



FACULTAT DE BIOLOGIA

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**CONTROL DE LA MIOGÈNESI EN PEIXOS:
FUNCIONS DE LA MIOSINA, L'IGF-II
I ELS FACTORS REGULADORS MIOGÈNICS**

Tesi Doctoral

Marta Codina Potrony

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

**CONTROL DE LA MIOGÈNESI EN PEIXOS:
FUNCIONS DE LA MIOSINA, L'IGF-II
I ELS FACTORS REGULADORS MIOGÈNICS**

Memòria presentada per
Marta Codina Potrony
per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Joaquim Gutiérrez Fruitós
i la Dra. Isabel Navarro del Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia.

Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, programa de
Fisiologia (bienni 2004-06)

Dr Joaquim Gutierrez

Dra Isabel Navarro

Marta Codina

Barcelona, Abril 2009

**Efectes metabòlics i mitogènics de l'IGF-II en miòcits de truita irisada
(*Oncorhynchus mykiss*) en cultiu i paper de l'IGF-II en les vies de
senyalització PI3/Akt i MAPK**

**Metabolic and mitogenic effects of IGF-II in rainbow trout (*Oncorhynchus
mykiss*) myocytes in culture and the role of IGF-II in the PI3K/Akt and
MAPK signalling pathways**

General and Comparative Endocrinology 157 (2008) 116-124

**Efectes metabòlics i mitogènics de l'IGF-II en miòcits de truita irisada
(*Oncorhynchus mykiss*) en cultiu i paper de l'IGF-II en les vies de
senyalització PI3/Akt i MAPK**

Resum

Es van utilitzar cultius primaris de cèl·lules del múscul esquelètic de truita irisada, per a examinar el paper del Factor de Creixement tipus Insulina de tipus II (IGF-II) en el metabolisme i creixement del múscul de peix i per a comparar les seves principals vies de senyalització amb les de l'IGF-I.

L'IGF-II va estimular la captació de 2-deoxy-D-glucosa (2-DG) per part dels miòcits de truita a concentracions entre 5 i 100 nM, amb efectes màxims i patró temporal similars als trobats per IGF-I (100nM). Els resultats obtinguts incubant les cèl·lules amb inhibidors (Wortmanina i citocalasina B) van indicar que l'IGF-II estimula la captació de glucosa pels mateixos mecanismes que l'IGF-I. A més a més, l'IGF-II va estimular la síntesi de DNA en mioblasts (mesurada per la incorporació de timidina) a concentracions relativament baixes (0.1 – 10 nM), amb l'increment màxim a 1 nM ($167 \pm 17\%$ respecte els valors control).

Les cèl·lules van ser immunoreactives contra la MAPK ERK 1/2 i l'Akt-PKB, components de les dues principals vies de transducció de la senyal a través del receptor d'IGF-I (IGF-IR). L'IGF-II va estimular la fosforil·lació de la proteïna MAPK, especialment durant l'estadi de proliferació (increments de fins el $125.7 \pm 16.9\%$ i $125.3 \pm 3.3\%$ respecte els controls en cèl·lules tractades amb IGF-II i IGF-I respectivament). Per contra, els efectes d'ambdós IGFs sobre l'activació de la via PI3K/Akt van resultar majors en miòcits totalment diferenciats i en fibres recentment formades (fins a $359 \pm 18.5\%$ en cèl·lules tractades amb IGF-II respecte el control).

Aquests resultats indiquen que l'IGF-II posseeix efectes tant mitogènics com metabòlics en cèl·lules musculars de truita irisada i que aquests efectes són equivalents als trobats en resposta a l'IGF-I. Ambdós IGFs realitzen aquests efectes a través de les mateixes vies de senyalització intracel·lulars (MAPK i PI3K/Akt).

Metabolic and mitogenic effects of IGF-II in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocytes in culture and the role of IGF-II in the PI3K/Akt and MAPK signalling pathways

Abstract

Primary cultures of rainbow trout skeletal muscle cells were used to examine the role of insulin-like growth factor II (IGF-II) in fish muscle metabolism and growth, and to compare its main signal transduction pathways with those of IGF-I.

IGF-II stimulated 2-deoxy-D-glucose (2-DG) uptake in trout myocytes at concentrations of between 5 and 100nM, with similar maximal effects and temporal pattern to IGF-I (100nM). The results of incubation with inhibitors (Wortmannin and CKB) indicated that IGF-II stimulates glucose uptake through the same mechanisms as IGF-I. In addition, IGF-II stimulated myoblast DNA synthesis (measured by thymidine incorporation) at relatively low concentrations (0.1-10nM), with the maximum increase at 1nM ($167 \pm 17\%$ with respect to control values).

The cells were immunoreactive against ERK $\frac{1}{2}$ MAPK and Akt/PKB, components of the two main signal transduction pathways for the IGF-I receptor. IGF-II stimulated the phosphorylation of the protein MAK, especially at the proliferation stage (increases up to $125.7 \pm 16.9\%$ and $125.3 \pm 3.3\%$ with respect to control in IGF-II- and IGF-I-treated cells, respectively). In contrast, the effects of both IGFs on the activation of the PI3K/Akt pathway were stronger in fully differentiated myocytes and in early-formed fibres (up to $359 \pm 18.5\%$ in IGF-II-treated cells with respect to control).

These results indicate that IGF-I has both mitogenic and metabolic effects in trout muscle cells, which are equivalent to those found in response to IGF-I. Both IGFs exert these effects through the same signalling pathways (MAPK and PI3K/Akt).

Referència bibliogràfica del treball:

Autors:

Marta Codina, Daniel García de la serrana, Joan Sánchez-Gurmaches, Núria Montserrat, Oxana Chistyakova, Isabel Navarro, Joaquim Gutiérrez.

Títol:

Metabolic and mitogenic effects of IGF-II in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocytes in culture and the role of IGF-II in the PI3K/Akt and MAPK signalling pathways.

Publicació:

General and Comparative Endocrinology 157 (2008) 116-124

**Clonació i caracterització de la miogenina d'orada (*Sparus aurata*) i anàlisi de
l'especificitat del seu promotor**

**Cloning and characterization of myogenin from seabream (*Sparus aurata*) and
analysis of promoter muscle specificity**

Comparative Biochemistry and Physiology, Part D 3 (2008) 128-139

Clonació i caracterització de la miogenina d'orada (*Sparus aurata*) i anàlisi de l'especificitat del seu promotor

Resum

La miogènesi del múscul esquelètic en vertebrats està controlada per molècules de senyalització extracel·lular juntament amb factors de transcripció intracel·lulars. Entre els factors transcripcionals, els membres dels factors reguladors de la miogènesi (MRFs) incloent MyoD, Myf5, Miogenina i MRF4, juguen papers importants, ja que regulen el desenvolupament i creixement del múscul esquelètic.

Per tal de caracteritzar l'estructura i l'expressió del gen de la miogenina en peixos, hem aïllat les seqüències genòmiques i de cDNA de l'orada (*Sparus aurata*), així com també analitzat la seva estructura genòmica, el seu patró d'expressió i la regulació de la seva expressió específica de múscul. L'anàlisi de la seqüència va demostrar que la miogenina d'orada comparteix una estructura similar amb la miogenina d'altres peixos, amb tres exons, dos introns, i el domini altament conservat bHLH. Els estudis d'expressió van demostrar que la miogenina s'expressa tant en múscul vermell (de contracció lenta) com en múscul blanc (de contracció ràpida) i també en cèl·lules musculars en cultiu primari. La hibridació *in situ* va mostrar que la miogenina s'expressava específicament en somites en desenvolupament en embrions d'orada.

L'anàlisi de l'activitat del promotor va demostrar que el promotor de la miogenina podia dirigir l'expressió de la proteïna verda fluorescent (GFP) en cèl·lules musculars d'embrions de peix zebra i en miofibres de peix zebra adult i de juvenils d'orada. L'anàlisi de deleció va demostrar que aquesta activitat específica de múscul depèn de la presència d'uns llocs d'unió per a MEF2 i MEF3 que es troben localitzats entre els primes 550 pb de la seqüència del promotor de miogenina.

Cloning and characterization of myogenin from seabream (*Sparus aurata*) and analysis of promoter muscle specificity

Abstract

Myogenesis of skeletal muscles in vertebrates is controlled by extracellular signalling molecules together with intracellular transcription factors. Among the transcriptional factors, the members of the myogenic regulatory family, including MyoD, Myf5, Myogenin and MRF4, play important roles regulating skeletal muscle development and growth.

To characterize the gene structure and expression of fish myogenin, we have isolated the myogenin genomic gene and cDNA from gilthead seabream (*Sparus aurata*) and analyzed the genomic structure, pattern of expression and the regulation of muscle-specific expression. Sequence analysis revealed that the seabream myogenin shares a similar gene structure with other fish myogenins, with three exons, two introns and the highly conserved bHLH domain. Expression studies demonstrated that myogenin is expressed in both slow and fast muscles as well as in muscle cells in primary culture. In situ hybridization showed that myogenin was specifically expressed in developing somites of seabream embryos.

Promoter activity analysis demonstrated that the myogenin promoter could drive green fluorescence protein expression in muscle cells of zebrafish embryos, as well as in myofibers of adult zebrafish and juvenile seabream. Deletion analysis demonstrated that this muscle-specific activity depends on the presence of a MEF2 and a MEF3 binding site within the 550 bp myogenin promoter sequence.

Referència bibliogràfica del treball:

Autors:

Marta Codina, Yue-Hong Bian, Joaquim Gutiérrez, Shao-Jun Du

Títol:

Cloning and characterization of myogenin from seabream (*Sparus aurata*) and analysis of promoter muscle specificity.

Publicació:

Comparative Biochemistry and Physiology, Part D 3 (2008) 128-139