

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Moléculas mediadoras de activación génica, Fak y Erks, en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne y en ratones *Mdx*

2. INTRODUCCION

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en
Bioquímica y Título Profesional de Bioquímico.

Profesor Patrocinante: Sr. Ricardo Fadic -Departamento de Neurología - Facultad de
Medicina – Pontificia Universidad Católica de Chile.

Paola Cecilia Muñoz Reyes

Valdivia Chile 2004

Contenido

Profesor Co-Patrocinante .

Dedicatoria .

Agradecimientos .

ABREVIATURAS . .

1. RESUMEN .

2. INTRODUCCION . 1

 2.1.Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) . 1

 2.2.Modelo animal para Distrofia Muscular de Duchenne; El ratón *mdx* . . 5

 2.3. Integrinas, proteínas transductoras de señales . 6

3. HIPOTESIS .

4. MATERIALES Y METODOS .

5. RESULTADOS . .

6. DISCUSION .

BIBLIOGRAFIA .

2. INTRODUCCION

Las distrofias musculares son un grupo grande y heterogéneo de enfermedades hereditarias que se caracterizan por atrofia y debilidad muscular progresiva, afectando en etapas tempranas de su desarrollo a músculos específicos. El tipo de herencia, los músculos afectados, la edad de inicio de los síntomas y la progresión de la patología son algunas de las características usadas para definir los distintos subtipos de distrofias musculares.

2.1. Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

Con la identificación del gen responsable de la Distrofia Muscular de Duchenne, (Monaco y cols., 1986) y de la proteína que codifica, distrofina (Koenig y cols., 1988) por el grupo de Kunkel, se inició toda una revolución por entender esta patología. La DMD afecta a 1 de cada 3.500 niños (Kunkel y cols., 1986; Koenig y cols., 1987; Emery, 1991). Se hereda en forma recesiva ligada al cromosoma X, y es causada por mutaciones puntuales, duplicaciones o deleciones en el gen de la distrofina (Lenk y cols., 1993; Roberts y cols., 1994). Los pacientes con DMD se caracterizan por presentar elevados niveles de creatina quinasa sérica, pérdida progresiva de la fuerza muscular y coexistencia de atrofia con pseudo hipertrofia de algunos grupos musculares. Histopatológicamente sus músculos presentan gran variación en el tamaño y forma de las fibras, continuos ciclos de necrosis,

degeneración y regeneración de las fibras, con un agotamiento gradual de este último proceso y el reemplazo de las fibras musculares degeneradas por tejido adiposo y tejido conectivo.

Generalmente los primeros síntomas de la patología aparecen entre los 2 a 5 años de edad (Jennekens y cols., 1991) cuando se manifiestan irregularidades al caminar, subir escaleras y correr, luego la debilidad y daño muscular se acrecientan, necesitando de una silla de ruedas, entre los 7 a 12 años de edad. Finalmente la mayoría de los pacientes mueren por insuficiencia respiratoria o cardíaca, alrededor de los 20 años.

El gen responsable de DMD, consiste en 79 exones distribuidos en 2,5 MB (Koenig y cols., 1987; Monaco y cols., 1988) y codifica para una proteína de gran tamaño (427 kDa) denominada distrofina (Hoffman y cols., 1987), la que se expresa en músculo liso, estriado esquelético, corazón y cerebro (Hoffman y cols., 1988). En músculo normal, la distrofina se asocia con un grupo de proteínas del sarcolema, distroglicanes, sarcoglicanes, distrobrevinas, sintrofinas, sarcospan, entre otras (Campbell y Kahl, 1989; Campbell, 1995; Crosbie y cols., 1997; Wakayama y cols., 2000). Este complejo de glicoproteínas transmembrana asociadas a distrofina (CGD), conecta el citoesqueleto (filamentos de actina) de la fibra muscular, a la matriz extracelular (laminina-2) (**FIGURA 1**). Se piensa que la interacción entre todas estas proteínas estabiliza la periferia de la fibra muscular durante la contracción. El subcomplejo distroglicán, está formado por la proteína de superficie α -distroglicán, que se une a laminina-2, y la proteína estructural de membrana β -distroglicán, que se une a distrofina, siendo distroglicán, la columna central de unión entre proteínas intracelulares y extracelulares. La interacción entre α -distroglicán y β -distroglicán, se encuentra estabilizada por el complejo heterotetramérico, sarcoglicán (subunidades α , β , δ , y γ) (Araishi y cols., 1999). Anomalías primarias y secundarias de varios componentes de este complejo de proteínas, son responsables de la fisiopatología de varios tipos de distrofias musculares (**TABLA I**).

Otras proteínas también están asociadas a CGD, proteínas citoesqueléticas, tales como vinculina, espectrina, α -actinina, talina e integrinas, y proteínas no citoesqueléticas, como por ejemplo, canales de sodio gatillados por voltaje, nNOS y Grb2 (Gossrau, 1998; Lakonishok

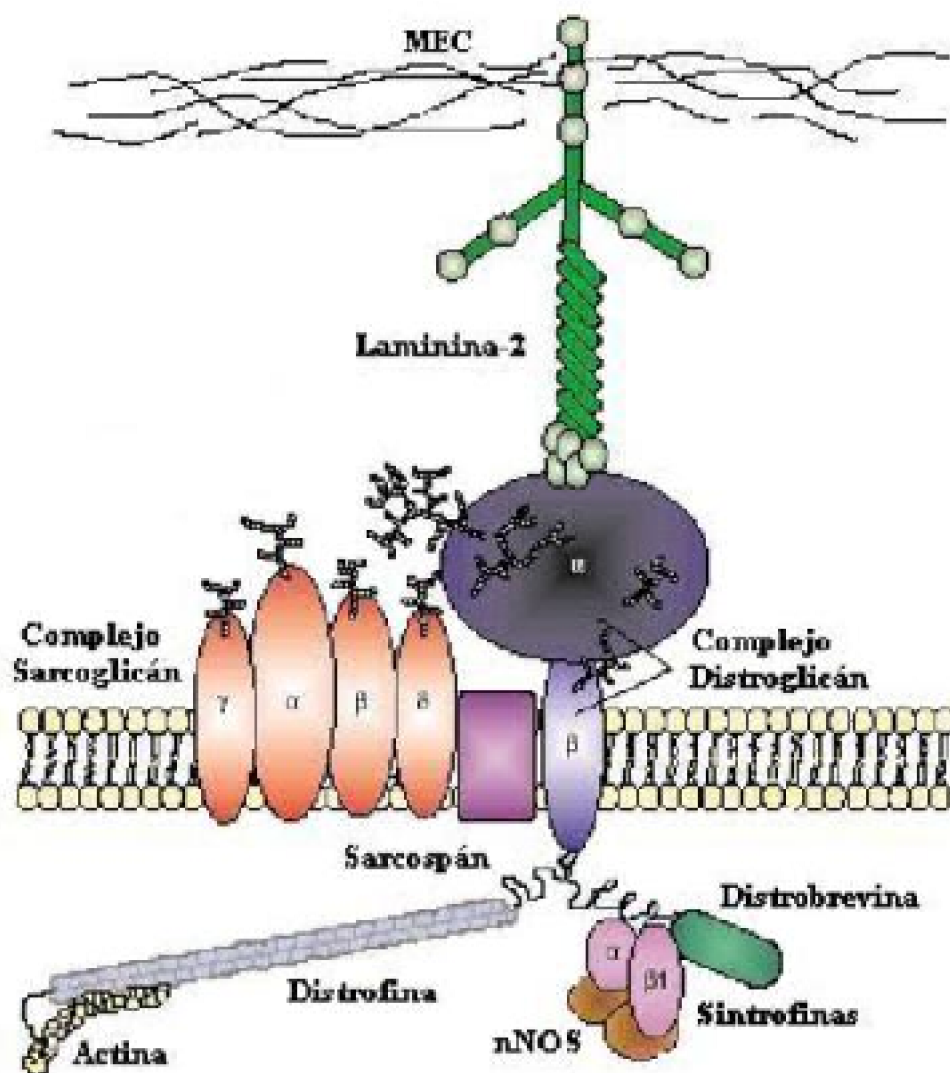


FIGURA 1. Modelo esquemático del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (CGD) en músculo esquelético. Se observa la unión de la matriz extracelular a través de laminina-2 con el citoesqueleto (actina) de la fibra muscular. La interacción entre α y β distroglicán, se encuentra estabilizada por el complejo heterotetramérico sarcoglicán (α, β, δ y γ) (Tomado de Durbeej y Campbell, 2002).

TABLA I. Tipos de distrofias musculares.

Moléculas mediadoras de activación génica, Fak y Erks, en pacientes con Distrofia Muscular de Duchenne y en ratones Mdx

Enfermedad	Modo de herencia	Localización del gen	Producto génico	Modelo animal
DM Duchenne/Becker	Recesiva, crom. X	Xp21	distrofina	Mdx
Emery-Dreifuss	Recesiva, crom. X	Xp28	emerina	-
DM de cintura				
DMC 1A	Autos. dominante	5q31	miotilina	-
DMC 1B	Autos. dominante	1q11	laminina A/C	Lmna
DMC 1C	Autos. dominante	3p25	caveolina-3	Cav3
DMC 2A	Autos. recesiva	15q15	calpaina-3	Capn3
DMC 2B	Autos. recesiva	2p13	disferlina	SJL
DMC 2C	Autos. recesiva	13q12	γ-sarcoglicano	Sgcg
DMC 2D	Autos. recesiva	17q12	α-sarcoglicano	Sgca
DMC 2E	Autos. recesiva	4q12	β-sarcoglicano	Sgcb
DMC 2F	Autos. recesiva	5q33	δ-sarcoglicano	Sgcd
DMC 2G	Autos. recesiva	17q11	teletonina	-
DMC 2H	Autos. recesiva	9q31	TRIM31	-
DMC 2I	Autos. recesiva	19q13	prot. relac. fukitina	-
DM Distal				
Miopatía de Miyoshi	Autos. recesiva	2p13	disferlina	SJL
Tibial	Autos. dominante	2q31	-	-
DM Congénita				
Clásica	Autos. recesiva	6q22	laminina α2	dy
α7-integrina	Autos. recesiva	12q13	α7-integrina	Igta7
Otras formas de DM				
Miopatía de Bethlem	Autos. dominante	21q22	colágeno VI α1	Col6 α 1
Miopatía de Bethlem	Autos. dominante	21q22	colágeno VI α2	-
Miopatía de Bethlem	Autos. dominante	2q37	colágeno VI α3	-

Lista resumen de distrofias musculares, su modelo mendeliano de herencia, localización cromosomal, proteína mutada y modelo animal. (DM; distrofia muscular, DMC; distrofia muscular de cintura; Autos; autosómica, Crom; cromosoma). (Durbeej y Campbell, 2002). y cols., 1992; Williams y Bloch, 1999; Yang y cols., 1995). Los proteoglicanos, proteínas de la matriz extracelular, también pueden unirse al complejo CGD, entre estas moléculas están; perlecan, agrina, y biglicán (Bowe y cols., 2000; Peng y cols., 1998).

Mutaciones que afectan a las proteínas de matriz extracelular, que se unen directa o indirectamente al CGD producen también el fenotipo histológico de distrofia muscular, es así como mutaciones en el gen de laminina-2 (inicialmente denominada merosina)

produce una distrofia muscular esquelética severa, la distrofia muscular congénita (DMC) merosina negativa (Helbling-Leclerc y cols., 1995). Mutaciones en los genes de las subunidades del colágeno VI, que interactúa con laminina-2 se asocian a la miopatía de Bethlem (Speer y cols., 1996) otro subtipo de distrofia muscular. El número de proteínas asociadas al complejo CGD, continúa creciendo y todos pasan a ser candidatos para proteínas responsables por distrofia o su modificación.

Por lo tanto, la teoría existente acerca de la patogenia de distrofia muscular es la interrupción de la unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, que puede ocurrir por falla en el citoesqueleto subsarcolemal (Ej. DMD), a nivel del sarcolema (Ej. distrofias en cintura asociadas a sarcoglicanes), o a nivel de la matriz extracelular (Ej. DMC). Este sarcolema debilitado mecánicamente se rompería más fácilmente, permitiendo el ingreso descontrolado de componentes del extracelular.

Sin embargo, varias líneas de evidencia, muestran que la explicación anterior es incompleta. El fenotipo de distrofia muscular se ha encontrado asociado a mutaciones en una serie de proteínas musculares, que aparentemente no tienen función estructural de integridad del sarcolema; algunas de ellas se presentan a continuación:

a) Mutaciones en el gen de la caveolina-3, asociada a una distrofia muscular en cintura (Minetti y cols., 1998; McNally y cols., 1998).

b) Mutaciones en calpaína-3, una proteasa específica de músculo (Richard y cols., 1995), y en las proteínas sarcoméricas teletonina, (Moreira y cols., 2000) y miotilina (Hauser y cols., 2000) también son responsables de distrofia muscular en humanos.

c) Otras proteínas del sarcolema, involucradas en la transducción de señales a nivel de la membrana, y que su defecto se ha asociado a distrofia muscular, son las integrinas (Mayer y cols., 1997; Saher y Hildt, 1999; Hayashi, 1998).

Esta evidencia nos sugiere que la expresión fenotípica de necrosis celular por falla de uno de los componentes del complejo distrofina y proteínas asociadas, puede ser el resultado de alteraciones en vías tróficas necesarias para la mantención celular, y no sólo una pura falla mecánica.

2.2. Modelo animal para Distrofia Muscular de Duchenne; El ratón *mdx*

El ratón *mdx* (de muscular dystrophy X-linked), es un modelo animal de distrofia que ocurre naturalmente, debido a una mutación puntual en el gen de distrofina (Sicinski y cols., 1989). La transición de **C** a **T** en la posición 3185 que convierte un codón **CAA** (Glutamina), por un codón **TAA** que es una señal de término, en el exón 23 (Bulfield y cols., 1984), produce la interrupción prematura de la traducción de distrofina. La proteína resultante es inestable y falla en ubicarse en posición subsarcolemal.

Aunque el ratón *mdx*, es un modelo de DMD, su fenotipo es distinto al de humanos. El ratón *mdx*, después de un periodo de necrosis y regeneración, tiene una sobrevivida

normal. Histopatológicamente la necrosis y regeneración tiene un curso predecible temporalmente y ocurre en forma simultánea en todas las fibras. La necrosis ocurre entre la segunda y cuarta semana de vida (Tanabe y cols., 1986), la cual se compensa con una activa regeneración (aproximadamente a la semana 10 de vida), en donde todas las células musculares quedan en etapa de miotubos con núcleos centrales. No se produce fibrosis endomisial y no se encuentra posteriormente nueva necrosis.

En cambio en las distrofinopatías de humanos, el proceso de necrosis y regeneración es focal y asincrónico, esto se acompaña de una fibrosis endo y perimisial precoz e irreversible (**FIGURA 2**). El músculo diafragma del ratón *mdx*, es el que se comporta más parecido patológicamente a los músculos humanos afectados con DMD (Cullen y cols., 1988; Stedman y cols., 1991), siendo este el que sufre de mayor fibrosis, necrosis y calcificación.

Por lo tanto, tiene que haber un punto regulatorio en la respuesta biológica a esta mutación, que se comporte distinto en el ratón *mdx* en comparación a Duchenne, determinando fenotipos y resultados funcionales diferentes.

2.3. Integrinas, proteínas transductoras de señales

Las integrinas se describieron en células musculares en 1985 (Damsky y cols., 1985), localizándose en regiones de adhesión celular, como costámeros, uniones miotendinosas y neuromusculares (Bozycsko y cols., 1989). Corresponden a glicoproteínas heterodiméricas, compuestas por dos cadenas polipeptídicas, α y β , unidas por enlaces no covalentes. Poseen un dominio extracelular prominente que se une a proteínas de MEC, un dominio transmembrana y un dominio intracitoplasmático, donde la cadena β se fija directamente a los microfilamentos de actina, a través de diversas proteínas ligadoras de actina, tales como vinculina, tensina y talina (BurrIDGE y Chrzanowska-Woodnicka, 1996; Dedhars y Hannigan, 1996).

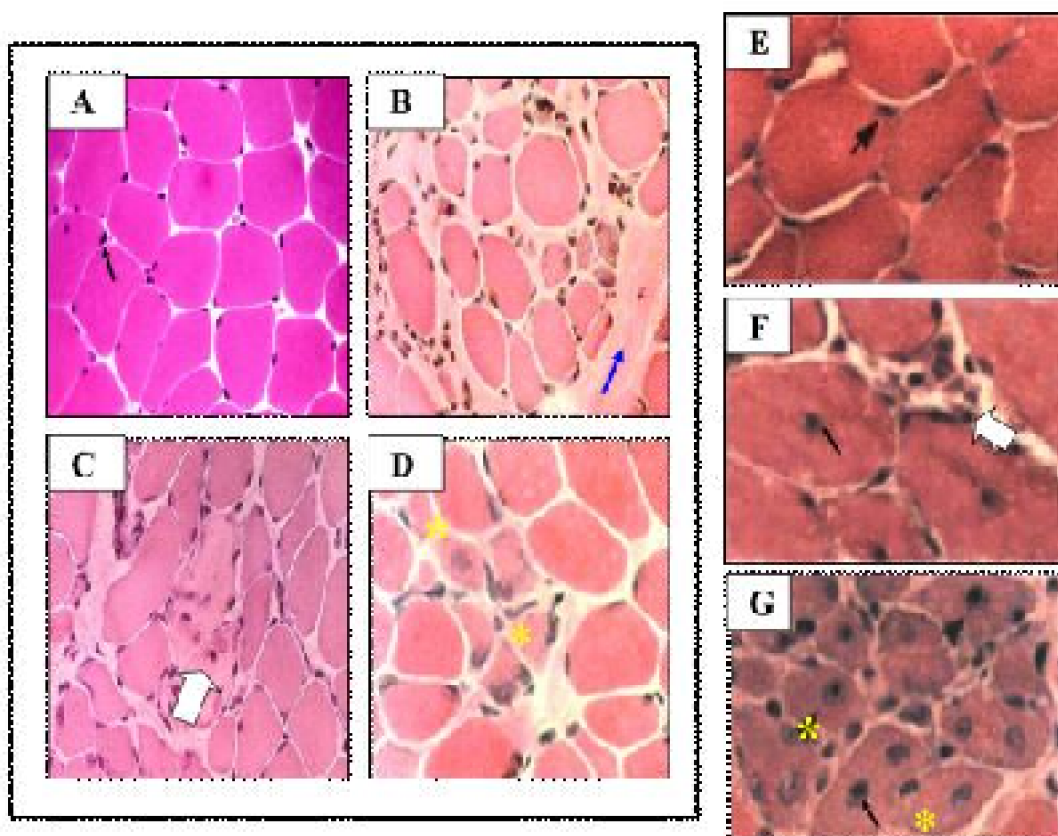


FIGURA 2. Comparación histológica de fibras musculares de paciente con distrofia muscular de Duchenne y de ratón distrófico mdx . Tinción Hematoxilina Eosina. (A) Corte de tejido muscular de paciente control. (B, C, D) Cortes de tejido muscular de pacientes con DMD, en diferentes estados de la enfermedad. (E) Corte de tejido muscular de ratón control. (F, G) Cortes de tejido muscular de ratón mdx, en etapa de necrosis (F) y en regeneración (G). (Fecha negra: muestra los núcleos; flecha en azul: muestra infiltración de tejido conectivo; flecha blanca: muestra células necróticas; asterisco amarillo: muestra células en regeneración).

Entre las funciones celulares de integrinas, se conoce que participan en un importante número de eventos celulares, tales como, modulación de la expresión génica, progresión del ciclo celular, proliferación, diferenciación, adhesión y migración celular (Saher y Hildt, 1999). La actividad de las integrinas como transductores de señales es bidireccional, conducen información tanto de afuera hacia adentro de la célula, como a la inversa (Yamada, 1997). En muchos casos los eventos de señalización en ambas direcciones se han asociado con cambios estructurales en las integrinas. Sin embargo no hay evidencia todavía, que cambios conformacionales modulan la afinidad de unión a ligandos a integrinas y con ello su activación (Tsuchida y cols., 1998).

2.3.1. Mediadores FAK y ERKs:

FAK, quinasa de adhesión focal, una proteína de 120 kDa, se expresa a partir del desarrollo embrionario (Ilic y cols., 1995) hasta la formación de todos los tejidos adultos y en muchas líneas celulares (Kornberg y cols., 1992). FAK, es una proteína tirosina

quinasa citoplasmática, elemento fundamental en los sistemas de transducción mediante integrinas (**FIGURA 3**). La unión del ligando a integrina, provoca la activación de FAK y su auto-fosforilación en Tyr-397 (Schaller y Parsons, 1994; Schlapfer y cols., 1997). La fosforilación de esta tirosina ocurre en el sitio de unión del dominio SH2 de la familia de la proteína quinasa Src. La subsecuente fosforilación dependiente de Src, en Tyr-576 y Tyr-577, incrementa la actividad catalítica de FAK (Calalb y cols., 1995). La fosforilación en Tyr-925 genera un sitio de unión en el dominio SH2 de la proteína adaptadora Grb2. Esta última está formada de un dominio central SH2, conocido para unir residuos de fosfotirosina y dos dominios SH3 amino y carboxilo-terminal (Lowenstein y cols., 1992). El dominio SH3 de Grb2 interactúa con la proteína SOS (Yu cols., 1994), la cual modula la actividad de Ras, finalmente resultando en la activación de Raf-1 y las MAPKs (Juliano, 1996; Hanks y Polte, 1995).

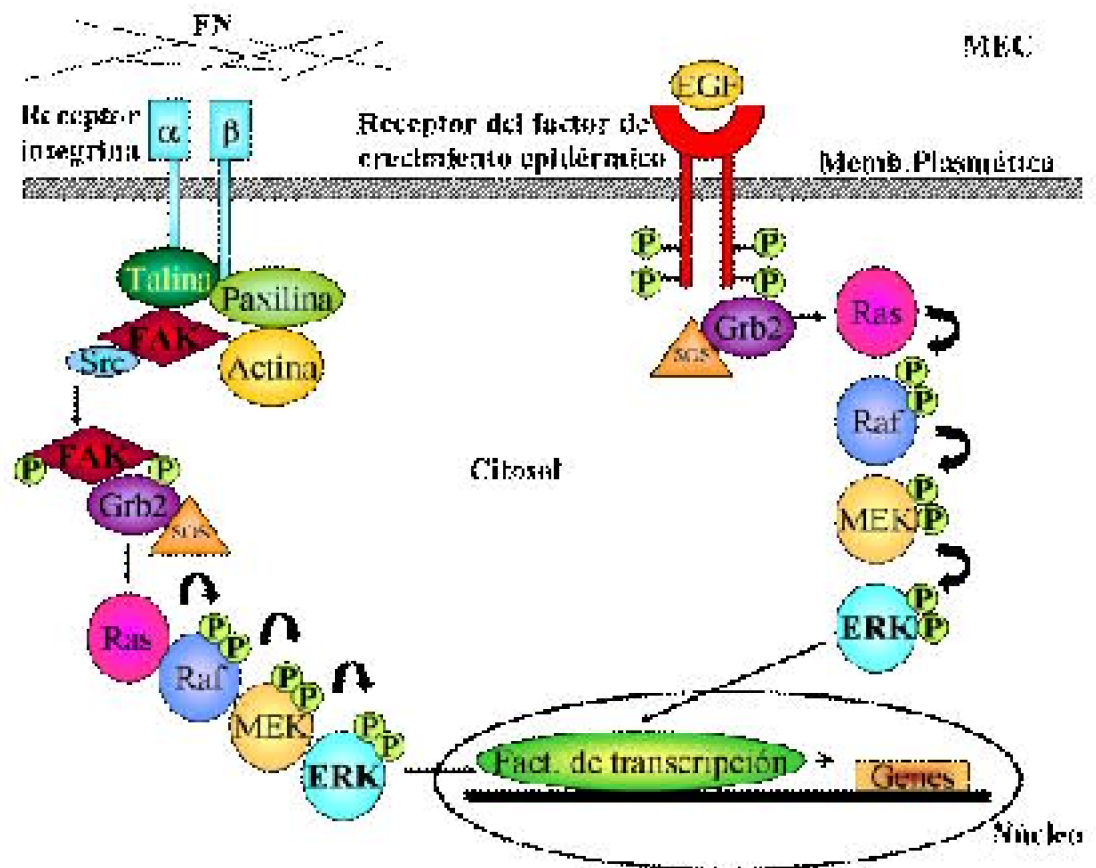


FIGURA 3. Cascada de activación, vía FAK y ERKs. Modelo esquemático de activación de las proteínas FAK y ERKs, mediado por unión a integrinas y factores de crecimiento. Al unirse el ligando al receptor de integrina se activan varias proteínas, entre ellas paxilina,

talina, y forman un complejo de adhesión que termina activando a FAK, esta última produce la activación de otras proteínas hasta que ERKs es fosforilada, y se transporta al núcleo produciendo la fosforilación de sustratos nucleares, con subsiguiente activación génica. (P, sitio de fosforilación; EGF, factor de crecimiento epidérmico; MEC, matriz extracelular; FN, fibronectina).

Se sabe que FAK participa en eventos de morfogénesis (Sorenson y Sheibani, 1999), viabilidad celular (Sonoda y cols., 1999; Almeida y cols., 2000) y media el efecto de factores de crecimiento en migración unidos a integrinas (Sieg y cols., 2000). Específicamente en músculo, la integrina $\beta 1$ junto a FAK son una importante vía de señalización intracelular que regula la expresión génica muscular (Wei y cols., 2000).

También dentro de los participantes de transducción de señales esta la super familia de las proteínas serina/treonina quinasa, conocidos como proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPKs). De amplia expresión en distintos tipos celulares, controlan procesos celulares fundamentales, tales como, proliferación, diferenciación, sobrevivencia y apoptosis. La activación básica de esta vía incluye a una familia de proteínas G pequeñas (Ras), y tres quinasa; una MAPK quinasa quinasa (Raf), una MAPK quinasa (MEK), y una MAPK (ERK) (**FIGURA 3**).

Una amplia variedad de hormonas, y factores de crecimiento, promueven la activación de esta vía, la mayoría de estos estímulos inducen a la proteína Ras a su forma activa y esta última a la activación de Raf.

Raf, es una proteína serina/treonina quinasa específica, de 74 kDa, la que en forma secuencial activa a MEK1/2, dos quinasa responsables de la doble fosforilación en tirosina y treonina de ERK 1/2 (quinasa reguladas del extracelular 1 y 2), con su subsecuente activación. Las ERKs (ERK1/2) son serina treonina quinasa de 44 y 42 kDa. de tamaño y dentro de los sustratos que son activados por esta proteína se encuentran; c-Jun, c-Fos, c-Myc, c-Myb y Elk-1.

En la vía MAPK, la modulación de células de adhesión a la MEC, contribuye a la reorganización morfológica requerida para la mitosis, migración y diferenciación. La adhesión mediada por integrinas a la MEC, permite una activación eficiente por factores de crecimiento de ERKs. En músculo liso de vasos sanguíneos se ha mostrado como la respuesta a fuerzas mecánicas es mediada por la interacción de integrinas con moléculas de MEC, seguidas de activación de ERKs (Goldschmidts y cols., 2001).

En músculo liso vascular el efecto de laminina y fibronectina en la respuesta a factores de crecimiento es similar en ERKs, pero distinta en FAK. Cultivos de estas células en fibronectina muestran una activación marcada de FAK en respuesta a PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) o FGF (factor de crecimiento fibroblástico), lo que no ocurre si están cultivadas en laminina (Morla y Mogford, 2000).