAGE gradient gel (4-12% acrylamide) in all lanes (A, B and C). Lanes A and C were immunoblotted and probed with an antibody to Trim72/MG53 (A') or to dysferlin (C'). Lane B was used for MS/MS sequencing of the bands recognized by the antibodies in lanes A' and C'.

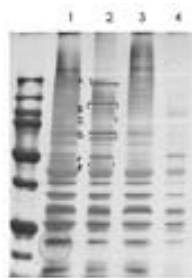


Figure 2: Silver stain of IP extracts separated in a SDS-PAGE gel. Lane 2 shows the proteins immunoprecipitated using the monoclonal antibody to dysferlin F4 from human myotubes protein extract. Lane 1 shows the supernatant from the same experiment. Lane 4 shows the proteins immunoprecipitated using a monoclonal llama-derived antibody used as a control of isotype in human myotubes. Lane 3 shows the supernatant from the same experiment. Bands A, B, C, D, E and F were sequenced by MS/MS. Band A corresponds to myosins 3, 9 and 10; Band B corresponds to cadherin-11; band C and corresponds to Cytoplasmic dynein 1 intermediate chain 2; Band D corresponds to Pyruvate kinase isozymes M1/M2; band E corresponds to Trim72/MG53 and band F corresponds to vimentin and tubulin beta chain.

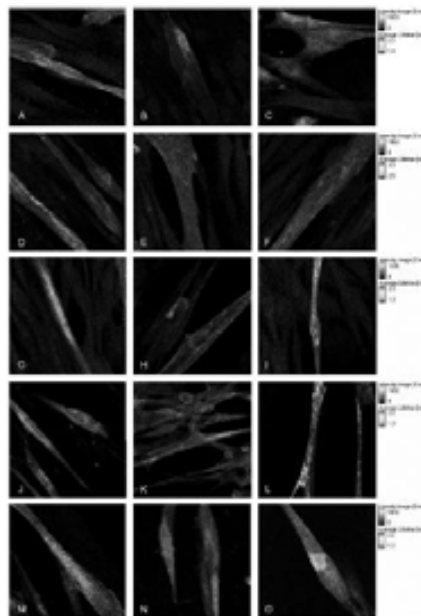


Figure 3: FLIM analysis in human control myotubes. A, D, G, J and M show donor fluorophore lifetimes in the absence of acceptor for each experiment. Only proteins closer than 10nm show lifetime shortening (blue pixels) in the pseudo-colored images. Colorimetric scale shows alexa fluor 488 fluorophore lifetime in nanoseconds. B) positive control with 2 different antibodies detecting dysferlin; C) calsequestrin-1/dysferlin interaction; E) Trim72/dysferlin interaction in non injured cells; F) Trim 72/dysferlin interaction in injured cells; H) AHNAK/dysferlin interaction; I) dystrophin/dysferlin interaction; K) annexin A1/dysferlin interaction L) caveolin-3/dysferlin interaction; N) Myomesin-2/dysferlin interaction and O) dynein/dysferlin interaction after photobleaching.

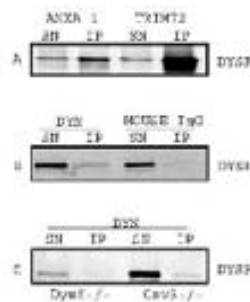


Figure 4: WB for dysferlin in IP assays in adult skeletal muscle. SN (supernatant), IP (immunoprecipitation). A) IP experiments using primary antibodies anti-annexin- A1 and Trim72/MG53 in control muscle showing co-IP of dysferlin with those two proteins. B) IP experiments using anti-dynein antibody and a mouse IgG as a control of isotype in control muscle, showing dysferlin co-IP only with dynein. C) IP experiments using a primary antibody anti-dynein in muscle extracts from patients with mutations in caveolin-3 and dysferlin, showing co-IP of dysferlin with dynein in patients lacking caveolin-3.

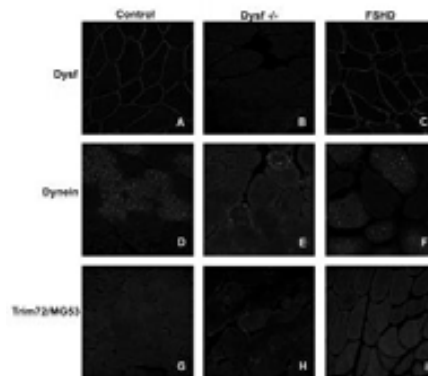


Figure 5: Immunohistochemistry on human biopsies. Immunohistochemistry showed normal dysferlin expression pattern in a healthy control (A) and a FSHD patient (C) and absence of dysferlin in a patient with limb girdle muscular dystrophy 2B (B); Picture D shows the normal expression pattern of dynein in a control muscle biopsy. In muscle sections of dysferlinopathy patients, we observe that absence of dysferlin causes accumulation of dynein at the subsarcolemma (E) that was not observed in FSHD patients (F); Trim72/MG53 expression pattern in healthy muscle is showed in picture G. We observe patches of Trim72/MG53 at the sarcolemma in patients with dysferlinopathy (H), which were occasionally observed in FSHD patients (I). Pictures A-F were taken at 630x, pictures G-I were taken at 400x.

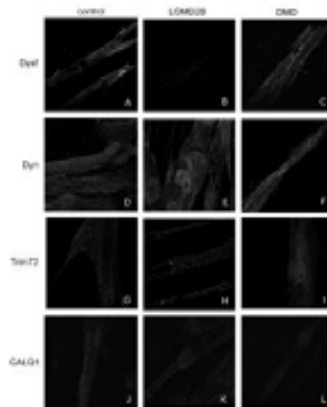


Figure 6: Immunocytochemistry in human myotubes. Immunocytochemistry showed normal dysferlin expression in control myotubes (A) and myotubes from a DMD patient (C) and absence of dysferlin in myotubes from a patient with LGMD2B (B); Picture D shows normal expression pattern of dynein in control myotubes. In myotubes from dysferlinopathy patients, we observe that the absence of dysferlin causes an accumulation of dynein around nuclei (E) that was not observed in DMD myotubes (F); Trim72/MG53 expression pattern in control myotubes is showed in G. Absence of dysferlin causes accumulation of Trim72/MG53 in dysferlinopathy patients (H), which is not observe in myotubes from DMD patients (I). Normal expression of Calsequestrin-1 (CALQ1) in control myotubes (J), seems to be reduced in dysferlinopathy (K) and DMD patients (L). Pictures A-L were taken at 630x, with a digital zoom of 2,5x.

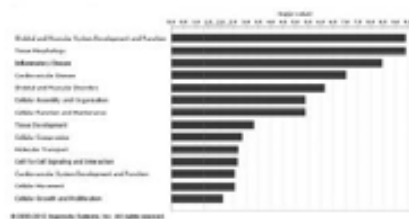


Figure 7: Ingenuity pathway analysis. Biofunctions compatible with the proteins listed in table 2. Interestingly, the most important common biofunctions found by the software for the proteins in table 2 correspond to the “skeletal and muscular system development and function”, followed by “tissue morphology”, “inflammatory disease”, “Cardiovascular disease” and “Skeletal and muscle disorders”.

Dysferlin regulates cell adhesion in human monocytes

Antoine de Morrée^{1#}, Bàrbara Flix², Ivana Bagaric¹, Jun Wang³, Marlinde van den Boogaard¹, Laure Grand Moursel¹, Rune R Frants¹, Isabel Illa², Eduard Gallardo², Rene Toes³, Silvère M van der Maarel^{1*}

1. Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands
2. Servei de Neurologia, Laboratori de Neurologia Experimental, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain.
3. Department of Rheumatology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Current address: Paul F. Glenn Laboratories for the Biology of Aging, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA, and Department of Neurology and Neurological Sciences, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA.

* Correspondence: Prof. Dr. S. M. van der Maarel, Leiden University Medical Center, Department of Human Genetics, Albinusdreef 2, 2333 ZA Leiden, The Netherlands.

E-mail: maarel@lumc.nl

Abstract

Dysferlin is mutated in a group of muscular dystrophies commonly referred to as dysferlinopathies. It is highly expressed in skeletal muscle, where it is important for sarcolemmal maintenance. Recent studies show that dysferlin is also expressed in monocytes. Moreover, muscle of dysferlinopathy patients is characterized by massive immune cell infiltrates, and dysferlin negative monocytes were shown to be more aggressive and phagocytose more particles. This suggests that dysferlin deregulation in monocytes might contribute to disease progression, but the molecular mechanism is unclear. Here we show that dysferlin expression is increased with differentiation in human monocytes and the THP1 monocyte cell model. Freshly isolated monocytes of dysferlinopathy patients show deregulated expression of fibronectin and fibronectin binding integrins, which is recapitulated by transient knockdown of dysferlin in THP1 cells. Dysferlin forms a protein complex with these integrins at the cell membrane, and its depletion impairs cell adhesion. Moreover, patient macrophages show altered adhesion and motility. These findings suggest that dysferlin is involved in regulating cellular interactions and provide new insight into dysferlin function in inflammatory cells.

Introduction

Mutations in the dysferlin gene (DYSF, MIM*603009) cause the progressive late-onset muscular dystrophies Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD) 2B (MIM#253601)¹, Miyoshi Myopathy (MIM#254130)² and Distal Anterior Compartment Myopathy (MIM#606768)³, collectively referred to as dysferlinopathies. All of them are characterized by an adult onset of muscle weakness, followed by progressive muscle wasting. The muscle tissue presents with strong

inflammatory infiltrates⁴, and for that reason the disease is often misdiagnosed for the immune disorder polymyositis. Dysferlin is a C2 domain containing transmembrane protein that is highly expressed in skeletal muscle⁵ and activated satellite cells⁶, and increases with differentiation. In addition it is expressed in monocytes^{7,8}.

Recent studies suggest that the immune response in dysferlin deficient tissue is compromised^{9,10}. In muscle, dysferlin deficiency causes reduced

cytokine^{9,10} and chemokine¹¹ secretion and a subsequent local misbalance in recruitment and persistence of immune cells⁹. In dysferlin mouse models, neutrophils and macrophages appear later at the site of damage compared to controls in degeneration/regeneration experiments⁹. Yet after their late appearance these cells reside longer in the muscle tissue, suggesting a prolonged inflammatory response of these cells⁹. Roche et al¹² showed the existence of a strong immune component in dysferlin deficiency that contributes to its slower recovery from injury

As dysferlin is strongly expressed in monocytes^{7,8}, it was suggested that modified monocyte behavior might contribute to the dysferlin phenotype. Indeed a recent study indicates that dysferlin deficient macrophages have a higher phagocytosis index and are thus more aggressive than wild-type cells¹³. However, the mechanism behind this observation is unclear.

We previously characterized the dysferlin protein complex in muscle and observed that dysferlin is found in complex with focal adhesion components in skeletal muscle cells¹⁴. Focal adhesions are cellular attachment sites where the internal cytoskeleton is connected to the extracellular matrix via integrins¹⁵. Integrins are heterodimeric transmembrane receptors that consist of an α - and a β -subunit and are central to focal adhesions¹⁵. According to the traditional view integrins link the extracellular matrix to the intracellular cytoskeleton^{15,16}. However, recent studies also indicated a role for integrins in cell-cell contacts¹⁶. Because of dysferlin's uncharacterized role near focal adhesions and the deregulated monocyte response in dysferlinopathy patients we investigated a potential function for dysferlin in monocyte cell adhesion. We observed a striking increase in macrophage motility in

dysferlinopathy patients, in line with an altered adhesion propensity.

Results

Dysferlin expression is enhanced in differentiating monocytes

Previous reports show that dysferlin is expressed in monocytes and macrophages^{7,8,13}. To confirm this observation we purified B cells, T cells, and monocytes from freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors and investigated dysferlin protein levels on western blot. Dysferlin is expressed only in monocytes, conform prior observations, while its interaction partner AHNAK¹⁷ is expressed in all three cell types (Figure 1A). We next differentiated freshly isolated monocytes in vitro to a pro-inflammatory (M1) or contra-inflammatory (M2) phenotype, and again tested for dysferlin and AHNAK expression on western blot (Figure 1B). Both proteins are increased with differentiation in both M1 and M2 macrophages. Interestingly, the monocyte-like leukemic THP1 cell model shows a similar increase in dysferlin and AHNAK upon differentiation (Figure 1B). Finally we measured RNA expression levels of dysferlin and AHNAK in THP1 cells (Figures 1C and 1D). Again, we found a strong upregulation of dysferlin. AHNAK however, is upregulated to much smaller extent suggesting that the increase in AHNAK protein levels is achieved through a different mechanism than for dysferlin. We conclude that dysferlin and AHNAK are increased with monocyte differentiation.

Dysferlin expression is insensitive to cell-matrix contact formation

In skeletal muscle, dysferlin functions as a calcium-sensitive membrane repair protein¹⁸. In a THP1 cell scratch-wounding assay dysferlin displayed a calcium dependent recruitment to the lesion site (data not shown), indicating that also in monocytes dysferlin

participate in calcium-sensitive membrane repair. However, it is not likely that monocytes suffer from frequent membrane damage as do myofibers, challenging the biological relevance of the membrane repair function of dysferlin in monocytes. We therefore explored potential additional functions of dysferlin. We and others previously reported that dysferlin forms a complex with focal adhesion components, which are important in cell-cell and cell-matrix contacts^{14,19}. Monocytes require interactions with the extracellular matrix and surrounding cells to exert their function. THP1 cells are non-adherent prior to differentiation and become adherent upon differentiation. We therefore investigated whether dysferlin and AHNAK expression levels are sensitive to cell adherence. We first measured the mRNA expression levels of various matrix and adherence proteins in differentiating THP1 cells (Figure 2A). This showed dysferlin expression to be concomitantly upregulated with fibronectin and integrins $\alpha 5$, αV , $\beta 1$ and $\beta 3$. Interestingly, the integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha V\beta 3$ have fibronectin binding capacity. We could not detect upregulated expression of other matrix proteins such as laminin (Figure 2A). This suggests that the THP1 cells adhere to fibronectin. The same genes were upregulated in in vitro differentiated M1 and M2 macrophages (Figure 2B). We proceeded to test THP1 cell adhesion on protein matrices. We coated wells with PBS (mock), poly L-lysine, collagen or fibronectin. Poly L-lysine is positively charged and attracts all cells to the surface without adherence, while fibronectin and collagen are matrix proteins. Figure 2C shows that on plastic surfaces dysferlin and AHNAK proteins are only increased upon the induction of differentiation. A similar effect is seen for poly L-lysine. Fibronectin however increases AHNAK protein levels, yet not dysferlin, even in the absence of differentiation. Indeed the cells adhere onto a fibronectin

matrix without achieving the spread-out differentiated phenotype (not shown). Dysferlin again only increases upon differentiation. Finally, the collagen matrix has no strong effect on either protein unless the cells were differentiated. We conclude that dysferlin expression does not respond to cell-matrix adhesion, contrary to AHNAK, which is sensitive to fibronectin adherence.

Differentiation induced dysferlin expression is enhanced in response to cell-cell contact formation

We next investigated dysferlin and AHNAK expression in response to cell-cell contacts. We differentiated THP1 cells at increasing cell densities, predicting that this would result in an increased frequency of cell-cell contact formation. Surprisingly, the differentiation-induced dysferlin mRNA expression levels are further increased with increasing cell density, suggesting a positive response to cell-cell contact formation (Figure 3). The integrins ITGA5, ITGAV, ITGB1 and ITGB3 show the opposite pattern, with expression levels dropping with increasing cell density (Figure 3A). Nevertheless, apart from their function in cell-matrix contacts, integrins are also important for cell-cell contacts^{16,20}. The dysferlin interaction partner AHNAK shows an increase in expression similar to dysferlin but followed by a sudden drop at the highest cell density tested. It is not clear why this happens, but given its function in cell interactions^{21,22} its increase may be a response to the cell's loss in integrin expression. To verify that dysferlin protein is involved in cell-cell contacts we performed immunofluorescent staining experiments on differentiated THP1 cells. Dysferlin strongly accumulates at cell-cell contacts (Figure 3B), together with ITGB3. Intriguingly, the proteins AHNAK and ITGB1 are also strongly present at cell-cell contacts (not shown), although their RNA expression levels are insensitive to cell density.

This indicates that dysferlin is involved in cell-cell contact signaling.

Loss of dysferlin protein results in deregulation of integrin expression. To obtain more evidence that dysferlin is important for cell adhesion, we transfected THP1 cells with an shRNA plasmid to knock down dysferlin (Figure 4A+B). We confirmed a substantial reduction of dysferlin protein levels by western blotting (Figure 4B). We measured RNA (Figure 4A) and protein (figure 4B) expression levels during differentiation and observed that ITGB1 and ITGB3 and fibronectin are much stronger upregulated in the dysferlin depleted cells, while other markers such as CD11b (ITGAM, or integrin α M) appear unaffected. This shows that integrin mRNA expression is affected by the absence of dysferlin, which is suggestive of a change in cell adhesion properties. We next measured RNA expression levels in a confirmed patient with LGMD2B and a matched control, and observed a strikingly similar deregulation of fibronectin and the integrins in the patient cells (Figure 4C). Finally, we performed cell counts at 4 days post-differentiation of mock-transfected and dysferlin depleted THP1 cells. In wild-type cells, most of the cells adhere to the surface after four days of differentiation. Transfection with a non-target shRNA plasmid results in a slight decrease in adherent cells, probably due to the transfection procedure. However, depletion of dysferlin results in a strong reduction in cell adhesion (Figure 4). We stained shRNA transfected THP1 cells for surface ITGB3. Again, this showed a clear loss of adherent cells, but no difference in surface ITGB3 could be detected between dysferlin depleted and control cells. This suggests that the trafficking of integrins, and not the absolute expression level, is affected by dysferlin depletion. We conclude that dysferlin is involved in Integrin mediated THP1 monocyte cell adhesion.

Dysferlin can form a complex with focal adhesion components

In skeletal muscle cells, dysferlin forms a complex with vinculin and associated focal adhesion proteins¹⁴. In order to test whether dysferlin is physically associated with adhesion complexes we performed immunoprecipitation experiments on protein homogenates from differentiated THP1 cells. In addition to total homogenates we also analyzed cellular subfractions enriched for organelles or microsomes (Figure 5). We used two independent dysferlin-specific heavy chain antibody fragments (VHH) and one non-specific VHH, as described previously^{14,23} and analyzed co-immunoprecipitation by western blot. Dysferlin is found in all fractions. Moreover, ITGB3, vinculin, paxillin and β -parvinco-immunoprecipitate with dysferlin from the microsomal fraction, suggesting that as in muscle cells, dysferlin forms a complex with a subset of focal adhesions in THP1 cells. ITGB1 does not co-immunoprecipitate with dysferlin. It should be noted that in the total cell extract no detectable amount of ITGB3 coimmunoprecipitates with dysferlin suggesting that the interaction takes place at the focal adhesion only. To further substantiate the evidence for dysferlin near focal adhesions we performed co-immunofluorescence experiments with an antibody against the focal adhesion protein vinculin (Figure 5C). Focal adhesions have a rapid turnover. Therefore we fixed the cells with the stringent CSK buffer. This allowed for detection of vinculin in focal adhesions. Dysferlin partially colocalizes with vinculin at these focal adhesions. We conclude that dysferlin can form a protein complex with focal adhesion components in monocytes.

Dysferlin endocytosis in response to Integrin stimulation

A recent study by Sharma et al²⁴ suggested a role for Dysferlin in the trafficking of the adhesion molecule PECAM in endothelium. We therefore studied the trafficking of dysferlin and

ITGB3 in THP1 cells with co-immunofluorescence staining. We observed that in resting differentiated THP1 cells dysferlin and ITGB1 or ITGB3 do not strongly colocalize (Figure 6A). This confirms the IP data on whole cell lysates and supports the hypothesis that both proteins are together only at the cell membrane or on endocytic vesicles. We therefore decided to stimulate integrin endocytosis by incubating differentiated THP1 cells with small peptide (GRGDS) containing the matrix binding site for integrin (RGD). This peptide competes for the matrix-binding site and activates integrin endocytosis (Figure 6B). We used a low concentration that removed the focal adhesions in the cell protrusions (stained by vinculinin Figure 6B), but prevented the cells from rounding up and detaching, and we stained the cells for dysferlin and ITGB3. Both proteins show a rapid response to GRGDS, and accumulate in a perinuclear compartment (Figure 6A). This recruitment is specific for dysferlin and ITGB3, as subsequent costaining for dysferlin and AHNAK showed the latter to shift towards the cell periphery (Figure 6C).

Many integrin heterodimers have the potential to bind to an RGD peptide motif²⁵, and all these heterodimers might be inhibited by the GRGDS treatment. However, our data thus far suggested that mainly ITGB3 is functionally linked to dysferlin. To test this we incubated cells in the presence of a monoclonal antibody specific for the extracellular part of ITGB3. This resulted in a similar recruitment of both ITGB3 and dysferlin (Figure 6D), suggesting that the GRGDS induced trafficking of dysferlin is largely caused by ITGB3 inhibition.

To prove that the integrins undergo endocytosis upon GRGDS stimulation we incubated differentiated THP1 cells with the integrin β 3 antibody on ice, prior to GRGDS stimulation. Subsequent stimulation with GRGDS at 37°C resulted in intracellular ITGB3

antibody, strongly indicating that the integrins are indeed endocytosed in response to the GRGDS treatment (Figure 6E). As there is no antibody available that binds to the extracellular domain of dysferlin it is technically not feasible to confirm this in a similar experimental setup for dysferlin. We conclude that dysferlin is co-endocytosed with ITGB3.

Dysferlinopathy macrophages move faster

Our data thus far suggest that dysferlin locates to monocyte cell adhesion sites, and that it is involved in cell interactions. We therefore hypothesized that cell adhesion might be disturbed in monocytes of dysferlinopathy patients. To test this we isolated and cultured human primary macrophages from five molecularly confirmed LGMD2B patients, and five healthy matched control donors. All isolated cells stained positive for the marker CD68, confirming the purity of our cultures (Figure 7A). Macrophages from all five donors adhered to plastic surface, but appeared more loosely attached (data not shown). We performed live cell microscopy to monitor the cells and record their movements. Strikingly, we observed that dysferlinopathy macrophages are more motile than their healthy counterparts (Figure 7B, C). Specifically, dysferlinopathy macrophages covered more distance and had a 60% increase in average velocity (13,85 μ m/h compared to 8.71 μ m/h for controls, with $p=0.00009$). These data are consistent with the reduced adhesion in dysferlin depleted THP1 cells, and with a role for dysferlin in regulation of cellular interactions.

Discussion

We report that dysferlin expression is upregulated in differentiating monocytes and the THP1 monocyte cell model. Dysferlin localizes to the cell membrane of monocytes and is rapidly endocytosed with ITGB3 upon inhibition

of this integrin. Dysferlin forms a complex with ITGB3 and focal adhesion components at the cell periphery. Moreover, our data indicate that in the absence of dysferlin the regulation of fibronectin binding integrins is disturbed. Dysferlin depletion further enhances the increase in ITGB3 expression. This results in attenuated differentiation and adhesion of these cells, which mimics the loss of adhesion observed in dysferlin depleted HUVEC cells²⁴. In dysferlinopathy macrophages this reveals itself as increased cell motility. Interestingly, monocytes expressing ITGB3 show increased motility²⁶ compared to cells without ITGB3.

During the recruitment of mononuclear cells to inflamed tissue, these cells first need to adhere to the endothelial cell and start the process of rolling. They subsequently transmigrate through the endothelial cell layer. And finally, they migrate through the tissue to participate in phagocytosis of apoptotic cells. The attachment of circulating monocytes to endothelial cells is in part mediated by integrins that bind to endothelial VCAM molecules and thereby induce tight interaction between the two cell types²⁷. Such cell-cell interactions generally increase the levels of integrin expression¹⁵ by positive feedback, thereby gradually increasing adherence to facilitate subsequent transmigration.

Our data suggest that dysferlin-depleted THP1 cells adhere less efficiently, but nevertheless increase expression of integrins. Integrins can be activated by outside-in and by inside-out signaling. Outside-in signaling refers to the process where integrins are activated through adhesion and trigger signaling cascades in the cells. Inside-out signaling denotes relocation of integrins during for instance motility to provide direction¹⁵. Via outside-in signaling, integrins can affect Erk, JNK and PKB and thereby affect gene expression¹⁵. Moreover, cells have numerous

feedback mechanisms that link expression of different adhesion proteins. For example, monocyte cell adhesion results in increase levels of fibronectin²⁸. Moreover, such feedback loops can be negative, as integrin $\alpha V\beta 6$ can compensate for the loss of ITGB1^{29,30}. Therefore the increased integrin mRNA expression in the absence of dysferlin may be explained as a compensatory mechanism. In muscle similar negative feedback loops have been described for dysferlin. Dysferlin deficient muscle cells produce increased amounts of IL1 β ¹⁰ and thrombospondin¹¹ suggesting that dysferlin inhibits expression of these proteins.

When comparing the mRNA expression levels in dysferlinopathy patient monocytes with dysferlin depleted THP1 cells, the deregulated expression of ITGB1 is consistent, contrary to ITGB3. However, cross-talk between integrins is common and has been reported between ITGB1 and ITGB3 in monocytes. ITGB1 ($\alpha 5\beta 1$) is regulated by ITGB3 ($\alpha V\beta 3$) in phagocytosis experiments³¹. Crosstalk between $\alpha V\beta 3$ and $\alpha 4\beta 1$ regulates monocyte migration on VCAM1³². Such crosstalk might explain the apparent discrepancy of the mRNA expression data.

We observed that dysferlin and ITGB3 trafficking is co-regulated. This is consistent with dysferlin's role in the transport of the adhesion protein PECAM in endothelium²⁴. Moreover, the fact that focal adhesion components are identified in the dysferlin protein complex in both monocytes and myoblasts suggest parallels in dysferlin function between these cells. Indeed, the process of phagocytosis has been implicated to be analogous to endocytosis, and both processes require coordinated restructuring of cell membrane and the cortical actin based cytoskeleton. Interestingly, ITGB1 and ITGB3 are involved in phagocytosis of both apoptotic cells and fibronectin

coated beads by monocytes³³. Moreover, fibronectin is used by monocytes for opsonization and enables ITGB1 dependent phagocytosis³⁴. This suggests that the disturbed LGMD2B monocyte phagocytosis behavior might be explained by a specific subset of fibronectin binding integrins. An intriguing model would be that dysferlin deficient monocytes show increased integrin endocytosis. Given the parallels between endocytosis and phagocytosis, this might translate into the increased phagocytotic behavior that was shown in LGMD2B monocytes¹³. It is tempting to hypothesize that the integrin deregulation also results in a modified phagocytotic response. This would open the way for a potential immunomodulatory treatment of dysferlinopathy, and such immunotherapies aimed at integrins are currently being investigated for other diseases^{35,36}.

Though recent studies provided evidence that the cause of the pathology in dysferlin deficient mouse models is intrinsic to the skeletal muscle tissue^{37,38} the role of the immune component was unclear. It was suggested that the inflammation aggravates the disease³⁷. Chiu et al reported that in dysferlin deficient mouse muscle tissue, monocytes arrive later after noxin induced myofiber damage⁹. This was explained by a deregulated communication from the myofibers to recruit the monocytes⁹. Our data however provide an additional explanation. In the absence of dysferlin the monocytes and macrophages show strongly reduced adhesion and increased motility, which would also negatively influence the infiltration.

In summary, we have identified a potential involvement of dysferlin in cellular adhesion and thereby a potential mechanism for the deregulation of dysferlin deficient immune cells.

Methods and materials

Cell isolation and culture

THP1 cells were grown at 37°C and 5% CO₂ in RPMI medium supplemented with 1% L-glutamine and 10% FCS (all Gibco). PBMCs were isolated by a Ficoll gradient. CD3-positive T-cells, CD14-positive monocytes and CDx-positive B-cells were subsequently isolated with antibody-coated magnetic beads (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. Cells were counted and resuspended in RPMI medium for further experiments. Monocytes were in vitro differentiated according to protocol³⁹, using established cytokine cocktails. Differentiation was monitored by FACS analysis of reported surface markers (CD11b, or ITGAM).

Antibodies and reagents

THP1 cells were differentiated by the addition of PMA (sigma) at 20nM to the culture medium. Cells were differentiated for 3-5 days for further experiments.

The following matrixes were used in this study: Fibronectin, rat collagen, poly L-lysine. Matrix compounds were dissolved 1;30 in PBS, incubated on plastic 6-well plates at 37°C for 2h, washed with PBS. Adhesion was monitored by light microscopy (bright field).

The following antibodies were used in this study: MaDYSF (1;300 for western and immunofluorescence, hamlet, Novocastra), RaAHNAK (KIS, gift of dr. J. Baudier), MaITGB3 (1;10,000, R&D), MaITGB1 (1;10,000, gift of WJ Pannekoek), GaPARVB (1;1,000, Santa Cruz), MaVINC (1;5,000 Sigma), MaACTN3 (1;5,000 Sigma).

Western blot detection

Cells were counted, dissolved in sample buffer and boiled for 10 min. Resulting protein homogenates were separated on SDS-page gels and transferred onto nitrocellulose (for AHNAK) or PVDF membranes. Protein loading was

standardized to cell count and monitored with Ponceau S staining of the blot directly after transfer. After antibody detection blots were analyzed with an Odyssey scanner (Licor).

RNA isolation and cDNA synthesis
RNA was extracted with a RNA extraction kit (Macherey-Nagel) according to manufacturer's protocol. Subsequent cDNA synthesis was performed with a kit and random hexamer primers (Fermentas) according to manufacturer's instructions. 1µg RNA was used as input for cDNA reactions.

Quantitative RT-PCR

All primers were designed with the web tool Primer3 (URL), with mispriming against human database. Quantitative PCR reactions were performed with SYBRgreen, in 15µl reaction volume with 3ng cDNA input. Primer sequences are in Table S1, All primers had comparable efficiencies between 95% and 105%. All measurements were performed in triplo. For statistical analysis was performed according to the method Pfaffl⁴⁰. GAPDH was used as a reference gene.

DNA plasmids and transfection

The following shRNA plasmids out of the Sigma Mission shRNA library were used in this study: non-target SHC002, and Dysferlin TRCN0000000967. The Dysferlin shRNA was validated by co-expression with Dysferlin expression vector.

10⁶ THP1 cells were washed in PBS and dissolved in nucleofactor buffer V. 0.5µg DNA plasmid was added. Transfection was achieved by electroporation with an Amaxa Nucleofactor device. Transfected cells were resuspended in culture medium.

Immunostaining

Differentiated THP1 cells were fixed in formalin solution for 10 min, following by permeabilization in 0.3% Triton (Sigma) for 5 min. Cells were washed,

blocked in 1% BSA (Sigma) for 10 min, and incubated with 1st antibody 2h RT. Cells were subsequently washed 3x and incubated with 2nd antibody for 1h RT. Cells were washed in PBS and mounted onto slides with AquaPolymount supplemented with DAPI).

For the visualization of the very transient focal adhesions we used CSK buffer. THP1 cells were differentiated at coverslips for >3days using PMA. Cells were fixed with fresh CSK buffer (0.3% Triton, 10mM Pipes pH 7.0, 50mM KCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 300mM sucrose, 4% paraformaldehyde) for 15min. This treatment washed out all of the soluble cell components but fixes the cytoskeletal parts including the focal adhesions. The coverslips were subsequently washed 2x in PBS and blocked with 1% BSA in PBS for >10 min. Next the coverslips were stained with the antibodies as mentioned above.

For the endocytosis assays, cells were incubated for 1h on ice with ITGB3 antibody at 1;10,000. Non-bound antibody was washed of with PBS, and fresh medium was added. Cells were cultured at 37°C for 1h. Endocytosis was stopped by putting the cells on ice. Surface antibody was washed of with 0.2 mM glycine (pH 2.5). Next cells were prepared as otherwise. As a control, cells were analyzed directly after antibody incubation, confirming that all surface-bound antibody could be washed of by the glycine treatment (not shown).

To inhibit the Integrins differentiated THP1 cells were incubated in 1µg/ml GRGDS (Sigma), or a control peptide (SDGRG, Sigma). For the ITGB3 stimulation cells were incubated with ITGB3 antibody at 37°C.

Immunoprecipitation

To obtain total cell lysates differentiated THP1 cells were lysed by scraping in triton buffer (50mM TrisHCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.2% Triton X100, 1x protease inhibitor cocktail (Roche)) after a PBS wash. Cultured cells were

prepared freshly by washing in PBS and lysed by scraping on ice in lysis buffer. All homogenates were spun down at maximum speed, 4°C, 20 min. To generate subcellular fractions, differentiated THP1 cells were trypsinized and washed with PBS. The pellet was lysed in sucrose buffer (320 mM Sucrose, 5 mM HEPES (pH 7.4), 5 mM EDTA, 2x Protease inhibitor cocktail) with a dounce homogenizer. Lysates were spun down subsequently at 1,000g (P1, containing insoluble debris), 10,000g (P2, containing mitochondria and peroxisomes) and 100,000g (P3, enriched for cell membrane, endoplasmic reticulum and vesicles (microsomes)). Pellet fractions were dissolved in triton buffer for further immunoprecipitations. Protein A sepharose CL-4B (GE Healthcare) was washed 3x in lysisbuffer and used to preclear the homogenates for 1h, at 4°C tumbling. Sepharose was removed and antibody added (50µg HCAb) for O/N incubation at 4°C, tumbling. Thereafter washed sepharose was added and incubated for 2h, 4°C, tumbling). Homogenates were spun down at 500g and supernatant stored as non-bound fraction. The sepharose was washed 5x 3x short, 2x long (>20min tumbling at 4°C). Finally, all fluid was removed and protein eluted by boiling in sample buffer.

Macrophages culture and video and immunocytochemistry

Blood samples from 5 patients and 5 healthy controls were extracted using vacutainer CPT tubes (Becton Dickinson, Basel, Switzerland). CD14+ monocytic cells were separated using the negative selection purple EasySep cell selection system (Stemcell technologies, Grenoble, France). Monocytes were differentiated into macrophages during 6 days in culture media based on RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 1% glutamine, 1% sodium pyruvate, penicillin-streptomycin and fungizone and amino acids in poly-D-

lysinprecoatedLumox plates (Sartedt, Nümbrecht, Germany).

Macrophages were filmed in a Laser Scanning Confocal Inverted Microscope Leica TCS SP5-AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) during 18h at 37°C and 5% CO₂. The videos were analyzed using Leica LAS AF software. (I analyzed all cells, even those that went out of the screen, as I express the motility as µm/h). In the end we were able to gather data on 29 macrophages from 5 dysferlinopathy patients and 17 macrophages from 5 controls. The distance ran by each studied cell was measured every 30 minutes. Comparison between control macrophages and dysferlin-negative macrophages was performed using a student t-test.

To determine the purity of macrophage cultures cells were fixed in cold methanol for 10 minutes at 4°C and blocked with Tris buffer saline supplemented with 1% BSA, 1% normal human serum, 0.5% donkey serum and 0.01% Triton X100. A primary monoclonal antibody to CD68 (Dako, Glostrup, Denmark) was incubated for 2h at room temperature and labeled with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad CA).

Acknowledgements

We thank dr. J. Baudier for the KIS AHNAK antibody and dr. W.J. Pannekoek for the ITGB1 and Paxilin antibodies and for help with the focal adhesion stainings. This study was funded by the Jain Foundation.

Bibliography

- 1 Bashir, R. et al. A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20, 37-42, doi:10.1038/1689 (1998).
- 2 Matsuda, C. et al. Dysferlin is a surface membrane-associated protein that is absent in Miyoshi

- myopathy. *Neurology*53, 1119-1122 (1999).
- 3 Illa, I. et al. Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol*49, 130-134 (2001).
- 4 Gallardo, E. et al. Inflammation in dysferlin myopathy: immunohistochemical characterization of 13 patients. *Neurology*57, 2136-2138 (2001).
- 5 Anderson, L. V. et al. Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Hum Mol Genet*8, 855-861, doi:ddc087 [pii] (1999).
- 6 De Luna, N., Gallardo, E. & Illa, I. In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol*63, 1104-1113 (2004).
- 7 De Luna, N. et al. Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord*17, 69-76, doi:S0960-8966(06)00538-4 [pii] 10.1016/j.nmd.2006.09.006 (2007).
- 8 Gallardo, E. et al. Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy. *PLoS One*6, e29061, doi:10.1371/journal.pone.0029061 PONE-D-11-11232 [pii] (2011).
- 9 Chiu, Y. H. et al. Attenuated muscle regeneration is a key factor in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*18, 1976-1989, doi:ddp121 [pii] 10.1093/hmg/ddp121 (2009).
- 10 Rawat, R. et al. Inflammasome up-regulation and activation in dysferlin-deficient skeletal muscle. *Am J Pathol*176, 2891-2900, doi:S0002-9440(10)60810-3 [pii] 10.2353/ajpath.2010.090058 (2010).
- 11 De Luna, N. et al. Role of thrombospondin 1 in macrophage inflammation in dysferlin myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*69, 643-653, doi:10.1097/NEN.0b013e3181e0d01c (2010).
- 12 Roche, J. A. et al. Extensive mononuclear infiltration and myogenesis characterize recovery of dysferlin-null skeletal muscle from contraction-induced injuries. *Am J Physiol Cell Physiol*298, C298-312, doi:ajpcell.00122.2009 [pii] 10.1152/ajpcell.00122.2009 (2010).
- 13 Nagaraju, K. et al. Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *Am J Pathol*172, 774-785, doi:S0002-9440(10)61839-1 [pii]10.2353/ajpath.2008.070327 (2008).
- 14 de Morree, A. et al. Proteomic analysis of the dysferlin protein complex unveils its importance for sarcolemmal maintenance and integrity. *PLoS One*5, e13854, doi:10.1371/journal.pone.0013854 (2010).
- 15 Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*110, 673-687 (2002).
- 16 Chattopadhyay, N., Wang, Z., Ashman, L. K., Brady-Kalnay, S. M. & Kreidberg, J. A. alpha3beta1 integrin-CD151, a component of the cadherin-catenin complex, regulates PTPmu expression and cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology*163, 1351-1362,

- doi:10.1083/jcb.200306067 (2003).
- 17 Huang, Y. et al. AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB J*21, 732-742, doi: fj.06-6628com [pii] 10.1096/fj.06-6628com (2007).
- 18 Bansal, D. et al. Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy. *Nature*423, 168-172, doi:10.1038/nature01573 nature01573 [pii] (2003).
- 19 Matsuda, C. et al. Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol*64, 334-340 (2005).
- 20 Davis, D. M. Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes. *Nature reviews. Immunology*9, 543-555, doi:10.1038/nri2602 (2009).
- 21 Benaud, C. et al. AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol*164, 133-144, doi:10.1083/jcb.200307098 jcb.200307098 [pii] (2004).
- 22 Salim, C., Boxberg, Y. V., Alterio, J., Fereol, S. & Nothias, F. The giant protein AHNAK involved in morphogenesis and laminin substrate adhesion of myelinating Schwann cells. *Glia*57, 535-549, doi:10.1002/glia.20782 (2009).
- 23 Huang, Y. et al. Protein studies in dysferlinopathy patients using llama-derived antibody fragments selected by phage display. *Eur J Hum Genet*13, 721-730, doi:5201414 [pii] 10.1038/sj.ejhg.5201414 (2005).
- 24 Sharma, A. et al. A new role for the muscle repair protein dysferlin in endothelial cell adhesion and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*30, 2196-2204, doi:ATVBAHA.110.208108 [pii] 10.1161/ATVBAHA.110.208108 (2010).
- 25 Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*12, 697-715, doi:10.1146/annurev.cellbio.12.1.697 (1996).
- 26 Weerasinghe, D. et al. A role for the alphavbeta3 integrin in the transmigration of monocytes. *The Journal of cell biology*142, 595-607 (1998).
- 27 Imhof, B. A. & Aurrand-Lions, M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature reviews. Immunology*4, 432-444, doi:10.1038/nri1375 (2004).
- 28 Thomas-Ecker, S. et al. Alteration in the gene expression pattern of primary monocytes after adhesion to endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*104, 5539-5544, doi:10.1073/pnas.0700732104 (2007).
- 29 Raghavan, S., Bauer, C., Mundschau, G., Li, Q. & Fuchs, E. Conditional ablation of beta1 integrin in skin. Severe defects in epidermal proliferation, basement membrane formation, and hair follicle invagination. *The Journal of cell biology*150, 1149-1160 (2000).
- 30 Raghavan, S., Vaezi, A. & Fuchs, E. A role for alphabeta1 integrins in focal adhesion function and polarized cytoskeletal dynamics. *Developmental cell*5, 415-427 (2003).
- 31 Blystone, S. D., Graham, I. L., Lindberg, F. P. & Brown, E. J. Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive

- and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *The Journal of cell biology* 127, 1129-1137 (1994).
- 32 Imhof, B. A. et al. Cross talk between alpha(v)beta3 and alpha4beta1 integrins regulates lymphocyte migration on vascular cell adhesion molecule 1. *European journal of immunology* 27, 3242-3252, doi: 10.1002/eji.1830271223 (1997).
- 33 Dupuy, A. G. & Caron, E. Integrin-dependent phagocytosis: spreading from microadhesion to new concepts. *Journal of cell science* 121, 1773-1783, doi: 10.1242/jcs.018036 (2008).
- 34 Vernon-Wilson, E. F., Aurade, F. & Brown, S. B. CD31 promotes beta1 integrin-dependent engulfment of apoptotic Jurkat T lymphocytes opsonized for phagocytosis by fibronectin. *Journal of leukocyte biology* 79, 1260-1267, doi: 10.1189/jlb.1005571 (2006).
- 35 Gottlieb, A. et al. Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 42, 428-435 (2000).
- 36 Jackson, D. Y. Alpha 4 integrin antagonists. *Current pharmaceutical design* 8, 1229-1253 (2002).
- 37 Lostal, W. et al. Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet* 19, 1897-1907, doi: ddq065 [pii] 10.1093/hmg/ddq065 (2010).
- 38 Millay, D. P. et al. Genetic manipulation of dysferlin expression in skeletal muscle: novel insights into muscular dystrophy. *Am J Pathol* 175, 1817-1823, doi: S0002-9440(10)60693-1 [pii] 10.2353/ajpath.2009.090107 (2009).
- 39 Xu, W. et al. IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* 107, 4930-4937, doi: 10.1182/blood-2005-10-4144 (2006).
- 40 Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* 29, e45 (2001).
- 41 de Morree, A. et al. Self-regulated alternative splicing at the AHNAK locus. *FASEB J* 26, 93-103, doi: fj.11-187971 [pii] 10.1096/fj.11-187971 (2012).

Figures and Legends

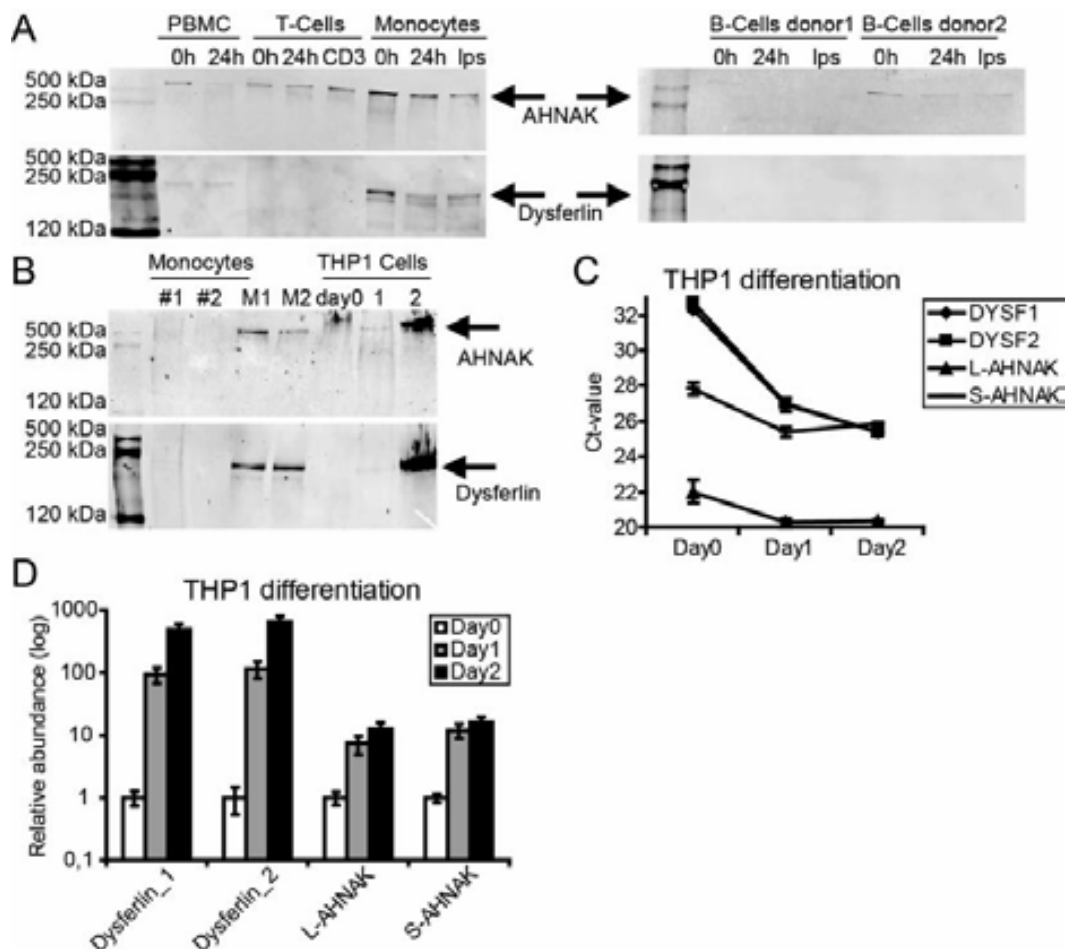


Figure 1: Dysferlin is expressed in monocytes and THP1 cells, and increases with differentiation. A) Fresh PBMCs were isolated from a healthy donor. CD3-positive T-cells, CD14-positive monocytes and CD19-positive B-cells (right panel) were subsequently isolated from this cell population. Cells were analyzed freshly, or cultured for 24h in culture medium, in the presence or absence of T-cell activation aCD3 antibody, to investigate the effect on protein expression. Cells were dissolved in sample buffer and analyzed on western blot for AHNAK and dysferlin levels. Arrows denote the protein bands. For the dysferlin-negative B-cells two different donors are shown. B) Monocytes were differentiated in vitro to M1 and M2 macrophages and analyzed on western blot for AHNAK and dysferlin. Less protein was loaded compared to the previous panel. Additionally, the THP1 cell model was differentiated to a macrophage-like phenotype and similarly analyzed. Arrows denote the protein bands. C) Quantitative RT-PCR was performed on differentiating THP1 cells to confirm the increase in expression on RNA levels. Uncorrected Ct-values confirm the increased expression of dysferlin in differentiating THP1 cells. Two different primer sets were used to measure dysferlin mRNA. Both the small and the long isoform of AHNAK were assayed⁴¹. D) Ct-values were standardized to GAPDH. Relative expression levels are shown. Error bars reflect relative standard deviation.

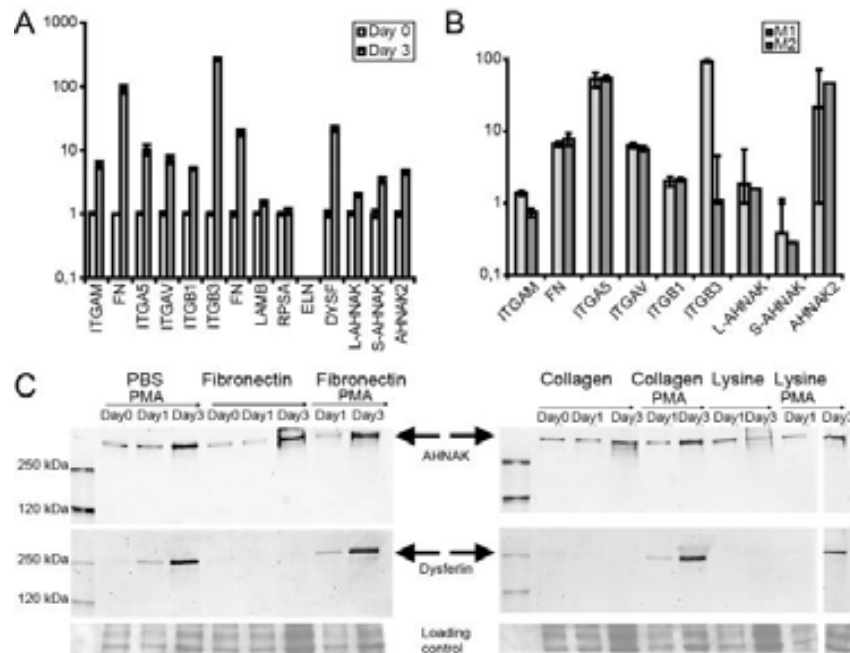


Figure 2: Dysferlin expression is insensitive to cell adhesion. A+B) Quantitative RT-PCR shows selective increased expression of fibronectin and fibronectin-binding integrins upon differentiation of THP1 cells (A) and in vitro differentiated macrophages (B). Values were standardized to GAPDH. In B) monocyte expression levels were set to 1. C) THP1 cells were seeded on different protein matrices and dysferlin protein expression was analyzed by western blot. Dysferlin increases only upon differentiation (induced by PMA addition). AHNAK increases in response to fibronectin adhesion. Arrows denote the AHNAK and dysferlin protein bands.

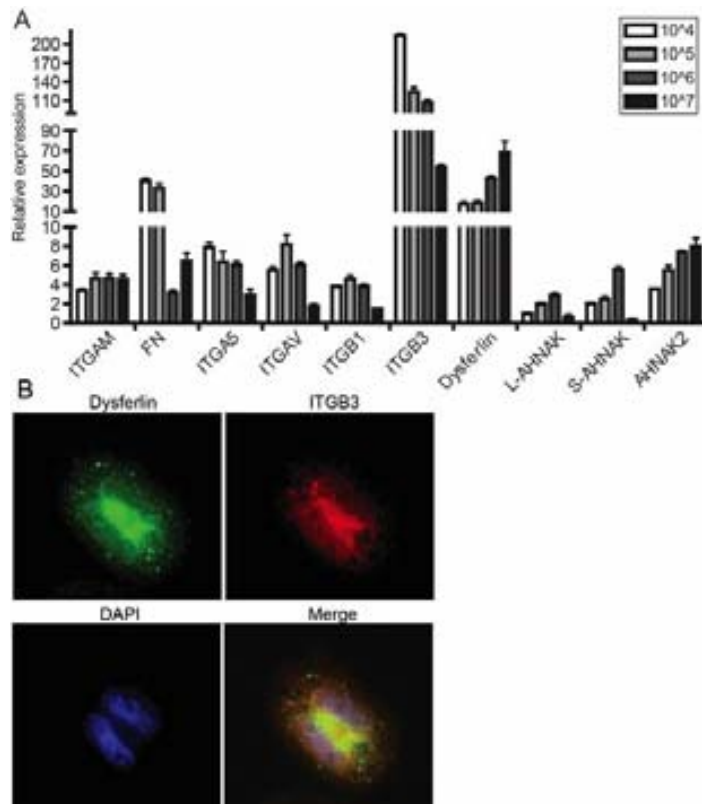


Figure 3: Dysferlin expression is sensitive to cell-cell contact formation. A) THP1 cells were differentiated at different cell densities, and after three days RNA expression was determined by quantitative RT-PCR. Values were standardized to GAPDH. B) Differentiated THP1 cells were stained for dysferlin (green) and ITGb3 (red). Nuclei are stained in blue (DAPI). Dysferlin and ITGb3 accumulate in between the two nuclei.

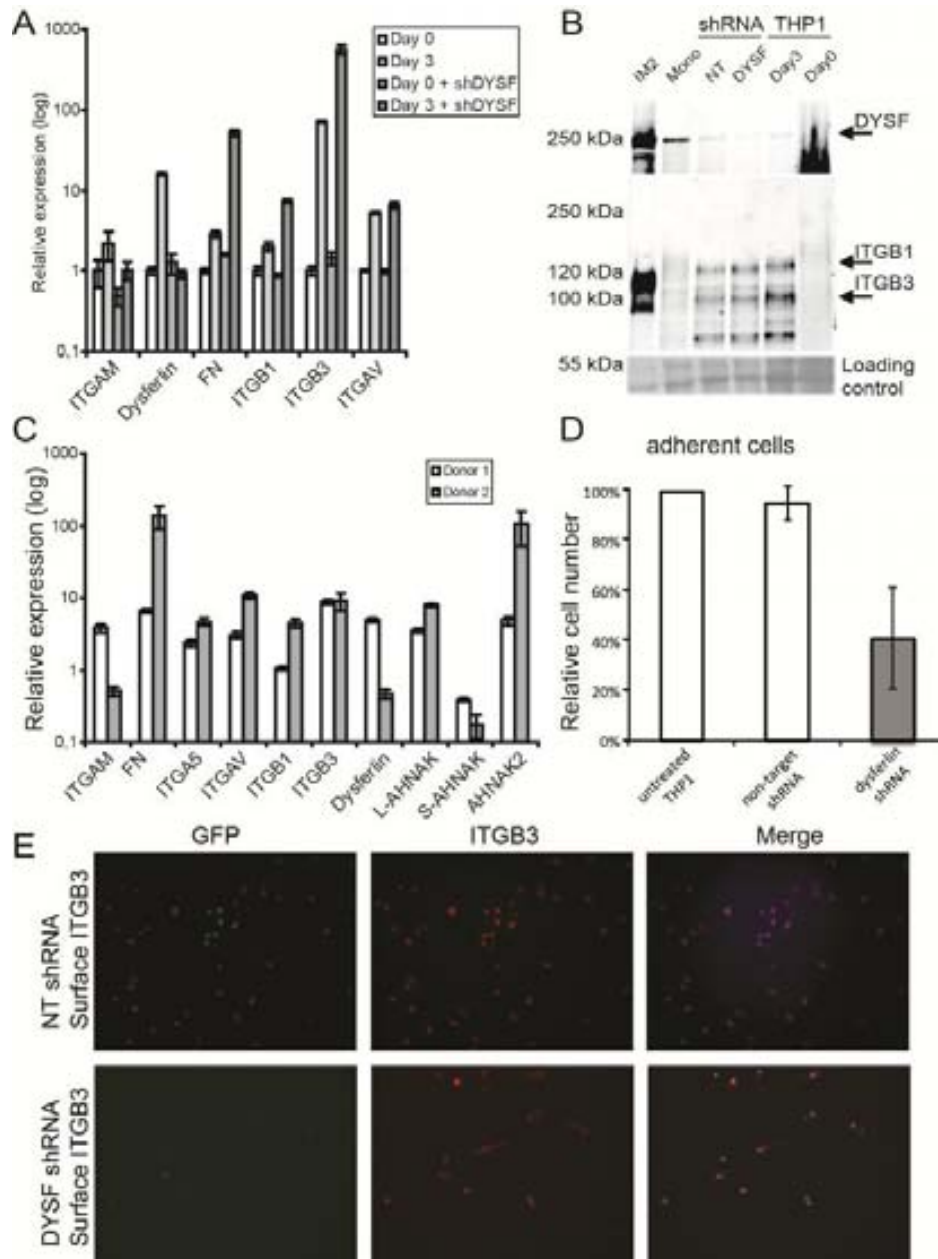


Figure 4: Dysferlin depletion results in deregulated Integrin expression and decreased cell adhesion. A) transient shRNA mediated knockdown of dysferlin further upregulates ITB3 mRNA expression, but not ITGAM. B) A concomitant western blot shows only a minor increase in protein level. C) Freshly isolated monocytes from an LGMD2B patient and a healthy matched control donor were analyzed for RNA expression levels. ITGB3 is similarly deregulated in the patient. Monocyte expression values were set to 100%. D+E) THP1 cells were transfected with a dysferlin targeting shRNA plasmid, a non-target shRNA plasmid, or mock and differentiated for four days. After four days cells adherent cells were counted (D) and stained for surface ITGB3 (E). In the absence of dysferlin cell adhesion is strongly reduced. There is no difference in the level of surface ITGB3 in the adherent cells.

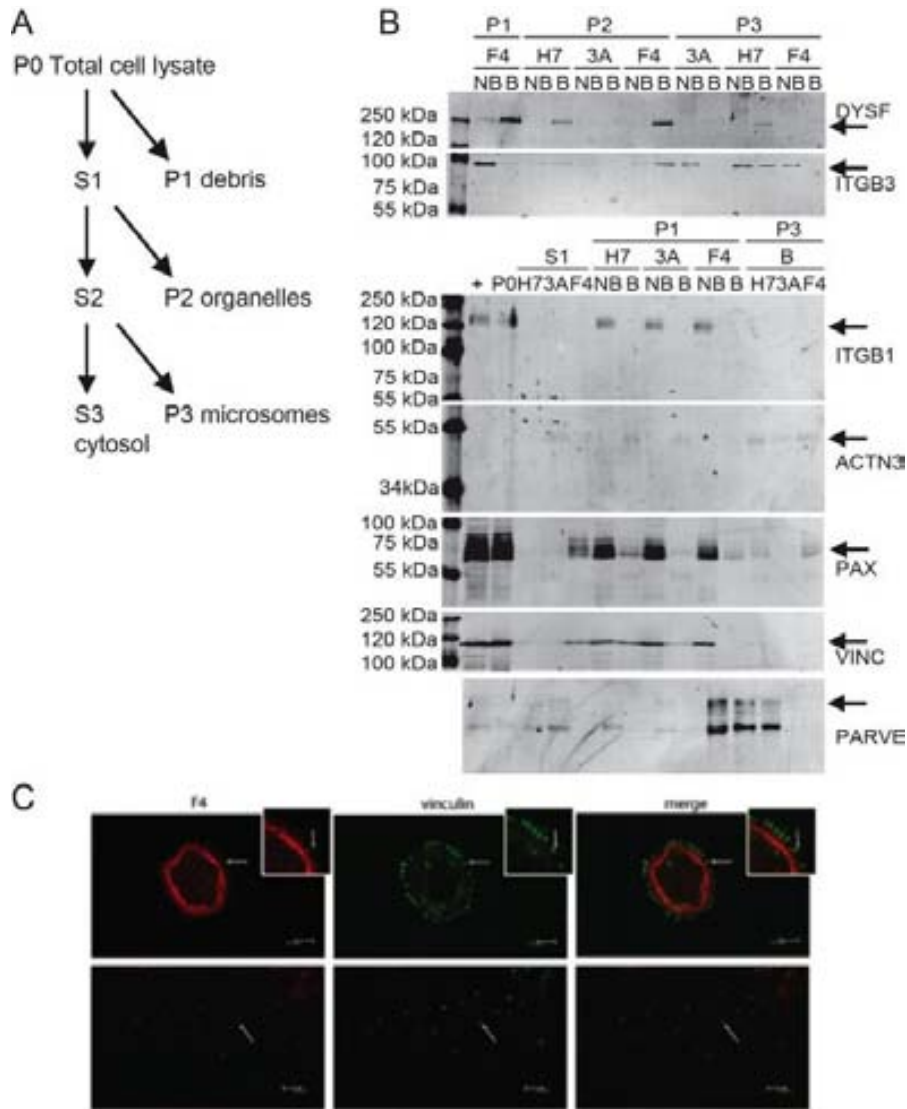


Figure 5: ITGb3 and focal adhesion components co-immunoprecipitate with Dysferlin. Differentiated THP1 cells were lysed in a sucrose buffer, fractionated and subjected to an immunoprecipitation (IP) protocol with HCAb against dysferlin (F4 and H7) or non-specific control HCAb (3A). Bound (B) and non-bound (NB) fractions were analyzed on western blot for dysferlin and Focal complex proteins. A) P1 (1,000g) contains the insoluble fraction, P2 (10,000g) is enriched for heavy organelles such as mitochondria and nuclei. P3 (100,000g) is enriched for microsomes and contains cell membrane and vesicles. B) IP fractions were analyzed for dysferlin and ITGB3 levels (upper blot), ITGB1, ACTN3, PAX, VINC and the described interaction partner PARVB (lower blot). Contrary to ITGB1, ITGB3 co-immunoprecipitates from the P3 fraction, containing microsomes (H7 Bound). This same IP sample also contains ACTN3, PAX, and PARVB, suggesting complete focal complexes co-immunoprecipitate with dysferlin. C) Co-immunostaining of the focal adhesion protein vinculin with dysferlin. Two representative cells are shown. The cell in the lower panels is completely removed by the CSK buffer and only the focal adhesions remain. The cell in the upper panels has some membraneous and cytoskeletal parts remaining. The arrows point to the enhanced part.

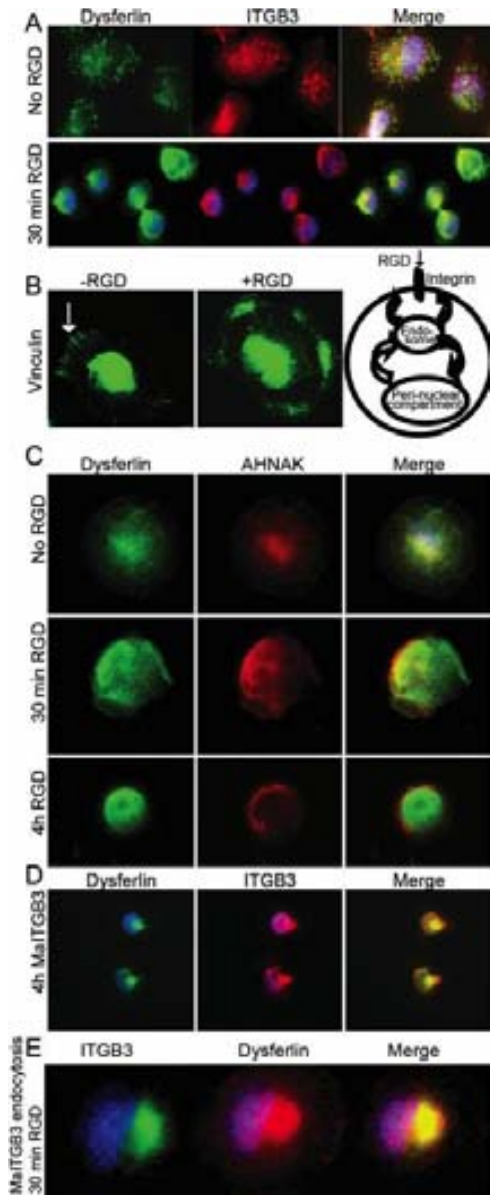


Figure 6: Dysferlin and integrin $\beta 3$ (ITGB3) are endocytosed in response to the Integrin inhibiting peptide RGD. A) Differentiated THP1 cells were incubated 30 min with an integrin binding peptide (RGD). Cells were stained for dysferlin and ITGB3. Prior to RGD stimulus there is no apparent colocalization between dysferlin and ITGB3. Both proteins show a dotted intracellular localization reminiscent of endosomes. Upon stimulation both proteins accumulate in an intracellular compartment. B) A schematic model of integrin trafficking and RGD stimulus. RGD prevent the integrins from binding to the extracellular matrix and thereby stimulate endocytosis. C) As in A) but now the cells were stained for dysferlin and AHNAK. Only dysferlin is recruited intracellularly. In the control situation cells were incubated with a control peptide containing the inverse amino acid sequence (SDGRG), which does not bind integrins. D) Differentiated THP1 cells were incubated with a monoclonal ITGB3 antibody and stained for dysferlin and ITGB3. Both proteins are recruited to a perinuclear compartment. E) Integrin $\beta 3$ is endocytosed upon RGD stimulus. Differentiated THP1 cells were incubated with MalITGB3 at 4°C for 1h. Cells were washed and incubated 30 min at 37°C with RGD. Surface-bound antibody was removed with glycine and cells were stained for internalized ITGB3 and dysferlin. Both proteins accumulate at the perinuclear storage compartment, indicating that ITGB3 is endocytosed.

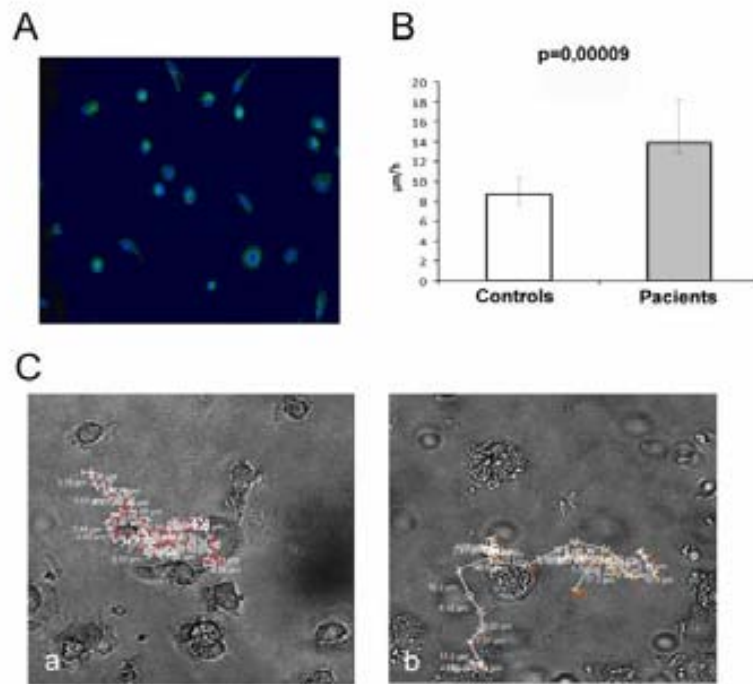


Figure 7: LGMD2B monocytes move faster than control cells. A) Macrophage culture stained with DAPI and the macrophage marker CD68. B) Graphic representation of average velocity and standard deviation in $\mu\text{m}/\text{h}$ of healthy macrophages (controls) and dysferlin-null macrophages (patients) ($p=0.00009$). C) Pictures of the 18h tracking drawn by control macrophages (a) and dysferlin-null macrophages (b).

Article publicat en el transcurs de la tesi doctoral que inclou resultats relacionats amb el projecte de la tesi però que no formen part d'aquesta

PLoS One. 2011;6(12):e29061. doi: 10.1371/journal.pone.0029061. Epub 2011 Dec 16.

Comparison of dysferlin expression in human skeletal muscle with that in monocytes for the diagnosis of dysferlin myopathy.

Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-García R, Gonzalez-Quereda L, Flix B, de Morrée A, van der Maarel S, Illa I.

Comparison of Dysferlin Expression in Human Skeletal Muscle with That in Monocytes for the Diagnosis of Dysferlin Myopathy

Eduard Gallardo^{1,9}, Noemi de Luna^{1,9}, Jordi Diaz-Manera¹, Ricardo Rojas-García¹, Lidia Gonzalez-Quereda², Bàrbara Flix¹, Antoine de Morrée³, Silvère van der Maarel³, Isabel Illa^{1*}

1 Servei de Neurologia, Laboratori de Malalties Neuromusculars, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma de Barcelona and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Barcelona, Spain, **2** Servei de Genètica, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Institut de Recerca de HSCSP, Universitat Autònoma and Centro de Investigación en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain, **3** Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

Abstract

Background: Dysferlinopathies are caused by mutations in the dysferlin gene (*DYSF*). Diagnosis is complex due to the high clinical variability of the disease and because dysferlin expression in the muscle biopsy may be secondarily reduced due to a primary defect in some other gene. Dysferlin is also expressed in peripheral blood monocytes (PBM). Studying dysferlin in monocytes is used for the diagnosis of dysferlin myopathies. The aim of the study was to determine whether dysferlin expression in PBM correlates with that in skeletal muscle.

Methodology/Principal Findings: Using western-blot (WB) we quantified dysferlin expression in PBM from 21 pathological controls with other myopathies in whom mutations in *DYSF* were excluded and from 17 patients who had dysferlinopathy and two mutations in *DYSF*. Results were compared with protein expression in muscle by WB and immunohistochemistry (IH). We found a good correlation between skeletal muscle and monocytes using WB. However, IH results were misleading because abnormal expression of dysferlin was also observed in 13/21 pathological controls.

Conclusions/Significance: The analysis of dysferlin protein expression in PBM is helpful when: 1) the skeletal muscle IH pattern is abnormal or 2) when muscle WB can not be performed either because muscle sample is lacking or insufficient or because the muscle biopsy is taken from a muscle at an end-stage and it mainly consists of fat and fibrotic tissue.

Citation: Gallardo E, de Luna N, Diaz-Manera J, Rojas-García R, Gonzalez-Quereda L, et al. (2011) Comparison of Dysferlin Expression in Human Skeletal Muscle with That in Monocytes for the Diagnosis of Dysferlin Myopathy. PLoS ONE 6(12): e29061. doi:10.1371/journal.pone.0029061

Editor: Markus Schuelke, Charité Universitätsmedizin Berlin, NeuroCure Clinical Research Center, Germany

Received: June 20, 2011; **Accepted:** November 20, 2011; **Published:** December 16, 2011

Copyright: © 2011 Gallardo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by research grants from the Fondo Investigación Sanitaria Instituto Carlos III: PI06/0455 (EG), PI09/1944 (EG) and EC07/90601 (II) and ETES 08/90622 (II), PI09/1964 (II), CIBERNED (II) and from the Fundación Isabel Gemio (II), the Jain Foundation (SM) and the Princess Beatrix Funds (WAR05-0112) (SM). The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: illa@santpau.cat

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Dysferlinopathy is a type of muscular dystrophy characterized by mutations in the *DYSF* gene [1,2]. It has a wide phenotypic variability that includes distal forms, such as Miyoshi myopathy (MM) and myopathy with onset in the distal anterior compartment of the legs (DACM), a proximal form known as limb girdle muscular dystrophy 2B (LGMD2B), and hyperCKemia [3,4,5,6,7,8,9]. A congenital form and an early-onset form have also been described [10]. In spite of the clinical variability, it has been observed that muscle MRI shows that both distal and proximal muscles are impaired from the onset of the disease in all phenotypes [11]. As well as in skeletal muscle, dysferlin is expressed in peripheral blood CD14⁺ monocytes (PBM), as reported in a series of 12 patients with MM or LGMD2B [12]. The findings from this latter study suggested that studying the

expression of dysferlin protein in these more accessible cells could be a reliable method to diagnose dysferlinopathies and a valid alternative to muscle biopsy. However, the expression of dysferlin in monocytes was not compared with that in skeletal muscle. Wein *et al* performed a flow cytometry study in a series of 6 patients with dysferlin myopathy and found that dysferlin expression in PBM differed between patients and controls, although the protocol would not allow quantification of dysferlin using the antibody NCL-Hamlet [13]. Furthermore, the authors did not compare the expression of dysferlin between blood and muscle. The present study was performed to assess whether there is a correlation between the expression of dysferlin in skeletal muscle and that in PBM. We analysed a large series of genetically characterized patients comparing the expression of dysferlin in skeletal muscle by immunohistochemistry (IH) and western blot (WB) with that in PBM.

Results

Dysferlin protein is expressed as a double band in PBM

WB analysis showed dysferlin was expressed as a double band in PBM. The molecular weight of the upper band corresponded to the single band expressed in skeletal muscle (234 kDa) and the lower band was approximately 8–10 kDa smaller. When monocytes were transfected with dysferlin siRNAs, the intensity of the two bands

decreased significantly. Control siRNAs (siMYOF and non-target siRNA) did not affect the protein levels of the doublet (Figure 1A). In immunoprecipitation studies using both F4 and H7 antibodies (Figure 1B) the doublet from PBM was pulled down (Figure 1C). When a control antibody against β -amyloid was used we observed the dysferlin doublet only in the non-bound fraction (Figure 1C). These results indicate that both bands correspond to dysferlin protein and support using both of them to quantify dysferlin in

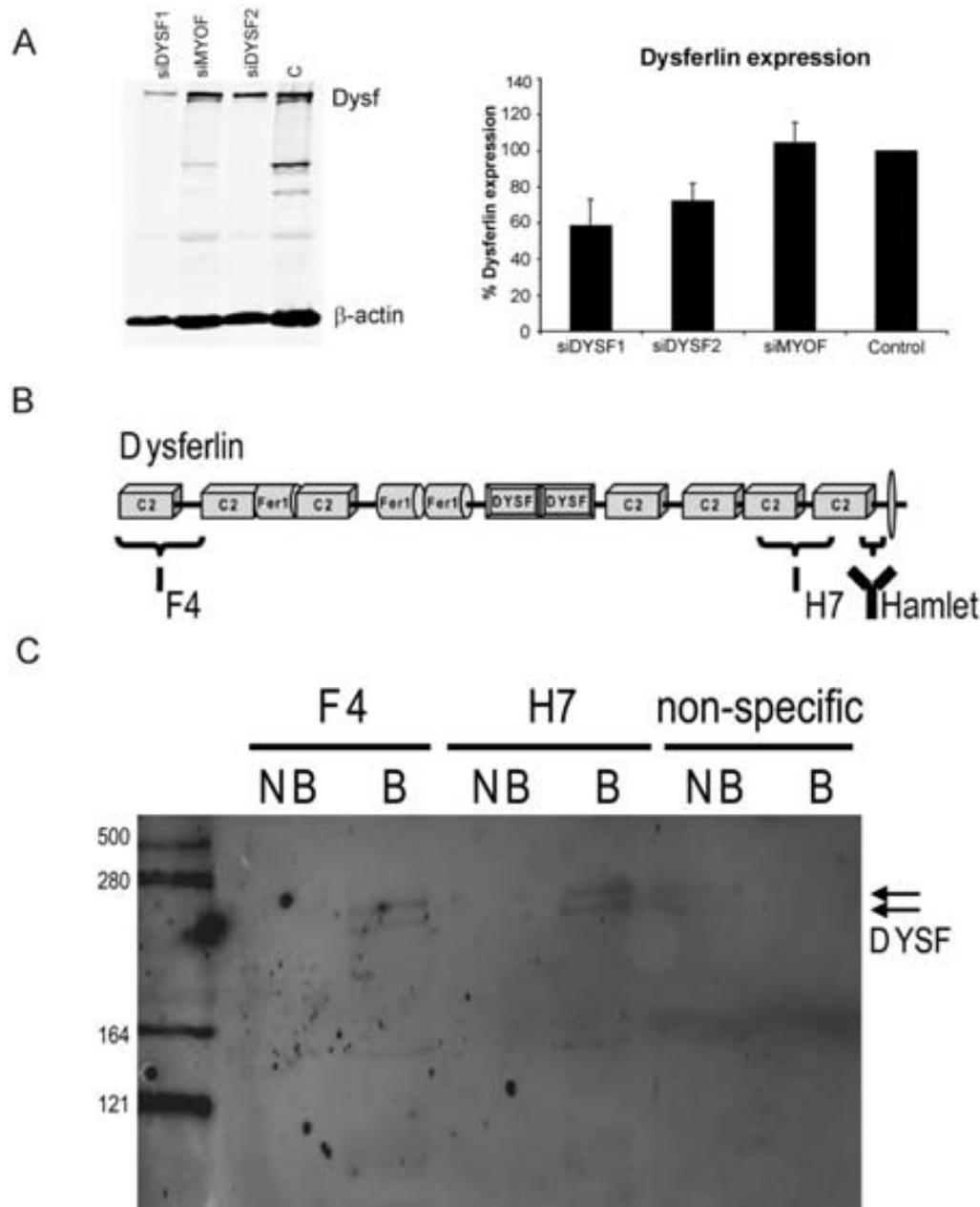


Figure 1. Characterization of the double band corresponding to dysferlin observed in CD14⁺ PBM by WB. A) Dysferlin siRNA efficiently reduced both dysferlin bands in PBM. Representative WB of monocytes from a healthy donor treated with siRNA showed that siDYSF efficiently reduced the two bands corresponding to dysferlin. On the right, quantification of WB from silenced monocyte samples, corresponding to four independent experiments, showed that when dysferlin was knocked down, levels diminished from 100% in Control (C) and 104.2 ± 11.3% in siMYOF to 58.4 ± 14.8% with siDYSF1 ($p < 0.05$) and 72.2 ± 9.8% with siDYSF2 ($p < 0.05$), error bars indicate standard deviation. B) Schematic overview of the dysferlin protein and the epitopes recognized by F4, H7 and Hamlet antibodies. The three affinity binders together cover the complete dysferlin protein sequence. C) Both F4 and H7 antibodies can immunoprecipitate the dysferlin doublet from PBM. Bound (B) and non-bound (NB) fractions were analyzed by WB for dysferlin. The arrow denotes the dysferlin doublet observed in the bound fraction using F4 and H7 and in the non-bound fraction using an antibody against β -amyloid. doi:10.1371/journal.pone.0029061.g001

PBM. In addition, in all patients with two mutations in *DYSF* in whom the monocytes test was performed both bands were absent.

Mutation analysis of *DYSF*

We found two mutations in all 17 patients (Table 1). In order to rule out the presence of two mutations in the same allele of *DYSF*, parents of patients P_1, P_2, P_4, P_14, P_15, P_16, P_17 (table 1) were analyzed and one of the familial mutations was found in each one. In P_6, P_9, P_11 and P_12 (Table 1) only one of the two mutations was found in their sons/daughters. In the remaining 6 patients (P_3, P_5, P_7, P_8, P_10 and P_13) (Table 1), DNA/RNA sample from relatives was not available [3].

The expression of dysferlin in monocytes correlated with that in skeletal muscle

In 21 cases with normal expression of dysferlin in PBM ($114.3 \pm 17.8\%$), skeletal muscle WB was also normal ($105 \pm 16.3\%$) (Figure 2A and Table 2).

We performed skeletal muscle WB in 17 dysferlinopathy patients and we found that dysferlin expression was $1.1 \pm 4.3\%$. Similar dysferlin levels of expression were found in PBM ($0.1 \pm 0.2\%$) (Figure 2B and Table 1). A WB of skeletal muscle and PBMs from 2 patients and 2 controls all loaded in the same gel was performed to confirm that primary deficiencies of dysferlin can be easily detected in PBMs (Figure S1).

Patients with abnormal dysferlin staining by IH showed normal levels of the protein by WB both in skeletal muscle and PBM (Figure 2C)(C_1 in Table 2).

We measured the expression of dysferlin in PBM by WB in the two previously reported symptomatic carriers [3]. The results were $37.9 \pm 3\%$ in monocytes and $36.3 \pm 12.2\%$ in muscle (Figure 2D).

An X-Y plot was performed to confirm the parallelism between dysferlin expression in PBM and in skeletal muscle (Figure 3).

We found absence of dysferlin staining in 11/17 patients with abnormal dysferlin expression in PBM (Figure 4B). The remaining 6 patients had some degree of dysferlin expression in muscle. Two

Table 1. Summary of dysferlin myopathy patients: Correlation with protein expression in PBM, skeletal muscle and mutations.

Patient	Sex	Age	Phenotype	PBM WB (%)	Muscle WB (%)	Muscle IH	Nucleotide change <i>DYSF</i> gene	Protein change
P_1	M	31	MM	0	0	Sarcoplasm granular pattern	c.5194G>T c.5999G>A	p.Glu1732X p.Arg2000Gln
P_2	M		MM	0	0	Absent	c.1555G>A c.1555G>A	p.Gly519Arg p.Gly519Arg
P_3	M	37	MM	0	0	Absent	c.5159delG c.5159delG	p.Arg1720LeufsX2 p.Arg1720LeufsX2
P_4	M	26	LGMD2B	0	0	Absent	c.5509G>A c.5903G>A	p.Asp1837Asn p.Trp1968X
P_5	F	27	LGMD2B	0	0.2	Absent	c.5979dupA c.5979dupA	p.Glu1994ArgfsX3 p.Glu1994ArgfsX3
P_6	F	38	LGMD2B	0	0	Absent	c.154T>C c.701G>A	p.Trp52Arg p.Gly234Glu
P_7	M	30	LGMD2B	0	0	Sarcoplasm granular pattern	c.2779delG c.4410+13T>G	p.Ala927LeufsX21
P_8	M	36	LGMD2B	0.9	1.5	Patchy sarcolemmal pattern	c.2055+1G>A c.3805G>T	p.Glu1269X
P_9	F	49	LGMD2B	0	0	Absent	c.4354C>A c.4354C>A	p.Pro1452Thr p.Pro1452Thr
P_10	F	63	LGMD2B	0	0	ABSENT	c.5525+3A>G c.5525+3A>G	
P_11	F	44	LGMD2B	0	0	Absent	c.5159delG c.5979dupA	p.Arg1720LeufsX2 p.Glu1994ArgfsX3
P_12	F	73	LGMD2B	0	0	Absent	c.2875C>T c.2875C>T	p.Arg959Trp p.Arg959Trp
P_13	M		MM	0	0	Patchy sarcolemmal pattern	c.4003G>A c.4003G>A	p.Glu1335Lys p.Glu1335Lys
P_14	F	28	DACM	0	0	Absent	c.5594delG c.5594delG	p.Gly1865AlafsX 101 p.Gly1865AlafsX 101
P_15	F	29	MM	0	18	Patchy sarcolemmal pattern	c.5979dupA c.9124C>T	p.Glu1994ArgfsX3 p.Arg2042Cys
P_16	M	17	LGMD2B	0	0	Sarcoplasm granular pattern	c.4882G>A c.4882G>A	p.Gly1628Arg p.Gly1628Arg
P_17	M	5	LGMD2B	0.2	0	Absent	c.2779delG c.2779delG	p.Ala927LeufsX21 p.Ala927LeufsX21

M- male; F- female; MM: Miyoshi myopathy; LGMD2B: limb girdle muscular dystrophy; DACM: Distal anterior compartment myopathy.

The mutations of patients P_1, P_2, P_4, P_5, P_6, P_10, P_13, P_14 [12,17], P_15 [8] and P_17 [26] have been previously described. The intronic mutation, c.4410+13T>G, of P_7 has been previously described in the Leyden Muscular Dystrophy web page (www.dmd.nl) (Accession number used NM_003494.2).

doi:10.1371/journal.pone.0029061.t001

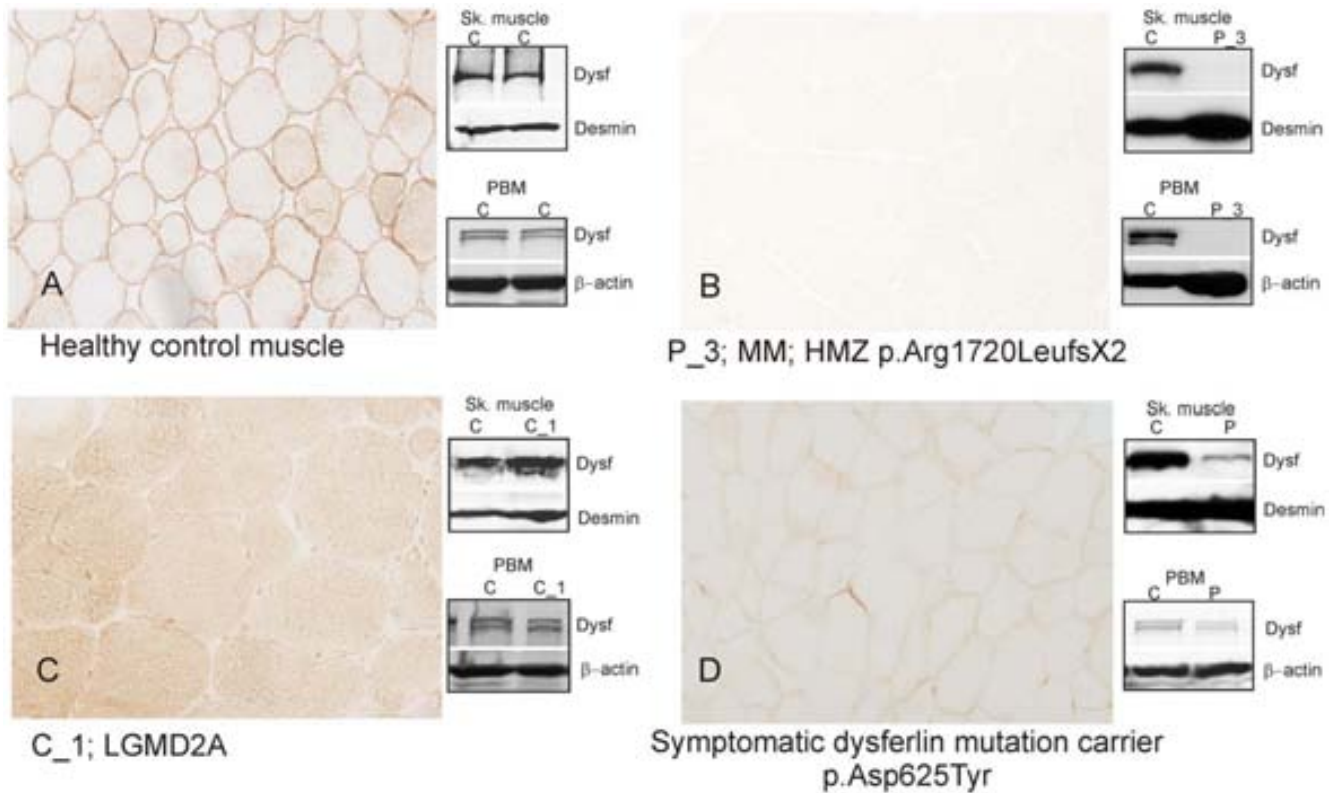


Figure 2. Correlation between dysferlin expression in skeletal muscle, detected by IH and WB, and WB of PBM. A) Healthy control with normal expression of dysferlin in PBM: Dysferlin is expressed in the sarcolemma of muscle fibres. WB of skeletal muscle and PBM showed normal levels of dysferlin. B) Dysferlinopathy patient (P_3): Dysferlin is absent in sarcolemma by IH, WB and in PBM. C) Patient with LGMD2A (C_1) showing abnormal expression of dysferlin in skeletal muscle by IH but normal levels in skeletal muscle and PBM WB. D) Symptomatic carrier of one mutation in *DYSF*: muscle IH and WB show reduced expression that was confirmed in PBM. HMZ: homozygous. doi:10.1371/journal.pone.0029061.g002

patterns were identified: i) a sarcoplasm granular pattern in scattered fibres in 3/6 (P_1, P_7, P_16) (Figure 4D); and ii) markedly reduced but unequivocal patchy sarcolemmal expression in 3/6 (P_8, P_13 and P15) (Figure 4F). Analysis of the PBM WB in these 6 patients showed $0.1 \pm 0.3\%$ of dysferlin expression compared to $0 \pm 0\%$ in the 11 patients with absent dysferlin immunostaining. We did not see any association with the type of mutation or its location within *DYSF* either in these 6 patients with residual amounts of dysferlin in the muscle biopsy or the 11 patients with absence of dysferlin (Table 1). In 21 muscle biopsies from patients with normal dysferlin expression in PBM we found different dysferlin staining patterns, similar to those previously described [14]: Dysferlin expression was normal in the sarcolemma in eight patients (C_5, C_6, C_7, C_10, C_11, C_12, C_17, C_20) (Figure 4A). Of the other 13, four showed a general reduction of a continuous staining (not patchy) of the sarcolemma (C_8, C_9, C_19, C_21) (Figure 4C), three had reduced staining in the sarcolemma but increased in the cytoplasm of all muscle fibers (C_1, C_16, C_18) (Figure 4G), and six had increased signal in the cytoplasm of only some fibres with normal expression in the sarcolemma (P_2, P_3, P_4, P_13, P_14, P_15) (Figure 4H and Table 2).

Discussion

Our study showed a reproducible relationship between dysferlin expression in skeletal muscle and in PBM by WB analysis. Analysis of 17 dysferlinopathy patients with two pathogenic mutations in

the gene *DYSF* and 21 patients with other neuromuscular diseases confirmed normal levels of dysferlin in all the pathological controls and abnormal dysferlin (severe reduction or absence) in all dysferlinopathy patients, demonstrating a high sensitivity and specificity for diagnosis of dysferlinopathy.

IH results, on the other hand, were misleading because dysferlin expression was deficient both in patients with mutations in *DYSF* and in patients with other myopathies. Most patients with *DYSF* mutations showed absence of dysferlin in IH, but some showed residual dysferlin expression. A large proportion of pathological controls with other myopathies (13/21) showed abnormal patterns of dysferlin expression using IH but their dysferlin expression in skeletal muscle and PBM was normal according to WB.

Several authors have described different IH patterns of dysferlin expression in muscle biopsies from patients with different myopathies, but none of them compared this expression with that found in PBM. The authors in the first of these studies found IH patterns which were slightly different from those in our study. However, they did not correlate their findings with muscle WB [15]. In two later papers, the authors observed mismatching results between WB and IH in muscle biopsies from different LGMD [14,16]. In the paper by Tagawa *et al* the authors found defective expression of dysferlin by IH, 19% of patients with LGMD and 50% of patients with other neuromuscular diseases, and established four different patterns of dysferlin staining (normal, negative, faint and abnormal cytoplasmic accumulation) The authors concluded that other proteins are necessary for a normal localization of dysferlin at the sarcolemma. In the paper by Lo *et al*

Table 2. Summary of patients with normal expression of dysferlin included in this study.

Patient	Sex	Age	Phenotype	PBM WB (%)	Muscle WB (%)	Muscle IH	Gene	Nucleotide change	Protein change
C_1	M	19	LGMD2A	121.6	110.5	2	<i>CAPN3</i>	c.2362_2363delinsTCATCT c.2362_2363delinsTCATCT	p.Arg788SerfsX14 p.Arg788SerfsX14
C_2	M	48	BMD	100	96	3	<i>DYS</i>	c.1704+2T>A	p.Cys569ValfsX18
C_3	M	73	POMPE	116.2	93.6	3	<i>GAA</i>	c.1195_1G>A c.1856G>A	IVS17 p.Ser619Asn
C_4	F	40	POMPE	125	118.7	3	<i>GAA</i>	c.32_13T>G c.236_246delCCACACAGTGC	IVS1-13 T>G p.Pro79ArgfsX13
C_5	F	56	POMPE	110.5	100	N	<i>GAA</i>	c.32_13T>G c.2600_2604delTGCTGinsA	IVS1-13 T>G; p.Val1867GlufsX19
C_6	F	30	ANOS	100	100	N	<i>ANOS</i>	c.191dupA c.1627dupA	p.Asn64LysfsX15 p.Met543AsnfsX11
C_7	M	35	Mitochondrial myopathy	100	98.6	N			
C_8	F	46	Nonaka	110.5	100	1	<i>GNE</i>	c.934G>A c.1519A>C	p.Gly312Arg p.Thr507Pro
C_9*	M	62	HyperCKs	140	105.2	1			
C_10	F		McArdle	100	100	N	<i>PYGM</i>	c.1979C>T c.1760T>C	p.Ala660Asp p.Leu587Pro
C_11	F	59	VCP	149.4	130.1	N	<i>VCP</i>	c.277C>T	p.Arg93Cys
C_12	M	55	PM	100	77.5	N			
C_13	F	57	PM	98.3	89.9	3			
C_14*	M	43	LGMD	100	99.5	3			
C_15*	M	46	LGMD	150	132.6	3			
C_16*	M	43	LGMD	100	100	2			
C_17*	F	29	HyperCKs	98.3	93.3	N			
C_18*	M	61	Myalgias hiperCKs	140	151.1	2			
C_19*	M	59	Muscular dystrophy	114.9	108	1			
C_20*	M	49	Calf atrophy	125.5	100	N			
C_21*	M	42	MM like	100	100	1			

N-Normal; 1- reduced sarcolemma; 2- Reduced sarcolemma and increased sarcoplasm staining; 3- Variable sarcoplasm staining.

*Patients with *DYSF* gene analyzed and no mutations found.

M:male; F: female; LGMD: limb girdle muscle dystrophy; VCP: valosin containing protein; PM: polymyositis; MM: Miyoshi myopathy. HMZ: homozygous.

The mutation of pathological control C_X have been previously described [38].

doi:10.1371/journal.pone.0029061.t002

the authors found abnormal dysferlin expression in a significant proportion of LGMD patients not LGMD2B (25 out of 76). They grouped these patients in four categories according to IH pattern of dysferlin expression in the muscle biopsy including: 1) deficiency, 2) reduced membrane staining, 3) reduced membrane staining with homogenously increased sarcoplasmic staining in all fibers and 4) reduced membrane staining and variable sarcoplasmic staining in some fibers. To explain their results the authors suggested that either the membrane damage is too excessive for satellite cells to repair or that the proteins needed for dysferlin function are defective in these patients. The results of both studies matched well with those found in our study (Figure 4). In yet another study, the authors found a patchy pattern of sarcolemmal dysferlin in two patients with 5' donor site mutations, but these mutations could not be related to a milder clinical phenotype [17].

In a more recent paper the authors described three patients with a suspicion of dysferlinopathy who displayed abnormal skeletal muscle IH (reduced or absent) and increased dysferlin protein by WB. In two of the three patients, genetic analysis showed a non-pathogenic change in one allele and no change in the second allele. The third patient displayed one pathogenic mutation in one

allele and a non-pathogenic change in the second allele. WB in PBM was performed in two of the three patients and dysferlin expression was normal in both. The quantification method and the WB, however, were not shown [18]. Together with our findings these results indicate that normal dysferlin expression has not yet been observed when two pathogenic mutations in the *DYSF* gene are found.

Dysferlin interacts with other proteins to form a complex, such as annexin-1 and 2 [19], calpain-3 [20,21], caveolin-3 [22], AHNAK [23], affixin [24], dihydropyridine receptor [25], MG53 [26] and tubulin [27]. Disruption of proteins in the dysferlin complex can affect the subcellular localization of dysferlin in the absence of mutations in the gene *DYSF* and may explain the abnormal immunohistochemical results described in the above-mentioned studies [14,22,28,29,30]. For this reason it is important to quantify dysferlin expression in skeletal muscle WB as well as by IH. However, in some cases the amount of muscle biopsy is insufficient to perform WB. It may also happen that in patients at end stages of the disease the muscle biopsy may mainly consist of fat and fibrotic tissue, also leading to inaccurate quantification results of muscle proteins. To overcome these difficulties, here we

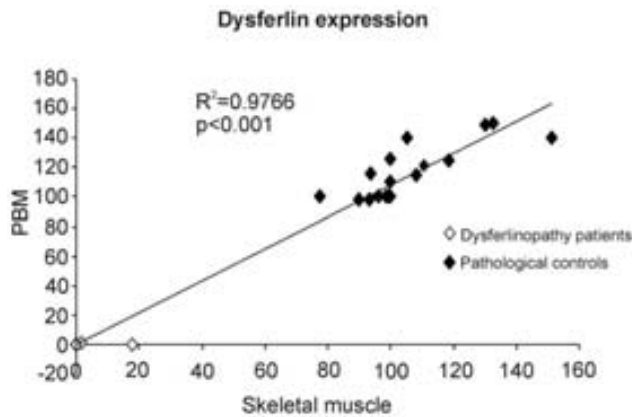


Figure 3. Parallelism between dysferlin expression in PBM and in skeletal muscle. Linear association between dysferlin expression in skeletal muscle (X axis) and in PBM (Y axis) were observed ($R^2 = 0.9766$, $p < 0.001$). Black diamonds show dysferlin expression in pathological controls and white diamonds show dysferlin expression in dysferlinopathy patients.
doi:10.1371/journal.pone.0029061.g003

propose dysferlin expression should be studied in PBM to help interpret the reductions noted in the muscle biopsy by IH. Indeed, when the clinical suspicion of dysferlinopathy is high, dysferlin in PBM can be studied even before the muscle biopsy is taken. The mean expression of dysferlin by skeletal muscle WB in our patients was $1.1 \pm 4.3\%$ and linked with that in monocytes. It is of note that the authors of a very recent report showed that when the expression of dysferlin in skeletal muscle analysed by WB was lower than 20% it was due to mutations in the gene *DYSF* [31]. The authors, however, did not compare dysferlin expression in PBM in the same patients, as we did in our study.

The analysis of dysferlin in PBM is very helpful to rule out a dysferlinopathy when no muscle sample is available. However, when available, the study of the muscle biopsy is very informative. In fact, the presence of characteristic inflammatory infiltrates [32] and sarcolemmal and interstitial amyloid deposits [33] can be helpful to support the diagnosis of dysferlinopathy and to study the pathogenesis of the disease.

The high parallelism between dysferlin expression in skeletal muscle and PBM by WB found in our study has improved the diagnostic approach in our routine practice, avoiding misleading diagnoses when the IH pattern is abnormal. In the diagnostic work up of a patient with proximal or distal weakness, we suggest to investigate the presence of dysferlin by WB in PBM in combination with the muscle biopsy prior to molecular analysis of a large gene such as *DYSF*.

Materials and Methods

Subjects

Patients were recruited at our neuromuscular unit, a reference center for dysferlin myopathy in Spain. The diagnosis of dysferlinopathy and other muscular dystrophies included the neurological examination and muscle MRI. Most cases also included a muscle biopsy to guide genetic analysis regarding the defective protein using IH and WB. PBM WB was carried out in 17 patients with two mutations in the *DYSF* gene and in 21 patients with other neuromuscular diseases. Our clinical research ethics committee approved this study (Reference number of our Ethics Committee: 08/77/883). Informed consent was obtained from all patients for muscle biopsy, blood samples and RNA/DNA analysis.

Isolation of PBM and immunoblot analysis

PBM-CD14 positive isolation was carried out in all subjects as previously described [12]. WB from human monocyte samples was performed using a mouse monoclonal antibody to dysferlin (NCL-Hamlet, Novocastra, Newcastle, UK) and a mouse monoclonal antibody to β -actin (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) as a loading control. IRDye®800 conjugate goat anti-mouse was used as a secondary antibody (Li-cor, Lincoln, Nebraska, USA). Fluorescent bands corresponding to dysferlin and β -actin were acquired and analyzed using an Odyssey Infrared Imaging System (Li-cor). To determine dysferlin expression we quantified the double band observed in PBM. The control samples were used as reference values and assigned 100% of dysferlin expression using β -actin as a normalizer. The amount of dysferlin shows some variation among different healthy individuals. We used several healthy controls to perform the different dysferlin expression determinations, since the same individual control sample was not always available. When performing a WB we assign a value of 100% to a healthy individual that has no mutations in *DYSF*. For this reason, in a given gel, an individual with a pathology other than dysferlinopathy or in other healthy individuals the levels of dysferlin may be slightly higher or lower than 100%. Dysferlin expression in patient samples was quantified using the control values to obtain the percentages of dysferlin expression/reduction.

Dysferlin knockdown

We performed an RNA inference experiment to confirm that the double band present in PBM corresponded to dysferlin. Human monocytes from healthy donors were isolated using the EasySep Human Monocyte Enrichment kit (Stemcell Technologies, Sheffield, UK) following the manufacturer's instructions.

230,000 monocytes/sample (100,000 monocytes/ml) were transfected with siRNA/siPORT Amine (Ambion, Texas, USA) at a concentration of 30 nM/5 μ l. siRNAs used were: siDYSF-1 target in exon 2 (s15788), siDYSF-2 target in exon 48 (s15790), siMYOF (s25476) as a non-related gene and a negative control (AM4611). Monocyte cultures were incubated with siRNAs for 6 days and dysferlin protein was analyzed by WB.

Immunoprecipitation

Freshly isolated PBM were lysed on ice in buffer composed of 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.15% CHAPS and 1 \times protease inhibitor cocktail. The lysates were spun down at maximum speed, 4°C, 20 min. Protein A Sepharose CL-4B (Amersham) was washed 3 \times in lysis buffer and used to preclear the homogenates for 1 h, at 4°C while shaking. Sepharose was removed and antibody was added (50 μ g Heavy Chain Antibody (HCAb) fragment) and shaken o/n at 4°C. HCAb fragments F4 (amino acids 2–245) and H7 (amino acids 1666–1788) (both Dysferlin specific) (Figure 2A and 3A) (non-specific control against amyloid- β 34) were described previously [21,34]. The washed Sepharose was then added, incubated while shaking for 2 h at 4°C. Bound and non-bound IP samples were separated on SDS-page gels and blotted onto a nitrocellulose membrane. Primary antibody (Hamlet) against amino acids 1999–2016, was incubated o/n and secondary antibody for 1 h. Detections were performed with an Odyssey scanner (Li-Cor).

Mutation analysis of *DYSF*

Mutation screening in the *DYSF* gene was performed in 25 patients, the seventeen with abnormal dysferlin by WB and eight patients from the pathological control group with normal levels of dysferlin protein in WB from muscle and monocytes and no final

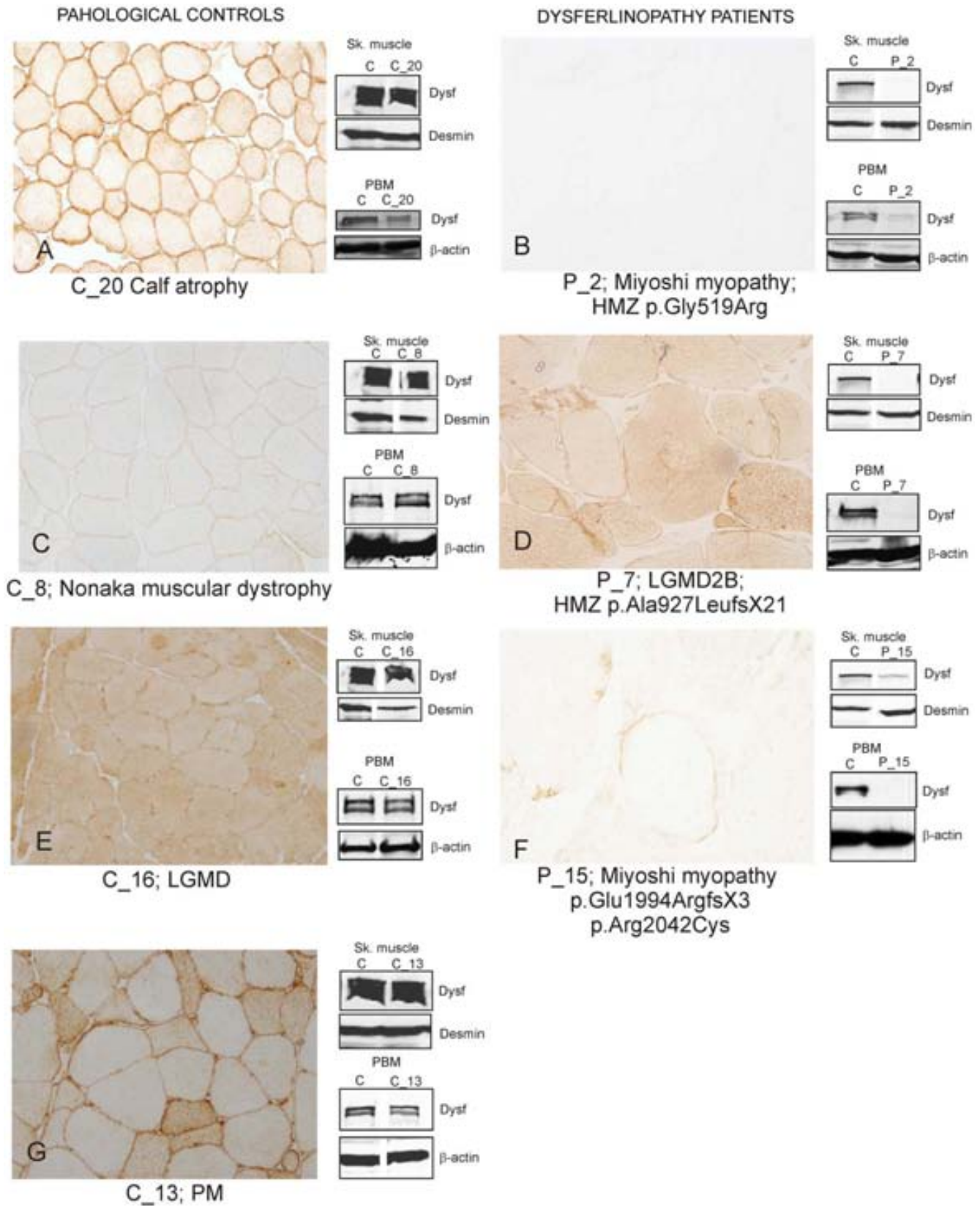


Figure 4. Dysferlin staining patterns in muscle biopsy from dysferlinopathy patients and from other muscle diseases. Muscle biopsies from dysferlinopathy patients show three staining patterns: A) Normal dysferlin staining in a pathological control muscle (C_20 with calf atrophy in Table 2). B) Total absence of dysferlin expression at sarcolemma and sarcoplasm (P_2 with Miyoshi myopathy in Table 1). C) reduced sarcolemmal staining in all muscles (C_8 with Nonaka myopathy in Table 2). D) A sarcoplasm granular pattern in scattered fibers was observed in some

dysferlinopathy patients (P_7 with LGMD2B) in Table 1) E) Increased cytoplasmic staining of dysferlin in all muscle fibres (C_16 with LGMD in Table 2). F) A patchy staining of dysferlin was observed in the sarcolemma in some muscle fibres (P_15 with Miyoshi myopathy in Table 1). G) Some muscle biopsies had increased dysferlin staining in the cytoplasm of some fibers (P_13 with PM in Table 2). doi:10.1371/journal.pone.0029061.g004

diagnosis of their myopathy. The RNA was extracted from PBM using Ultraspec (Biotech Laboratories, Houston, USA) and retrotranscribed with the oligo(dT) primer technique (Invitrogen, Carlsbad, USA). Amplification and direct sequencing of the entire dysferlin cDNA was performed using 14 sets of oligonucleotide primers covering the 55 exons, as previously described [35].

Skeletal muscle immunohistochemistry and immunoblot

We studied dysferlin expression in muscle in 38 biopsy samples. Immunohistochemistry was performed as previously described [36]. The slides were incubated overnight with a primary antibody to human dysferlin (NCL-Hamlet) at a final concentration of 10 µg/ml. After a washing step, slides were incubated with a secondary antibody for 1 hour at room temperature. Samples were then mounted and directly examined using an Axioscop 2 plus photomicroscope equipped with epifluorescence optics and bright field (Carl Zeiss, Munich, Germany). Lysates from the same 38 skeletal muscle biopsies were analyzed by WB as previously described [3,37]. Briefly, frozen muscle samples were homogenized with 19 volumes of treatment buffer containing 0.125 mol/L Tris/HCL buffer pH 6.4, 10% glycerol, 4% SDS, 4 mol/L urea,

10% mercaptoethanol and 0.001% bromophenol blue and 30 µl of samples were loaded in the gel (equivalent to 200 µg of non-collagen protein). Immunoblots were performed as described above for monocytes.

Supporting Information

Figure S1 Western blot of skeletal muscle and PBMs from 2 patients and 2 controls all loaded on the same gel using an antibody to dysferlin (Hamlet). (TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Carolyn Newey for editorial support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EG NdL II. Performed the experiments: NdL LGQ BF JDM RRG AdM. Analyzed the data: EG NdL. Contributed reagents/materials/analysis tools: SvdM. Wrote the paper: EG NdL II.

References

- Bashir R, Britton S, Strachan T, Keers S, Vafiadaki E, et al. (1998) A gene related to Caenorhabditis elegans spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet* 20: 37–42.
- Liu J, Aoki M, Illa I, Wu C, Fardeau M, et al. (1998) Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet* 20: 31–36.
- Illa I, De Luna N, Dominguez-Perles R, Rojas-Garcia R, Paradas C, et al. (2007) Symptomatic dysferlin gene mutation carriers: characterization of two cases. *Neurology* 68: 1284–1289.
- Illa I, Serrano-Munuera C, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, et al. (2001) Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol* 49: 130–134.
- Klinge L, Dean AF, Kress W, Dixon P, Charlton R, et al. (2008) Late onset in dysferlinopathy widens the clinical spectrum. *Neuromuscul Disord* 18: 288–290.
- Nguyen K, Bassez G, Krahn M, Bernard R, Laforet P, et al. (2007) Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Arch Neurol* 64: 1176–1182.
- Okahashi S, Ogawa G, Suzuki M, Ogata K, Nishino I, et al. (2008) Asymptomatic sporadic dysferlinopathy presenting with elevation of serum creatine kinase. Typical distribution of muscle involvement shown by MRI but not by CT. *Intern Med* 47: 305–307.
- Urtizberea JA, Bassez G, Leturcq F, Nguyen K, Krahn M, et al. (2008) Dysferlinopathies. *Neurol India* 56: 289–297.
- Vilchez JJ, Gallano P, Gallardo E, Lasa A, Rojas-Garcia R, et al. (2005) Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Arch Neurol* 62: 1256–1259.
- Paradas C, Gonzalez-Quereda L, De Luna N, Gallardo E, Garcia-Consuegra I, et al. (2009) A new phenotype of dysferlinopathy with congenital onset. *Neuromuscul Disord* 19: 21–25.
- Paradas C, Llauger J, Diaz-Manera J, Rojas-Garcia R, De Luna N, et al. (2010) Redefining dysferlinopathy phenotypes based on clinical findings and muscle imaging studies. *Neurology* 75: 316–323.
- Ho M, Gallardo E, McKenna-Yasek D, De Luna N, Illa I, et al. (2002) A novel, blood-based diagnostic assay for limb girdle muscular dystrophy 2B and Miyoshi myopathy. *Ann Neurol* 51: 129–133.
- Wein N, Krahn M, Courrier S, Bartoli M, Salort-Campana E, et al. (2010) Immunolabelling and flow cytometry as new tools to explore dysferlinopathies. *Neuromuscul Disord* 18: 57–60.
- Lo HP, Cooper ST, Evesson FJ, Seto JT, Chiotis M, et al. (2008) Limb-girdle muscular dystrophy: diagnostic evaluation, frequency and clues to pathogenesis. *Neuromuscul Disord* 18: 34–44.
- Piccolo F, Moore SA, Ford GC, Campbell KP (2000) Intracellular accumulation and reduced sarcolemmal expression of dysferlin in limb-girdle muscular dystrophies. *Ann Neurol* 48: 902–912.
- Tagawa K, Ogawa M, Kawabe K, Yamanaka G, Matsumura T, et al. (2003) Protein and gene analyses of dysferlinopathy in a large group of Japanese muscular dystrophy patients. *J Neurol Sci* 211: 23–28.
- Saito A, Higuchi I, Nakagawa M, Saito M, Hirata K, et al. (2002) Miyoshi myopathy patients with novel 5' splicing donor site mutations showed different dysferlin immunostaining at the sarcolemma. *Acta Neuropathol* 104: 615–620.
- Rosales XQ, Gastier-Foster JM, Lewis S, Vinod M, Thrush DL, et al. (2010) Novel diagnostic features of dysferlinopathies. *Muscle Nerve* 42: 14–21.
- Lennon NJ, Kho A, Bacskai BJ, Perlmutter SL, Hyman BT, et al. (2003) Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem* 278: 50466–50473.
- Huang Y, de Morree 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.
- 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.
- Matsuda C, Hayashi YK, Ogawa M, Aoki M, Murayama K, et al. (2001) The sarcolemmal proteins dysferlin and caveolin-3 interact in skeletal muscle. *Hum Mol Genet* 10: 1761–1766.
- Huang Y, Laval SH, van Remoortere A, Baudier J, Benaud C, et al. (2007) AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *Faseb J* 21: 732–742.
- Matsuda C, Kameyama K, Tagawa K, Ogawa M, Suzuki A, et al. (2005) Dysferlin interacts with affixin (beta-parvin) at the sarcolemma. *J Neuropathol Exp Neurol* 64: 334–340.
- Ampong BN, Imamura M, Matsumiya T, Yoshida M, Takeda S (2005) Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myol* 24: 134–144.
- Cai C, Weisleder N, Ko JK, Komazaki S, Sunada Y, et al. (2009) Membrane repair defects in muscular dystrophy are linked to altered interaction between MG53, caveolin-3, and dysferlin. *J Biol Chem* 284: 15894–15902.
- Azakir BA, Di Fulvio S, Therrien C, Simreich M (2010) Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One* 5: e10122.
- Anderson LV, Harrison RM, Pogue R, Vafiadaki E, Pollitt C, et al. (2000) Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B and Miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscul Disord* 10: 553–559.
- Chrobakova T, Hermanova M, Kroupova I, Vondracek P, Marikova T, et al. (2004) Mutations in Czech LGMD2A patients revealed by analysis of calpain3 mRNA and their phenotypic outcome. *Neuromuscul Disord* 14: 659–665.
- Hermanova M, Zapletalova E, Sedlackova J, Chrobakova T, Letocha O, et al. (2006) Analysis of histopathologic and molecular pathologic findings in Czech LGMD2A patients. *Muscle Nerve* 33: 424–432.
- Cacciottolo M, Numitone G, Aurino S, Caserta IR, Fanin M, et al. (2011) Muscular dystrophy with marked Dysferlin deficiency is consistently caused by primary dysferlin gene mutations. *Eur J Hum Genet*.

32. Gallardo E, Rojas-Garcia 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.
33. Spuler S, Carl M, Zabojszcza J, Straub V, Bushby K, et al. (2008) Dysferlin-deficient muscular dystrophy features amyloidosis. *Ann Neurol* 63: 323–328.
34. Rutgers KS, van Remoortere A, van Buchem MA, Verrips CT, Greenberg SM, et al. (2009) Differential recognition of vascular and parenchymal beta amyloid deposition. *Neurobiol Aging*.
35. De Luna N, Freixas A, Gallano P, Caselles L, Rojas-Garcia R, et al. (2007) Dysferlin expression in monocytes: a source of mRNA for mutation analysis. *Neuromuscul Disord* 17: 69–76.
36. De Luna N, Gallardo E, Illa I (2004) In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 63: 1104–1113.
37. Anderson LV, Davison K (1999) Multiplex Western blotting system for the analysis of muscular dystrophy proteins. *Am J Pathol* 154: 1017–1022.
38. Paradas C, Fernandez-Cadenas I, Gallardo E, Llige D, Arenas J, et al. (2005) Variable presentation of the clinical phenotype of McArdle's disease in a kindred harbouring a novel compound genotype in the muscle glycogen phosphorylase gene. *Neurosci Lett* 391: 28–31.