

Patologia molecular de les miopaties miofibril·lars

Anna Janué Muntasell

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

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

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



Departament de Patologia i Terapèutica Experimental

**Programa de doctorat de Biologia Cel·lular i Molecular
(bienni 2005/2007)**

Patologia molecular de les miopaties miofibril·lars

Tesi doctoral de l'Anna Janué Muntasell

**Director de la tesi
Dr. Isidre Ferrer Abizanda
Catedràtic d'Anatomia Patològica (INP)**

**Codirectora de la tesi
Dra. Montserrat Olivé Plana
Facultativa especialista (INP)**

Barcelona, desembre del 2009.

I. ÍNDEX

I. ÍNDEX	5
II. Abreviatures i acrònims	11
1. Introducció	
1.1 MFM	17
1.2 Patologia general de les MFM	18
1.3 Aspectes clínics de les MFM	
1.3.1 Desminopaties	20
1.3.2 αB-cristal·linopaties	21
1.3.3 Miotilinopaties	22
1.3.4 Zaspopaties	22
1.3.5 Filaminopaties	23
1.4 Proteïnes mutades que produeixen MFM	
1.4.1 DESMINA	23
Funció i interacció amb altres proteïnes.....	25
Models d'estudi i mutacions.....	26
1.4.2 αB-CRISTAL·LINA	27
Funció i interacció amb altres proteïnes.....	28
Models d'estudi i mutacions.....	28
1.4.3 MIOTILINA	29
Funció i interacció amb altres proteïnes.....	30
Models d'estudi i mutacions.....	31
1.4.4 ZASP	32
Funció i interacció amb altres proteïnes.....	33
Models d'estudi i mutacions.....	34
1.4.5 FILAMINA C	34
Funció i interacció amb altres proteïnes.....	35
Models d'estudi i mutacions.....	36
1.5 Mecanismes patològics	
1.5.1 L'estrès oxidatiu i nitratiu	36
1.5.2 El proteosoma i l'UPS	39
1.5.3 Els agregats proteics i l'agresoma	41
1.5.4 <i>Molecular misreading</i>	43
1.5.5 El rol de la p62	44

1.6 Altres proteïnes agregades a les MFM	
1.6.1 TDP-43.....	45
1.6.2 Tau.....	47
2. Objectius	
2.1 Modificacions per dany oxidatiu (3.1, 3.2).....	53
2.2 Relació entre el dany oxidatiu i els agregats proteics (3.1, 3.3).....	53
2.3 Altres proteïnes agregades a les MFM (3.4, resultats annexos 7.5).....	53
3. Resultats	
3.1 Janué, A; Olivé, M; Ferrer, I. Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: a link between oxidative damage and abnormal protein aggregation. <i>Brain Pathol</i> (2007);17 (4): 377-88.....	59
3.2 Janué, A; Odena, MA; Oliveira, E; Olivé, M; Ferrer, I. Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathie. <i>J Neuropathol Exp Neurol</i> (2007); 66 (8): 711-23.....	71
3.3 Olivé, M; van Leeuwen, FW; Janué, A; Moreno, D; Torrejón-Escribano, B; Ferrer, I. Expression of mutant ubiquitin (UBB+1) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. <i>Neuropathol Appl Neurobiol</i> (2008); 34 (1): 76-87.....	85
3.4 Olivé, M; Janué, A; Moreno, D; Gámez, J; Torrejón-Escribano, B; Ferrer, I. TAR DNA-Binding protein 43 accumulation in protein aggregate myopathies. <i>J Neuropathol Exp Neurol</i> (2009); 68 (3):262-73.....	97
4. Discussió	
4.1 L'estrès oxidatiu/nitratiu.....	113
4.2 Relació entre el dany oxidatiu i els agregats proteics.....	116
4.3 Altres proteïnes agregades a les MFM	
4.3.1 TDP-43.....	120
4.3.2 Tau.....	124

5. Conclusions	
5.1 Modificacions per dany oxidatiu/nitratiu.....	131
5.2 Relació entre el dany oxidatiu i els agregats proteics.....	131
5.3 Altres proteïnes agregades a les MFM.....	132
5.4 Conclusió general.....	133
6. Referències.....	137
7. Resultats annexos	
7.1 Fig 1. Confocals de la miotilina i els AGE a les desminopaties.....	163
7.2 Fig 2. Confocals de la γ-tubulina i la miotilina a les miotilinopaties...	164
7.3 Fig 3. Confocals de la γ-tubulina i la desmina o la miotilina a les desminopaties.....	165
7.4 Fig 4. RT-PCR de la miotilina i la desmina a les MFM.....	166
7.5 Article de la fosforilació de la tau a les MFM.....	167
7.6 Immunohistoquímica de la 14-3-3 a les MFM.....	193
III. Agraïments.....	197

II. ABREVIATURES

II. Abreviatures i acrònims

- ABP-L: *actin binding protein*, isoforma L
- AD: autosòmica dominant
- ADN: àcid desoxiribonucleic
- AGE: *advanced glycation end products*
- ARNm: àcid ribonucleic missatger
- ATP: trifosfat d'adenosina
- β APP: proteïna precursora del β -amiloid
- BAG3: *BCL2-associated athanogene 3*
- CAP: *Cbl-associated protein*
- cdk5: *cyclin-dependent kinase 5*
- CEL: N-carboxietil-lisina
- CHMP2B: gen de la *chromatin modifying protein 2B*
- CML: N-carboximetil-lisina
- CRYAB: gen de l' α B-cristal·lina
- DES: gen de la desmina
- DGCR8: *DiGeorge syndrome critical region gene 8*
- DM1: distròfia miòtonica del tipus I
- ELA: esclerosi lateral amiotròfica
- eNOS: sintasa de l'òxid nítric endotelial o isofoma III
- ERAD: degradació associada al reticle endoplasmàtic
- ERK: *extracellular signal-regulated kinase*
- FATZ: *filamin, α -actinin and telethonin binding protein of the Z-disc*
- FHL1: *four-and-a-half LIM domain 1*
- FI: filaments intermedis
- FLNC: gen de la filamina C
- FTD: demència frontotemporal
- FTLD-MND: degeneració del lòbul frontotemporal amb afectació de les motoneurones
- FTLD-U: degeneració del lòbul frontotemporal amb inclusions d'ubiquitina
- GFAP: *glial fibrillary acid protein*
- GSK3 β : *glycogen synthase kinase 3 β*
- HE: tinció d'hematoxilina-eosina
- HNE: 4-hidroxinonenal
- HSP: *heat shock proteins*

HUB: Hospital Universitari de Bellvitge
IBM: miositis amb cossos d'inclusió
IBMPFD: miopatia amb cossos d'inclusió i malaltia de Paget dels ossos
iNOS: sintasa de l'òxid nítric induïble o isoforma II
INP: Institut de Neuropatologia
KO: *knockout*
LBD3: gen de la *LIM domain binding 3* o altrament anomenada ZASP
LINC: *linker of the nucleoskeleton and the cytoskeleton*
LGMD1A: *limb-girdle muscular dystrophy 1A* o distròfia muscular de cintura escapular i pelviana del tipus 1A
MAPK: *mitogen activated kinase protein ERK1/ERK2*
MAPs: proteïnes associades als microtúbuls
MAPT: gen de la proteïna associada als microtúbuls tau
MDAL: malondialdehid-lisina
ME: microscopia electrònica
MFM: miopaties miofibril·lars
microARN: micro àcid ribonucleic
MTOC: centre d'organització dels microtúbuls
MURFs: muscle-specific RING finger protein family
MYOT: gen de la miotilina
N-CAM: *neural cell adhesion molecule*
NFκB: factor de transcripció nuclear κB
nNOS: sintasa de l'òxid nítric neuronal o isofoma I
NO: òxid nítric
NOS: sintases de l'òxid nítric
N-Tyr: 3-nitrotirosina
O₂⁻: anions del superòxid
ONOO⁻: peroxinitrit
PAM: miopaties d'agregats proteics
PGRN: gen de la progranulina
PHF: *paired helical filaments*
PKC: proteïna quinasa C
RAGE: receptor dels *advanced glycation end products*
RE: reticle endoplasmàtic
RN3: ARNasa del tipus III Drosha
RNS: espècies reactives del nitrogen
ROS: espècies reactives de l'oxigen

RT-PCR: *real-time polymerase chain reaction*

Ser: serina

sHSP: *small heat shock proteins*

sIBM: miopaties esporàdiques amb cossos d'inclusió

SN: sistema nerviós

SNC: sistema nerviós central

SNP: sistema nerviós perifèric

SOD: enzims dismutadors dels anions de superòxid o superòxid dismutases

SSAO: oxidasa d'amines sensible a la semicarbàcida

TARDBP: gen de la *TAR DNA binding protein* o la TDP-43

TDP-43: *TAR DNA binding protein 43*

TG: tinció de tricròmic de Gomori

UBA: domini associat a la ubiquitina

UBB⁺¹: ubiquitina mutada mitjançant el procés del *molecular misreading*

UBL: domini tipus ubiquitina

ULFs: unitats longitudinals dels filaments

UPS: sistema ubiquitina-proteosoma

VCP: gen de la valosina

wt: *wild type*

ZASP: *Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein*

ZM: motiu tipus ZASP

1. INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1 MFM

Les miopaties miofibril·lars (MFM) són un grup heterogeni de malalties musculars progressives, hereditàries o esporàdiques, que es caracteritzen morfològicament per la dissolució focal de les miofibril·les, l'acumulació dels productes que resulten de la degradació miofibril·lar i l'expressió ectòpica de múltiples proteïnes en forma d'agregats intracitoplasmàtics insolubles (De Bleecker et al. 1996, Nakano et al. 1996, Selcen et al. 2004a). Les MFM són causades per mutacions a diferents gens, la majoria dels quals codifiquen per proteïnes sarcomèriques del disc Z o bé per proteïnes que resulten indispensables per mantenir-ne la seva integritat. Aquestes són la desmina (Goldfarb et al. 1998, Munoz-Marmol et al. 1998, Dalakas et al. 2000, Dagvadorj et al. 2004, Goldfarb et al. 2004, Olivé et al. 2007, Goldfarb et al. 2008), l' α B-cristal·lina (Vicart et al. 1998, Selcen et al. 2003), la miotilina (Selcen et al. 2004b, Olivé et al. 2005), la ZASP (*Z-band alternatively spliced PDZ motif-containing protein*) (Selcen et al. 2005, Griggs et al. 2007) i la filamina C (Vorgerd et al. 2005).

No es coneix la freqüència relativa de les mutacions dels gens que causen MFM, però se sap que la proporció de mutacions de cada un dels diferents gens trobades en un grup de 63 pacients afectats de MFM de la Clínica Mayo dels EEUU és de: 6% per al gen de la desmina (*DES*); 15% al gen de la ZASP (*LBD3*), 3% al gen de l' α B-cristal·lina (*CRYAB*); 10% al gen de la miotilina (*MYOT*) i 3% a gen de la filamina C (*FLNC*). Tot i així, es creu que encara queden altres gens causatius per descobrir, ja que al 80% dels pacients d'aquest grup de la Clínica Mayo no se'ls ha pogut identificar la base genètica de la seva MFM (www.genereviews.org; Selcen and Engel, 2008).

Altres gens que ja s'inclouen en classificacions més àmplies de les MFM són el gen del FHL1 (*four-and-a-half LIM domain 1*), el gen del BAG3 (*Bcl-2-associated athanogene-3*) o el gen de la plectina (Schroder et al. 2009). De tota manera a la introducció d'aquesta tesi ens centrarem amb la descripció dels 5 subtipus de MFM esmentats al paràgraf anterior i que són els que de moment estan més globalment acceptats dins de la classificació de les MFM.

1.2 Patologia general de les MFM

Com ja s'ha esmentat anteriorment, el terme miopaties miofibril·lars agrupa diferents malalties genètiques amb unes característiques morfològiques comunes, que són les següents:

- a) Mitjançant l'ús de tècniques histològiques al estudiar les biòpsies musculars dels pacients s'observa en un nombre variable de fibres musculars: la presència d'un material amorfe, hialí o granular que es tenyeix de color vermellós o blavós amb la tinció modificada del tricròmic de Gomori; la reducció marcada de l'activitat enzimàtica oxidativa a les zones de les fibres on es troben aquestes alteracions; zones altament congofíliques que es corresponen amb les estructures hialines i la presència de petites vacuoles (ribetejades o sense ribetejar) que sovint contenen material membranós (Ferrer et al. 2008, Selcen 2008, Schroder et al. 2009).

- b) L'estudi immunohistoquímic revela l'expressió anormal i ectòpica de diverses proteïnes en forma d'agregats proteics. Aquests agregats a més de contenir la corresponent proteïna mutada (desmina a les desminopaties, miotilina a les miotilinopaties, etc.) també n'inclouen moltes d'altres que formen part del disc Z; de les miofibril·les; del citoesquelet (incloent altres filaments intermedis a part de la desmina o la distrofina); del nucli; xaperones; proteïnes del sistema de degradació proteica ubiquitina-proteosoma (UPS) i del immunoproteosoma; proteïnes relacionades amb l'Alzheimer com la proteïna precursora del β -amiloide o la tau fosforilada; marcadors de l'agresoma (γ -tubulina), proteïnes neuronals, quinases i d'altres com la proteïna priònica o la N-CAM (*neural cell adhesion molecule*) (Goebel 1995, De Bleecker et al. 1996, Nakano et al. 1996, Nakano et al. 1997, Dalakas et al. 2000, Goebel et al. 2001, Howman et al. 2003, Olivé et al. 2003, Ferrer et al. 2004, Goldfarb et al. 2004, Olivé et al. 2004b, Selcen et al. 2004a, Olivé et al. 2005, Ferrer et al. 2005a, Goebel et al. 2006, Barrachina et al. 2007, Goldfarb et al. 2008).

- c) L'observació a nivell ultraestructural, mitjançant la microscopia electrònica, de la progressiva degeneració miofibril·lar que s'inicia als discs Z i que comporta la desintegració dels sarcòmers, l'acumulació de material filamentós en degradació, la formació d'inclusions hialines de forma i mida variable i la deslocalització d'òrgans membranosos com les mitocòndries i la seva degradació a les vacuoles autofàgiques (Selcen et al. 2004a).

Desminopaties

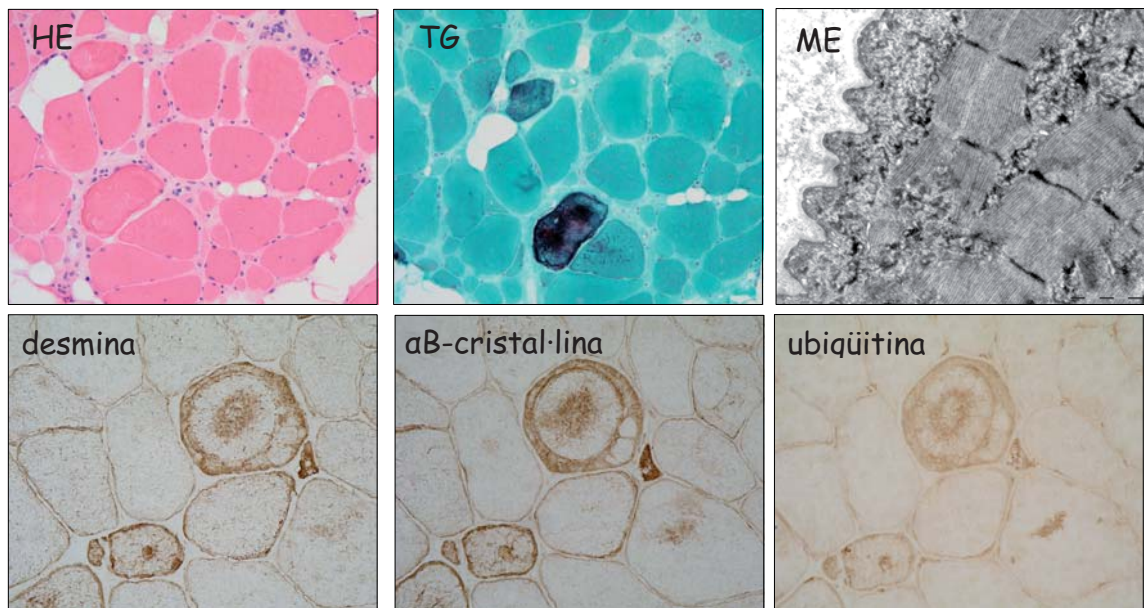


Fig 1. HE: tinció d'hematoxilina-eosina on s'observen dipòsit d'un material amorfe, eosinòfil en forma de xarxa o placa mal definida; TG: tinció de tricròmic de Gomori on el mateixos agregats agafen un color vermellós o blavós; ME: microscopia electrònica on s'observa l'acumulació d'un material granulofilamentós entre les miofibril·les i sota el sarcolemma. Les tres imatges inferiors corresponen a tincions immunohistoquímiques utilitzant anticossos que reconeixen diferents proteïnes presents als agregats proteics.

Miotilopaties

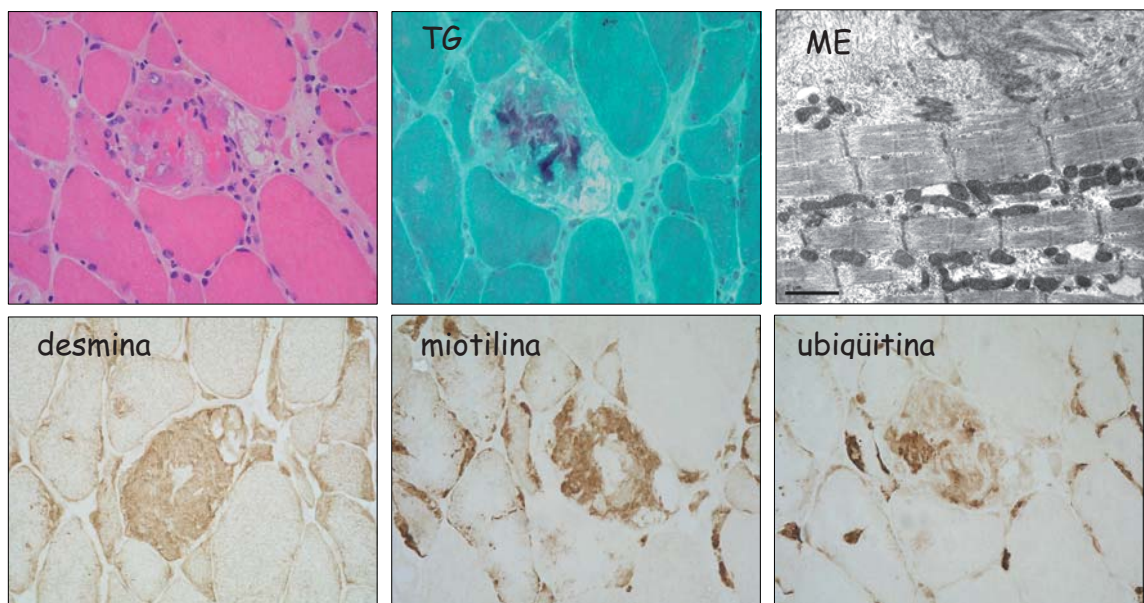


Fig 2. HE: tinció d'hematoxilina-eosina on s'observen agregats eosinòfils però també la presència de nombroses vacuoles; TG: tinció de tricròmic de Gomori on els agregats eosinòfils anteriors s'observen de color vermellós i blavós; ME: microscopia electrònica on s'observa l'acumulació d'un material filamentós i l'agrupació de mitocondries. Les tres imatges inferiors corresponen a tincions immunohistoquímiques utilitzant anticossos que reconeixen diferents proteïnes presents als agregats proteics. Observar la morfologia més compacta d'aquests en comparació a la dispersió o la forma de teranyina que presenten els de les desminopaties (1er panell).

1.3 Aspectes clínics de les MFM

Els aspectes clínics o manifestacions fenotípiques associades a les MFM són molt variades, el nombre de gens candidats a ser-ne els causants no ha parat de créixer durant els últims 10 anys (Selcen 2008).

A la major part dels casos el primers símptomes apareixen en edats adultes, excepte a les desminopaties, que en alguns casos apareix ja en l'adolescència. A trets generals, les desminopaties i les α B-cristal·linopaties tendeixen a manifestar-se en edats adultes primerenques o mitjanes, mentre que les miotilinopaties, zaspopaties i filaminopaties acostumen a aparèixer en edats adultes més avançades (Schroder et al. 2009).

El símptoma clínic inicial més freqüent acostuma a ser l'aparició de debilitat als músculs esquelètics de les extremitats inferiors (Schroder et al. 2009). En general predomina la presència de debilitat distal en el moment d'inici dels símptomes, tot i que també hi ha casos que comencen amb debilitat proximal (Ferrer et al. 2008). Altres aspectes com són la insuficiència respiratòria, la neuropatia distal i les cardiomiopaties poden aparèixer o no (Ferrer et al. 2008, Schroder et al. 2009).

1.3.1 Desminopaties

És el subgrup de les MFM causades per mutacions al gen de la desmina (*DES*). L'edat d'aparició dels primers símptomes és molt variable, entre els 15 i els 40 anys, com també ho és la gravetat amb que aquests es manifesten. Normalment es presenta en forma de debilitat muscular distal a les extremitats inferiors, primàriament al compartiment anterior, i posteriorment afecta també als músculs proximals i també als de les extremitats superiors (Goldfarb et al. 2004, Ferrer et al. 2008). Sovint apareix associada a cardiomiopaties sobretot als pacients d'edats més joves. Aquesta es pot desenvolupar molt abans de l'aparició dels símptomes al múscul esquelètic, de manera simultània a aquests o a posteriori (Dalakas et al. 2000). Altres símptomes que poden sorgir al llarg de la progressió de la malaltia o en fases finals d'aquesta són la insuficiència respiratòria i la debilitat en els músculs facials i bulbars, tot i que aquests segons a vegades es produeixen des d'un inici. El patró d'herència acostuma a ser dominant, tot i que les mutacions *de novo* no són infreqüents, i només rarament s'observa un tipus d'herència recessiva (Goldfarb et al. 2004, Selcen et al. 2004a, Ferrer et al. 2008, Selcen 2008).

La heterogeneïtat de fenotips observats i la progressió d'aquests es poden relacionar amb diversos factors: el tipus d'herència genètica, l'expressió de la proteïna als diferents tipus de teixit muscular i la ubicació de la mutació a la proteïna mutada resultant juntament amb l'alteració de les interaccions estructurals que aquesta mutació pot trencar (Goldfarb et al. 2004, Goudeau et al. 2006).

Per exemple, els casos amb edat d'aparició més primerenca i on els símptomes es presenten de manera més severa són els que presenten una herència autosòmica recessiva, mentre que els pacients que mostren una herència autosòmica dominant (AD) es caracteritzen per presentar una edat d'inici més tardana i una progressió de la malaltia més lenta. En aquest grup de pacients amb herència AD s'observen diferents tipus de síndromes: miopatia del múscul esquelètic aïllada; miopatia del múscul esquelètic seguida de l'aparició de cardiomiopatia; miopatia del múscul esquelètic seguida de l'aparició d'insuficiència respiratòria (sense la presència de cardiomiopatia); cardiomiopatia seguida de l'aparició de miopatia del múscul esquelètic i finalment cardiomiopatia aïllada. I per acabar cal afegir que les desminopaties associades amb les mutacions *de novo* encara representen un grup més complex, on la variabilitat de fenotips encara és més àmplia (Goldfarb et al. 2004).

D'altra banda, tenint en compte la localització de la mutació a la proteïna, s'ha observat que els pacients amb mutacions al segment 2B de la desmina acostumen a desenvolupar miopaties del múscul esquelètic, mentre que els que presenten mutacions al segment 1B o a la regió de la cua manifesten cardiomiopaties de manera predominant (Goudeau et al. 2006, Goldfarb et al. 2008).

1.3.2 α B-cristal·linopaties

És el subgrup de les MFM causades per mutacions al gen de l' α B-cristal·lina (*CRYAB*). L'aparició dels primers símptomes és en edats adultes, cap a la trentena. Es presenta en forma de debilitat muscular simètrica distal i proximal, i amb insuficiència respiratòria. Alguns casos presenten també cardiomiopatia, debilitat palato-faríngea i opacitat a les lents oculars (cataractes). El tipus d'herència és AD (Ferrer et al. 2008, Selcen 2008). A més, també s'ha descrit un tipus de mutació de l' α B-cristal·lina que es presenta només amb afectació cardíaca, sense haver-hi alteracions a la musculatura esquelètica (Inagaki et al. 2006).

1.3.3 Miotilinopaties

És el subgrup de les MFM causades per mutacions al gen de la miotilina (*MYOT*). L'aparició dels primers símptomes acostuma a ser en edats adultes mitjanes o més avançades, entre els 40 i 70 anys. El fenotip clínic més habitual associat a les mutacions de la miotilina és el de miopatia distal o de miopatia mixta distal i proximal. Altres símptomes com són la neuropatia perifèrica, la cardiomiopatia, la insuficiència respiratòria i l'aparició d'una veu nasal també poden aparèixer (Selcen et al. 2004b, Olivé et al. 2005). En molts casos el primer símptoma es manifesta en forma de caiguda del peu causada per la debilitat del múscul *tibialis* anterior, però en estudis posteriors s'ha demostrat mitjançant la tècnica de la tomografia computeritzada (Olivé et al. 2005) que l'atròfia muscular s'inicia al compartiment posterior de les extremitats inferiors, a diferència de les desminopaties (Olivé et al. 2005). Els pacients poden presentar una herència del tipus AD o no presentar història familiar, en aquest cas s'anomenen mutacions *de novo* (Selcen et al. 2004b, Olivé et al. 2005, Ferrer et al. 2008). Altres fenotips que s'observen a malalts d'aquest subtipus de MFM, però amb menor freqüència són els anomenats LGMD1A (*limb-girdle muscular dystrophy 1A*) (distròfia muscular de cintura escapular i pelviana del tipus 1A) en la qual predomina una distribució de la debilitat muscular proximal (Hauser et al. 2000), i la *spheroid body myopathy* (miopatia dels cossos esferoides) (Foroud et al. 2005).

1.3.4 Zaspopaties

És el subgrup de les MFM causades per mutacions al gen de la ZASP (*LBD3*). L'edat d'inici dels símptomes també és tardana, entre els 40 i els 70 anys. Acostuma a començar amb debilitat muscular distal a les extremitats inferiors, més concretament al compartiment posterior com també s'observa a les miotilinopaties. La malaltia progressa lentament i pot afectar als músculs de les mans i produir també debilitat proximal, que acostuma a ser menys predominant que la debilitat distal. En alguns pacients també apareixen altres símptomes com la cardiomiopatia o la neuropatia perifèrica (Selcen et al. 2005, Griggs et al. 2007, Ferrer et al. 2008, Selcen 2008). L'herència és del tipus AD. Les mutacions descrites que produeixen aquest subtipus de MFM es poden trobar a l'exó 6 o al 9 del gen que codifica per la ZASP (Selcen et al. 2005), però altres mutacions ubicades a l'exó 4 o al 6 s'han vinculat amb la presència de cardiomiopaties aïllades (Arimura et al. 2004).

1.3.5 Filaminopaties

És el subgrup de les MFM causades per mutacions al gen de la filamina C (*FLNC*). Una altra vegada la presentació dels primers símptomes és en edats adultes mitjanes, entre els 37 i 57 anys (o un promig de 44 anys). Apareix de manera progressiva en forma de debilitat muscular distal a les extremitats inferiors. Altres símptomes freqüents són la insuficiència respiratòria i les alteracions cardíaques, i menys freqüentment s'observa també neuropatia perifèrica (Vogler et al. 2005, Kley et al. 2007).

1.4 Proteïnes del disc Z que quan estan mutades produeixen MFM

1.4.1 DESMINA: el gen de la desmina (*DES*) es localitza al cromosoma 2q35, conté 9 exons i codifica una proteïna de 470 aminoàcids (aa) amb un pes molecular d'uns 53kDa (Li et al. 1989, Viegas-Pequignot et al. 1989). Pertany a la classe III d'homologia de seqüència de la família de proteïnes que conformen els filaments intermedis (FI) del citoesquelet juntament amb la vimentina, la periferina i la GFAP (*glial fibrillary acid protein*) (Fuchs et al. 1994). Com altres FI, la desmina s'expressa de manera específica de teixit, n'és el principal a les cèl·lules musculars i com a tal es pot trobar als tres tipus de teixits musculars (esquelètic, cardíac i llis) (Lazarides 1980a). Durant el desenvolupament del múscul esquelètic dels mamífers, la desmina n'és un dels primers marcadors (Kaufman et al. 1988, Furst et al. 1989), ja que s'expressa en mioblasts en replicació. La seva expressió precedeix la d'altres proteïnes de l'aparell contràctil i fins i tot, la de factors de transcripció de la família myoD que regulen la diferenciació del múscul, excepte el myf5 (Ott et al. 1991, Ontell et al. 1993).

Com altres FI, la desmina presenta tres dominis diferenciats: un domini central de seqüència molt conservada entre els diferents FI i amb estructura d'hèlix α que està flanquejat per dos dominis de seqüència molt variable i sense estructura helicoidal, l'extrem amino-terminal anomenat cap i l'extrem carboxi-terminal anomenat cua (Geisler et al. 1982). El domini central de 308 aa conté quatre segments helicoidals consecutius anomenats 1A, 1B, 2A i 2B, que estan separats per tres zones d'unió o *linkers*: L1, L12 i L2. La conservació de seqüència d'aquest domini es caracteritza per la periodicitat en la seqüència de 7 residus (heptens), que permeten la formació d'homodímers de desmina en forma de *coiled-coil* (Geisler et al. 1982, Bar et al. 2004). Els *coiled-coil* consisteixen en l'enrotllament dels dominis centrals de dues hèlix α de manera paral·lela que formen la unitat elemental dels filaments de desmina (Burkhard et al. 2001). Altres zones molt

conservades d'aquest domini entre els FI són els 30 primers aa del segment 1A i el final del segment 2B que inclou una de les seqüències de consens dels FI "TYRKLLEGEESRI" (Herrmann et al. 2004). I a més, una regió del centre del segment 2B anomenada *stutter*, que consisteix en una discontinuïtat de tres residus dels heptens que permet que les dues cadenes d'hèlix α dels dímers siguin paral·leles just en aquest punt (Herrmann et al. 1999, Strelkov et al. 2002).

El domini del cap de la proteïna tot i que és de seqüència molt variable entre els diferents FI, presenta un petit segment molt conservat de 9 residus. Es creu que aquest domini és important perquè hi hagi un assemblatge prou estable dels tetràmers, és a dir, una bona interacció entre els dos dímers que els formen (Herrmann et al. 1992). La segona seqüència de consens dels FI es troba just abans de la regió 1A i consisteix en 26 aa amb una seqüència que afavoreix la conformació helicoidal en forma de *coiled-coil* del domini central, per tant es considera una de les regions del cap de la proteïna imprescindible per al posterior correcte plegament de la proteïna i la formació dels filaments (Herrmann et al. 1998, Bar et al. 2004, Herrmann et al. 2004).

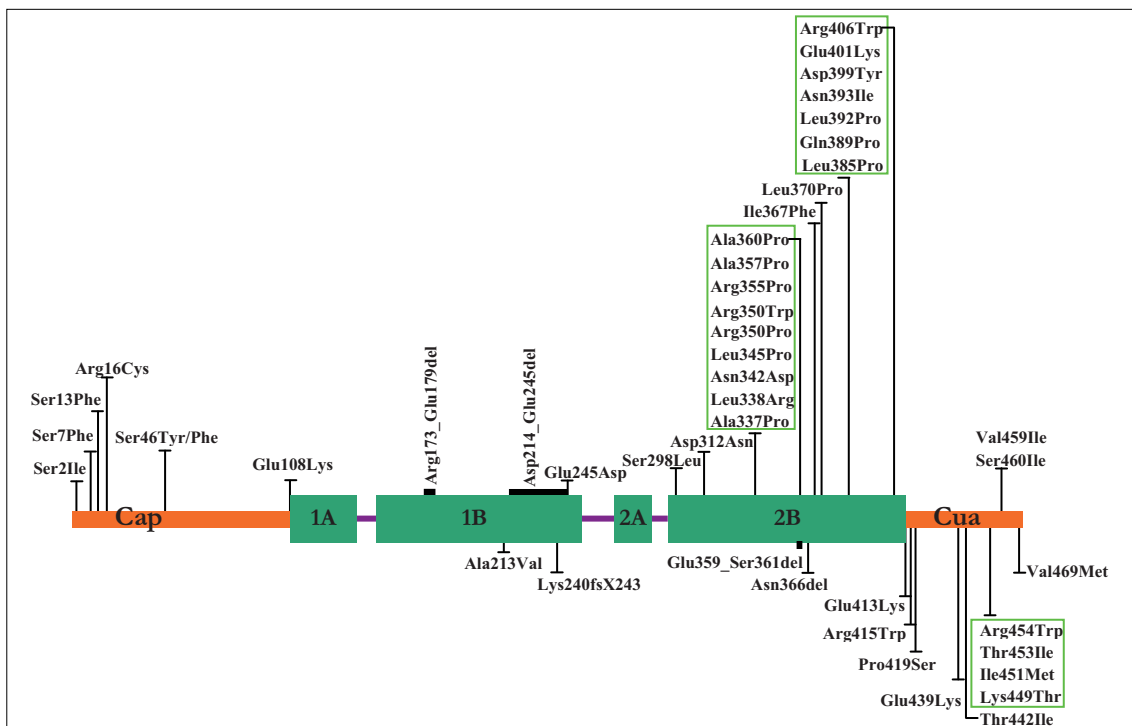


Fig 3. . Esquema de totes les mutacions identificades en el gen de la desmina (*DES*). El domini central de la proteïna està format pels quatre segments helicoidals (requadres verds) enllaçats per tres zones d'unió o *linkers* (segments violeta). Observar la nombrosa representació de les mutacions localitzades al segment 2B.

Finalment la cua de la proteïna també intervé en la formació dels filaments, concretament en l'associació lateral dels diferents oligòmers i l'empaquetatge de les diferents subunitats (Herrmann et al. 1996). Els filaments de desmina es formen a partir de la unió antiparal·lela, lateral i esglaonada de dos dímers idèntics de la proteïna (tetràmer) i aquests, s'associen pels seus extrems per formar protofilaments. Aquests protofilaments són les unitats longitudinals bàsiques dels filaments (ULFs) i s'anellen lateralment i longitudinalment per formar protofibril·les amb poc grau de compactació. La unió d'un nombre variable de protofibril·les forma un filament madur, quan aquest ha adquirit el grau de compactació radial necessari (Bar et al. 2004, Herrmann et al. 2004).

Funció i interacció amb altres proteïnes

Un cop diferenciades les cèl·lules musculars presenten els filaments de desmina a nivell dels discs Z dels sarcòmers, on enllacen lateralment les miofibril·les entre elles, i també a nivell del sarcolemma, on enllacen l'aparell contràctil a la membrana cel·lular mitjançant unes estructures anomenades costàmers (Lazarides 1980b). Ambdues unions es creuen que es fan a través de diferents isoformes de la plectina, una proteïna que fa de pont entre el citoesquelet i altres estructures (Hijikata et al. 1999, Schroder et al. 2000, Hijikata et al. 2003, Hijikata et al. 2008, Konieczny et al. 2008). A més, la desmina també interconnecta l'aparell contràctil amb el nucli i altres orgànols membranosos, com ara les mitocondries (Reipert et al. 1999, Milner et al. 2000, Capetanaki et al. 2007). La unió amb el nucli es dona a través del complex LINC (*linker of the nucleoskeleton and the cytoskeleton*) (Crisp et al. 2006). La nesprina 3, un dels components d'aquest complex, també interacciona amb la plectina (Wilhelmsen et al. 2005, Ketema et al. 2007), i així intervé en aquesta estructura d'enllaç entre els FI del citoesquelet nuclear, format principalment per les laminines A/C i els FI citoplàsmics, com la desmina (Houben et al. 2007). Les unions amb les mitocondries també depenen de la proteïna plectina (Reipert et al. 1999), i tot i que se'n coneix la isoforma específica i diferent de les associades als costàmers i als discs Z (Rezniczek et al. 2003, Konieczny et al. 2008), encara se'n desconeix la proteïna mitocondrial amb la qual enllaçaria (Capetanaki et al. 2007). Finalment també trobem desmina a les àrees post-sinàptiques de la placa motora, a les unions miotendinoses del múscul esquelètic i als desmosomes del múscul cardíac (Bar et al. 2004).

Models d'estudi i mutacions

A l'any 1996 dos grups van generar un model de ratolí transgènic en el qual l'expressió de la desmina estava anul·lada, el que s'anomena ratolins *knockout* (KO) per la desmina (Li et al. 1996, Milner et al. 1996). Aquests ratolins de fenotip (*des^{-/-}*) presenten defectes en els tres tipus de teixit muscular, però la seva arquitectura es veu afectada de manera diferent entre els dos models pel que fa a l'extensió i a l'inici dels efectes. En ambdós casos s'observa la pèrdua de l'alineament lateral de les miofibril·les, el trencament del seu ancoratge al sarcolemma i l'alteració del funcionament d'algunes mitocòndries (Bar et al. 2004). En el model de Milner s'observa una afectació primerenca i greu del múscul cardíac i l'aparició posterior de la patologia muscular en relació a l'augment de l'edat i de l'exercici; mentre que en el grup de Li, el fenotip és menys sever i els canvis en l'arquitectura del múscul apareixen en edats més avançades (Li et al. 1996, Milner et al. 1996, Bar et al. 2004). Pel que fa a les mitocòndries dels ratolins (*des^{-/-}*), s'observa l'augment de la seva mida i nombre, la pèrdua del seu correcte posicionament i finalment la seva degeneració (Milner et al. 1996, Milner et al. 2000, Bar et al. 2007). Sembla doncs que la presència d'una xarxa de desmina funcional compleix funcions essencials mitjançant l'organització en l'espai dels diferents components cel·lulars, fet que resulta imprescindible per al correcte funcionament del múscul (Milner et al. 1996, Li et al. 1997, Thornell et al. 1997, Milner et al. 2000, Bar et al. 2007).

Altres estudis funcionals de la desmina es basen en l'observació dels efectes que produeixen les seves mutacions en models de transfecció cel·lular. Si se'n vol estudiar l'efecte en la formació dels FI, es fa en un model cel·lular que no en tingui de propis com són les cèl·lules humanes SW13 de carcinoma adrenocortical; en canvi si es vol veure el seu efecte en una xarxa de FI pre-existents s'utilitzen els mioblasts de ratolí C2C12 (Bar et al. 2007). En cèl·lules C2C12, la majoria de les mutacions puntuals estudiades de la regió de la cua de la desmina exerceixen un efecte dominant negatiu en la formació de la xarxa de filaments. És a dir, no s'observa la formació d'agregats directament ja que la proteïna manté la capacitat de formar tetràmers, i fins i tot d'assolir els següents nivells d'assemblatge dels filaments. Però finalment aquests presenten unes propietats alterades i similars a les descrites en l'estudi de les mutacions puntuals de la regió central de la proteïna 2B (Bar et al. 2005, Bar et al. 2007). Es creu que aquest segon model que estudia l'impacte de les mutacions puntuals de la desmina en l'assemblatge de la desmina *wt* (*wild type*) és més interessant, perquè la majoria dels malalts de desminopaties

són heterozigots per la desmina mutant i co-expressen també la desmina wt. Per tant, aquest model mimetitzava millor les condicions patofisiològiques de la malaltia que es produeixen com a resultat de la mescla de la desmina mutada i la desmina wt (Bar et al. 2007).

L'objectiu d'aquests models és estudiar l'efecte de les mutacions puntuals de la desmina en la seva capacitat d'assemblar-se en forma de filaments primer, i la seva posterior organització en forma de xarxa. I el que s'ha vist és que aquests efectes són difícils de predir per una mutació donada. Primerament es creia que aquestes mutacions no permetien la formació de filaments, però en canvi s'ha vist que moltes de les proteïnes mutades sí que en permeten l'assemblatge tan *in vitro* com en models de tranfecció cel·lular. Per tant, actualment es creu que el mecanisme patològic implicat en aquestes mutacions podria estar més relacionat amb l'alteració de les propietats mecàniques de la xarxa de filaments intermedis o de la seva interacció amb altres elements cel·lulars (Capetanaki et al. 2007, Herrmann et al. 2007, Bar et al. 2009).

1.4.2 α B-CRISTAL·LINA: el gen de l' α B-cristal·lina (*CRYAB*) es localitza al cromosoma 11q22.3-q23.1, conté tres exons que codifiquen una proteïna de 175 aa amb un pes molecular aproximat de 20kDa (Brakenhoff et al. 1990). Aquesta proteïna pertany a la família de les sHSP (*small heat shock proteins*), que es caracteritza per la presència d'una seqüència molt conservada d'uns 90 aa a la zona carboxi-terminal de les proteïnes sHSP que s'anomena domini *crystallin* (de Jong et al. 1993). Aquest domini conservat conté dues regions hidrofòbiques riques en motius que s'estructuren en forma de fulles β connectades per una regió hidrofílica (Mornon et al. 1998). Aquestes regions hidrofòbiques són llocs d'interacció amb altres proteïnes, ja siguin les proteïnes diana a les quals hi aplica la seva activitat xaperona, com altres subunitats de la mateixa proteïna o altres sHSP (HSP20, HSP22 i HSP27) amb les quals pot formar hetero-oligòmers i fins i tot, complexes d'elevat pes molecular (Sugiyama et al. 2000, Fontaine et al. 2005). Aquest domini conservat està flanquejat per una regió amino-terminal més hidrofòbica que també està implicada en ambdós tipus d'interacció proteïna-proteïna anteriorment esmentades (Ghosh et al. 2005a, Ghosh et al. 2005b); i una extensió carboxi-terminal més polar i flexible, d'estructura no definida, que es creu que participa amb la solubilització de la proteïna i els complexes que forma juntament amb la proteïna diana (Boelens et al. 1998, Carver et al. 1998, Ghosh et al. 2006, Ecroyd et al. 2009).

Funció i interacció amb altres proteïnes

En principi la localització de l' α B-cristal·lina és citosòlica, ja que forma complexos proteics de mida i estructura variable. Aquests poden arribar a pesar fins a 800kDa i formen esferes imperfectes amb un forat central i un diàmetre d'entre 8-18nm (Haley et al. 1998, MacRae 2000). Aquests grans oligòmers o multimers d' α B-cristal·lina i altres sHSP semblen estar específicament implicats amb l'activitat xaperona d'aquest grup de proteïnes conjuntament amb la d'altres HSP d'elevat pes molecular, com per exemple l'hsp70 (Carver et al. 1998, Welsh et al. 1998). En canvi, tan al múscul esquelètic com al cardíac, l' α B-cristal·lina també es troba a la banda I dels sarcòmers, al nivell dels discs Z on es creu que interactua amb els filaments intermedis del citoesquelet, principalment amb la desmina (Atomi et al. 1991); i també amb els filaments d'actina (Bennardini et al. 1992, Ghosh et al. 2007b). Aquestes interaccions amb diferents tipus de filaments del citoesquelet tenen un rol en la modulació i reorganització d'aquests quan estan estables o en condicions normals; però també estan involucrades en la seva estabilització com a resposta a diferents tipus d'estrès cel·lular (Djabali et al. 1997, Golenhofen et al. 1998, Golenhofen et al. 1999, Ghosh et al. 2007b). En aquest segon cas, se sap que a més l' α B-cristal·lina pot interactuar amb altres proteïnes com la miosina, la titina i la tubulina (Golenhofen et al. 2002, Melkani et al. 2006, Ghosh et al. 2007a).

Models d'estudi i mutacions

Mitjançant l'estudi de ratolins KO per al gen de l' α B-cristal·lina es va observar que aquesta és important pel desenvolupament del múscul esquelètic, ja que, tot i que els ratolins són viables i no presenten defectes perinatals, a mesura que envelleixen desenvolupen una miopatia progressiva en músculs on predominen les fibres de tipus I (Brady et al. 2001), possiblement perquè l'expressió d' α B-cristal·lina acostuma a ser-hi més abundant (Atomi et al. 2000). En un altre model de ratolí transgènic en el qual es sobreexpressa als cardiomiòcits la principal mutació de l' α B-cristal·lina que causa MFM (R120G), s'ha observat la presència d'agregats de desmina i α B-cristal·lina, la desestructuració de les miofibril·les i hipertròfia cel·lular. Aquestes alteracions de les cèl·lules cardíques produeixen una cardiomiopatia similar a la que presenten alguns dels pacients amb aquesta mutació (Wang et al. 2001). Anteriorment ja s'havia descrit la reducció de l'activitat xaperona de l' α B-cristal·lina amb aquesta mutació mitjançant l'ús de models cel·lulars, i es creu que possiblement aquesta es produeix per l'alteració de l'estructura quaternària de la proteïna (Bova et al. 1999). Posteriorment, a més de

la seva tendència a formar agregats citoplasmàtics, també se'n va descriure un augment en la seva fosforilació i una alteració de la seva interacció amb altres SHSP mitjançant l'estudi de dos models cel·lulars diferents (cèl·lules COS-7 i cardiomiòcits), en els quals s'hi expressava aquesta i altres mutacions de l' α B-cristal·lina lligades a les MFM (R120G, Q151X i 464delCT) (Simon et al. 2007).

1.4.3 MIOTILINA: el gen de la miotilina (*MYOT*) es troba al cromosoma 5q31, conté 10 exons i codifica per una proteïna de 498 aa amb un pes molecular de 57kDa. La seva regió amino-terminal és única en seqüència, conté una zona rica en residus serina (29-124 aa) amb tres possibles llocs de fosforilació, i a més inclou un tram amb 23 aa hidrofòbics (57-79 aa). A la seqüència de la regió carboxi-terminal s'hi troben dos dominis tipus immunoglobulina (Ig) que són homòlegs als dominis Ig 7 i 8 de la proteïna titina que es troben associats al disc Z. La miotilina és una proteïna d'expressió restringida al múscul esquelètic, on ho fa de manera abundant, i al múscul cardíac, de manera més dèbil. A nivell subcel·lular es troba a les bandes I, més concretament als discs Z, i en forma part com a component estructural dels sarcòmers. A més, també es pot trobar a algunes regions de la membrana cel·lular (sarcolemma) i als nervis perifèrics (Salmikangas et al. 1999).

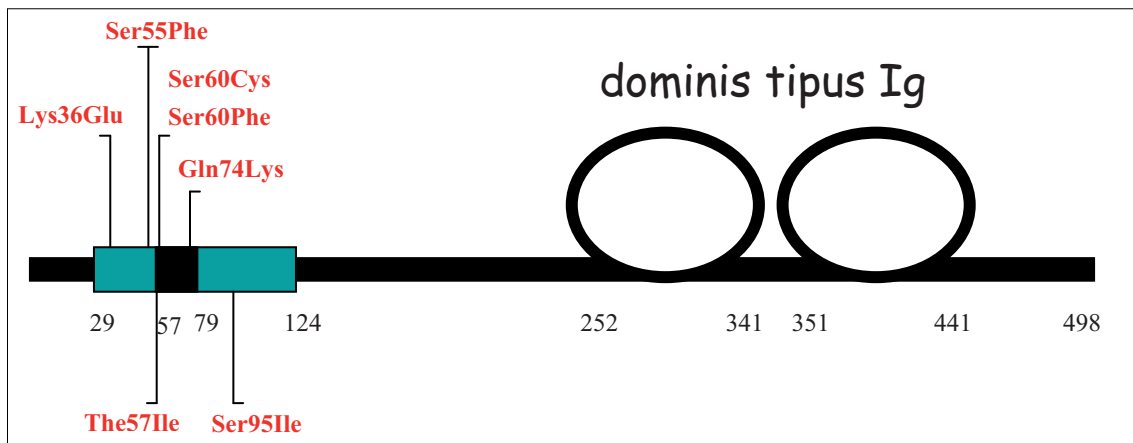


Fig 4. Esquema de totes les mutacions identificades en el gen de la miotilina (*MYOT*). Observar que totes les mutacions descrites es localitzen a la regió rica en residus serina (Ser).

Funció i interacció amb altres proteïnes

La miotilina interacciona amb l' α -actinina i la filamina C. Amb la primera ho fa través dels seus primers 215 aa amino-terminals, entre els residus 79 i 150 (Hauser et al. 2000), i amb la filamina C, mitjançant la seva regió carboxi-terminal (251-447 aa) que conté els dos dominis tipus Ig (Salmikangas et al. 1999, van der Ven et al. 2000b). Se sap que aquests dominis permeten l'interacció entre diferents proteïnes, i en el cas de la miotilina podrien estar implicats a més en la seva capacitat de dimeritzar (Salmikangas et al. 1999).

Tan l' α -actinina com la filamina C són proteïnes d'interacció amb els filaments d'actina de l'aparell contràctil de les fibres musculars, però a més la miotilina també interacciona amb la F-actina directament (Salmikangas et al. 2003). De manera que les tres proteïnes formarien un complex d'interacció amb l'actina, on la miotilina tindria un paper principal en l'ancoratge dels filaments primals als discs Z. Aquest paper estabilitzador se li otorga pel fet que, a diferència d'altres proteïnes sarcomèriques, la seva expressió es produeix durant els darrers estadis de la diferenciació cel·lular in vitro; quan el citoesquelet d'actina i els precursors dels discs Z ja han format els petits cossos I-Z-I i aleshores les miofibril·les comencen a alinear-se lateralment per formar els futurs sarcòmers, a la vegada que els discs Z es reforcen amb l'incorporació d'altres proteïnes (Ojima et al. 1999, Sanger et al. 2005). Per tant, es creu que la miotilina podria tenir un paper crucial en l'estabilització d'aquests ja que no només s'ubica als discs Z posteriorment a d'altres dels seus elements, com l' α -actinina i la filamina C; sinó que a més, quan se'n altera l'estructura mitjançant experiments de transfecció amb la proteïna truncada, s'observa com les miofibril·les en creixement es desestructuren i es formen agregats de proteïnes miofibril·lars (Salmikangas et al. 2003). Un estudi posterior identifica els dos dominis tipus Ig de la miotilina (214-498 aa) com a llocs d'interacció amb l'actina, encara que perquè es produeixi l'acció organitzadora d'aquesta cal una porció més gran de la proteïna (185-498 aa). A més, també s'observa que mutacions de la miotilina relacionades amb les MFM no alteren aquesta interacció entre la miotilina i l'actina (von Nandelstadh et al. 2005).

La miotilina també interacciona amb una altra proteïna dels discs Z, l'anomenada FATZ-1 (*filamin, α -actinin and telethonin binding protein of the Z-disc*), també anomenada miozenina-2 o cal sarcina-1. Aquesta interacció amb la regió CD2 carboxi-terminal de la FATZ-1 només és possible amb la molècula de miotilina

sencera potser perquè la seva conformació i/o potencial de dimerització són importants perquè aquesta es produeixi (Gontier et al. 2005). A més, la miotilina també pot interaccionar amb un altre membre de la família de les cal sarcines, la FATZ-2 (calsarcina-1, miozenina-2) i sembla que ho podria fer de manera similar a com ho fa amb la FATZ-1, degut a l'elevada homologia que hi ha entre les FATZ (Frey et al. 2000, Gontier et al. 2005). Com que ambdues proteïnes (miotilina i FATZ-1) interaccionen amb la filamina C (Faulkner et al. 2000, van der Ven et al. 2000b, Takada et al. 2001, Frey et al. 2002) es planteja la possibilitat de que hi hagi competència entre elles per establir aquesta interacció, ja que totes dues ho fan per la regió carboxi-terminal de la filamina C, on hi ha els dominis tipus Ig del 19 al 24. Però s'ha vist que ambdues proteïnes contenen més d'un lloc d'interacció amb la filamina C i que aquests inclouen tan regions carboxi-terminals com regions amino-terminals (Gontier et al. 2005). Per tant, ens tornem a trobar amb la possibilitat que aquestes tres proteïnes interaccionin entre elles formant un complex terciari (Gontier et al. 2005) o potser un complex multiproteïc conjuntament amb altres proteïnes dels discs Z (ex. α -actinina 2), de manera que s'establirien múltiples interaccions simultàniament.

Finalment s'ha descrit que la miotilina també pot interaccionar amb la ZASP, una altra proteïna dels discs Z, i que aquesta interacció es dona a través d'un motiu carboxi-terminal de 5aa que es troba conservat també entre altres proteïnes del discs Z com serien les diferents isoformes de FATZ (també anomenades cal sarcines) (von Nandelstadh et al. 2009).

Models d'estudi i mutacions

L'estudi de ratolins transgènics on el gen de la miotilina ha estat suprimit (*myo*^{-/-}) mostra que aquests es desenvolupen amb normalitat, tenen una esperança de vida similar a la dels ratolins control (wt) i mantenen la seva capacitat muscular, fins i tot en condicions d'estrès físic. A nivell cel·lular, l'estructura dels sarcòmers i la integritat del sarcolemma tampoc resulta alterada. Es creu que una possible explicació d'aquest fet podria ser que altres proteïnes podrien exercir una funció estructural compensatòria a la falta de miotilina, ja que a més s'observa la regulació a l'alça de l'expressió de la teletonina, una altra proteïna dels discs Z (Moza et al. 2007).

Tot i així, quan s'estudia l'efecte de l'expressió de la mutació T57I de la miotilina, també en ratolins transgènics, sí que s'observa un fenotip similar al de les MFM

causades per mutacions al gen *MYOT*. La patologia d'aquests ratolins inclou la desestructuració dels discs Z, la formació de vacuoles i la presència d'agregats de miotilina i d'altres proteïnes associades als discs Z, tot i que la miotilina mutada es localitza correctament als discs Z (Garvey et al. 2006). A més, si en el mateix model s'hi afegeix la sobreexpressió de la proteïna sense mutacions, és a dir, miotilina wt, encara apareix un fenotip més sever: amb més degeneració muscular, més agregació de proteïnes i una aparició més avançada (Garvey et al. 2008).

1.4.4 ZASP: el gen de la *Z-band alternatively spliced PDZ motif protein (LDB3)* es localitza al cromosoma 10q22.3-q23.2, conté 16 exons i codifica per diferents formes d'una mateixa proteïna que mitjançant el procés del *splicing* (empalmament) alternatiu dona lloc a proteïnes de diferents longituds i pesos moleculars, en funció del teixit on es troba. El múscul esquelètic és el lloc de màxima expressió d'aquest gen i també ho fa al múscul cardíac, encara que en menor proporció. En ambdós teixits s'hi detecten almenys tres transcrits diferents, però a nivell de proteïna només se'n detecten dues de majoritàries, una de 32kDa i una altra de 78kDa (Faulkner et al. 1999). En realitat es creu que hi ha quatre variants de ZASP en humans: la primera que seria d'uns 283 aa, i dues variants alternatives més, la segona de 470 aa i la tercera de 617 aa, que també es trobarien al múscul. Finalment la quarta que es trobaria al cervell, perquè no se'n ha demostrat la seva presència al múscul, es coneix com a *KIAA0613* i té 727 aa (Faulkner et al. 1999). L'estudi de l'ortòleg de ZASP en ratolins, l'anomenat *Cypher*, n'ha permès la classificació de 6 isoformes diferents separades en dos grups. Tres isoformes serien específiques del teixit cardíac (*Cypher* 1c, 2c i 3c) i les altres 3 (*Cypher* 1s, 2s i 3s), específiques del teixit esquelètic (Huang et al. 2003). Aquest mateix grup proposa que els humans també presenten 3 isoformes de ZASP al múscul esquelètic i tres més al múscul cardíac, però que les diferències pel que fa al nombre i la repartició dels exons que les conformen no coincideixen exactament amb la de les isoformes del gen ortòleg *Cypher*. Com al ratolí, totes les isoformes presenten el domini PDZ a la seva part amino-terminal. Les isoformes del teixit cardíac inclouen l'exó 4 i les de l'esquelètic en comptes d'aquest, presenten l'exó 6 (Huang et al. 2003). La isoforma curta del múscul esquelètic, a més, presenta un codó de terminació de transcripció a l'exó 9 i no presenta cap domini LIM al seu extrem carboxi-terminal. En canvi les isoformes llargues, poden o no incloure l'exó 10, però mai l'exó 9, i totes elles presenten 3 dominis LIM als seus extrems carboxi-terminals (Selcen et al. 2005). A més, entre els dominis PDZ i LIM, també es troba una seqüència interna de 26 aa molt

conservada entre algunes de les proteïnes que també presenten ambdós tipus de dominis. Aquesta seqüència conforma els anomenats dominis ZM i coincideix amb els exons 4 i 6 de ZASP (Klaavuniemi et al. 2004).

Funció i interacció amb altres proteïnes

Tan els dominis PDZ com els dominis LIM són importants per les interaccions entre proteïnes. El domini PDZ de ZASP interacciona amb l' α -actinina 2, el component majoritari dels discs Z on hi enllaça els filaments primis d'actina i la titina (Faulkner et al. 1999, Faulkner et al. 2001). De fet s'ha proposat la formació d'un complex terciari entre la ZASP, l' α -actinina 2 i la titina, on el domini PDZ amino-terminal de la ZASP interaccionaria amb el domini tipus calmodulina carboxi-terminal de l' α -actinina 2, i a la vegada aquesta interaccionaria amb les repeticions Z de la titina mitjançant una superfície d'unió diferent (Au et al. 2004). D'aquesta manera la ZASP forma part de l'entremat de proteïnes que conformen els discs Z dels sarcòmers tan del teixit esquelètic com del cardíac (Faulkner et al. 1999). D'altra banda, se sap que els dominis LIM que presenten algunes de les isoformes de *Cypher* interaccionen amb la proteïna quinasa C (PKC) (Zhou et al. 1999). A més, els dominis ZM sembla que podrien estar implicats amb un segon tipus d'interacció amb l' α -actinina 2, és a dir, que hi interaccionarien per una regió diferent de per on ho fan els dominis PDZ (Klaavuniemi et al. 2004, Klaavuniemi et al. 2006). Tot i així encara no és té clar quina funció tindria aquesta segona interacció, ja que al estudiar l'efecte de les mutacions dels dominis ZM que han estat implicades amb malalties del múscul cardíac (Vatta et al. 2003) i de l'esquelètic (Selcen et al. 2005), no s'ha trobat cap alteració de la seva colocalització amb l' α -actinina (Klaavuniemi et al. 2006).

La ZASP interacciona també amb les diferents isoformes de la FATZ (també anomenades calsarcines), i sembla que no ho fa de manera específica d'isoforma ja que s'ha comprovat tant per la isoforma *ZASP/Cypher 1* com per la *ZASP/Cypher 2* (Frey et al. 2002). A més, es creu que aquesta interacció podria fer-se mitjançant un motiu carboxi-terminal que també es troba conservat en d'altres proteïnes com la miotilina, la paladina i la miopaladina, i que sembla que els permet interaccionar amb els dominis PDZ que tenen diverses proteïnes de la família Enigma, entre elles la ZASP (von Nandelstadh et al. 2009).

Models d'estudi i mutacions

L'estudi de ratolins transgènics que són nuls o KO tan per *cypher 1* com per *cypher 2* (*cypher*^{-/-}), mostra que aquests animals presenten una elevada mortalitat perinatal. Aquesta segurament es deu a la no funcionalitat de molts dels seus músculs estriats. A nivell ultraestructural es pot observar que tan els músculs esquelètics com el cardíac presenten desorganització i fragmentació de la línia Z dels sarcòmers. Sembla que la presència de *cypher 1* i *2* no és necessària perquè els músculs es formin durant el desenvolupament, però en canvi sí que ho és per mantenir-ne la seva funcionalitat un cop formats (Zhou et al. 2001).

A més, al introduir mutacions a la proteïna mitjançant estudis in vitro de cardiomiòcits transfectats, s'ha vist que quan les mutacions es troben al domini PDZ poden impedir la interacció de *cypher* amb l' α -actinina 2 i també la seva localització a la línia Z (Zhou et al. 2001). Posteriorment, en estudis amb els mateixos ratolins nuls per *cypher* en els quals se'ls rescatava l'expressió de l'isoforma curta o la llarga del múscul esquelètic d'aquesta proteïna (*Cypher 2s* o *3s*), es va aconseguir fer-los sobreviure com a mínim durant un any, tot i que continuaven mostrant signes de patologia muscular (Huang et al. 2003).

1.4.5 FILAMINA C: el gen de la filamina C, γ -filamina o també ABP-L (*FLNC*) es troba al cromosoma 7q32-q35, conté 46 exons i codifica per una proteïna de 2.705 aa amb un pes molecular de 289kDa (Gariboldi et al. 1994, Xie et al. 1998). La filamina C és la isoforma de les filamines específica del múscul estriat, tan de l'esquelètic com del cardíac. Al primer es troba als discs Z i a les unions miotendinoses, i al segon la trobem als discs intercalars (van der Ven et al. 2000a). Les filamines són proteïnes d'unió a l'actina, al cap de cada una de les isoformes de la proteïna (extrem amino-terminal) hi trobem el seu domini d'unió a l'actina i a continuació es succeeixen 24 dominis tipus immunoglobulina (Ig). La filamina C conté, a diferència de les altres isoformes (A i B), una inserció de 78 aa enmig del domini tipus Ig número 20 que és el responsable de la seva localització als discs Z (van der Ven et al. 2000b). A més, el domini tipus Ig més carboxi-terminal, el nº 24, és el responsable de la seva capacitat de dimeritzar, fet imprescindible perquè pugui dur a terme la seva activitat d'interconnexió de l'actina (Himmel et al. 2003). Aquesta capacitat de dimeritzar sembla que podria estar regulada per una regió de 35 aa poc conservada, que es troba entre el dominis tipus Ig 23 i 24 de totes les isoformes de la filamina i que s'anomena *hinge 2* (regió frontissa) (Himmel et al. 2003).

Funció i interacció amb altres proteïnes

La filamina C és una proteïna de doble localització a les fibres musculars, ja que a part de trobar-se als discs Z de les miofibril·les, també n'hi ha a nivell del sarcolemma, al anomenat complex de la distrofina i les glicoproteïnes, on interacciona amb els sarcoglicans γ i δ (Thompson et al. 2000). La interacció amb aquest complex estructural tan important del sarcolemma de les fibres musculars juntament amb la seva capacitat de interconnectar els filaments d'actina podria implicar la participació de la filamina C en algun mecanisme de transducció de senyals des de la matriu extracel·lular al citoesquelet d'actina (Thompson et al. 2000, Stossel et al. 2001, Popowicz et al. 2006).

Una de les altres proteïnes que interacciona amb la filamina C és la miotilina, com s'esmenta a l'apartat referent a aquesta proteïna, ho fa just per la inserció de 78 aa del domini tipus Ig 20 específica d'aquesta isoforma de les filamines, fet que l'ancora de manera indirecta a l' α -actinina dels discs Z (van der Ven et al. 2000b). A més, com també queda descrit a l'apartat de la miotilina, la filamina C també interacciona amb les miozenines, també anomenades FATZ i cal sarcines (Faulkner et al. 2000, Takada et al. 2001, Frey et al. 2002, Gontier et al. 2005). Sembla que el lloc d'interacció de la miozenina podria localitzar-se a al domini tipus Ig 23 de l'extrem carboxi-terminal de la filamina C, molt a prop però diferent del lloc d'unió de la miotilina que es trobaria al domini tipus Ig 20 (Takada et al. 2001). El que resulta més interessant de la relació d'aquestes tres proteïnes és que la interacció de la filamina C, també mitjançant la seva regió carboxi-terminal, amb la subunitat β 1A de l'integrina (proteïna de membrana) permet la connexió d'aquestes proteïnes del disc Z amb el sarcolemma (Gontier et al. 2005).

La filamina C també interacciona amb la proteïna Xin (van der Ven et al. 2006), proteïna que es troba de manera abundant als discs intercalars de les cèl·lules del múscul cardíac i a les unions miotendinoses de les cèl·lules del múscul esquelètic, en ambdós casos forma llocs especialitzats d'unió de les miofibril·les amb el sarcolemma (Pacholsky et al. 2004). A més, en aquest tipus d'estructures d'ancoratge a la membrana que també inclouen els costàmers, la filamina C interacciona amb la CAP (*Cbl-associated protein*), una proteïna adaptadora que interacciona amb proteïnes senyalitzadores i proteïnes del citoesquelet (Zhang et al. 2007).

Models d'estudi i mutacions

Principalment trobem dos models desenvolupats pel mateix grup, on l'expressió de la filamina C ha estat reduïda o eliminada. El primer consisteix en reduir-ne la seva expressió en mioblasts de ratolí C2C12 mitjançant ARN d'interferència. En aquest cas s'observen problemes en la diferenciació d'aquests mioblasts i la seva fusió, fet que desemboca en la formació d'una espècie de "mioboles" multinucleades. El segon model consisteix en ratolins transgènics nuls per la filamina C, que presenten una mort prematura després del seu naixement, degut a dificultats respiratòries. Es creu que això es produeix perquè els seus músculs presenten una reducció en el nombre de fibres musculars i de miotubs primaris, fet que indicaria l'existència de defectes durant la miogènesis primària dels músculs d'aquests ratolins (Dalkilic et al. 2006).

1.5 Mecanismes patològics

1.5.1 L'estrès oxidatiu i nitratiu

La producció de radicals lliures, tan si es tracta d'espècies reactives de l'oxigen (ROS) com del nitrogen (RNS), és un fenomen àmpliament distribuït que es dona tan en condicions patològiques com de manera fisiològica. A les cèl·lules musculars, igual que a la resta de cèl·lules eucariotes, la principal font de ROS són les mitocondries, on mitjançant el transport d'electrons a través de la cadena respiratòria es produeix ATP amb consum d'oxigen i producció d'anions de superòxid (Murrant et al. 2001). D'altra banda, la principal RNS que es produeix al múscul esquelètic és el peroxinitrit (ONOO^-), una molècula molt reactiva que es produeix ràpidament quan els anions del superòxid (O_2^-) reaccionen amb l'òxid nítric (NO) que produeixen les sintases de l'òxid nítric (NOS) (Nakaki et al. 1999). A les fibres musculars esquelètiques s'expressen les tres isoformes de les NOS [nNOS(I), iNOS(II) i eNOS(III)]. La nNOS es troba restringida a les proximitats del sarcolemma on s'uneix al complex de la distrofina, condició en la qual es creu que resta inactivada. La eNOS es localitza principalment a l'interior de les mitocondries, mentre que la iNOS està relacionada amb processos inflamatoris, tot i que també es troba al citoplasma de les fibres musculars sanes (Stamler et al. 2001).

Donada l'elevada reactivitat de les ROS i les RNS, les cèl·lules han desenvolupat sistemes de "defensa"; o el que altrament s'anomenen respostes antioxidants (ex. la catalasa, les dismutases del superòxid, el glutatí i la seva peroxidasa, etc.); per mantenir sota control els nivells d'aquestes substàncies, i així impedir que reaccionin i alterin les macromolècules de la cèl·lula (àcids nucleics, lípids,

proteïnes i polisacàrids) (Yu 1994). Es parla d'estrès oxidatiu/nitratiu quan la producció de les ROS/RNS i els danys que aquestes causen superen els nivells i l'eficiència de les respostes/defenses antioxidants i dels sistemes de reparació d'aquests danys.

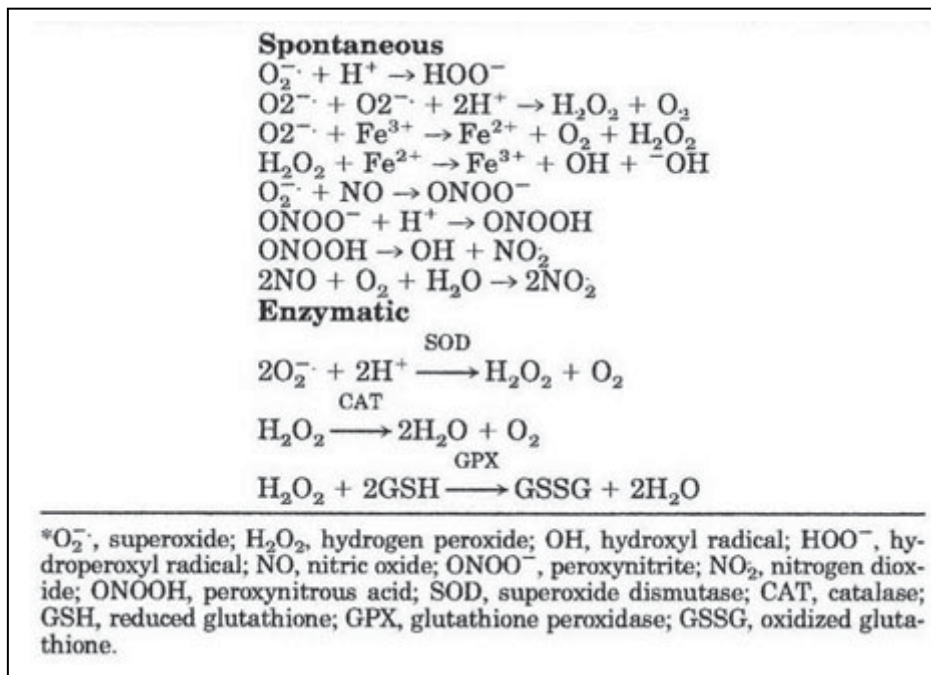


Fig 5. Esquema d'algunes de les diverses reaccions i interaccions en les quals participen les ROS i les RNS (Murrant et al. 2001).

Tot i que les cèl·lules musculars són particularment propenses a acumular dany oxidatiu amb el pas del temps (Yan et al. 2004, Kanski et al. 2003, Grune et al. 2005, Piec et al. 2005), també els processos patològics en general en són causa d'increment i el múscul esquelètic no n'és cap excepció. Si ens centrem amb les malalties musculars, la toxicitat deguda a la presència de radicals lliures s'ha vinculat amb la patogènia d'una àmplia varietat de malalties que inclouen: miopaties i miositis amb cossos d'inclusió (IBM) (Yang et al. 1996, Yang et al. 1998), miopaties mitocondrials (Esposito et al. 1999), miopaties distals amb vacuoles ribetejades (Tsuruta et al. 2002, Tateyama et al. 2003), distrofinopaties (Haycock et al. 1996, Rando 2002, Rodriguez et al. 2003) i miopaties inflamatòries (Tews et al. 1998, Haslbeck et al. 2005).

Per exemple, les fibres vacuolades presents a les IBM i a les miopaties per cossos d'inclusió queden marcades immunoreactivament tan per les sintases de l'òxid nítric neuronal i l'induïble (nNOS, iNOS) com per a la nitrotirosina (Yang et al. 1996, Yang et al. 1998). També s'observa un increment dels nivells de carbonils, i per tant del dany oxidatiu proteic, així com del dany causat per radicals lliures al ADN, en músculs de malalts de distròfies musculars de Duchenne i de Becker i altres distròfies musculars (Haycock et al. 1996, Rando 2002, Rodriguez et al. 2003). A les miopaties inflamatòries, també es troben increments en els nivells de proteïnes modificades per carbonils, com indiquen els nivells de carboximetil-lisina (CML) que s'observen tan a les fibres en degeneració i regeneració, com a les cèl·lules inflamatòries (Haslbeck et al. 2005). Pel que fa a les MFM, no es coneix l'impacte que pot tenir el dany oxidatiu en la patogènia de la malaltia, però s'ha descrit la sobreexpressió de l'oxidasa d'amines sensible a la semicarbacida (SSAO); considerada un indicador de l'estrès oxidatiu present en diferents teixits; en fibres musculars amb agregats proteics (Olivé et al. 2004a).

Una de les maneres d'estudiar la presència de l'estrès oxidatiu i/o nitratiu en un teixit és avaluar-ne l'expressió de diferents marcadors a les mostres de pacients amb una determinada patologia i comparar-les amb mostres sense alteracions o mostres control. Hi ha marcadors específics dels productes de les reaccions de glicoxidació, de lipoxidació i de nitració. Com a evidència bioquímica de la glicoxidació es pot utilitzar el marcatge amb anticossos contra els AGE (*advanced glycation end products*) i els seus receptors (RAGE), la CML (N-carboximetil-lisina) i la CEL (N-carboxietil-lisina). Tant els AGE com la CML i la CEL són grups carbonils generats per reaccions secundàries i no enzimàtiques de sucres reductors o els seus productes d'oxidació (derivats de carbonils reactius) amb els residus lisina de les proteïnes (reaccions de glicació/glicoxidació) (Dalle-Donne et al. 2006). Com a marcadors de la lipoxidació es troben anticossos que reconeixen adductes del malondialdehid (MDAL) i del 4-hidroxinonenal (HNE), ambdós són productes tardans de les reaccions de peroxidació dels lípids (Uchida 2003, Petersen et al. 2004). La detecció de la nitració es pot realitzar mitjançant anticossos contra la 3-nitrotirosina (N-Tyr), ja que aquesta marca les proteïnes modificades per peroxinitrit (Beckman et al. 1996). Una altra aproximació que també pot resultar útil és l'estudi d'altres indicadors com podrien ser els enzims productors de l'òxid nítric (nNOS, eNOS i iNOS) o enzims relacionats amb la regulació de l'estat redox de la cèl·lula, per exemple els enzims dismutadors dels anions de superòxid (SOD), entre d'altres.

El possible rol de l'estrès oxidatiu i/o nitratiu en la cascada patogènica de les MFM ha estat poc estudiat, però és un tema d'interès ja que tant les proteïnes oxidades com les nitrades poden presentar propietats anòmales que poden arribar a impedir el seu correcte funcionament. A més a més, les proteïnes oxidades poden debilitar el sistema de degradació proteica ubiquitina-proteosoma (UPS) i com a conseqüència afavorir l'acumulació de proteïnes (Davies 2001).

1.5.2 El proteosoma i l'UPS

A les cèl·lules dels mamífers trobem diferents tipus de proteases encarregades de la degradació general de les proteïnes dels diferents compartiments cel·lulars. Deixant de banda les caspases, que són proteases especialitzades i de substrat molt específic, trobem el proteosoma (20S o 26S) que s'encarrega de la degradació de les proteïnes citosòliques i nuclears més solubles (Coux et al. 1996); les catepsines lisosomals que degraden principalment proteïnes extracel·lulars que arriben al lisosoma via endocitosis, algunes proteïnes citosòliques de vida llarga que són translocades directament a través de la membrana lisosomal i proteïnes d'altres orgànols intracel·lulars mitjançant processos de micro/macroautofàgia (Pillay et al. 2002, Bechet et al. 2005); les calpaines que degraden proteïnes citoesquelètiques en resposta a augments del calci intracel·lular (Goll et al. 2003, Goll et al. 2008); i les proteases mitocondrials que s'encarreguen del reciclatge proteic intramitocondrial (Tatsuta 2009).

El proteosoma és el component essencial del sistema de degradació proteica amb consum d'ATP de les cèl·lules eucariotes. És un complex proteic format per moltes subunitats amb diverses activitats catalítiques i es pot trobar de dues formes diferents, la 20S (700kDa) i la 26S (2000kDa). Hi ha una tercera forma menys abundant anomenada immunoproteosoma que consisteix en el nucli 20S (amb tres de les seves subunitats substituïdes) i dues partícules reguladores 11S, també anomenades PA28. El proteosoma 20S conté el centre catalític amb diverses activitats peptidases, mentre que el 26S està format pel nucli 20S unit a dos partícules reguladores 19S, les quals presenten activitat ATPasa i zones de reconeixement de les cadenes de poliubiquitina (Rivett 1993, Coux et al. 1996, Shringarpure et al. 2001).

El proteosoma 26S utilitza la conjugació de les proteïnes amb l'ubiquitina com a marcatge de les proteïnes que cal degradar, cosa que fa mitjançant els enzims E1, E2 i E3, de tal manera que tot aquest mecanisme de degradació de proteïnes

marcades amb ubiquitina reb el nom de sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). Les proteïnes queden marcades per a ser degradades via el proteosoma 26S mitjançant la unió covalent de vàries ubiquitines, fet que s'anomena ubiquitinització. El primer pas consisteix en l'activació de la ubiquitina mitjançant l'enzim E1 (enzim activador de l'ubiquitina), reacció que requereix el consum d'ATP per tal d'aconseguir unir la ubiquitina a l'enzim E1. A continuació, un dels enzims E2 (enzims conjugadors de l'ubiquitina) transfereix la ubiquitina de l'enzim E1 a la proteïna substrat, que a la vegada està unida de manera específica a un dels enzims E3 (l·ligases de l'ubiquitina). A més, el proteosoma 26S requereix el consum d'ATP per tal de desplegar la proteïna substrat, i degrada principalment proteïnes marcades amb ubiquitina. Les seves partícules reguladores 19S contenen hidrolases d'ATP, proteïnes d'unió a les cadenes d'ubiquitina i enzims desubiquitinizants; per tant són imprescindibles per a reconèixer les proteïnes conjugades amb ubiquitina, desubiquitinitzar-les i desplegar-les perquè puguin accedir al centre catalític del proteosoma (Coux et al. 1996, Shringarpure et al. 2001, Glickman et al. 2002). Així doncs, molts substrats del proteosoma 26S són proteïnes reguladores de vida curta, les quals sovint no estan ni danyades ni desnaturalitzades i per això necessiten el marcatge mitjançant un "pedaç" hidrofòbic extern en forma de cadena de poliubiquitina (Beal et al. 1998). A més com que aquestes proteïnes conserven la seva forma nativa, la seva degradació a més de ser dependent d'ubiquitina, també ho és del consum d'ATP (Shringarpure et al. 2001).

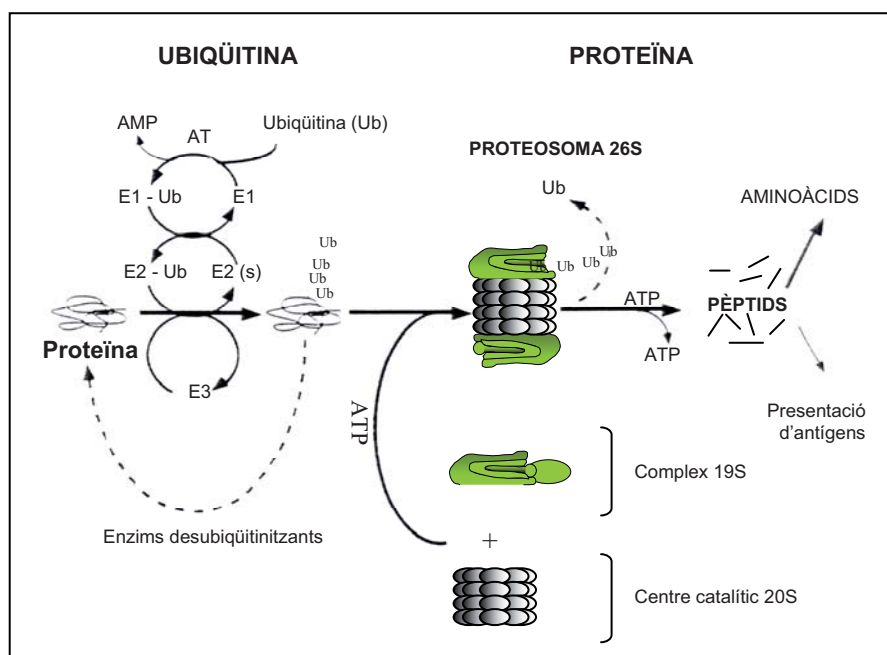


Fig 6. Esquema de l'estructura i del funcionament de l'UPS.

En canvi, s'ha descrit que les proteïnes oxidades es degraden de manera preferent al proteosoma 20S, sense consum d'ATP ni marcatge d'ubiquitina (Davies 2001). Es creu que les zones hidrofòbiques que queden al descobert a les proteïnes oxidades poden ser reconegudes pel proteosoma 20S (Grune et al. 1997), el qual a més de presentar les tres activitats peptidasa bàsiques (la tipus quimotripsina, la tipus tripsina i la hidrolasa de pèptids peptidilglutamil) també les pot mantenir en condicions d'augment de les ROS (Reinheckel et al. 1998). Cal afegir que contràriament al que es creia, la quantitat de proteosomes 20S és més de dues vegades superior a la de proteosomes 26S present a les cèl·lules de mamífers (Brooks et al. 2000). Considerant tots aquests aspectes, el proteosoma 20S és vist com una defensa de la cèl·lula vers al dany oxidatiu, que mitjançant la degradació de les proteïnes lleugerament oxidades pot evitar-ne la seva reacció creuada i la posterior formació d'agregats (Davies 2001, Shringarpure et al. 2001).

A les cèl·lules del múscul esquelètic, la major part dels proteosomes 20S detectats es troben íntimament lligats a les miofibril·les i presenten una distribució sarcomèrica (Bassaglia et al. 2005). A les MFM i a les IBM (miositis per cossos d'inclusió) s'observa la presència de les diferents subunitats del proteosoma i de l'immunoproteosoma associades als agregats proteics intracel·lulars (Ferrer et al. 2004). A més, es creu que la degradació de les proteïnes oxidades pel proteosoma 20S podria estar inhibida o disminuïda en persones d'edat avançada i malalties neuromusculars inflamatòries com la IBM (Davies et al. 2006). Per tant, no seria d'estrenyar que en d'altres malalties musculars com les MFM, on els agregats proteics són més prominents que els de les IBM, l'activitat del proteosoma per degradar proteïnes oxidades hagués quedat d'alguna manera sobrepassada. Però l'observació del manteniment de l'activitat del proteosoma, ja sigui en mostres de pacients amb MFM (Ferrer et al. 2004) com en un model de ratolí transgènic de les desminopaties (Liu et al. 2006), fa pensar que la possible alteració del proteosoma a les MFM segurament no es deu a una disminució de la seva activitat enzimàtica, sinó potser a la dificultat d'algunes proteïnes per accedir al seu centre catalític donat l'elevat grau d'agregació d'aquestes proteïnes (Ferrer et al. 2008).

1.5.3 Els agregats proteics i l'agresoma

Els agresomes són inclusions citoplasmàtiques sense membrana i de localització pericentriolar, que contenen proteïnes desplegadas i ubiquitinades. Aquestes inclusions sovint es troben envoltades per una "caixa" de filaments intermedis i la

seva formació es produeix al centre d'organització dels microtúbuls (MTOC) (Johnston et al. 1998). Es considera que la formació de l'agresoma és una resposta cel·lular general que es produeix quan la capacitat del proteosoma per eliminar les proteïnes mal plegades i amb tendència a formar agregats queda excedida (Johnston et al. 1998, Kopito 2000). S'han proposat models alternatius per explicar la formació dels cossos d'inclusió que es troben en moltes malalties amb presència d'agregats proteics, un d'ells consisteix en considerar-los agregats d'agregats. És a dir, que els cossos d'inclusió es formarien per la convergència de diferents agregats petits en un d'únic més gros, o en un nombre limitat d'aquests (Kopito 2000). Aquest model implicaria l'existència d'un transport retrògrad dels agregats cap als agresomes que es faria mitjançant la xarxa de microtúbuls. Un cop formats, el manteniment de la seva estructura està associat a la γ -tubulina (Johnston et al. 1998, Johnston et al. 2002).

Es creu que la formació dels agresomes està íntimament relacionada amb l'expressió de proteïnes mal plegades; ja sigui perquè són proteïnes mutants o perquè estan oxidades; l'envelliment cel·lular i la inhibició o disfunció del proteosoma (Grune et al. 2004).

Sembla que tot comença amb la formació d'agregats proteics. Els agregats proteics són complexos oligomèrics de proteïnes sense plegar o mal plegades que normalment no es troben unides les unes a les altres; són insolubles i metabòlicament estables en condicions fisiològiques normals (Johnston et al. 1998). Es creu que un 30% de les proteïnes de nova síntesi queden mal plegades (Fabunmi et al. 2000), per això la cel·lula ha desenvolupat tot un sistema de control de la qualitat de les proteïnes que es produeix majoritàriament al reticle endoplasmàtic (RE) i que és conegut amb el nom d'ERAD (degradació associada al RE). El procés d'ERAD es basa en la retrotranslocació de les proteïnes mal plegades a través de la membrana del RE cap al citoplasma i la seva següent degradació mitjançant el proteosoma 26S (Kostova et al. 2003). Però el nombre de proteïnes mal plegades pot incrementar-se degut a l'expressió de proteïnes mutades o quan es produeix un augment de l'estrès oxidatiu, ja que ambdós fets afavoreixen l'alteració de l'estructura secundària de les proteïnes. Quan aquesta alteració de l'estructura de les proteïnes produeix un augment de la seva superfície hidrofòbica, fa que aquestes siguin més propenses a formar agregats (Wetzel 1994, Fink 1998).

Com ja hem esmentat anteriorment, les proteïnes mal plegades són degradades pel proteosoma (20S o 26S). En ambdós casos les proteïnes han de travessar el cilindre del proteosoma que formen les seves subunitats amb activitat catalítica, i perquè això es produeixi és imprescindible que les proteïnes estiguin desplegadas (Rivett 1993, Coux et al. 1996, Grune et al. 1997). Com que els agregats proteïcs són més estables que els intermediaris proteïcs que els conformen, el destí de les proteïnes mal plegades depèn de l'equilibri entre la seva degradació al proteosoma i la seva agregació en forma d'oligòmers d'elevat pes molecular. Per tant, per poder degradar les proteïnes mal plegades d'una manera eficient, cal que els proteosomes accedeixin als seus substrats abans que aquests s'agreguin (Kopito 2000).

1.5.4 *Molecular misreading*

Un altre dels esdeveniments moleculars que han estat relacionats amb la disfunció del proteosoma és l'anomenat *molecular misreading* (van Leeuwen et al. 2000, de Pril et al. 2006). Aquest procés consisteix en l'adquisició de delecions de dinucleòtids als motius GAGAG (o a zones adjacents a aquests) presents a alguns ARN missatgers (ARNm) i va ser primerament descobert a nivell neuronal. Com a conseqüència la proteïna que es tradueix d'aquest ARNm mutat té la pauta de lectura desplaçada una posició, per això s'anomenen proteïnes +1, i es caracteritzen per tenir un extrem amino-terminal normal seguit d'un extrem carboxi-terminal alterat. Aquest mecanisme explica la modificació de la informació genètica a través de l'adquisició de mutacions a nivell transcripcional o per edicions post-transcripcionals de l'ARN (van Leeuwen et al. 1998, van Leeuwen et al. 2000).

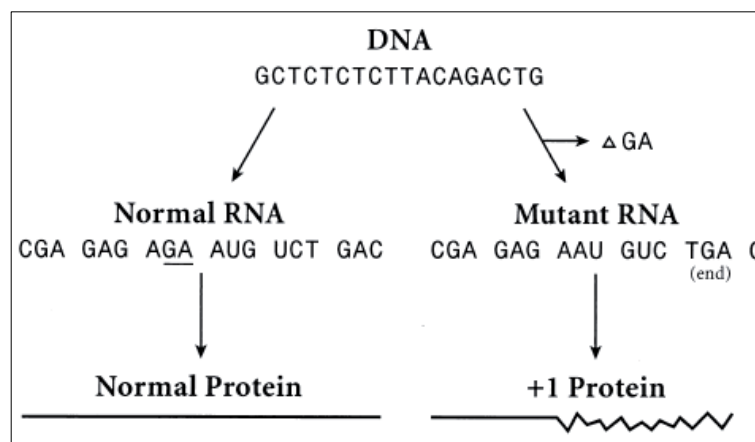


Fig 7. Esquema explicatiu del esdeveniment del *molecular misreading* (van Leeuwen et al. 2000).

De les proteïnes +1 descrites, la UBB⁺¹ és la que ha estat més estudiada i no només al SNC, ja que es creu que pot estar directament implicada en la disfunció del proteosoma en malalties amb presència d'agregats proteics també en d'altres teixits (Lam et al. 2000, van Leeuwen et al. 2000, De Vrij et al. 2001, French et al. 2001, Lindsten et al. 2002, Fischer et al. 2003, Fratta et al. 2004, de Pril et al. 2006). Es creu que la UBB⁺¹ no només no pot realitzar la seva funció correctament, sinó que a més dificulta la funció de proteosoma d'una manera més general, de manera que s'afegeix a la llista de proteïnes que es poden trobar als agregats proteics de diverses patologies caracteritzades per la presència d'aquests, ja siguin del SN com del fetge o el múscul (French et al. 2001, Lindsten et al. 2002, Fratta et al. 2004).

1.5.5 El rol de la p62

A algunes de les patologies caracteritzades per la presència d'agregats proteics, com són els cossos de Mallory en els hepatocits d'alcohòlics, els cabdells neurofibril·lars de les neurones a la malaltia d'Alzheimer o els cossos de Lewy a la malaltia de Parkinson; s'hi ha identificat la proteïna p62 com a nou component comú entre totes elles (Zatloukal et al. 2002). Aquesta proteïna va ser identificada primer com a lligand del domini SH2 de la proteïna p56^{l^{kc}} independent de la fosfotirosina (Joung et al. 1996). La seva capacitat d'interaccionar amb diferents proteïnes ha permès descriure el seu paper en la formació de l'esquelet de proteïnes que regulen la transducció de senyals que produeixen l'activació del factor de transcripció nuclear κ B (NF κ B) i també caracteritzar-ne el seu rol com a co-activador transcripcional quan en troba dins del nucli (Geetha et al. 2002). A més, mitjançant l'observació de la seva capacitat d'unió no covalent amb l'ubiquitina via el seu domini UBA, ha fet que també se la consideri implicada en la regulació mediada per senyalització de la ubiquitinització i/o la degradació proteosomal de proteïnes cel·lulars (Vadlamudi et al. 1996).

La seva expressió es troba induïda a cultius de cèl·lules neuronals quan se'ls sotmet a tractaments pro-apoptòtics o a inhibidors del proteosoma, fet que és considerat com a mecanisme de protecció contra l'augment de proteïnes ubiquitinitzades (Kuusisto et al. 2001, Zatloukal et al. 2002). I com que també es troba unida específicament als agregats de proteïnes ubiquitinitzades i mal plegades de les inclusions citoplasmàtiques de diverses malalties humanes, es

creu que també participa en la resposta cel·lular vers les proteïnes anòmales que conformen aquests agregats (Zatloukal et al. 2002).

Es creu que la p62 té un paper decisiu en el marcatge de les cadenes d'ubiquitina que a la vegada marquen els substrats per ser degradats via proteosoma. Ja que presenta un domini carboxi-terminal associat a la ubiquitina (UBA) que selecciona preferentment substrats marcats amb cadenes de poliubiquitina, i a la vegada el seu domini amino-terminal tipus ubiquitina (UBL) interacciona amb el proteosoma. A més, la seva disminució produeix la inhibició de la degradació proteosomal depenent de l'ubiquitina i l'acumulació de proteïnes ubiquitinitzades; mentre que la seva sobreexpressió indueix la formació de grans inclusions (Seibenhener et al. 2004).

Per tant, sembla que la proteïna p62 és necessària per la formació d'inclusions quan la funció del proteosoma resta alterada. D'aquesta manera intervé com a mecanisme de protecció de la cèl·lula enfront de la possible toxicitat de les proteïnes mal plegades afavorint la formació d'inclusions, a la vegada que promou l'enllaç d'aquestes proteïnes poliubiquitinitzades i agregades amb la maquinària de l'autofagocitosi com a mecanisme compensatori a la disfunció del sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) de degradació proteica (Bjorkoy et al. 2006, Wooten et al. 2006, Pankiv et al. 2007).

1.6 Altres proteïnes agregades a les MFM

1.6.1 TDP-43: també anomenada *TAR DNA binding protein 43*, és una proteïna nuclear d'expressió ubiqua principalment implicada en processos biològics dins el marc de la regulació de la transcripció, del *splicing* alternatiu dels exons i l'estabilització de l'ARN missatger. Totes aquestes funcions les pot realitzar gràcies a la seva capacitat d'unió a l'ADN de cadena senzilla, l'ARN i les ribonucleoproteïnes (Buratti et al. 2008). La TDP-43 va començar a tenir interès dins de l'estudi de les malalties caracteritzades per la presència d'agregats proteics quan va ser identificada com a component majoritari dels agregats de proteïnes insolubles que caracteritzen malalties del sistema nerviós central com són la degeneració del lòbul frontotemporal amb inclusions d'ubiquitina (FTLD-U) i l'esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Arai et al. 2006, Neumann et al. 2006, Mackenzie et al. 2007). Com a resultat d'aquestes observacions, es va començar a considerar la presència d'inclusions de TDP-43 en aquestes dues malalties com a manifestació d'una mateixa patologia que es va anomenar proteïnopatia de la

TDP-43 (Neumann et al. 2006, Forman et al. 2007, Neumann et al. 2007a, Neumann 2009a). Aquesta idea s'ha vist refermada amb la identificació de 20 mutacions diferents del gen que codifica per la TDP-43 (*TARDBP*) a pacients afectats d'ELA (Gitcho et al. 2008, Kabashi et al. 2008, Kuhnlein et al. 2008, Rutherford et al. 2008, Sreedharan et al. 2008, Van Deerlin et al. 2008, Corrado et al. 2009, Daoud et al. 2009, Del Bo et al. 2009, Lemmens et al. 2009, Pamphlett et al. 2009). Però també s'han descrit mutacions del *TARDBP* a pacients amb demència frontotemporal que no mostren afectació de les motoneurones (Borrioni et al. 2009) i altres que sí (FTLD-MND) (Benajiba et al. 2009), fet que suggereix que la TDP-43 podria estar involucrada d'una manera més directa amb la patogènia de la degeneració del lòbul frontotemporal, i no només amb la de les motoneurones.

A les proteïnopaties de la TDP-43, a més de la ubiquïtinització de la proteïna, també es produeixen altres tipus de modificacions de la proteïna, bàsicament dues, la hiperfosforilació i la fragmentació (Neumann et al. 2006). S'han generat diversos anticossos que reconeixen múltiples llocs de fosforilació a l'extrem carboxi-terminal de la proteïna i que a més no detecten la TDP-43 del nucli, que és on habitualment desenvolupa la seva funció, a més es creu que la quinasa responsable d'aquestes fosforilacions podria ser la caseïna quinasa 1 (Hasegawa et al. 2008, Kametani et al. 2009). Però el lloc de fosforilació localitzat a la serina 409/410 és el que de moment, a més de posseir les característiques anteriorment esmentades, la seva detecció és constant a les inclusions patològiques que es troben a les diferents formes de les proteïnopaties de la TDP-43 (Inukai et al. 2008, Neumann et al. 2009b).

Pel que fa a la seva truncació, aquesta genera un fragment amino-terminal i un de carboxi-terminal, però no sembla haver-hi unanimitat a l'hora de decidir quin dels dos s'acumula a les inclusions o si ho fan tots dos (Neumann et al. 2009b). Però com que el fragment carboxi-terminal és el que conté els llocs de fosforilació reconeguts pels diferents anticossos generats (Hasegawa et al. 2008, Inukai et al. 2008, Neumann et al. 2009b), a més de ser on es localitzen la majoria de les mutacions del gen (*TARDBP*) d'alguns pacients afectats d'ELA (Neumann 2009a), sembla ser que podria tenir un paper més rellevant en la formació de les inclusions citoplasmàtiques (Igaz et al. 2009, Nonaka et al. 2009, Zhang et al. 2009). També s'ha proposat que aquesta fragmentació podria estar mediada per la progranulina, ja que la supressió de la seva expressió *in vitro* produeix un augment dels

fragments de la TDP-43 generats per caspases (Zhang et al. 2007); i a més mutacions en el gen que la codifica (*PGRN*) també produeixen FTLD-U (Baker et al. 2006, Cruts et al. 2006, Mackenzie et al. 2006). Però altres creuen que la fragmentació de la TDP-43 que s'observa a la majoria de pacients amb FTLD-U podria ser causada per l'activació de caspases, però que aquesta seria independent dels nivells de progranulina dels pacients (Dormann et al. 2009).

La degeneració del lòbul frontotemporal amb inclusions d'ubiquitina (FTLD-U) és la presentació patològica més freqüent de la demència frontotemporal (FTD), que és la síndrome clínica amb que aquesta es presenta de manera més habitual (Lipton et al. 2004, Forman et al. 2006). La FTD és una síndrome clínica amb una base molecular molt heterogènia; les que són familiars poden ser causades per mutacions a diferents gens com al de la proteïna associada als microtúbuls tau (*MAPT*), la progranulina (*PGRN*), la valosina (*VCP*) i la proteïna 2B dels cossos multivessiculars (*CHMP2B*) (Neumann et al. 2009c). Els pacients amb mutacions en el gen de la valosina (*VCP*); que codifica per una proteïna membre de la superfamília de les AAA-ATPases i que és un component essencial del sistema de degradació proteica associat al reticle endoplasmàtic (ERAD) (Watts et al. 2004); presenten una afectació multisistèmica amb demència frontotemporal, miopatia amb cossos d'inclusió i malaltia de Paget dels òssos (IBMPFD) (Kimonis et al. 2000, Watts et al. 2004, Hubbers et al. 2007, Kimonis et al. 2008). Al estudiar el cervell de malalts d'IBMPFD també s'ha detectat la presència de la TDP-43 als agregats proteics ubiquitinitzats que aquests presenten (Neumann et al. 2007b) i que també es poden trobar als seus músculs (Weihl et al. 2008). De manera que també se'n ha estudiat la seva presència a les inclusions citoplasmàtiques d'altres malalties musculars com les miopaties esporàdiques amb cossos d'inclusió (sIBM) (Weihl et al. 2008, Salajegheh et al. 2009) i també a diverses miopaties amb vacuoles ribetejades (Kusters et al. 2009), a la vegada que s'ha assegurat la seva absència en els músculs dels pacients afectats d'ELA (Soraru et al. 2009).

1.6.2 Tau: és una proteïna de la família MAP2/Tau de les proteïnes associades als microtúbuls (MAPs) (Dehmelt et al. 2005), la funció principal de la qual és la regulació de la formació dels microtúbuls de la cèl·lula (Weingarten et al. 1975). Generalment la seva expressió es considera específica dels teixits neuronals, però també es pot trobar, descrit en rates, a altres tipus de teixits entre ells al múscul esquelètic (Gu et al. 1996). El gen de la tau (*MAPT*) es localitza al cromosoma 17q21 i el seu transcrit primari conté 16 exons (Neve et al. 1986, Andreadis et al.

1995). Al cervell humà aquest transcrit dóna lloc a 6 isoformes de la proteïna tau que es diferencien entre elles per la presència o absència dels exons 2, 3 i 10, fet que dóna lloc a les combinacions següents: 2-3-10-; 2+3-10-; 2+3+10-; 2-3-10+; 2+3-10+; 2+3+10+. Aquestes variacions es produeixen mitjançant el procés del *splicing* alternatiu dels exons i fan que, a nivell de proteïna, les 6 isoformes de la tau també es diferenciïn entre elles per la presència de 3 (3R) o 4 (4R) repeticions del domini d'unió a la tubulina a l'extrem carboxi-terminal i per la presència o absència d'una o dues insercions de 29 aa a l'extrem amino-terminal que conformen l'anomenat domini de projecció (Goedert et al. 1989a, Goedert et al. 1989b, Himmler et al. 1989, Ballatore et al. 2007). Però al sistema nerviós perifèric (SNP) s'hi troba una altra isoforma de la proteïna tau anomenada *big tau* que es produeix per un *splicing* alternatiu dels exons diferent del que es produeix al sistema nerviós central (SNC). Aquest inclou un exó extra anomenat 4A equivalent a una inserció de 254 aa que dóna lloc a una proteïna tau d'elevat pes molecular, d'uns 110kDa aproximadament (Couchie et al. 1992, Goedert et al. 1992).

Les primeres referències que ubiquen la proteïna tau al múscul esquelètic es centren en la seva implicació a patologies com les sIBM, on es troba acumulada a les vacuoles i a les inclusions de les biòpsies musculars dels pacients afectats d'aquesta malaltia (Askanas et al. 1994). Però també ha estat relacionada amb esdeveniments regeneratius del les fibres amb lesions a malalties tan variades com la distròfia muscular oculofaríngea i la de Becker, la dermatomiositis, la malaltia de cossos centrals, l'atròfia neurogènica i en fases de recuperació després d'un atac d'hipertèrmia maligne (Lübke et al. 1994). Finalment es va proposar que la diferència entre la presència de la tau a les fibres regeneratives i a les fibres amb vacuoles de diferents malalties musculars podria ser el seu estat de fosforilació (Murakami et al. 1995b). Tot i que a les IBM la tau fosforilada es troba tan a les fibres atròfiques sense canvis vacuolars com a les fibres no necròtiques que han estat invaïdes per cèl·lules inflamatòries (Maurage et al. 2004). A més, la tau també apareix acumulada a les vacuoles autofàgiques dels músculs de les rates model de les miopaties vacuolars, a les quals se'ls hi indueix la malaltia mitjançant el tractament amb cloroquina (Murakami et al. 1998). I fins i tot, se'n ha detectat la seva presència, encara que no ha estat confirmat per altres estudis, en forma de *curly fibres* i *tangle-like* en diversos òrgans de pacients afectats de la malaltia d'Alzheimer, entre ells també al múscul esquelètic i al cardíac (Miklossy et al. 1999).

El cert és que la presència de la tau al múscul encara es posa en dubte, ja que en molts casos quan es detecta no es té clar ni a quina de les seves isoformes correspon. La primera tau que es detecta al múscul esquelètic d'humans consisteix en una banda d'elevat pes molecular d'uns 120kDa (Lübke et al. 1994), que es podria correspondre a l'anomenada *big tau* característica del sistema nerviós perifèric (Couchie et al. 1992, Goedert et al. 1992). Aquesta isoforma d'elevat pes molecular també es troba en alguns teixits no neuronals de la rata, entre ells al teixit esquelètic i al cardíac (Gu et al. 1996). S'han fet altres intents de definir les isoformes de tau presents al múscul esquelètic, sobretot per establir-ne un patró característic a les mostres de malalts d'IBM. Per exemple, s'ha observat una banda de 60kDa tant a les mostres control com a les mostres patològiques, mentre que una altra de 62kDa s'ha proposat que podria ser específica de la patologia i correspondre a la mateixa isoforma de 60kDa però fosforilada. Aquest doblet de bandes el detecten amb els anticossos TauCter i PS422. En aquest mateix treball també es detecta una banda de 120kDa, però en aquest cas es considera que es tracta d'una contaminació de la mostra per part del nervi perifèric que podria haver-hi a la biòpsia (Maurage et al. 2004). En un treball anterior s'havia descrit també un patró de bandes en forma de doblet de 66 i 68kDa al estudiar mostres de malalts d'IBM (Mirabella et al. 1996), en aquest cas utilitzant els anticossos AT-8 i SMI-3. A més, en un estudi on es caracteritzen les alteracions del *splicing* alternatiu dels exons de la tau que es produeixen a la distròfia miòtonica del tipus I (DM1) en teixits com el cervell i el múscul, es va estudiar primer la presència dels exons 2,3 i 6 a músculs control. Doncs es va observar que l'exó 2 sempre apareix a totes les isoformes de la tau que es detecten al múscul, que no hi ha expressió de cap isoforma sense els exons 2 i 3, però sí que hi ha expressió de l'exó 6 que normalment està molt reduïda al SNC (Leroy et al. 2006).

D'altra banda, algunes quinases han estat implicades en la hiperfosforilació de la tau al múscul esquelètic de malalts d'IBM, com la cdk5 (*cyclin-dependent kinase 5*) (Nakano et al. 1999, Wilczynski et al. 2000b), l'ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (Wilczynski et al. 2000a, Nakano et al. 2001) i la GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*) (Kitazawa et al. 2008), de la mateixa manera que es creu que ho estan a la malaltia d'Alzheimer i d'altres taupaties (Ferrer et al. 2005b).

2. OBJECTIUS

Objectiu general

- Identificar marcadors que estiguin relacionats amb les característiques patològiques que defineixen les MFM, més concretament les miotilinoïpaties i les desminopaties, i que permetin entendre i descriure els mecanismes patològics moleculars que estan involucrats en el seu desenvolupament.

Objectius concrets

2.1 Modificacions per dany oxidatiu (3.1, 3.2)

- Estudiar la presència de l'estrés oxidatiu a les MFM a partir de l'avaluació de l'expressió de diferents marcadors de glicoxidació, lipoxidació i nitració, així com dels enzims productors d'òxid nítric i els enzims dismutadors dels anions de superòxid en biòpsies musculars de pacients afectats de miotilinoïpaties i desminopaties.
- Detectar possibles proteïnes diana del dany oxidatiu i/o nitratiu a les miotilinoïpaties i les desminopaties, a partir de la selecció dels marcadors anteriors que presentin els resultats més sòlids.

2.2 Relació entre el dany oxidatiu i els agregats proteics (3.1, 3.3)

- Establir la relació entre els marcadors del dany oxidatiu/nitratiu, les proteïnes diana d'aquest/s dany/s i la formació dels agregats proteics característics d'aquestes patologies.
- Estudiar la presència d'altres marcadors relacionats amb la formació dels agregats i la disfunció del proteosoma.

2.3 Altres proteïnes agregades a les MFM (3.4, resultats annexos 7.5)

- Buscar nous marcadors, potser més atípics, per tal d'identificar altres mecanismes i/o processos que també puguin estar involucrats en la patologia de les MFM i que obrin noves perspectives de treball.

3. RESULTATS

3. Resultats

3.1 Janué, A; Olivé, M; Ferrer, I. Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: a link between oxidative damage and abnormal protein aggregation. *Brain Pathol* (2007);17 (4): 377-88.

3.2 Janué, A; Odena, MA; Oliveira, E; Olivé, M; Ferrer, I. Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathie. *J Neuropathol Exp Neurol* (2007); 66 (8): 711-23.

3.3 Olivé, M; van Leeuwen, FW; Janué, A; Moreno, D; Torrejón-Escribano, B; Ferrer, I. Expression of mutant ubiquitin (UBB+1) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* (2008); 34 (1): 76-87.

3.4 Olivé, M; Janué, A; Moreno, D; Gámez, J; Torrejón-Escribano, B; Ferrer, I. TAR DNA-Binding protein 43 accumulation in protein aggregate myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* (2009); 68 (3):262-73.

Oxidative Stress in Desminopathies and Myotilinopathies: A Link between Oxidative Damage and Abnormal Protein Aggregation

Anna Janué; Montse Olivé; Isidre Ferrer

Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge CIBERNED, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Professor Isidre Ferrer, Institut de Neuropatologia, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain (E-mail: 8082ifa@comb.es)

Myotilinopathies and desminopathies are subgroups of myofibrillar myopathies (MFM) caused by mutations in myotilin and desmin genes, respectively. They are characterized by the presence of protein aggregates in muscle cells. As oxidation of proteins facilitates their aggregation and makes them more resistant to proteolysis, the present study was geared to analyze oxidative stress in MFM. For this purpose, markers of glycooxidation, lipoxidation and nitration were examined with gel electrophoresis and Western blotting, single immunohistochemistry, and double- and triple-labeling immunofluorescence and confocal microscopy in muscle biopsies from patients suffering from myotilinopathy and desminopathy. Increased levels of glycation-end products (AGEs), N-carboxymethyl-lysine (CML) and N-carboxyethyl-lysine (CEL), malondialdehyde-lysine (MDAL), 4-hydroxynonenal (HNE) and nitrotyrosine (N-tyr) were found in MFM. Furthermore, aberrant expression of AGE, CML, CEL, MDAL and HNE, as well as of neuronal, inducible and endothelial nitric oxide synthases (nNOS, iNOS, eNOS), and superoxide dismutase 2 (SOD2), was found in muscle fibers containing protein aggregates in myotilinopathies and desminopathies. AGE, ubiquitin and p62 co-localized in several muscle fibers in MFM. As oxidized proteins are vulnerable to misfolding and are resistant to degradation by the UPS, the present observations support a link between oxidative stress, protein aggregation and abnormal protein deposition in MFMs.

Brain Pathol 2007;17:377–388.

INTRODUCTION

Free radical production is a widespread phenomenon occurring under physiological aerobic metabolism in eukaryotic cells. In a healthy organism, a balance between oxidation and reduction reactions serves to maintain the physiological redox status; however, when oxidative stress occurs this can may cause deleterious metabolic effects, when the generation of reactive oxygen species exceeds the level of antioxidant responses. Skeletal muscle is not an exception, and muscle cells are particularly prone to accumulating oxidative damage to DNA, lipids and proteins over time (22, 30, 38). In addition, evidence for free radical toxicity has been found in several pathological conditions including inclusion-body myositis (IBM) and myopathies (39, 40), mitochondrial myopathies (5) and dystrophinopathies (25), as well as inflammatory myopathies (14, 32).

The term myofibrillar myopathy (MFM) encompasses a group of muscle disorders characterized morphologically by focal dissolution of the myofibrils and accumulation of protein aggregates (4, 17, 29). Protein aggregates in MFM contain desmin, myotilin and other cytoskeletal proteins, chaperones, phosphorylated tau and β -amyloid, plectin, gelsolin, clusterin, and ubiquitin (4, 10, 19, 29). MFMs are caused by mutations in different genes, including desmin (11, 12, 16), α -crystallin (34), selenoprotein N (6), myotilin (19, 27), ZASP (28) and filamin (35). Little is known about the putative role of oxidative stress in the pathogenic cascade occurring in MFM, although overexpression of semicarbazide-sensitive amine oxidase, which has been considered as an indicator of oxidative stress in different tissues, has been found in muscle fibers containing protein aggregates in MFM (18).

In order to investigate oxidative stress in MFM, the present study focused on the expression of markers of glycooxidation, lipoxidation and nitration, as well as on nitric oxide (NO)-producing enzymes and superoxide dismutase (SOD2), in muscle biopsy samples of patients suffering from myotilinopathy and desminopathy. With this purpose, antibodies to advanced glycation end products (AGE), N-carboxymethyl-lysine (CML) and N-carboxyethyl-lysine (CEL), as glycooxidation markers; antibodies to malondialdehyde-lysine (MDAL) and 4-hydroxynonenal (HNE) adducts, as lipoxidation markers; and antibodies to nitrotyrosine (N-tyr) have been used for gel electrophoresis and Western blotting, and immunohistochemistry. In addition, immunohistochemistry to neuronal, endothelial and inducible isoforms of nitric oxide synthase (nNOS, eNOS and iNOS) was carried out to investigate expression of enzymes linked with NO production. Finally, antibodies to RAGE were used to recognize the expression of AGE receptors, and antibodies to SOD2 to reveal antioxidant responses in muscle cells. Double and triple immunofluorescence and confocal microscopy was performed to further refine oxidative damage with protein aggregates and proteasome markers.

MATERIALS AND METHODS

Patients and muscle biopsies. Muscle biopsies from five patients suffering from myotilinopathy and four patients suffering from desminopathy were obtained following informed consent and in accord with the guidelines of the Ethics Committee of the Hospital Universitari de Bellvitge. Patients suffering from myotilinopathy

were two women and three men aged from 52 to 80 years of age (mean age: 71 years). Muscle samples were taken from the lateral gastrocnemius in one case, vastus lateralis in two cases, and deltoid muscle in the remaining two. A detailed description of these patients has been reported elsewhere (19). Desminopathy cases were three women and one man aged from 27 to 49 years of age (mean age 37.5 years). Muscle biopsies in these patients were taken from the lateral gastrocnemius in two cases and from the biceps brachii in the other two. A detailed description of three of these patients has been reported elsewhere (20). Finally, muscle biopsy specimens from five age-matched controls were used for comparative purposes. Samples were taken

Patient	Age/gender	Site of muscle biopsy	Mutation
1	52/M	Lateral gastrocnemius	<i>MYOT</i> Ser55Phe
2	70/M	Vastus lateralis	<i>MYOT</i> Ser60Cys
3	80/M	Deltoid	<i>MYOT</i> Ser60Phe
4	73/F	Deltoid	<i>MYOT</i> Ser55Phe
5	80/F	Vastus lateralis	<i>MYOT</i> Lys36Glu
6	49/F	Lateral gastrocnemius	<i>DES</i> Pro419Ser
7	46/F	Biceps brachii	<i>DES</i> Leu392 Pro
8	27/M	Lateral gastrocnemius	<i>DES</i> Ile367Phe
9	28/F	Biceps brachii	<i>DES</i> Arg406Trp
10	78/M	Biceps brachii	
11	52/F	Deltoid	
12	64/F	Deltoid	
13	33/M	Vastus lateralis	
14	29/F	Vastus lateralis	

Table 1. Summary of cases included in the present study.

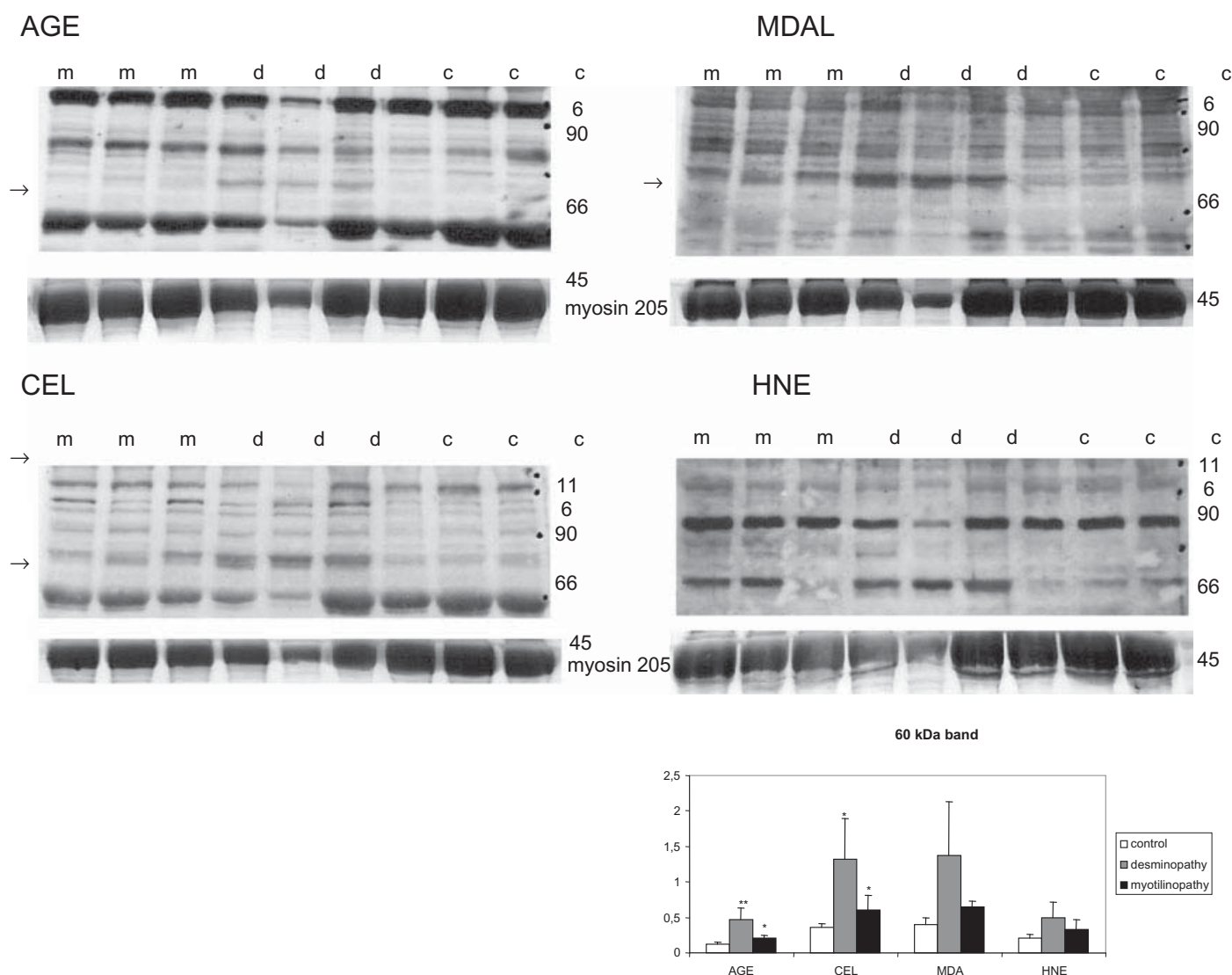


Figure 1. Western blots to AGE, CEL, MDAL and HNE in myotilinopathies (m) and desminopathies (d) compared with controls (c) show multiple bands of molecular weights between 45 and 110 kDa. A band of about 60 kDa is more prominent in diseased cases than in controls. Coomassie blue staining is used to control protein loading. Densitometric studies show significant differences between control and diseased cases regarding AGE and CEL immunostaining ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$). Differences in the intensity of MDAL and HNE bands of about 60 kDa between control and diseased cases were not significant.

Antigen	Epitope	Host	Dilution		Manufacturer
			IHQ IF	WB	
SOD2	Polyclonal	Rabbit	1:500	1:2000	Stressgen
N-tyr	Monoclonal	Mouse	–	1:1000	Zymed
nNOS	Polyclonal	Rabbit	1:1000	–	Calbiochem
iNOS	Polyclonal	Rabbit	1:500	–	Chemicon
eNOS	Polyclonal	Rabbit	1:50	–	Chemicon
CEL	Monoclonal	Mouse	1:16	1:300	TransGenic
CML	Monoclonal	Mouse	1:25	1:500	TransGenic
AGE	Monoclonal	Mouse	1:200–250	1:500	TransGenic
RAGE	Polyclonal	Goat	1:500	–	Serotec
HNE	Polyclonal	Rabbit	1:1000	1:1000	Alexis
MDAL	Polyclonal	Goat	1:10	1:300	Academy Bio-Medical Company
Myotilin	Monoclonal	Mouse	1:100	–	Novocastra
Myotilin	Polyclonal	Goat	1:10	–	Santa Cruz
Desmin	Monoclonal	Mouse	1:15	–	Dako
Desmin	Polyclonal	Rabbit	1:200	–	GeneTex
p62 C-terminal	Polyclonal	Guinea pig	1:100	–	Progen
Ubiquitin	Polyclonal	Rabbit	1:100	–	Dako

Novocastra, Newcastle, UK; Stressgen, Bionova Científica, Madrid, Spain; Zymed; San Francisco, CA, USA; Calbiochem, San Diego, CA, USA; Chemicon, Barcelona, Spain; TransGenic, Kobe, Japan; Serotec, Bloomington, MN, USA; Alexis, Lausen, Switzerland; Academic BioMedical Company, Houston, TX, USA; Santa Cruz, Quimigen, Madrid, Spain; Progen, Heidelberg, Germany; GeneTex, San Antonio, TX, USA; Dako, Barcelona, Spain; Sigma, Madrid, Spain.

Table 2. Antibodies used in the present study. Abbreviations: IHQ = immunohistochemistry; IF = immunofluorescence; WB = Western blotting.

from the vastus lateralis in two cases, deltoid in two cases and the biceps braquii in the remaining one. A summary of the clinical characteristics of all the patients included in the present study is provided in Table 1.

Western blotting. Roughly 50 mg of frozen muscle samples was homogenized with a manual glass homogenizer in ice with 1 mL of homogenizer buffer (75 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.001% (w/v) bromophenol blue, 15% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 5% (v/v) β -mercaptoethanol) and a mix of protease inhibitors containing 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 1 μ g/mL pepstatin A, 10 μ g/mL leupeptin and 10 μ g/mL aprotinin. Total homogenates were boiled at 94°C for 4 minutes and centrifuged at 9500 g for 5 minutes. Pellets were discarded and 25 μ L aliquots were stored at –80°C.

For Western blot studies 5 μ L of each sample was loaded in an 8% SDS-PAGE electrophoresis (20 mA/gel for 80 minutes at 4°C) and then transferred to nitrocellulose membranes (20 V and 40 mA/gel for

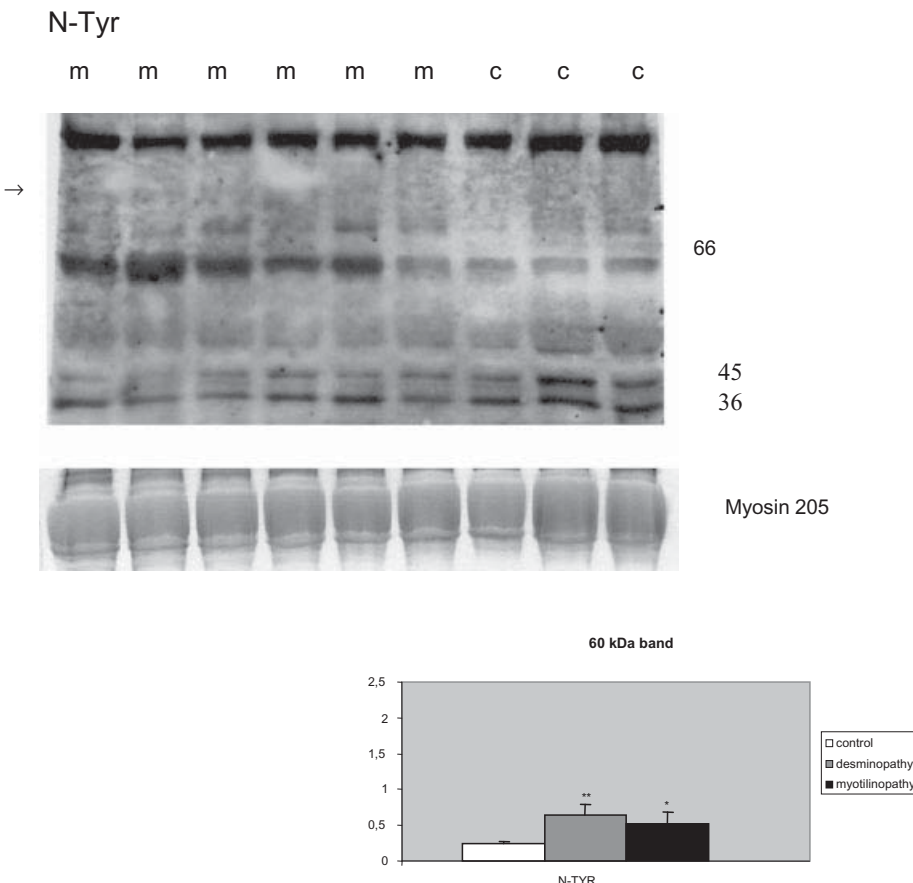


Figure 2. Western blots to nitrotyrosine (N-Tyr) in myotilinopathies (m) and desminopathies (d) compared with controls (c). Several bands are seen in control and diseased muscles. A band of about 60 kDa is more prominent in diseased muscles compared with controls. Significant differences in the intensity of the band of 60 kDa were seen between control and desminopathy (** $P < 0.05$) and between controls and myotilinopathy (* $P < 0.01$) cases.

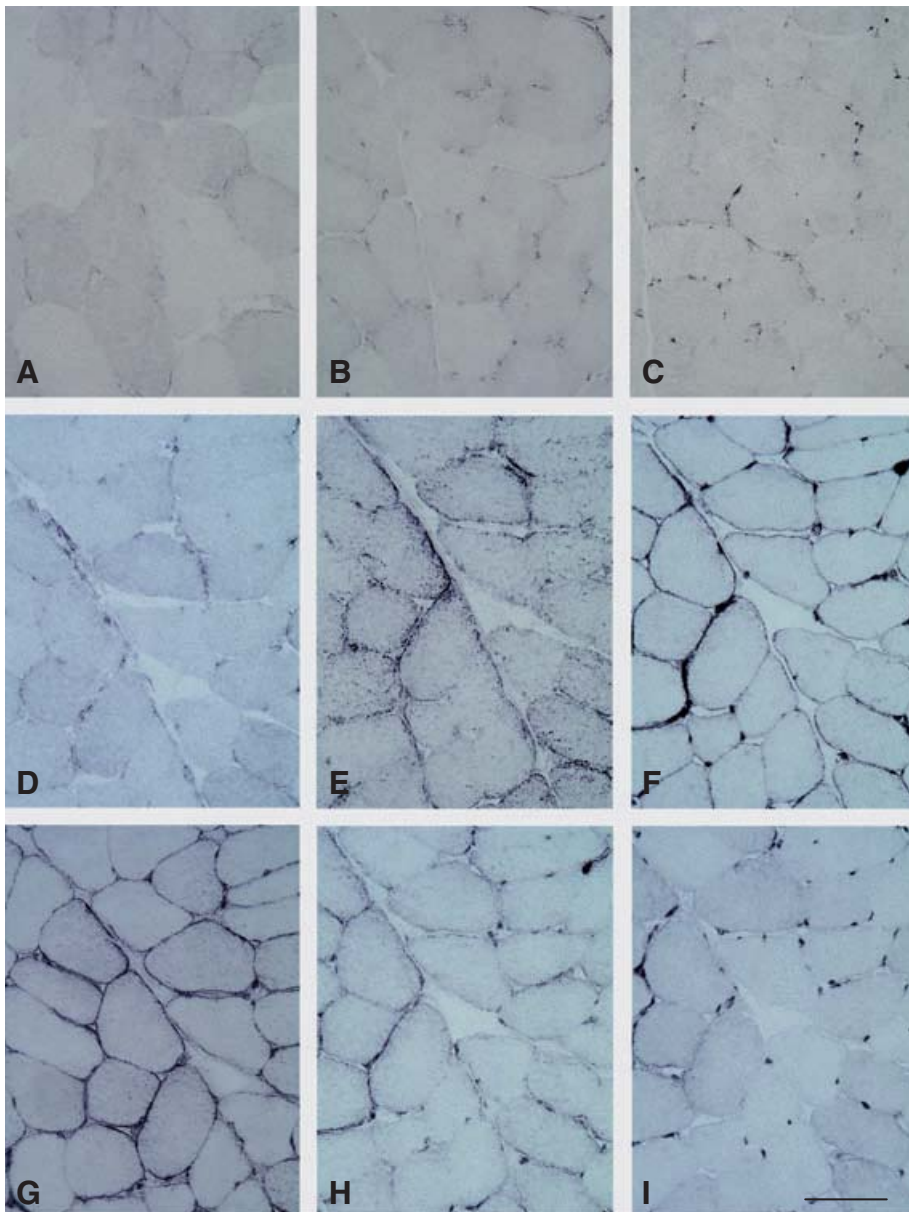


Figure 3. Representative sections of AGE (A), CEL (B), CML (C), HNE (D), MDAL (E), eNOS (F), nNOS (G), iNOS (H) and SOD 2 (I) immunoreactivity in control muscles. Cryostat sections without counterstaining. Bar = 50 microns.

75 minutes) in a Semi-Dry Transfer System (Bio-rad, Madrid, Spain). Once the membranes were stained with Ponceau Solution (Sigma, Madrid, Spain) as a transfer quality control, they were immediately incubated with 5× Western Blocking Reagent (Roche, Mannheim, Germany) at 4°C overnight. Then, membranes were incubated with one of the primary antibodies diluted in TBS-T (100 mM Tris base, 1.4 M NaCl and 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.4) with 1% Western Blocking Reagent (Roche) at 4°C overnight. Details of the antibodies are shown in Table 2. Subsequently, the mem-

branes were washed with TBS-T and then incubated with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako, Barcelona, Spain) at a dilution of 1:1000 or 1:2000 in the same buffer (TBS-T with 0.5% Blocking Reagent) for 45 minutes at room temperature. After washing the membranes with TBS-T, the protein bands were detected by chemiluminescence ECL method (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The myosin band of 205 kDa stained with Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) in the post-transfer gel was used as a control of protein loading.

The densitometric quantification of Western blot bands was carried out with Total Lab v2.01 software, and the data obtained were analyzed using Statgraphics Plus v5.1 software. Differences between control and diseased samples were analyzed with ANOVA: * $P < 0.05$ or ** $P < 0.01$.

Immunohistochemistry. Cryostat sections, 8 μm-thick, were incubated with 1% hydrogen peroxide for 5 minutes followed by 10% goat or 3% horse normal serum for 2 h, and then incubated overnight with one of the primary antibodies listed in Table 2. After washing, the sections were processed with Super Sensitive Link-Label IHC Detection System (BioGenex, San Ramon, CA, USA) or with LSAB+ System-HRP (Dako) following the instructions of the manufacturer. The immunoreaction was visualized as a dark blue precipitate using NH_4NiSO_4 (0.05 M) diluted in phosphate buffer (0.1 M) with 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.04% NH_4Cl and 0.001% hydrogen peroxide. Sections processed only with the secondary antibody were used as negative controls. Serial consecutive sections from each case were stained with hematoxylin and eosin.

Double- and triple-labeling immunofluorescence and confocal microscopy. Cryostat sections 8-μm-thick were blocked for 30 minutes at room temperature with 10% fetal bovine serum diluted in 1 × PBS in order to avoid unspecific binding reactions. For double-labeling immunofluorescence, the sections were incubated overnight at 4°C with different combinations of two primary antibodies as follows: (i) mouse monoclonal anti-AGE antibody, and goat polyclonal anti-myotilin or rabbit polyclonal anti-desmin antibodies; (ii) goat polyclonal anti-RAGE antibody, and mouse monoclonal anti-myotilin or mouse monoclonal anti-desmin antibodies; and (iii) rabbit polyclonal anti-eNOS antibody and mouse monoclonal anti-myotilin or mouse monoclonal anti-desmin antibodies. For triple-labeling immunofluorescence, some sections were incubated with mouse monoclonal anti-AGE, rabbit polyclonal anti-ubiquitin and guinea-pig polyclonal anti-p62 (C-terminus) antibodies. Details of the primary antibodies are shown in Table 2.

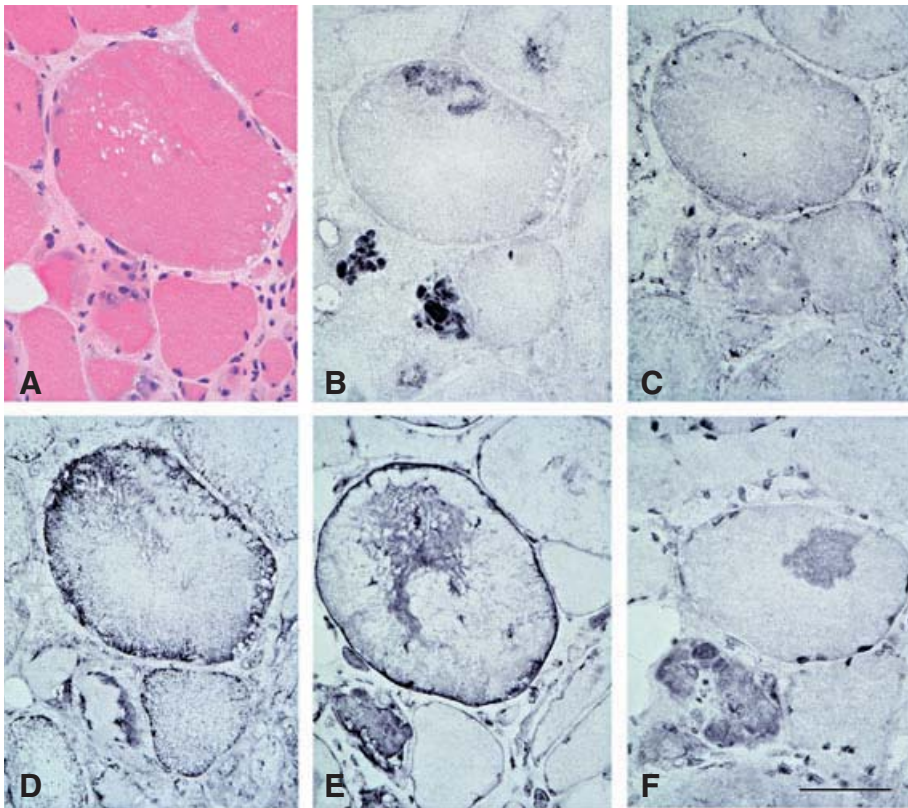


Figure 4. Muscle biopsy from one patient suffering from myotilinopathy showing a large fiber, and two atrophic fibers containing eosinophilic cytoplasmic inclusions (A). Strong AGE immunoreactivity decorating collections of spheroid bodies in two atrophic fibers, as well as moderate AGE immunostaining in focal areas of the cytoplasm in other fibers (B). Faint CML immunoreactivity in abnormal fibers (C). MDAL immunoreactivity is observed at the periphery of the inclusions, but not within them (D). eNOS (E) and SOD2 (F) are found in abnormal fibers. Cryostat sections without counterstaining (except A). Bar = 50 microns.

After washing, the sections were incubated with the corresponding combination of secondary antibodies Alexa 488 anti-rabbit (green), Alexa 546 anti-mouse (red) or Alexa 647 (blue) (all from Molecular Probes, Leyden, The Netherlands), at a dilution of 1:400 for 3 h at room temperature. Subsequently, the nuclei were stained using To-pro[®]-3-iodide (Molecular Probes) at a dilution of 1:1000 for 20 minutes at room temperature. Sections were mounted with Fluorescent Mounting Medium (Dako Cytomation), sealed and dried overnight at 4°C. Sections were examined with a Leica TCS-SL confocal microscope. Sections incubated only with the secondary antibodies were used as controls.

RESULTS

Western blotting

Glycoxidation and lipoxidation markers

Western blots of total homogenates revealed that several bands from 45 to

115 kDa were immunostained with anti-AGE, anti-CML and anti-CEL antibodies. Although variable from one case to another, the bands of 60 kDa had higher intensity in myotilinopathies and desminopathies when compared with controls. The density of the band of about 60 kDa was higher in MFM cases (Figure 1). Densitometry and quantification of this band as revealed with anti-AGE antibodies showed significant differences in desminopathies and myotilinopathies when compared with controls ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). Similarly, differences were significant regarding CEL immunoreactivity between MFM cases and controls ($P < 0.05$). Western blots to MDAL and HNE also showed multiple bands in control and diseased cases. Yet differences were not significant between control and diseased cases (Figure 1).

Nitrated proteins (N-tyr)

Western blots to nitrotyrosine revealed a similar pattern of nitrated proteins in myo-

tilinopathies, desminopathies and control cases. However, a band of 60 kDa showed a significantly higher density in myotilinopathies ($P < 0.05$) and desminopathies ($P < 0.01$) when compared with controls (Figure 2).

Immunohistochemistry

Control muscles

Glycoxidation markers In control samples, CML immunoreactivity was observed in the cytoplasm of muscle fibers. A mosaic pattern with two populations of fibers was noted depending on the degree of the immunoreaction. Faint CEL and AGE immunoreactivity was also observed in the cytoplasm of normal muscle fibers, whereas RAGE immunoreactivity was absent. The wall of intramuscular vessels displayed CML, CEL, AGE and RAGE immunoreactivity.

Lipoxidation markers Faint HNE and moderate MDAL immunoreactivity was observed in the cytoplasm of normal muscle fibers.

nNOS, eNOS and iNOS Strong nNOS and moderate eNOS immunoreactivity was observed at the sarcolemma of muscle fibers in control cases, whereas faint iNOS immunoreactivity was seen within the cytoplasm. In addition, strong eNOS and faint iNOS immunoreactivity was seen in the wall of intramuscular vessels and capillaries as well as in the nuclei of myocytes.

SOD2 Faint SOD2 immunoreactivity was present in the cytoplasm of normal fibers. Two populations of fibers could be distinguished according to differing intensities of the immunoreaction. SOD2 immunolabeling was also observed in the nuclei of muscle fibers.

Representative sections of muscle fibers stained with anti-oxidation and nitration markers is shown in Figure 3.

Myotilinopathy

Glycoxidation markers Faint CEL and CML, but strong AGE immunoreactivity, were observed in abnormal muscle fibers in myotilinopathies. AGE expression was particularly strong in muscle fibers containing spheroid bodies (Figure 4). In addition, RAGE immunoreactivity was observed in

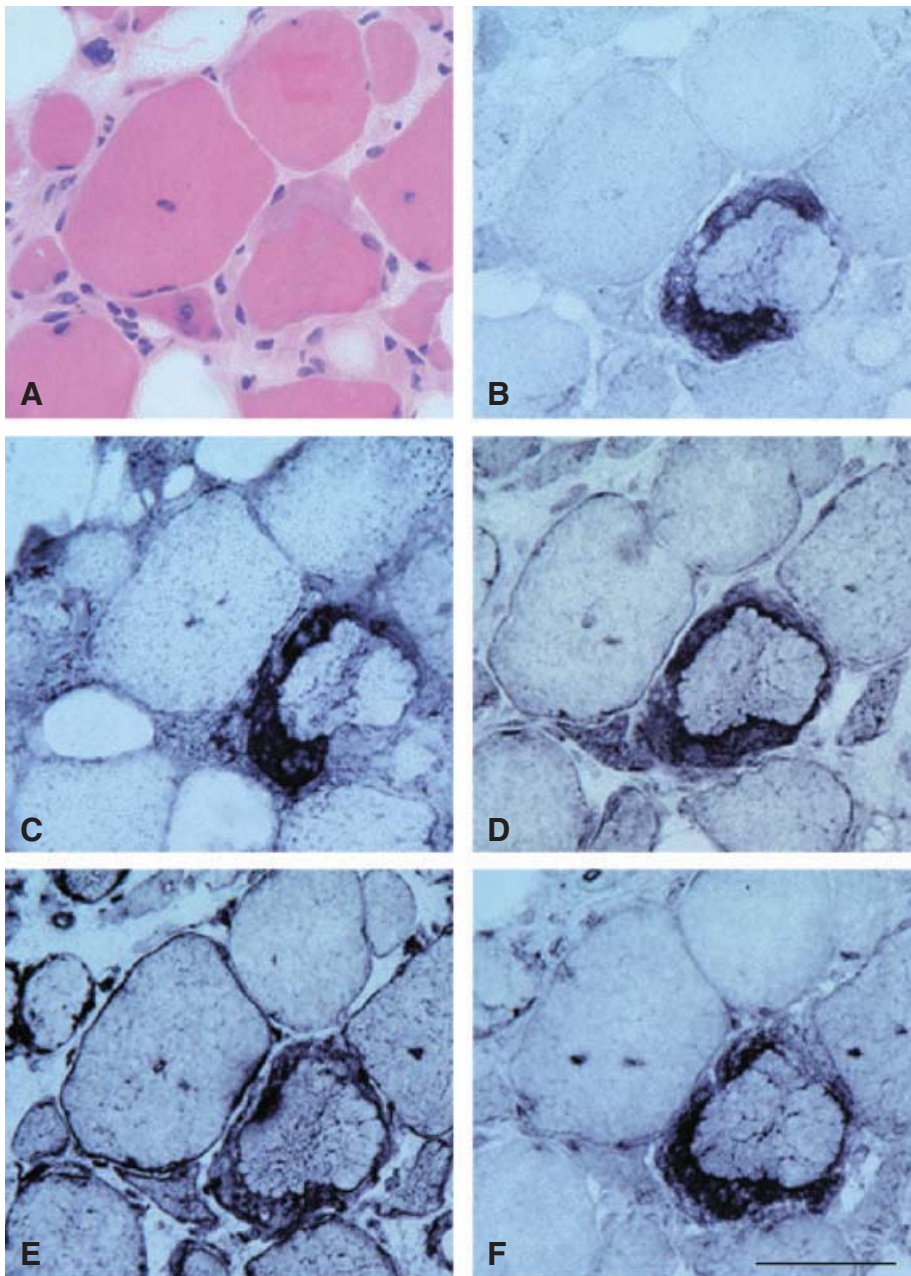


Figure 5. Muscle biopsy from one patient suffering from desminopathy. A muscle fiber containing a subsarcolemmal inclusion is seen in (A). Serial consecutive sections demonstrating strong AGE (B), MDAL (C), iNOS (D), eNOS (E) and SOD2 (F) immunoreactivity in the abnormal fiber. Cryostat sections without counterstaining (except A). Bar = 50 microns.

the sarcolemma, as well as within the cytoplasm of abnormal muscle fibers (data not shown). The number of fibers immunostained with CEL, CML, AGE and RAGE varied from one case to another, but all the abnormal fibers were immunostained with the antibodies recognizing glycoxidation markers.

Lipoxidation markers Increased HNE expression was found in the sarcolemma of the majority of fibers in myotilinopathies

when compared with controls. Furthermore, faint HNE immunoreactivity was observed within the cytoplasm in muscle fibers containing cytoplasmic inclusions. Strong MDAL immunoreaction appeared at the periphery of the fibers containing cytoplasmic inclusions, but, curiously, not within the cytoplasmic inclusions themselves (Figure 4). The number of fibers immunostained with HNE and MDAL antibodies varied from one case to another, but always correlated with the

number of fibers containing cytoplasmic inclusions.

nNOS, eNOS and iNOS Strong eNOS and nNOS immunoreactivity was observed at the sarcolemma as well as within the cytoplasm of abnormal fibers. Strong iNOS immunostaining was seen in the cytoplasm but not in the sarcolemma of abnormal fibers. In each specimen, all the muscle fibers containing cytoplasmic inclusions were immunostained with the three anti-NOS antibodies (Figure 4).

SOD2 Strong SOD2 immunoreaction was observed within the cytoplasm in all the muscle fibers containing cytoplasmic inclusions (Figure 4).

Desminopathy

Glycoxidation markers Faint to moderate AGE, CML, CEL and RAGE immunoreactivity was observed in the cytoplasm of muscle fibers in desminopathies. In addition, a small proportion of fibers, corresponding to those containing dense hyaline inclusions displayed strong AGE immunoreactivity. The number of fibers immunostained with AGE, CML, CEL and RAGE varied from case to case, depending on the number of muscle fibers containing cytoplasmic or subsarcolemmal inclusions (Figure 5).

Lipoxidation markers Strong HNE immunostaining was observed in the sarcolemma in the vast majority of fibers in desminopathies when compared to controls. Furthermore, HNE adducts occurred in a subset of fibers containing dense hyaline cytoplasmic inclusions. Areas devoid of MDAL immunoreactivity were observed in muscle fibers in desminopathy when compared to controls. These negative areas corresponded to abnormal fiber regions containing non-hyaline inclusions (Figure 5).

nNOS, eNOS and iNOS Strong eNOS, iNOS and nNOS immunoreactivity was observed in the sarcolemma of muscle fibers. Furthermore, eNOS, iNOS and nNOS immunostaining decorating fiber regions containing inclusions was observed in every case (Figure 5).

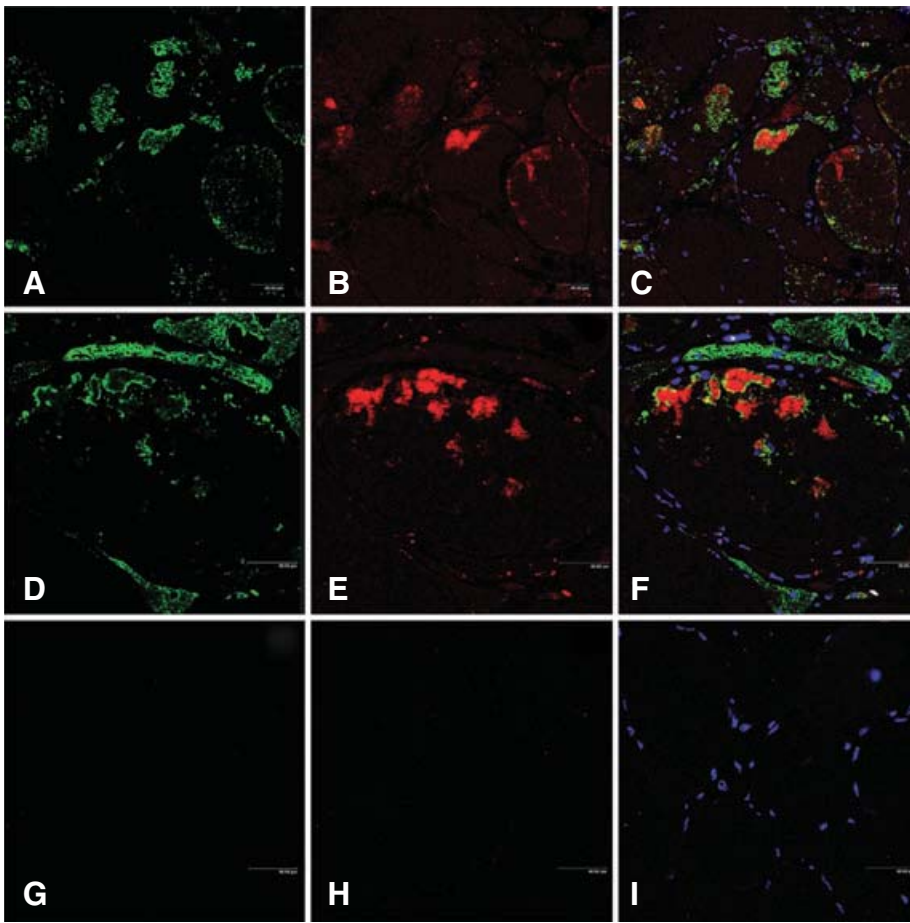


Figure 6. Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy to myotilin (green) and AGE (red) in myotilinopathy. Myotilin deposition occurs as multiple small confluent granular aggregates, as diffuse deposits in atrophic fibers or decorating the periphery of abnormal muscle fibers (**A,D**). AGE immunoreactivity is observed as large dense deposits in abnormal fibers (**B,D**). Colocalization of myotilin and AGE (merge, yellow) is found in some aggregates, whereas AGE immunoreactivity is localized inside myotilin aggregates in other fibers (**C,F**). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**G-I**). Nuclei are visualized with To-pro[®]-3-iodide (blue).

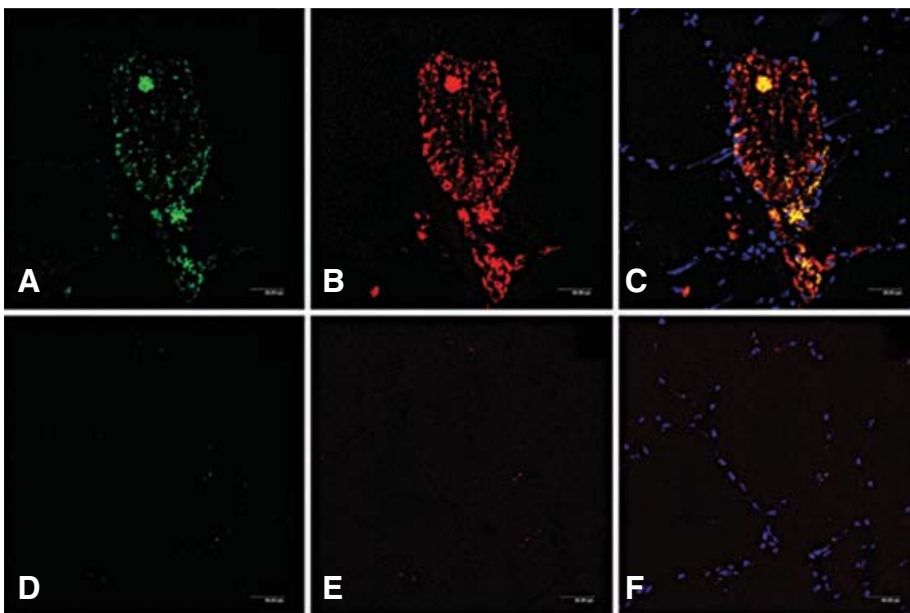


Figure 7. Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy to myotilin (green, **A**) and RAGE (red, **B**) showing almost complete colocalization of RAGE and myotilin (merge, yellow, **C**). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**D-F**). Nuclei are visualized with To-pro[®]-3-iodide (blue).

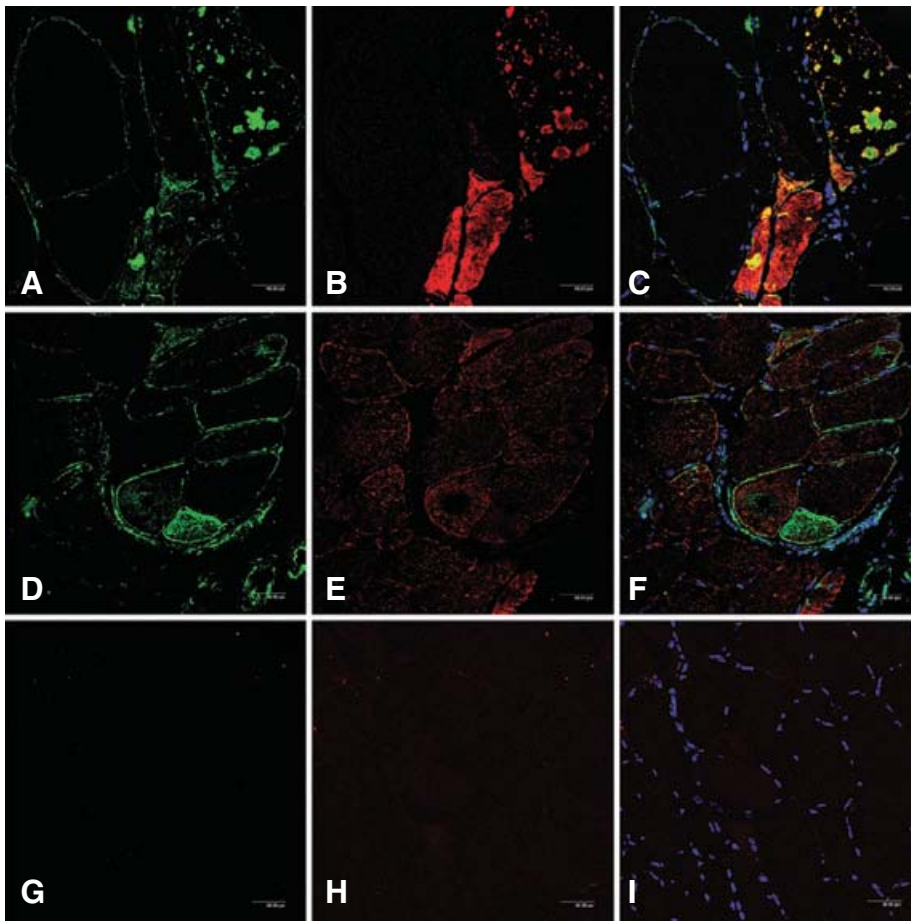


Figure 8. Double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy to eNOS (green, **A,D**) and myotilin (red, **B**) in myotilinopathy (**A–C**) and with desmin (red, **E**) in desminopathy (**D–F**). Co-localization of eNOS and myotilin is observed in some fibers in myotilinopathy (merge, **C**), whereas atrophic fibers displaying diffuse myotilin immunofluorescence show partial co-localization. Partial co-localization of e-NOS (**D**) and desmin (**E**) is observed mainly at the sarcolemma of some fibers in desminopathy. One section stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**G–I**). Nuclei are visualized with To-pro[®]-3-iodide (blue).

SOD2 Increased SOD2 immunoreactivity was also noted in abnormal fibers in desminopathies (Figure 5).

Double and triple-labeling immunofluorescence and confocal microscope

Myotilinopathy

Markers of glycooxidation in muscle fibers containing myotilin aggregates Double-labeling immunofluorescence confirmed the existence of glycooxidation immunoreactive products in muscle fibers containing protein aggregates. Double labeling immunofluorescence revealed the coexistence of AGE (red) and myotilin (green) in the same fibers. AGE and myotilin co-localized in muscle fibers containing small, confluent, punctate aggregates, as well as at the periphery of larger aggregates. In general, the areas showing AGE immunofluores-

ence exceeded those displaying myotilin immunofluorescence (Figure 6).

In contrast, sections double-immunostained with RAGE (green) and myotilin (red) revealed almost complete co-localization of RAGE and myotilin in affected fibers (Figure 7).

Lack of localization of MDAL in myotilin aggregates In line with single labeling immunohistochemical observations, faint MDAL immunofluorescence was observed surrounding myotilin aggregates but no MDAL immunostaining was found within myotilin aggregates (data not shown).

eNOS and myotilin double-labeling Double-labeling to eNOS (green) and myotilin (red) revealed complete co-localization in protein aggregates. However,

partial co-localization was observed in atrophic fibers exhibiting diffuse myotilin immunostaining (Figure 8A–C).

Triple-labeling to AGE, ubiquitin and p62 Confocal microscopy of triple immunolabeling revealed co-localization of AGE (green), ubiquitin (red) and p62 (blue) in several but not all aggregates. Some AGE products were not immunolabeled with ubiquitin or with anti-p62 antibodies (Figure 9).

Desminopathy

Markers of glycooxidation in muscle fibers containing desmin aggregates AGE immunofluorescence revealed the presence of immunoreactive adducts within some muscle fibers, whereas desmin immunofluorescence revealed desmin deposition in the subsarcolemma as well as within the cytoplasm of selected fibers. Double-labeling to AGE (green) and desmin (red) revealed the coexistence of AGE adducts and desmin aggregates in the same fibers. Yet AGE-immunostained products were usually found at the center of desmin aggregates (Figure 10).

MDAL and desmin double-labeling

Faint MDAL immunofluorescence was seen in the subsarcolemma in a small proportion of fibers. No MDAL immunofluorescence was present in fiber regions containing desmin aggregates (data not shown).

eNOS and desmin double-labeling

eNOS (green) immunofluorescence was widely distributed in the sarcolemma, as well as within the cytoplasm of selected fibers. eNOS co-localized with desmin in some areas but not in others (Figure 8D–F).

Triple-labeling to AGE, ubiquitin and p62

Confocal microscopy of triple immunolabeling revealed co-localization of AGE (green), ubiquitin (red) and p62 (blue) in some fiber regions. However, AGE co-localized with ubiquitin but not with p62 in other fibers (Figure 11).

DISCUSSION

Basal levels of glycooxidized, lipoxidized and nitrated protein species were found in skeletal muscles of controls. This is not surprising as protein oxidation is a normal phenomenon occurring as a

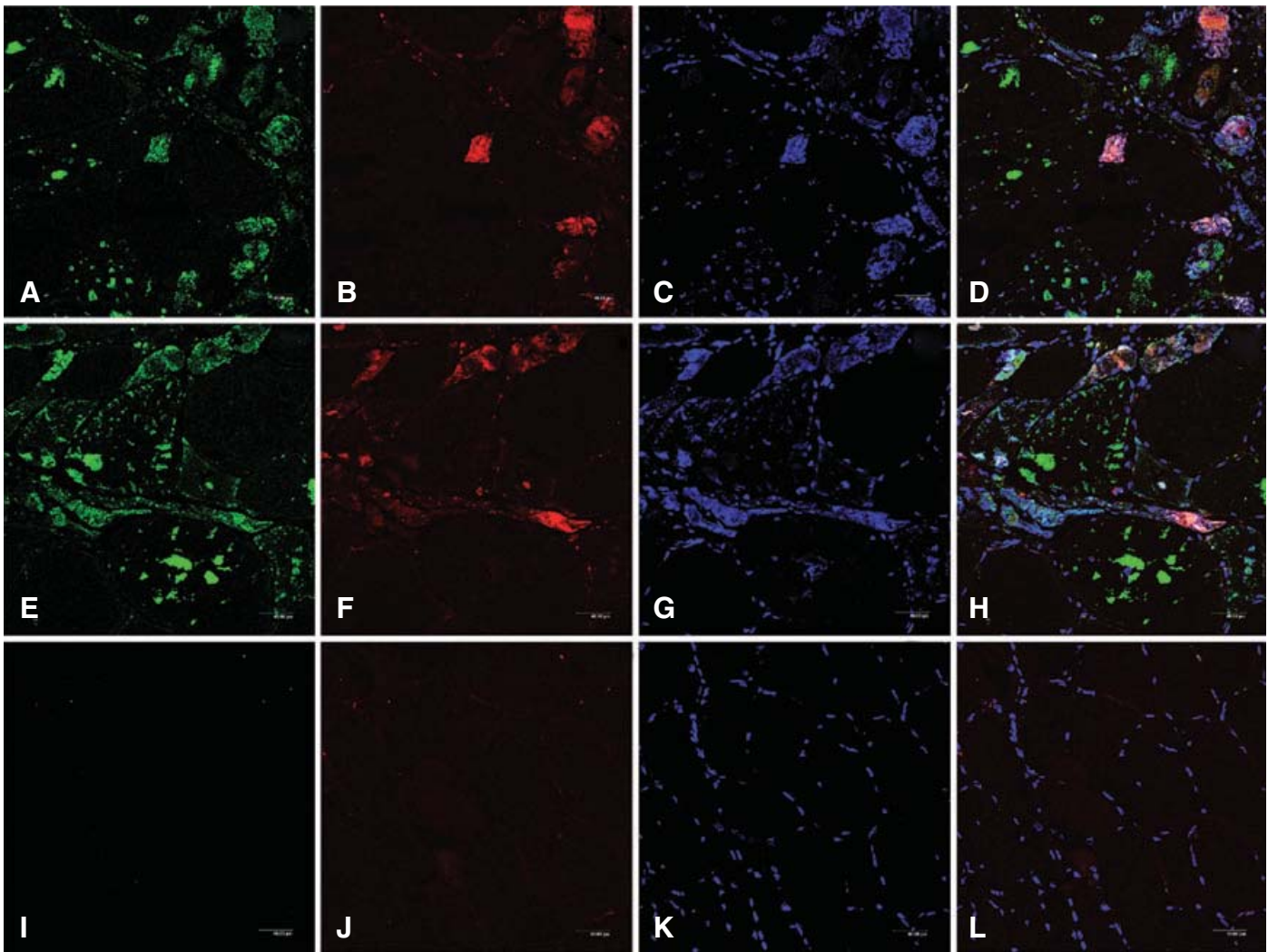


Figure 9. Triple-labeling immunofluorescence and confocal microscopy to AGE (green, **A,E**), ubiquitin (red, **B,F**) and p62 (blue, **C,G**) in myotilinopathy showing co-localization of AGE adducts with ubiquitin and p62, in several but not all aggregates (merge, yellow, **D,H**). Yet some AGE products are not immunolabeled with ubiquitin or with anti-p62 antibodies. One section stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**I–L**). Nuclei are visualized with To-pro®-3-iodide (blue).

consequence of aerobic metabolism. Yet increased levels of CEL, CML and AGE, mainly glycoxidative adducts, as well as HNE and MDAL lipoxidized proteins have been noted in muscle samples in myotilinopathies and desminopathies. Furthermore, increased levels of N-Tyr in diseased muscles points to extensive oxidative/nitrosative damage in MFMs. Combined gel electrophoresis and Western blotting, and immunohistochemistry, have shown not only an increase but also a re-localization of oxidative products in association with abnormal protein aggregates in MFMs. Differences do exist between myotilinopathies and desminopathies, but these are largely related to the characteristics of the protein deposits rather than to the specificity of the oxidative lesions. Similarly,

enhanced immunostaining to eNOS, iNOS and nNOS is found in myotilinopathies and desminopathies; and RAGE and SOD2 expression is activated in both groups of MFMs.

However, glycoxidative and lipoxidative markers do not match in a particular fiber with abnormal protein aggregates. Although AGE co-localizes with protein aggregates, MDAL immunoreactivity is largely located at the external borders of protein deposits. This is further demonstrated with double-labeling immunofluorescence and confocal microscopy, thus suggesting that different proteins are substrates for glycoxidation, lipoxidation or both. It is also interesting to demonstrate re-localization of NO-producing enzymes in association with abnormal protein

deposits in myotilinopathies and desminopathies. Similar sub-cellular re-distribution of NOS has been previously demonstrated in dystrophinopathies (1, 23, 36), and it is likely related to the production of NO as a mediator to reduce cellular susceptibility to metabolic stress (24, 31).

Characterization of targets to oxidation and nitration is a means of identifying particular cytoskeletal proteins and enzymes, but preliminary studies have shown desmin to be the main target of glycoxidation and nitration in myotilinopathies and desminopathies (15). The present findings show that other proteins, in addition to desmin, may be putative substrates of oxidation and nitration in MFMs. In this line, double-labeling immunofluorescence and

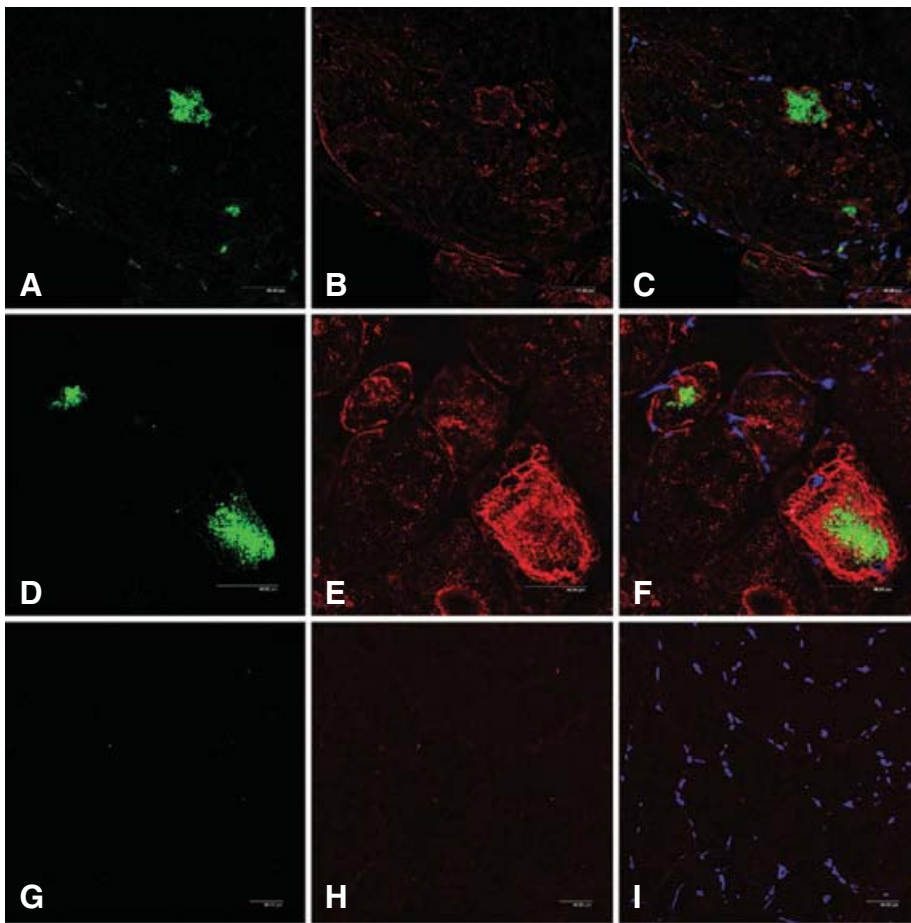


Figure 10. Double-labeling to AGE (green, **A,D**) and desmin (red, **B,E**) in desminopathy. AGE deposition is observed in several fibers, even some fibers which do not contain desmin aggregates. Partial colocalization of AGE and desmin is present in some fiber regions (merge, yellow, **C,F**). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**G–I**). Nuclei are visualized with To-pro[®]-3-iodide (blue).

confocal microscopy revealed co-localization of AGE and myotilin, and of AGE and desmin in damaged muscle fibers in myotilinopathies and desminopathies, respectively. Interestingly, AGE adducts were not only present in muscle fibers containing myotilin aggregates in myotilinopathies, but also in fiber areas devoid of myotilin deposits. AGE adducts were located at the center of the desmin deposits in desminopathies.

Oxidized proteins appear to be degraded by the 20S proteasome (2). Yet excessive oxidative stress may render the proteolytic capacity of this system insufficient, and thereby facilitate the accumulation of abnormal and often disabled proteins, through covalent cross-linking reactions and increased surface hydrophobicity (2, 3, 13). Previous studies have shown abnormal ubiquitin-proteasome system (UPS) in MFM, basically characterized by abnormal expression of several subunits of the 19S

and 20S proteasome, up-regulation of the immunoproteasome and enzymatic proteolytic activity (7). This is accompanied by increased clusterin and immunoreactivity in association with abnormal protein deposits, and expanded aggresome as revealed by increased immunoreactivity to γ -tubulin in damaged fibers (8). Furthermore, mutant ubiquitin (UBB⁺¹) has recently been found to accumulate in muscle fibers in myotilinopathies and desminopathies (21). Finally, p62 was demonstrated in association with protein deposits in MFMs (21). p62 is a protein for which a role in protein aggregation and degradation has recently been attributed; p62 is able to self-aggregate and it has high affinity for multi-ubiquitin chains (9, 23, 26, 33, 37).

In the present study, AGE co-localized p62 and ubiquitin in several abnormal protein aggregates, thus establishing a link between protein oxidation and protein

aggregation in myotilinopathies and desminopathies. As the oxidation of proteins not only facilitates their aggregation, but also makes them resistant to proteolytic machinery, the present observations suggest that oxidative damage added to protein mutation is an important contributory factor to muscle fiber damage in myotilinopathies and desminopathies.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by FIS grants PI051213, PI040184 and PI05/1570. It was also supported by the European Commission under the Sixth Framework Programme (BrainNet Europe II, LSHM-CT-2004-503039). We thank T. Yohanann for editorial advice.

REFERENCES

- Buchwalow IB, Minin EA, Müller F, Lewin G, Samoilova VE, Schmitz W, Wellner M, Hasselblatt M, Punkt K, Müller-Werdan U, Demus U, Slezak J, Koehler G, Werner B (2006) Nitric oxide synthase in muscular dystrophies: a re-evaluation. *Acta Neuropathol* 111:579–588.
- Davies KJA (2001) Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 83:301–310.
- Davies KJA, Shringarepure R (2006) Preferential degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome may be inhibited in aging and inflammatory neuromuscular diseases. *Neurology* 66(Suppl.1):s93–s96.
- De Bleecker JL, Engel AG, Ertl B (1996) Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:563–577.
- Esposito LA, Melov A, Panov A, Cottrell A, Wallace DC (1999) Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4820–4825.
- Ferreiro A, Ceuterick-de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, Fardeau M, Martin JJ, Goebel HH, Richard P, Guicheney P, Bonnemann CG (2004) Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 55:676–686.
- Ferrer I, Martín B, Castañón JG, Lucas JJ, Moreno D, Olivé M (2004) Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:484–498.
- Ferrer I, Carmona M, Blanco R, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Olivé M (2005) Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol* 15:101–108.

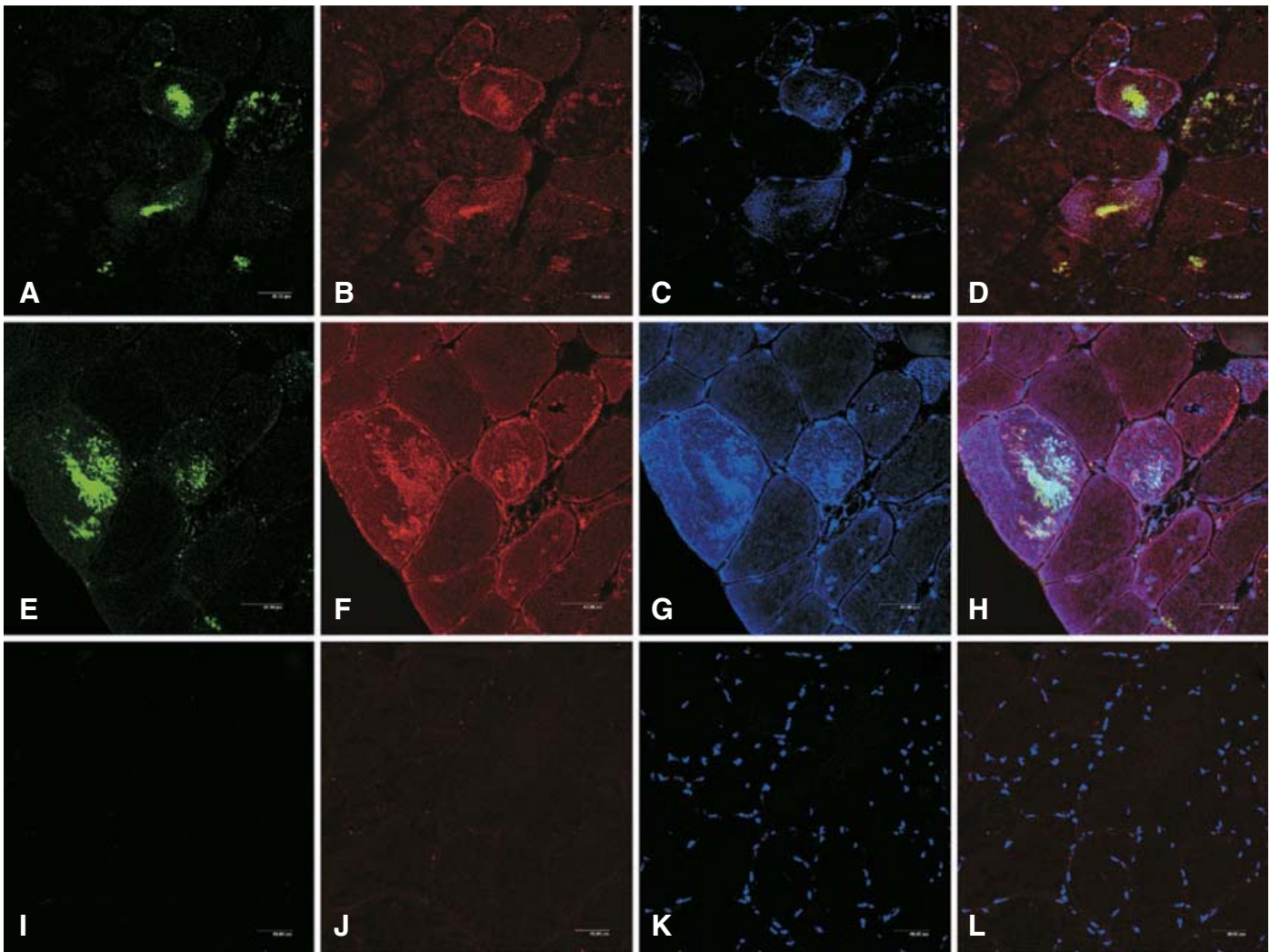


Figure 11. Triple-labeling immunofluorescence and confocal microscopy to AGE (green, **A,E**), ubiquitin (red, **B,F**) and p62 (blue, **C,G**) in desminopathy showing co-localization of AGE adducts with ubiquitin and p62, in some fiber regions (merge, yellow, **D,H**). In other fibers, AGE co-localized with ubiquitin but not with p62. One section stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**I–L**). Nuclei are visualized with To-pro[®]-3-iodide (blue).

9. Geetha T, Wooten MW (2002) Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett* 512:19–24.

10. Goebel HH, Muller HD (2006) Protein aggregate myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 13:96–103.

11. Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, Gorkhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC (1998) Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 19:402–403.

12. Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC (2004) Desmin myopathy. *Brain* 127:723–734.

13. Grune T, Jung T, Merker K, Davies KJA (2004) Decreased proteolysis caused by protein aggregates, inclusion body, plaques, lipofuscin, ceroid, and aggresomes during oxidative stress, aging, and disease. *J Biol Chem* 279:2519–2530.

14. Haslbeck KM, Friess U, Schleicher ED, Bierhaus A, Nawroth PP, Kirchner A, Pauli E, Neundörfer B, Heuss D (2005) The RAGE pathway in inflammatory myopathies and limb girdle muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 110:247–254.

15. Janué A, Odena MA, Oliveira E, Olivé M, Ferrer I (2007) Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* (in press).

16. Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernandez-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E (1998) A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalised myopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11312–11317.

17. Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA (1996) Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:549–562.

18. Olivé M, Unzeta M, Moreno D, Ferrer I (2004) Overexpression of semicarbazide-sensitive amine oxidase in human myopathies. *Muscle and Nerve* 29:261–266.

19. Olivé M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D, Ferrer I (2005) Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* 128:2315–2326.

20. Olivé M, Armstrong J, Miralles F, Pou A, Fardeau M, Gonzalez L, Martínez F, Fischer D, Martínez-Matos JA, Shatunov A, Goldfarb L, Ferrer I (2007) Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene. *Neuromusc Disord* 17:443–450.

21. Olivé M, van Leeuwen FW, Janué A, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Ferrer I (2007) Expression of mutant ubiquitin (UBB+) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* (in press).

22. Piec I, Listrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG, Bechet D (2005) Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J* 19:1143–1145.

23. Punkt K, Schering S, Löffler S, Minin EA, Samoilova VE, Hasselblatt M, Paulus W, Müller-Werdan U, Demus U, Koehler G, Boecker W, Buchwalow IB (2006) Nitric oxide synthase is up-regulated in muscle fibers in muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 348:259–264.

24. Rando TA (2001) Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a two-hit hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech* 55:223–235.

25. Rodriguez MC, Tarnapolsky MA (2003) Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 34:1217–1220.
26. Seibenhener ML, Geetha T, Wooten MW (2007) Sequestosome 1/p62—more than just a scaffold. *FEBS Lett* 581:175–179.
27. Selcen D, Engel AG (2004) Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 62:1363–1371.
28. Selcen D, Engel AG (2005) Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* 57:269–276.
29. Selcen D, Ohno K, Engel AG (2004) Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 127:439–451.
30. Stagsted J, Bendixen E, Andersen HJ (2004) Identification of specific oxidatively modified proteins in chicken muscles using a combined immunologic and proteomic approach. *J Agric Food Chem* 52:3967–3974.
31. Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol Rev* 81:209–237.
32. Tews DS, Goebel HH (1998) Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin Immunol Immunopathol* 87:240–247.
33. Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J (1996) p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 271:20235–20237.
34. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M (1998) A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 20:92–95.
35. Vorgerd M, van de Ven PF, Bruchertseifer V, Lowe T, Kley RA, Schroder R, Lochmuller H, Himmel M, Koehler K, Furst DO, Huebner A (2005) A mutation in the dimerization domain of filamin causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet* 77:297–304.
36. Wells KE, Torelli S, Lu Q, Brown SC, Partridge T, Muntoni F, Wells DJ (2003) Relocalization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a marker for complete restoration of the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Neuromusc Dis* 13:21–31.
37. Wooten MW, Hu X, Babu JR, Seibenhener ML, Geetha T, Paine MG, Wooten MC (2006) Signaling, poly-ubiquitination, trafficking, and inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J Biomed Biotech* 3:62079.
38. Yan L, Ge H, Li H, Lieber SC, Natividad F, Resuello RRG, Kim SJ, Akeju S, Sun A, Loo K, Peppas AP, Rossi F, Lewandowski ED, Thomas AP, Vatner SF, Vatner DE (2004) Gender-specific proteomic alterations in glycolytic and mitochondrial pathways in aging monkey hearts. *J Mol Cell Cardiol* 37:921–929.
39. Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Askanas V (1996) Increase of nitric oxide synthases and nitro-
- tyrosine in inclusion-body myositis. *Neuroreport* 8:153–158.
40. Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Heller L, Askanas V (1998) Nitric oxide-induced oxidative stress in autosomal recessive and dominant inclusion-body myopathies. *Brain* 121:1089–1097.

ORIGINAL ARTICLE

Desmin Is Oxidized and Nitrated in Affected Muscles in Myotilinopathies and Desminopathies

Anna Janué, Biol, Maria Antonia Odena, PhD, Eliandre Oliveira, PhD, Montse Olivé, MD, PhD, and Isidro Ferrer, MD, PhD

Abstract

Degenerative diseases with abnormal protein aggregates are characterized by the accumulation of proteins with variable post-translational modifications including phosphorylation, glycoxylation, oxidation, and nitration. Myofibrillar myopathies, including myotilinopathies and desminopathies, are characterized by the intracytoplasmic focal accumulation of proteins in insoluble aggregates in muscle cells. By using single immunohistochemistry, monodimensional gel electrophoresis and Western blotting, and bidimensional gel electrophoresis, in-gel digestion, and mass spectrometry, desmin was demonstrated to be a major target of oxidation and nitration in both desminopathies and myotilinopathies. Because oxidized and nitrated proteins may have toxic effects and may impair ubiquitin-proteasomal function, modified desmin can be considered to be an additional element in the pathogenesis of myofibrillar myopathies. In addition to desmin, pyruvate kinase muscle splice form M1 is oxidized, thus supporting complemental mitochondrial damage, at least in some cases of myotilinopathy.

Key Words: Desmin, Desminopathy, Myofibrillar myopathies, Myotilin, Myotilinopathy, Nitration, Oxidation damage, Oxidative stress.

INTRODUCTION

Myofibrillar myopathies (MFMs) are familial or sporadic muscle disorders characterized morphologically by intracytoplasmic focal accumulation of proteins in insoluble aggregates in muscle cells (1–3). This heterogeneous group of diseases was previously designated as desmin-related myopathy or desmin-storage myopathy, because desmin accumulation is constantly found in muscle fibers in these conditions. MFMs are caused by mutations in different

genes, including desmin (4–6), α B-crystallin (7), selenoprotein N (8), myotilin (9, 10), ZASP (11), and filamin (12). A major morphologic hallmark of MFMs is the presence of insoluble protein aggregates in muscle cells. In addition to desmin and myotilin, protein aggregates in MFMs are enriched by cytoskeletal proteins, chaperones, phosphorylated tau and β -amyloid, plectin, gelsolin, clusterin, and ubiquitin (2, 3, 10, 13–15). Whether oxidative and nitrosative damage occurs in MFMs is not known; however, this is an important issue because oxidized and nitrated proteins have abnormal properties that may impair their normal function. Moreover, oxidized proteins may weaken the normal ubiquitin-proteasomal pathway of protein degradation, and, consequently, they may favor the accumulation of nondegraded proteins (16).

Proteomics has permitted the identification of proteins vulnerable to oxidation in muscles under certain physiologic and pathologic conditions. Thus, ATP synthase β -chain, desmin, actin, and myosin contain oxidatively induced carbonyls in muscles of the non-insulin-dependent diabetes mellitus model Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat compared with the control Long-Evans Tokushima Otsuka rat (17). Postischemia reperfusion in isolated rat hearts results in myofibrillar protein oxidation involving actin, desmin, and tropomyosin (18). Myosin heavy chain is oxidized in hyperthyroid rat soleus (19). Several proteins contain 3-nitrotyrosine (N-Tyr) in rat cardiac muscle with aging (20).

This study is focused on the detection of putative targets of oxidative and nitration damage in myotilinopathies and desminopathies. For this purpose, muscle biopsies from patients with these MFMs were processed for single immunohistochemistry, monodimensional gel electrophoresis and Western blotting, and bidimensional gel electrophoresis, in-gel digestion of selected spots, mass spectrometry, and protein identification. Biochemical evidence of oxidation was carried out by identification of advanced glycation end products (AGEs). AGEs are carbonyl groups generated by secondary reaction of the primary amino group of lysine residues with reactive carbonyl derivatives produced by the reaction of reducing sugars or their oxidation products with lysine residues of proteins (glycation/glycoxylation reactions) (21). Identification of nitration was conducted by the recognition of N-Tyr. In all cases of this series, mutations in the myotilin or desmin genes were identified; the clinical, pathologic, and genetic characteristics have been described in detail elsewhere (10, 22).

From the Institut de Neuropatologia (AJ, MO, IF), Servei Anatomia Patològica, Institut d' Investigació de Bellvitge–Hospital Universitari de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Plataforma de Proteòmica, Barcelona Spain; Parc Científic de Barcelona (MAO, EO), Barcelona, Spain; and Universitat de Barcelona (MAO, EO, IF), Barcelona, Spain. Send correspondence and reprint requests to: Isidro Ferrer, MD, PhD, Institut de Neuropatologia, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain; E-mail: 8082ifa@comb.es

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (PI05/1213 and PI05/1570) and was also supported by the European Commission under the Sixth Framework Programme (BrainNet Europe II, LSHM-CT-2004-503039).

TABLE 1. Summary of Cases

Patient	Age/ Gender	Age at Onset	Site of Muscle Biopsy	Mutation
1	52/M	50	Lateral gastrocnemius	<i>MYOT</i> Ser55Phe
2	80/M	70	Deltoid	<i>MYOT</i> Ser60Phe
3	70/F	58	Vastus lateralis	<i>MYOT</i> Ser60Cys
4	80/F	77	Vastus lateralis	<i>MYOT</i> Lys36Glu
5	73/F	69	Deltoid	<i>MYOT</i> Ser55Phe
6	49/F	25	Lateral gastrocnemius	<i>DES</i> Pro419Ser
7	46/F	25	Biceps brachii	<i>DES</i> Leu392 Pro
8	27/M	25	Lateral gastrocnemius	<i>DES</i> Ile367Phe
9	78/M		Biceps brachii	
10	52/F		Deltoid	
11	64/F		Deltoid	
12	33/M		Vastus lateralis	
13	29/F		Vastus lateralis	
14	37/M		Lateral gastrocnemius	

The present results show desmin to be an important common target of protein oxidation in myotilinopathies. Desmin is also a major target of nitration in these diseases. In addition, mutant desmin has been shown to be oxidized and nitrated in desminopathies. These results demonstrate posttranslational modifications of certain proteins in MFMs and show, for the first time, that desmin is a target vulnerable to oxidation and nitration in myotilinopathies and desminopathies.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Muscle Biopsies

Muscle biopsy samples from 5 patients suffering from myotilinopathy were included in the present study. Samples were taken from the lateral gastrocnemius in 1 patient, vastus lateralis in 2 patients, and the deltoid muscle in the remaining 2 patients. The patients were 3 women and 2 men, from 52 to 80 years of age (mean age 71 years). Two cases were sporadic, whereas the disease was inherited following an autosomal dominant trait in the remaining 3 cases. Four different myotilin mutations (Ser55Phe, Ser60Cys, Ser60Phe, and Lys36Glu) were identified in these patients. Muscle biopsy samples from 3 patients with desminopathy were examined in parallel. These patients were 2 women and 1 man, from 27 to 49 years of age (mean age 40.6 years) from 3 different families. Muscle biopsies in these patients were taken from the lateral gastrocnemius in 2 patients and from the biceps brachii in the third. Finally, muscle biopsy specimens from 6 age-matched control subjects were used for comparative purposes; these were taken from the gastrocnemius in 1 patient, biceps brachii in 1 patient, del-

toid in 2 patients, and vastus lateralis in 2 patients. A summary of the clinical characteristics of the patients included in the present study is provided in Table 1.

Immunohistochemistry

Cryostat sections, 8- μ m-thick, fixed with acetone (-20°C for 10 minutes), were incubated with 1% hydrogen peroxide in $1\times$ PBS for 5 minutes to block endogenous peroxidase. Unspecific binding reactions were blocked with 10% goat serum in PBS for 2 hours, followed by incubation with 1 of the primary antibodies diluted in $1\times$ PBS with 3% goat serum at 4°C overnight. The mouse monoclonal anti-myotilin antibody (Novocastra, Newcastle, UK) was used at a dilution of 1:100, the rabbit polyclonal anti-desmin antibody (GeneTex, San Antonio, TX) at 1:200, the mouse monoclonal anti-AGE antibody (TransGenic, Kobe, Japan) at 1:250, and the rabbit polyclonal anti-endothelial nitric oxide synthase (eNOS) antibody (Chemicon, Barcelona, Spain) at 1:50. After washing, the sections were processed with the Super Sensitive Link-Label IHC Detection System (BioGenex, San Ramon, CA) following the instructions of the manufacturer. The immunoreaction was visualized as a dark blue precipitate using NH_4NiSO_4 (0.05 M) diluted in phosphate buffer (0.1 M) with 0.03% diaminobenzidine, 0.04% NH_4Cl , and 0.001% hydrogen peroxide. Sections

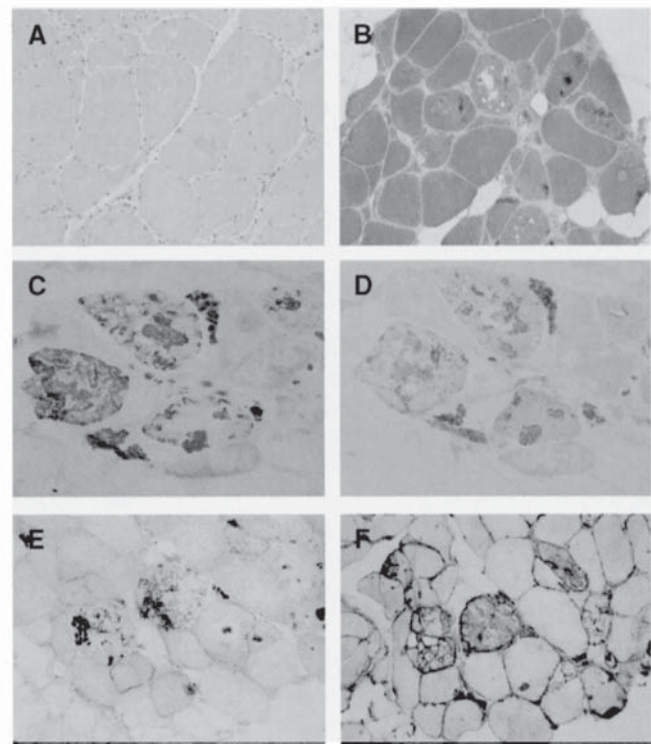


FIGURE 1. Muscle pathology in 1 myotilinopathy case showing several fibers containing eosinophilic inclusions (A), which stain blue-red or dark-blue on modified trichrome stain (B). Strong myotilin (C) and desmin (D) immunoreactivity is observed within the cytoplasm in several fibers. Prominent advanced glycation end products (E) and endothelial nitric oxide synthase (F) deposition are seen in muscle fibers containing aggregates. Scale bar = 50 μm .

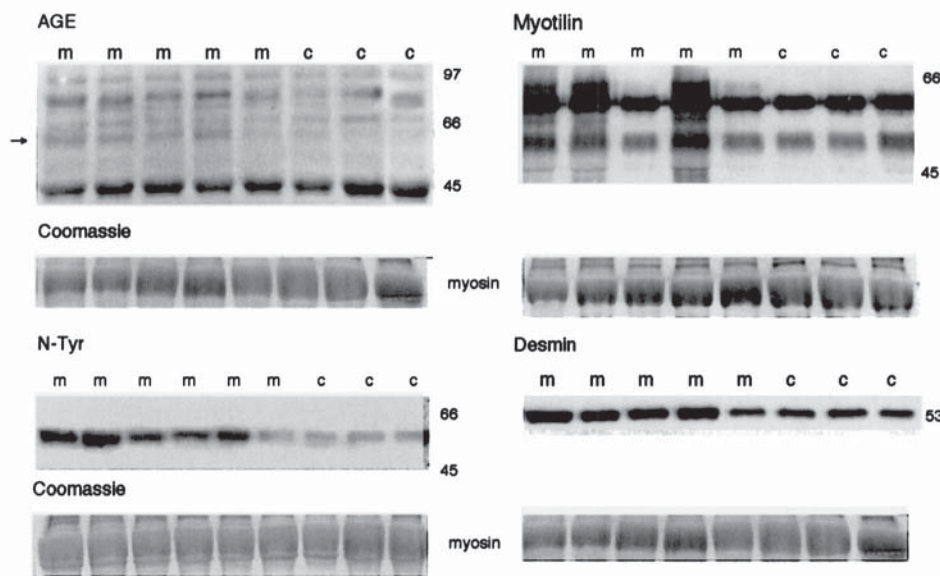


FIGURE 2. Monodimensional gel electrophoresis and Western blotting for advanced glycation end products (AGEs) and nitrotyrosine (N-Tyr) in myotilinopathies. Although the pattern of AGE immunoreactivity is similar in controls and diseased cases, a band of ~57 kDa is prominent in myotilinopathy (m) compared with controls (c). Significant differences are seen between controls and diseased cases ($p < 0.01$, Student *t*-test). Western blots for N-Tyr show a band of ~50 kDa in myotilinopathy compared with controls. Densitometric studies show significant differences between controls and diseased cases ($p < 0.01$, Student *t*-test). The same cases (same lane order distribution) blotted with anti-myotilin antibodies show intragroup variations, although myotilin (66 kDa) levels are higher in 3 cases. Western blots for desmin (53 kDa) show a significant increase in the density of the specific band ($p < 0.01$, Student *t*-test). Coomassie Blue, with the suspected molecular mass of myosin as a marker, was used to control protein loading.

processed only with the secondary antibody were used as negative controls. Additional sections were stained with hematoxylin and eosin in every case.

Monodimensional Gel Electrophoresis and Western Blotting

Roughly 50 mg of frozen muscle samples was homogenized with a manual glass homogenizer in ice with 1 mL of homogenizer buffer (75 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.001% [w/v] bromphenol blue, 15% (w/v) sodium dodecyl sulfate [SDS], 20% [v/v] glycerol, 5% [v/v] phenylmethylsulfonyl fluoride [P-7626], 1 μ g/mL pepstatin A [P-4265], 10 μ g/mL leupeptin [L-2884], and 10 μ g/mL aprotinin [A-1153]; all from Sigma, Madrid, Spain). Total homogenates were boiled at 94°C for 4 minutes and centrifuged at $9,500 \times g$ for 5 minutes. Pellets were discarded; the concentration of the resulting supernatants was determined by the RC-DC Protein Assay (Bio-Rad, Madrid, Spain), and 25- μ L aliquots were stored at -80°C.

For Western blot studies, 24 μ g was mixed with sample buffer 4 times, processed for 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (20 mA/gel for 60 minutes at 4°C), and then transferred to nitrocellulose membranes (20 V and 40 mA/gel for 50 minutes) in a Semi-Dry Transfer System (Bio-Rad). Once membranes were stained with Ponceau solution (Sigma) as a transfer quality control, they were immediately incubated with 5 \times Western Blocking Reagent (Roche, Mannheim, Germany) or with 5% skimmed milk in 1 \times PBS at 4°C overnight. After 24 hours, the membranes were incubated with 1 of the primary antibodies diluted in

TBS-T (100 mM Tris base, 1.4 M NaCl, and 0.1% [v/v] Tween 20, pH 7.4) with 1% Western Blocking Reagent or with 5% skimmed milk in 1 \times PBS at 4°C overnight. The mouse monoclonal anti-AGE antibody was used at a dilution of 1:500; the mouse monoclonal anti-desmin antibody (DakoCytomation, Barcelona, Spain) was used at 1:5000, and the mouse monoclonal anti-myotilin antibody was used at a dilution of 1:7000. The mouse monoclonal anti-N-Tyr antibody (Zymed, San Francisco, CA) was diluted at 1:500 to 1:1000. Subsequently, the membranes were washed with TBS-T or with 5% skimmed milk in 1 \times PBS, and then incubated with anti-mouse IgG secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (DakoCytomation) at a dilution of 1:1000 in the same buffer (TBS-T with 0.5% Blocking Reagent) for 45 minutes at room temperature. After washing the membranes with TBS-T or PBS, the protein bands were detected with the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The myosin band of ~200 kDa, stained with Coomassie Brilliant Blue R (Sigma), in the posttransfer gel, was used as a loading protein control.

Bidimensional Gel Electrophoresis and Western Blotting

Approximately 20 mg of frozen muscle sample was homogenized with a manual glass homogenizer in ice with 800 μ L of lysis buffer (40 mM Tris-base, 9 M urea, 2 M thiourea, and 4% [w/v] 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; Bio-Rad) and a mix of protease inhibitors containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride,

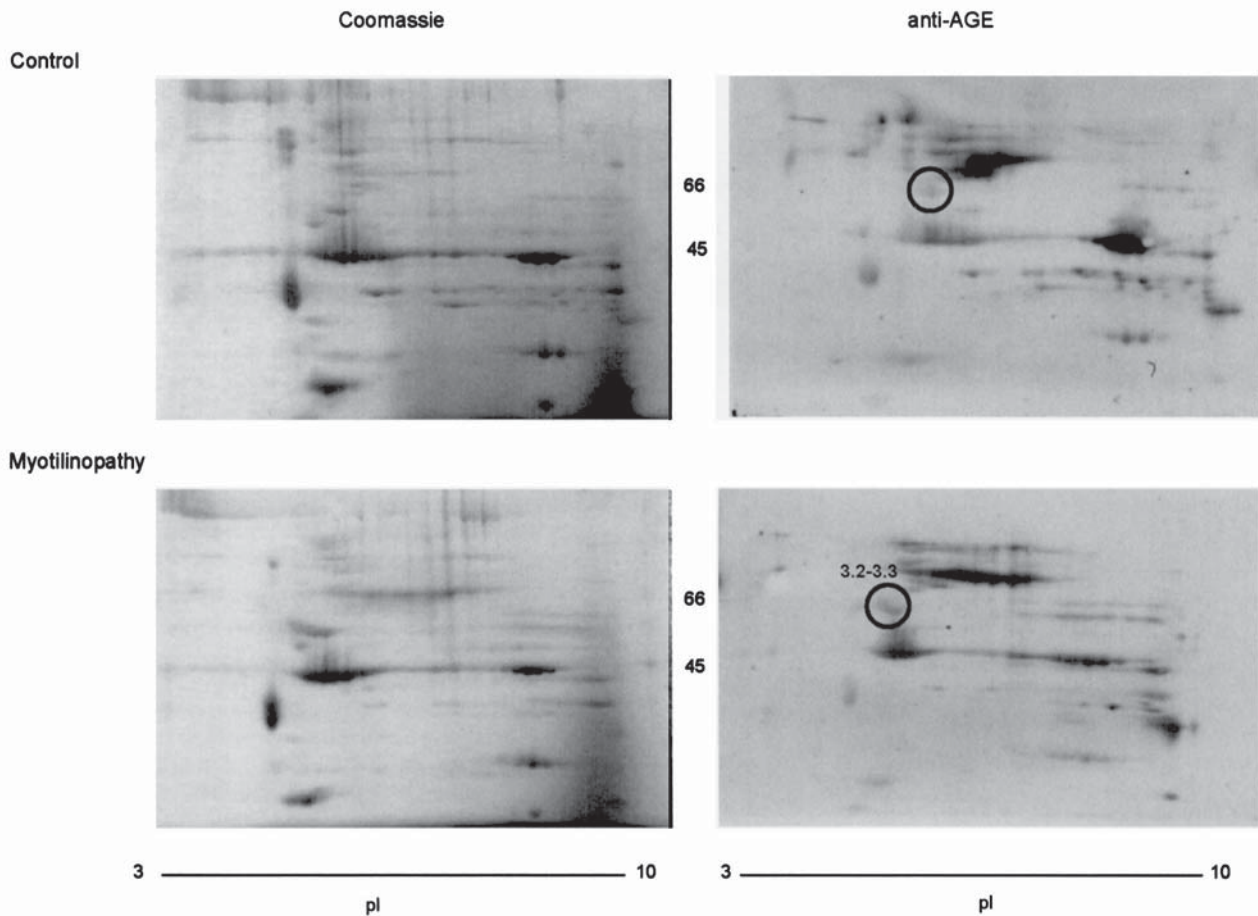


FIGURE 3. Bidimensional gel electrophoresis and advanced glycation end product (AGE) blotting in myotilinopathy. One diseased case and 1 control were processed in parallel. Spots of ~50 kDa whose AGE-immunoreactive density was higher in myotilinopathy were identified (circles) and excised in parallel gels stained with Coomassie Blue. Spots 3.2 and 3.3 were selected for study.

1 $\mu\text{g/mL}$ pepstatin A, 10 $\mu\text{g/mL}$ leupeptin, and 10 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin (all from Sigma). Then, total homogenates were centrifuged at $16,000 \times g$ and 20°C for 5 minutes, pellets were discarded, protein concentrations of the resulting supernatants were measured with the Bradford assay (Sigma), and aliquots were stored at -80°C .

Before the 7-cm, pH 3 to 10 nonlinear gradient ReadyStrip IPG strips (Bio-Rad) were rehydrated with the samples, 0.8% Bio-Lyte 3/10 Ampholites (Bio-Rad), 2 mM tributylphosphine (Sigma), and 0.0004% bromphenol blue were added to aliquots containing 200 μg of total protein in a final volume of 125 μL . Immobilized IPG strips were used

to run the first dimension electrophoresis, and 125 μL of the sample was applied along the length of the strips, which were actively rehydrated for 12 hours at 50 V. Subsequently, proteins were focused at 200 V for 1 hour, 500 V for 1 hour, 1,000 V for 1 hour, and 8,000 V for 1 hour, and, finally, the voltage was kept at 8,000 V to reach a total of 24 kVh.

Before the second dimension separation was run, IPG strips were equilibrated twice for 15 minutes each time in equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS, and 0.0002% bromphenol blue) with 1% dithiothreitol (Sigma). The gel was treated with 4% iodoacetamide (Bio-Rad). Subsequently, strips were placed

TABLE 2. Advanced Glycation End Product-Modified Proteins in Myotilinopathies

Spot	Calculated pI	Nominal Mass (Da)	Protein	Score	Sequence Coverage (%)	Number of Peptides Matched	GI accession
3.2	5.21	53,560	Desmin	219	31	12	GI/55749932
3.3	5.21	53,560	Desmin	192	27	15	GI/55749932
4.2	5.21	53,560	Desmin	219	38	15	GI/55749932

Identification of spots labeled 3.2 and 3.3 in Figure 3. Results are from the MASCOT search engine of MALDI-TOF/TOF data against the database.

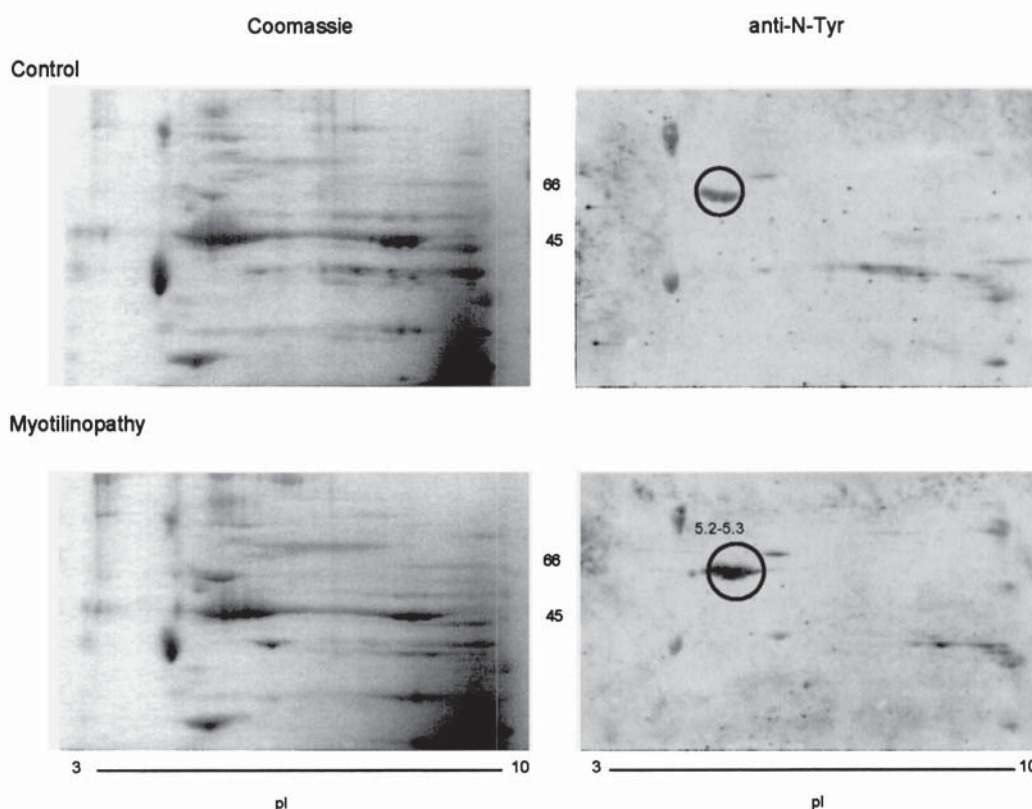


FIGURE 4. Bidimensional gel electrophoresis and nitrotyrosine (N-Tyr) blotting in myotilinopathy. One diseased case and 1 control were processed in parallel. Spots of ~50 kDa whose N-Tyr-immunoreactive density was higher in myotilinopathy were identified (circles) and excised in parallel gels stained with Coomassie Blue. Spots 5.2 and 5.3 were selected for study.

on 10% SDS-polyacrylamide gel and electrophoresis was run at 35 mA/gel for 1.5 hours.

Two bidimensional electrophoreses of each sample were run in parallel. Later, 1 gel was stained with Bio-Safe Colloidal Coomassie Blue G-250 stain (Bio-Rad), as described by the manufacturer, and the other gel was transferred to a nitrocellulose membrane (20 V and 50 mM/gel for 70 minutes). Once the membranes were stained with Ponceau solution (Sigma) as a transfer quality control, they were immediately incubated with 1× Western Blocking Reagent at 4°C overnight. The next day, the membranes were incubated with 1 of the primary antibodies. The mouse monoclonal anti-AGE antibody was used at a dilution of 1:500, whereas the mouse monoclonal anti-N-Tyr antibody was diluted 1:1,000/1:2,000; both were kept in TBS-T with 1% Western Blocking Reagent at 4°C overnight. After incubation with the primary antibodies, the membranes were

washed with TBS-T and then incubated with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase at a dilution of 1:1000 in the same buffer (TBS-T with 0.5% blocking reagent) for 45 minutes at room temperature. After washing the membranes with TBS-T, protein bands were detected by the enhanced chemiluminescence method.

In-Gel Digestion

Proteins were manually excised from the 2-dimensional gels and in-gel digested with trypsin (sequencing grade modified, Promega, Barcelona, Spain) in the automatic Investigator ProGest robot of Genomic Solutions. Briefly, gel-excised spots were washed sequentially with ammonium bicarbonate buffer and acetonitrile. Then, proteins were reduced and alkylated for 30 minutes each, with 10 mM dithiothreitol solution and 100 mM solution of iodoacetamide, respectively. After sequential washings with buffer and

TABLE 3. Nitrated Proteins in Myotilinopathies

Spot	Calculated pI	Nominal Mass (Da)	Protein	Score	Sequence Coverage	Number of Peptides Matched	GI accession
5.2	5.21	53,560	Desmin	348	51	26	GI/55749932
5.3	5.21	53,560	Desmin	329	53	28	GI/55749932
5.1	5.21	53,560	Desmin	390	61	37	GI/55749932
5.4	5.21	53,560	Desmin	402	72	43	GI/55749932

Identification of spots labeled 5.2 and 5.3 in Figure 4. Results are from the MASCOT search engine of MALDI-TOF/TOF data against the database.

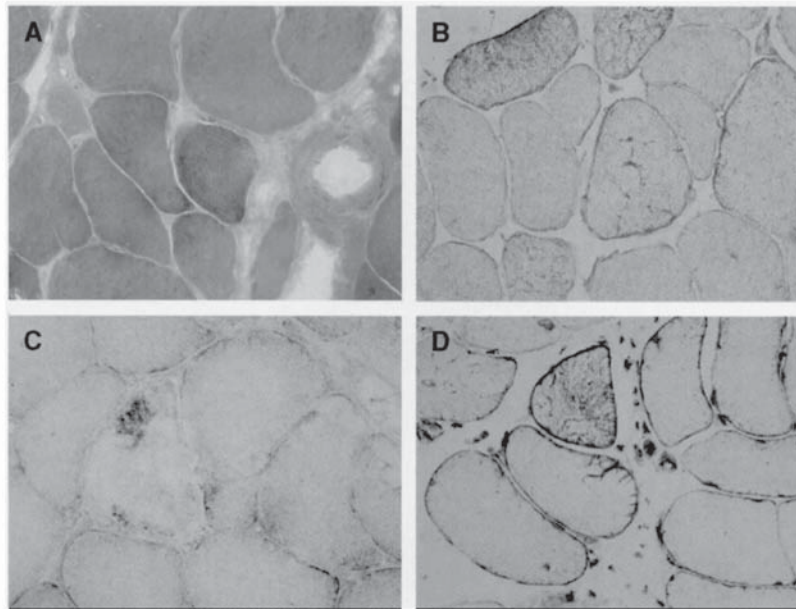


FIGURE 5. (A) Muscle biopsy in 1 patient suffering from desminopathy showing patches of dark material on modified trichrome stain. (B) Desmin immunoreactivity in muscle fibers. Weak AGEs (C) and marked eNOS (D) immunoreactivity are also observed in certain muscle fibers. Scale bar = 50 μm .

acetonitrile, proteins were digested overnight at 37°C with 0.27 nM trypsin. Tryptic peptides were extracted from the gel matrix with 10% formic acid and acetonitrile. The extracts were pooled and dried in a vacuum centrifuge.

Acquisition of Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry Spectra

Digested samples were analyzed by mass spectrometry either via liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (MS/MS) and/or matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)/time of flight (TOF)-mass spectrometry-MS/MS. In the first case, the tryptic-digested peptide samples were analyzed using on-line liquid chromatography (CapLC; Micromass-Waters, Manchester, UK) coupled with MS/MS (Q-TOF Global; Micromass-Waters). Samples were resuspended in 12 μL of 1% formic acid solution, and 4 μL was injected for chromatographic separation into a reverse-phase capillary C_{18} column (75 μm internal diameter and 15 cm in length, PepMap column; LC Packings, Amsterdam, Netherlands). The eluted peptides were ionized via coated nano-ES needles (PicoTipTM; New Objective, Woburn, MA). A capillary voltage of 1,800 to 2,200 V was applied together with a cone voltage of 80 V. The collision in the collision-induced dissociation was 25 to 35 eV, and argon was used as the collision gas.

Analysis by MALDI-TOF was done in a MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (4700 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA). In this case, the digests were resuspended in 10 μL of 0.1% trifluoroacetic acid; 5 μL was cleaned up and concentrated in homemade microcolumns (23) and eluted directly on a MALDI plate with 0.8 μL of hydroxycinnamic acid (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 70% acetonitrile-0.1%

trifluoroacetic acid). The most intense peaks were selected for further characterization by MS/MS analysis.

Database Search

Data from the Q-TOF were generated in PKL file format and the spectra from MALDI-TOF were submitted for database searching in a generic MASCOT format. Both sets of data were submitted for database searching in a MASCOT server (Matrix Science, Boston, MA) using the National Center for Biotechnology Information database with the following parameters: trypsin enzyme, 1 missed cleavage, carbamidomethyl (C) as fixed modification and oxidized (M) as variable modification, and mass tolerance of 100 ppm. A probability-based MOWSE score was used to determine the level of confidence in the identification of specific isoforms from the mass spectra.

Image Processing and Statistical Analysis

The densitometric quantification of Western blot bands was carried out with Total Lab v2.01 software, and the data obtained were analyzed using Statgraphics Plus v5.1 software. Differences between control and diseased samples were analyzed with the Student *t*-test: *, $p < 0.05$ or **, $p < 0.01$.

Identification of Mutant Desmin

Searches from spots resulting in positive identification of human desmin were checked for the presence of unassigned *m/z* corresponding to mutant desmin tryptic peptides. The identification of the mutant desmin was done from MS/MS analysis of such unassigned peptide signals. De novo sequencing was performed on data from such samples with Proteinlynx software (Micromass-Waters), and sequences were manually checked for confirmation and

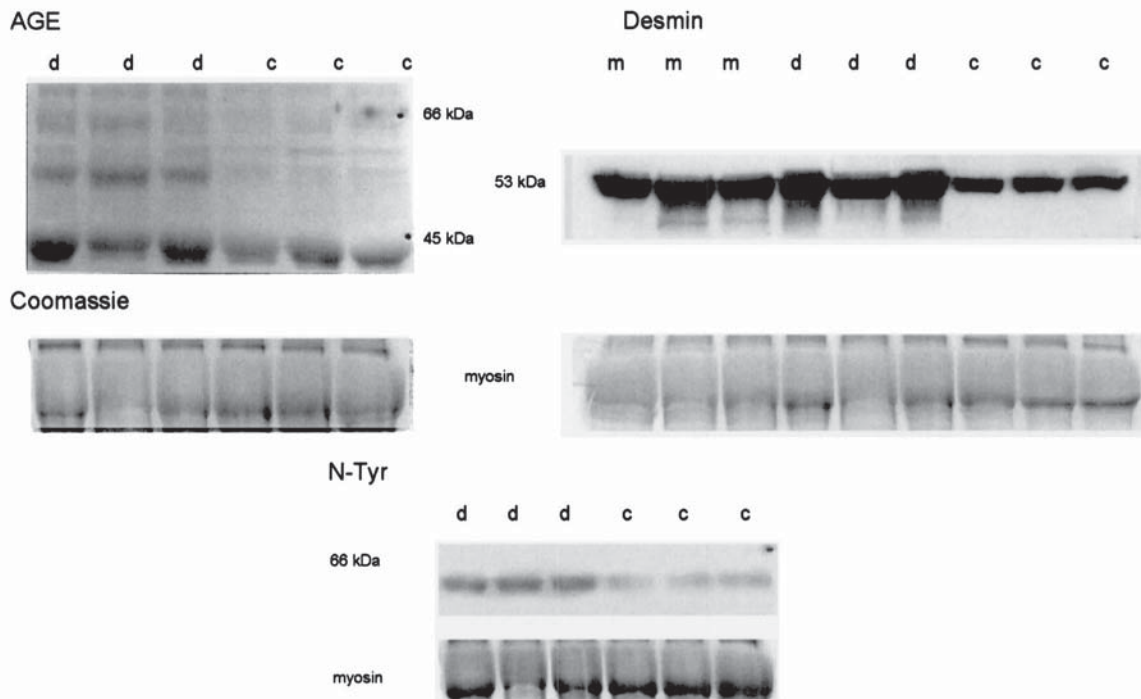


FIGURE 6. Monodimensional gel electrophoresis and Western blotting for advanced glycation end products (AGEs) and nitrotyrosine (N-Tyr) in desminopathies. Western blots for AGEs show a band of ~50 kDa, which is higher in desminopathies (d) compared with controls (c) ($p < 0.05$, Student *t*-test). Western blots for N-Tyr show a band of ~50 kDa in desminopathy compared with controls. Densitometric studies show significant differences between control and diseased cases ($p < 0.01$, Student *t*-test). Western blots for desmin show increased protein levels in desminopathy and myotilinopathy compared with controls ($p < 0.05$, Student *t*-test). Yet no differences are observed in the amount of desmin between desminopathies and myotilinopathies. Coomassie Blue staining was used to control protein loading.

annotation of nonassigned peaks. In addition, de novo results were confirmed with Peaks v4.2 software.

RESULTS

General Aspects in Myotilinopathies

The most characteristic finding in myotilinopathy was the presence of variable numbers of fibers containing single

or multiple eosinophilic hyaline inclusions, which stained dark blue or blue-red on modified trichrome stain. Variation in the fiber size, increased numbers of internal nuclei, spheroid bodies and rare cytoplasmic bodies, and the presence of rimmed and nonrimmed vacuoles were also observed. Immunohistochemical studies revealed prominent protein aggregates strongly reactive with anti-myotilin and anti-desmin antibodies. Focal, strong AGE immunoreactivity

TABLE 4. Advanced Glycation End Product-Modified Proteins in Desminopathies

Spot	Calculated pI	Nominal Mass (Da)	Protein	Score	Sequence Coverage (%)	Number of Peptides Matched	GI Accession
5A2	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	761	43	17	GI/55749932 or not assigned
5A3	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	863	45	18	GI/55749932 or not assigned
5B	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	686	34	16	GI/55749932 or not assigned
6A1	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	517	30	12	GI/55749932 or not assigned
6A2	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	804	37	17	GI/55749932 or not assigned
6A3	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	587	30	12	GI/55749932 or not assigned
6A4	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	748	34	16	GI/55749932 or not assigned

Identification of spots. Results from the MASCOT search engine of MALDI-TOF/TOF data against the database. approx., approximately.

was observed in muscle fibers containing protein aggregates. The immunoreaction was particularly strong in spheroid bodies. Cytoplasmic eNOS immunoreactivity decorating protein aggregates was also observed in myotilinopathies. The number of fibers displaying AGEs and eNOS immunoreactivity varied from 1 case to another but always correlated with the number of fibers containing protein aggregates as seen on myotilin and desmin immunostains (Fig. 1).

Monodimensional Gel Electrophoresis and Western Blotting to Advanced Glycation End Products and Nitrotyrosine in Myotilinopathies

Western blotting for AGEs revealed a similar pattern of oxidized proteins between controls and myotilinopathy cases. However, a band of ~57 kDa was clearly higher in myotilinopathy, the difference being significant ($p < 0.01$, Student *t*-test) when the density of this band was compared in controls and diseased cases (Fig. 2). The same cases blotted with anti-myotilin antibody showed no statistically significant differences between controls and diseased cases due to the pronounced intragroup variations in the amount of myotilin expressed in myotilinopathy cases. Despite these individual differences, a marked increase of myotilin was found in 3 cases (Fig. 2). In contrast to myotilin, a significant increase of desmin (53 kDa) was observed in myotilinopathy cases as a group ($p < 0.05$, Student *t*-test) (Fig. 2). Interestingly, the only myotilinopathy case with a tenuous AGE immunoreactive band of ~50 kDa was the 1 with the lowest content of myotilin and desmin on Western blots.

Western blotting for N-Tyr revealed a similar pattern of nitrated proteins between controls and myotilinopathies, except for a strong band of ~50 kDa, which was more intense in pathologic cases (Fig. 2). Densitometric studies showed significant differences in myotilinopathy compared with controls ($p < 0.01$, Student *t*-test). The only myotilinopathy case that did not show differences with controls was the biopsy of a muscle showing only a few fibers with protein aggregates.

Bidimensional Gel Electrophoresis, Advanced Glycation End Product Blotting, and Characterization of Advanced Glycation End Product-Modified Proteins in Myotilinopathies

Several spots were identified in blots processed for AGEs in control and diseased cases. However, the attention was focused on putative spots of ~50 kDa. Spots of this approximate molecular mass whose density was higher in myotilinopathy than in controls were excised, in-gel digested, and analyzed with MS. Similar spots were found in the 2 myotilinopathies examined (Fig. 3). MALDI-TOF/TOF-MS identified these spots as desmin with a MOWSE score close to 200, thus indicating a high confidence of identification (Table 2).

Bidimensional Gel Electrophoresis, Nitrotyrosine Blotting, and Identification of Nitrated Proteins in Myotilinopathies

Immunoblots displayed many nitrated spots, but only spots located between 45 and 66 kDa and showing clear differences between pathologic and control cases were selected for further study. Similar profiles were observed in all myotilinopathy cases with protein aggregates (Fig. 4). MALDI-TOF/TOF MS identified these spots as desmin with a MOWSE score >300 , thus indicating a very high confidence of identification (Table 3).

General Aspects in Desminopathies

Muscle biopsies in desminopathy cases showed non-hyaline inclusions that were best identified with modified trichrome stain. Hyaline inclusions were rarely observed. Variation in the fiber size and small numbers of rimmed vacuoles were found in every case. Immunohistochemistry revealed desmin and α B-crystallin deposition in the subsarcolemma or within the cytoplasm. AGE immunoreactivity was observed in a subset of fibers containing desmin deposits. eNOS immunoreactivity decorating the cytoplasmic inclusions was found in every case (Fig. 5).

TABLE 5. Nitrated Proteins in Desminopathies

Spot	Calculated pI	Nominal Mass (Da)	Protein	Score	Sequence Coverage (%)	Number of Peptides Matched	GI Accession
5N1	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	878	38	15	GI/55749932 or not assigned
5N2	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	1074	48	20	GI/55749932 or not assigned
5N3	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	1031	47	23	GI/55749932 or not assigned
5N4	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	878	40	17	GI/55749932 or not assigned
6N2	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	958	39	24	GI/55749932 or not assigned
6N3	5.21	53,560 or approx.	Desmin and/or mutant desmin	862	39	18	GI/55749932 or not assigned

Identification of spots. Results from the MASCOT search engine of MALDI-TOF/TOF data against the database. approx., approximately.

Monodimensional Gel Electrophoresis and Western Blotting for Advanced Glycation End Products and Nitrotyrosine in Desminopathies

Western blotting for AGEs showed a band of ~50 kDa higher in desminopathies compared with controls. The increased immunoreactivity was significant ($p < 0.05$, Student *t*-test) (Fig. 6). Western blots to desmin showed increased levels of the protein in desminopathy compared with controls ($p < 0.05$, Student *t*-test). Similar amounts of desmin were observed in myotilinopathy and desmin cases processed in parallel (Fig. 6). Western blotting for N-Tyr revealed a similar pattern of nitrated proteins between controls and desminopathies, except for a strong band of ~50 kDa that was more intense in pathologic cases (Fig. 6). Densitometric studies showed significant differences in desminopathy compared with controls ($p < 0.01$, Student *t*-test).

Bidimensional Gel Electrophoresis and Advanced Glycation End Product Blotting in Desminopathies

Several spots were identified in blots processed for AGE in control and diseased cases. Spots of ~50 kDa molecular mass whose density was higher in desminopathy than in controls were selected for further study. Similar spots were seen in the 2 desminopathy cases examined (data not shown). MALDI-TOF/TOF-MS identified these spots as desmin or mutant desmin with a MOWSE score >500, thus indicating a very high confidence of identification (Table 4).

Bidimensional Gel Electrophoresis and Nitrotyrosine Blotting in Desminopathies

Several spots were identified in blots processed for N-Tyr in control and diseased cases. Spots of ~50 kDa molecular mass whose density was higher in desminopathy

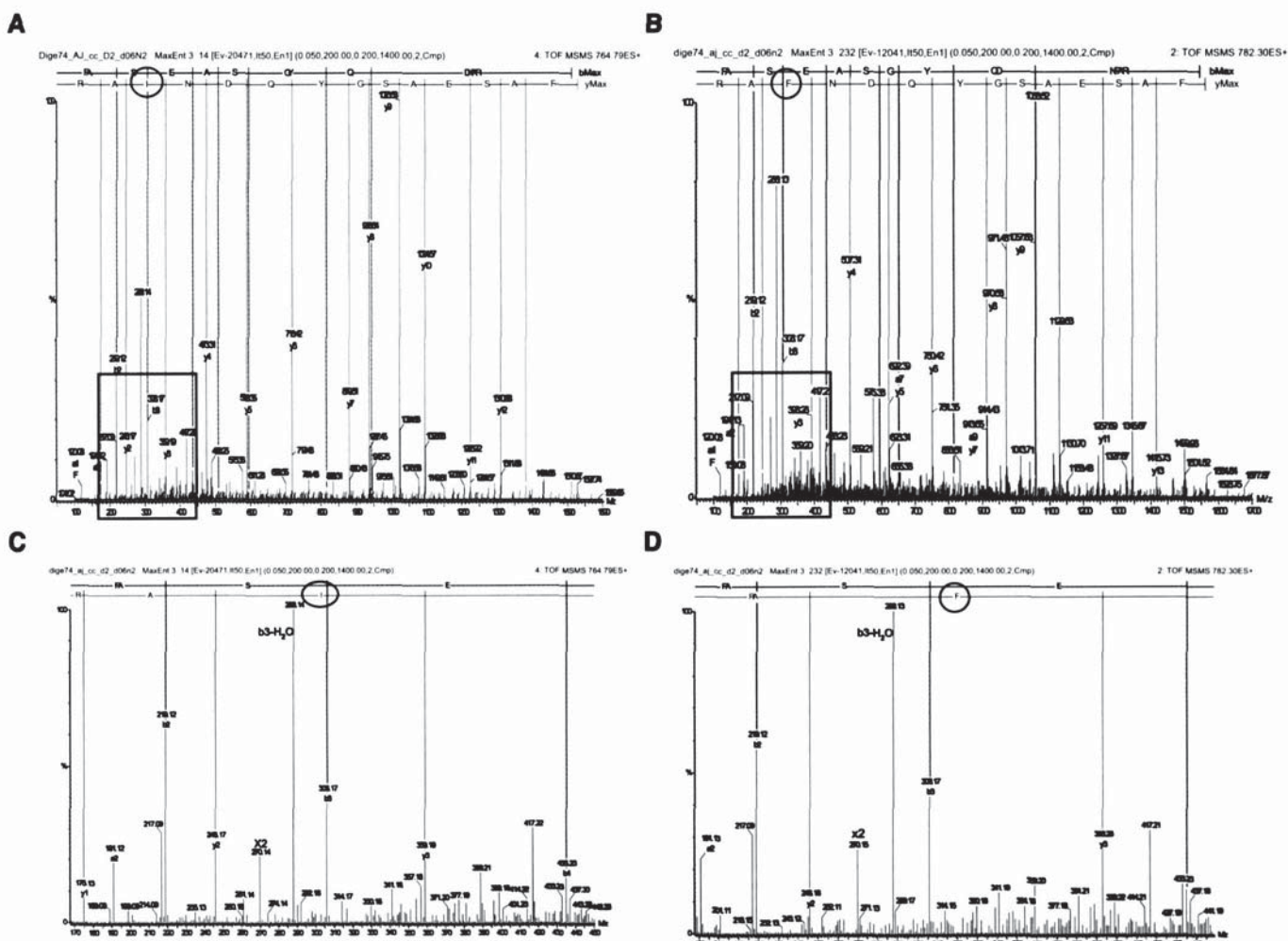


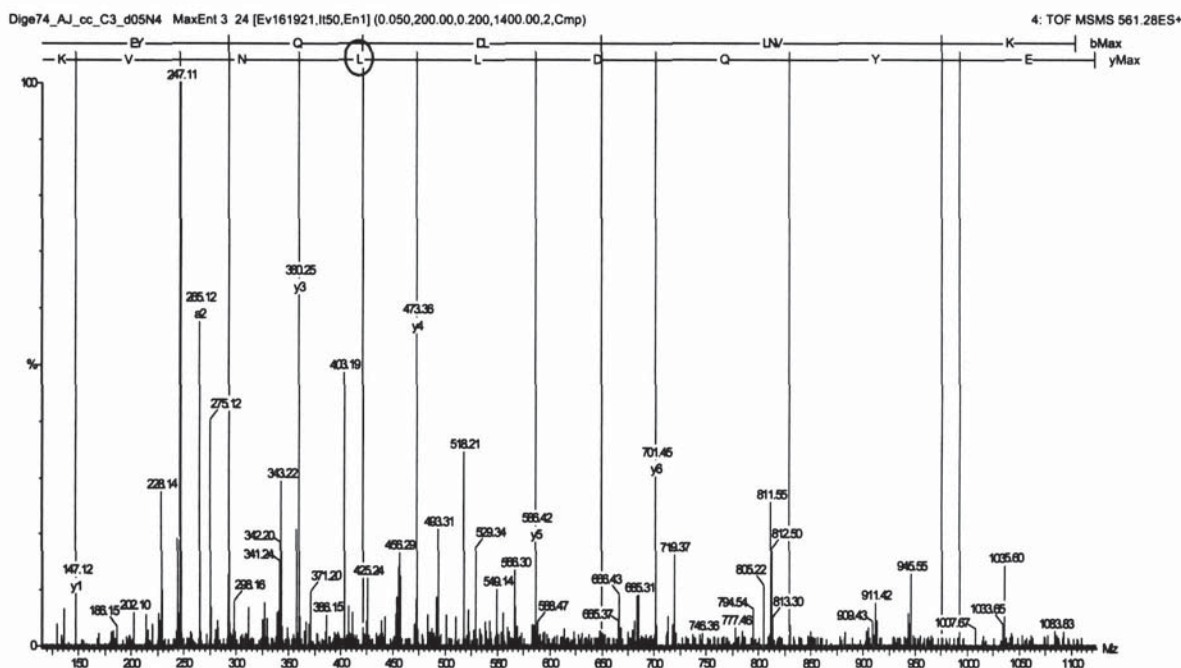
FIGURE 7. Comparison of spectra corresponding to desmin tryptic peptides with (1561.6 Da) and without (1527.6 Da) Ile/Phe mutation. Both were found in samples from the patient with a known Ile/Phe mutation in the desmin gene (Table 1, case 8). Assigned spectra for tryptic peptide FASEASGYQDNIAR (**A**) and FASEASGYQDNFAR (**B**). The squared regions are amplified in (**C**) and (**D**), respectively, for the MS/MS spectra of FASEASGYQDNIAR and FASEASGYQDNFAR.

than in controls were selected for further study. Similar spots were seen in the 2 desminopathy cases examined (data not shown). MALDI-TOF/TOF-MS identified these spots as desmin or mutant desmin with a MOWSE score >800, thus indicating a very high confidence of identification (Table 5).

Identification of Mutant Desmin Excised From Bidimensional Gels

Mass analysis of tryptic peptides showed the presence of peptides corresponding to FASEASGYQDN/AR and EYQDLLNVK (theoretical mass 1527.70 and 1120.58 Da,

A



B

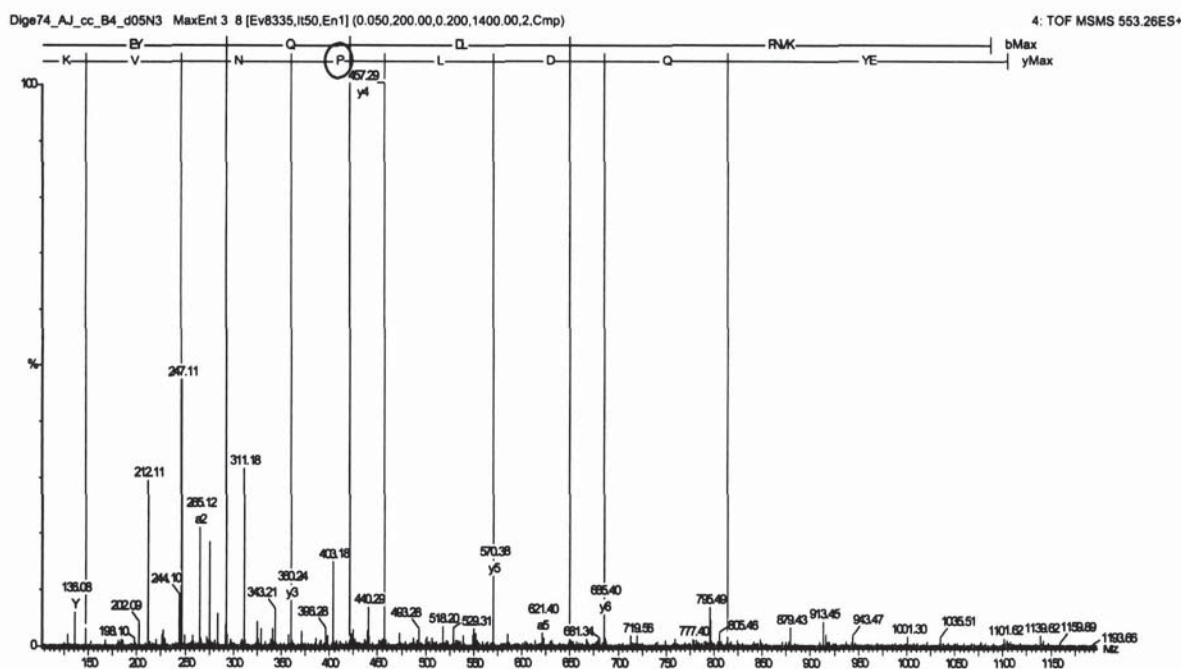


FIGURE 8. Comparison of spectra corresponding to desmin tryptic peptides with (1104.7 Da) and without (1120.7 Da) Leu/Pro mutation. Both were found in samples from the patient with the Leu/Pro mutation in the desmin gene (Table 1, case 7). Assigned spectra for tryptic peptides EYQDLLNVK (**A**) and EYQDLPNVK (**B**).

TABLE 6. Advanced Glycation End Product-Modified Pyruvate Kinase in Myotilinopathy

Spot	Calculated pI	Nominal Mass (Da)	Protein	Score	Sequence Coverage (%)	Number of Peptides Matched	GI accession
6.1	7.20	58,479	Pyruvate kinase muscle splice form M1	450	18	11	GI/2117873
6.2	7.20	58,479	Pyruvate kinase muscle splice form M1	117	27	12	GI/2117873
6.3	7.20	58,479	Pyruvate kinase muscle splice form M1	702	3	25	GI/2117873
6.4	7.20	58,479	Pyruvate kinase muscle splice form M1	105	7	7	GI/2117873
6.5	7.20	58,479	Pyruvate kinase muscle splice form M1	329	13	9	GI/2117873

Numbers of spots are numerical codes used for identification of proteins. These modifications are not constant but rather present in individual cases.

respectively) that were matched to desmin protein in database search. Moreover, some unidentified peptides with masses of 1561.7 and 1104.6 Da were also observed. Such peptides were further analyzed by MS/MS, showing 2 mutations in the amino acid sequence of desmin. In the peptide FASEASGYQDN¹AR 1 residue of Ile was replaced by Phe (FASEASGYQDN¹FAR, theoretical mass 1561.67 Da). In the peptide EYQDLLNVK 1 residue of Leu was replaced by Pro (EYQDL¹PNVK, theoretical mass 1104.55 Da). De novo sequencing was performed with MS/MS from these peptides to confirm that their fragmentation spectra matched the sequences (Figs. 7, 8).

Additional Putative Damaged Proteins

In addition to the striking modification of desmin, other spots were selected for study in myotilin disorders. As seen in Table 6, pyruvate kinase muscle splice form M1 was oxidized. Damage to these proteins was variable from 1 case to another, with no particular association with gender, course, or disease phenotype.

DISCUSSION

Oxidation of proteins in tissues, including striated muscle, is a normal process that triggers antioxidative defenses. Oxidative stress and responses are modified by age, gender, and regional variations (24–26). Focusing on muscular disorders, free radical toxicity has been implicated in the pathogenesis of a wide variety of disorders, including inclusion body myositis and myopathies (27, 28), mitochondrial myopathies (29), distal myopathies with rimmed vacuoles (30), and inflammatory myopathies (31). Increased protein carbonyl levels in muscles and increased protein oxidative damage have been described in Duchenne and other muscular dystrophies (32, 33). Free radical damage to DNA has also been observed in Duchenne and Becker muscular dystrophies (34). Levels of carboxymethyllysine-modified proteins are increased in inflammatory myopathies, and carboxymethyllysine immunoreactivity is found in degenerating and regenerating muscle fibers and in inflammatory cells (35). Reduction of nitric oxide in human and murine muscular dystrophies reduces nitric oxide-mediated protection against ischemia and increases cellular suscepti-

bility to metabolic stress (36, 37). Reduction of nitric oxide is associated with an abnormal distribution of nitric oxide synthases in affected muscles (38, 39) and with an increase in N-Tyr (40). Recent studies point to the synergistic interaction between mechanical and oxidative/nitrosative stresses of sarcolemmal damage in dystrophinopathies (41); however, there is no information available on the possible protein targets of oxidative stress in human myopathies.

The present observations have shown AGE and N-Tyr immunoreactive protein species in normal aged human muscle. Yet a marked increase of oxidative and nitrosative damage occurs in MFMs. A major target protein for oxidation and nitration is desmin in both myotilinopathies and desminopathies, as revealed by bidimensional gel electrophoresis, Western blotting, mass spectrometry, and protein identification.

Oxidized proteins are removed by the ubiquitin-proteasome system (42–44). However, previous studies have shown abnormal ubiquitin-proteasome systems in MFMs (14), as well as focal abnormal expression of mutant ubiquitin and p62 in damaged fibers in myotilinopathy (45). These observations suggest that degradation of proteins is undermined in MFMs, and, in addition to the production of abnormal proteins, there is a debilitated mechanism of protein degradation in MFMs. The presence of oxidized proteins such as desmin may have a further impact on the abnormal function of the ubiquitin-proteasome system in these disorders (16). Whether age and, more specifically, the oxidative shift in old age (46) may accelerate desmin oxidation in myotilinopathies is not known. However, this mechanism could facilitate our understanding of the neurologic deficits in older individuals, a typical feature of the neurologic phenotype in myotilinopathy.

The causes of oxidative stress leading to oxidative damage are not fully known in MFM, but several concomitant factors may contribute to the progression of oxidative and nitrosative injuries in MFMs. Mitochondrial dysfunctions involving low respiratory chain complex I activity have been described in MFMs (47). Increased numbers and abnormal distribution of mitochondria are also seen in some biopsies of patients with MFMs. Morphologic changes of mitochondria, abnormal localization and distribution, and abnormal respiratory function have been found in muscles of

desmin-null mice (48). The present results also suggest that oxidation of the mitochondrial enzyme pyruvate kinase is a putative component of impaired mitochondrial function, at least in some cases of myotilinopathy. Studies are needed, however, to examine more deeply the nature of altered mitochondria in MFMs.

Together, the present observations suggest that oxidative/nitrosative stress as an important pathogenic factor in MFM and that oxidative protein damage is a complementary element of myodegeneration in these disorders (49). These results further reveal that there is an accumulation of proteins in MFMs and that posttranslational modifications of key proteins and, more specifically, of desmin, occur in myotilinoopathies and desminopathies.

ACKNOWLEDGMENT

We thank T. Yohannan for editorial assistance.

REFERENCES

- Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA. Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:549–62
- De Bleecker JL, Engel AG, Ertl B. Myofibrillar myopathy with foci of desmin positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55:563–77
- Selcen D, Ohno K, Engel AG. Myofibrillar myopathy: Clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 2004;127:439–51
- Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, et al. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998;19:402–3
- Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, et al. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalised myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11312–17
- Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC. Desmin myopathy. *Brain* 2004;127:723–24
- Vicart P, Caron A, Guicheney P, et al. A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998;20:92–95
- Ferreiro A, Ceuterick-de Groote C, Marks JJ, et al. Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004;55:676–76
- Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004;62:1363–71
- Olivé M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D Ferrer I. Myotilinopathy: Refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* 2005;128:2315–26
- Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* 2005;57:269–76
- Vorgerd M, van der Ven PF, Bruchertseifer V, et al. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet* 2005;77:297–304
- Goebel HH, Muller HD. Protein aggregate myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:96–103
- Ferrer I, Martín B, Castañó JG, Lucas JJ, Moreno D, Olivé M. Proteasomal expression and activity, and induction of the immunoproteasome in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:484–88
- Ferrer I, Carmona M, Blanco R, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Olivé M. Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol* 2005;15:101–8
- Davies KJ. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* 2001;83:301–10
- Oh-Ishi M, Ueno T, Maeda T. Proteomic method detects oxidatively induced protein carbonyls in muscles of a diabetes model Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat. *Free Radic Biol Med* 2003;34:11–22
- Canton M, Neverova I, Menabò R, van Eyk J, di Lisa F. Evidence of myofibrillar protein oxidation induced by postischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H870–77
- Yamada T, Mishima T, Sakamoto M, Sugiyama M, Matsunaga S, Wada M. Oxidation of myosin heavy chain and reduction in force production in hyperthyroid rat soleus. *J Appl Physiol* 2006;100:1520–26
- Kanski J, Behring A, Pelling J, Schöneich C. Proteomic identification of 3-nitrotyrosine-containing rat cardiac proteins: Effects of biological aging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H371–81
- Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. *J Cell Mol Med* 2006;10:389–406
- Olivé M, Armstrong J, Miralles F, et al. Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene. *Neuromusc Disord* 2007;17:443–50
- Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pre-treatment in proteomics. *Anal Chem* 2003;75:663–70
- Yan L, Ge H, Li H, et al. Gender-specific proteomic alterations in glycolytic and mitochondrial pathways in aging monkey hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:921–29
- Stagsted J, Bendixen E, Andersen HJ. Identification of specific oxidatively modified proteins in chicken muscles using a combined immunologic and proteomic approach. *J Agric Food Chem* 2004;52:3967–74
- Piec I, Listrat A, Alliot J, Chambon C, Taylor RG, Bechet D. Differential proteome analysis of aging in rat skeletal muscle. *FASEB J* 2005;19:1143–45
- Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Askanas V. Increase of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in inclusion-body myositis. *Neuroreport* 1996;8:153–58
- Yang CC, Alvarez RB, Engel WK, Heller L, Askanas V. Nitric oxide-induced oxidative stress in autosomal recessive and dominant inclusion-body myopathies. *Brain* 1998;121:1089–97
- Esposito LA, Melov A, Panov A, Cottrell A, Wallance DC. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:4820–25
- Tateyama M, Takeda A, Onodera Y, et al. Oxidative stress and predominant A β 42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol* 2003;105:581–85
- Tews DS, Goebel HH. Cell death and oxidative damage in inflammatory myopathies. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:240–47
- Haycock JW, Mac Neil S, Jones P, Harris JB, Mantle D. Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport* 1996;8:357–61
- Rando TA. Oxidative stress and the pathogenesis of muscular dystrophies. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81:S175–86
- Rodriguez MC, Tarnapolsky MA. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2003;34:1217–20
- Haslbeck KM, Friess U, Schleicher ED, et al. The RAGE pathway in inflammatory myopathies and limb girdle muscular dystrophy. *Acta Neuropathol* 2005;110:247–54
- Rando TA. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: A two-hit hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech* 2001;55:223–35
- Kasai T, Abeyama K, Hashiguchi T, Fukunaga H, Osame M, Maruyama I. Decreased total nitric oxide production in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Biomed Sci* 2004;11:534–37
- Wells KE, Torelli S, Lu Q, et al. Relocalization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a marker for complete restoration of the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Neuromusc Dis* 2003;13:21–31
- Punkt K, Schering S, Löffler S, et al. Nitric oxide synthase is up-regulated in muscle fibers in muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348:259–64

40. Buchwalow IB, Minin EA, Müller F, et al. Nitric oxide synthase in muscular dystrophies: A re-evaluation. *Acta Neuropathol* 2006;111:579–88
41. Dudley RWR, Danialou G, Govindaraju K, Lands L, Eidelman DE, Petrof BJ. Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. *Am J Pathol* 2006;168:1276–87
42. Shringarpure R, Grune T, Davies KJ. Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1442–50
43. Poppek D, Grune T. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:173–84
44. Divald A, Powell SR. Proteasome mediates removal of proteins oxidized during myocardial ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006;40:156–64
45. Olivé M, van Leeuwen FW, Janué A, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Ferrer I. Expression of mutant ubiquitin (UBB^{T1}) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*. In press.
46. Drogue W. Redox regulation in anabolic and catabolic processes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:190–95
47. Reimann J, Kunz WS, Vielhaber S, Kappes-Horn K, Schröder R. Mitochondrial dysfunction in myofibrillar myopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003;29:45–51
48. Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function. *J Cell Biol* 2000;150:1283–97
49. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now? *J Neurochem* 2006;97:1634–58

Expression of mutant ubiquitin (UBB⁺¹) and p62 in myotilinopathies and desminopathies

M. Olivé*, F. W. van Leeuwen†, A. Janué*, D. Moreno*, B. Torrejón-Escribano‡ and I. Ferrer*§

*Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, §Universitat de Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ‡Serveis Científic-Tècnics, Unitat de Biologia de Bellvitge, UB, Spain; and †University of Maastricht, Department of Psychiatry and Neuropsychology, Division of Cellular Neuroscience, Maastricht, the Netherlands

M. Olivé, F. W. van Leeuwen, A. Janué, D. Moreno, B. Torrejón-Escribano and I. Ferrer (2008) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34, 76–87

Expression of mutant ubiquitin (UBB⁺¹) and p62 in myotilinopathies and desminopathies

Protein aggregates in muscle cells are the morphological hallmark of myofibrillar myopathies, including myotilinopathies and desminopathies. The aim of the present study is to analyse the expression of mutant ubiquitin (UBB⁺¹), an aberrant form of ubiquitin which accumulates in certain disorders characterized by intracellular aggregates of proteins, and p62, a multimeric signal protein which plays an active role in aggregate formation, in muscle biopsies from patients suffering from myotilinopathy and desminopathy in order to gain understanding of the mechanisms leading to protein aggregation in these disorders. Single immunohistochemistry, and single- and double-labelling immunofluorescence and confocal microscopy for UBB⁺¹ and p62, has been performed in muscle biopsies from patients suffering from myotilinopa-

thy and desminopathy. Strong UBB⁺¹ immunoreactivity, colocalizing with myotilin aggregates, was found in muscle fibres in myotilinopathies. UBB⁺¹ accumulation, colocalizing with desmin aggregates, also occurs in desminopathies. In addition, strong p62 immunoreactivity colocalizing with myotilin aggregates was observed in myotilinopathies. Similarly, p62 immunoreactivity colocalizing with desmin aggregates was found in desminopathies. The present findings suggest that accumulation of protein aggregates in myotilinopathies and in desminopathies may be related with UBB⁺¹/abnormal protein complexes which are resistant to proteasome degradation. Furthermore, these observations suggest a relationship between the presence of p62 and the formation of inclusions in different subtypes of myofibrillar myopathies.

Keywords: desminopathies, mutant ubiquitin, myofibrillar myopathies, myotilinopathies, p62, proteasome

Introduction

The term myofibrillar myopathy (MFM) refers to a group of familial or sporadic muscle disorders characterized morphologically by focal dissolution of myofibrils, accumulation of the products of myofibrillar degradation and ectopic expression of multiple proteins [1–3]. This heterogeneous entity includes subgroups of patients showing

mutations in desmin [4,5], α B-crystallin [6], selenoprotein N [7], myotilin [8,9], ZASP [10] and filamin C [11] genes.

A major morphological hallmark of MFM is the intracytoplasmic accumulation of proteins in insoluble aggregates in muscle cells. In addition to disease-specific mutant proteins (that is, desmin in desminopathies, α B-crystallin in α B-crystallinopathies, myotilin in myotilinopathies), protein aggregates in MFM are enriched by a wide range of proteins, including cytoskeletal and myofibrillar proteins, chaperones, phosphorylated tau and β -amyloid [2,3,9,12–14].

Correspondence: Dr Montse Olivé, Institut de Neuropatologia, IDIBELL-Hospital de Bellvitge, Feixa Llarga s/n, 08907 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel: +34 932607452; Fax: +34 93 2607503; E-mail: 25169mop@comb.es

The mechanisms leading to protein aggregation in MFM are poorly understood and, probably, multifactorial. It is known that misfolding of mutant proteins results in inappropriate exposure to their hydrophobic surfaces for protein–protein interactions, and this promotes aggregation [15,16]. Furthermore, abnormalities of the ubiquitin proteasome system (UPS), increased clusterin expression and aggresome expansion have been previously demonstrated to be associated with aggregate formation in MFM [13,14]. MFMs may be considered conformational diseases because of the accumulation of insoluble proteins in the affected cells. Several neurodegenerative disorders, including Alzheimer disease and other tauopathies (Pick disease), α -synucleinopathies (Parkinson and Lewy body diseases) and polyglutamine diseases (Huntington disease), as well as non-neuronal disorders such as alcoholic liver disease, inclusion body myositis and α 1-antitrypsin deficiency, are also characteristic conformational disorders [17,18].

A frequent event in some, but not all these diseases is ‘molecular misreading’, a phenomenon which designates acquired, non-DNA-encoded dinucleotide deletions occurring within messenger RNA, resulting in the production of potentially toxic mutant proteins. Molecular misreading of the ubiquitin-B (UBB) gene results in a dinucleotide deletion in UBB mRNA in the vicinity of GAGAG sequence motifs. Downstream from the deletion, the mutant RNAs are translated in the +1 reading frame, giving rise to a protein with an aberrant C-terminus; the deletion of the G residue results in loss of biological function of ubiquitin [19,20]. UBB⁺¹ accumulates in neurones with neurofibrillary tangles in Alzheimer disease and related tauopathies, as well as in intranuclear inclusions in Huntington disease, but not in Lewy bodies in α -synucleinopathies [18,21,22]. Interestingly, UBB⁺¹ occurs in neurones with neurofibrillary tangles but not in neurones with α -synuclein inclusions in cases with double tau and α -synuclein pathology [23].

Furthermore, UBB⁺¹ has been found in non-neuronal cells, including hepatocytes with Mallory bodies, and muscle fibres in inclusion body myositis [24–26]. It has been shown that UBB⁺¹ is unable to ubiquitinate [27], and that UBB⁺¹ is a ubiquitin-fusion degradation proteasome substrate [22]. Finally, ubiquitinated UBB⁺¹ inhibits the proteasome [22] possibly through the inability of deubiquitinating enzymes to deubiquitinate UBB⁺¹ sufficiently [28].

Sequestosome 1/p62 is a 62-kDa protein encoded by an immediate-early response gene activated by a variety of

extracellular signals which is involved in cell proliferation, differentiation and oxidative stress [29]. At its C-terminus, p62 possesses an ubiquitin-associated (UBA) domain that binds polyubiquitin chains, and which may regulate ubiquitin-mediated processes. p62 binds to proteasomal subunits through its N-terminal Phox and Bem1p (PB1) domain [29–31]. p62 binds specifically to protein aggregates or to misfolded and ubiquitinated proteins in several human diseases, including neuronal and glial ubiquitinated inclusions in Alzheimer disease, Pick disease, Parkinson disease, dementia with Lewy bodies and multiple system atrophy. Furthermore, p62 has been shown to be a major component of Mallory bodies [31–36].

The present study examines, by means of both single immunohistochemistry and single and double immunofluorescence and confocal microscopy, UBB⁺¹ and p62 immunoreactivity, and their relationship with protein aggregates in myofibrillar inclusions in myotilinopathies and desminopathies, in an attempt to gain understanding of the pathogenesis of protein aggregation in these disorders.

Patients and methods

Muscle biopsies

Muscle biopsies from 17 patients with light and electron microscopic features of MFM were included in the present study. Twelve patients had a mutation in the myotilin gene, whereas a mutation in the desmin gene was identified in the remaining five. In addition, muscle samples from six age-matched patients who were considered to be free of any neuromuscular disease after detailed clinicopathological studies were used as controls. A detailed description of the clinical, pathological and molecular studies of 15 cases has been reported elsewhere [9,37,38]. A summary of the patients included in the present study is provided in Table 1. For the present study, cryostat sections were stained with haematoxylin and eosin, modified Gomori trichrome and tioflavine T, and processed for myotilin, desmin, dystrophin, α B-crystallin and ubiquitin immunohistochemistry. Briefly, cryostat sections were incubated with 1% hydrogen peroxide and 10% methanol for 30 min at room temperature, followed by 5% normal serum for 2 h, and then incubated overnight with one of the primary antibodies. Mouse monoclonal antimyotilin (Novocastra, Newcastle, UK), antidesmin (Dako, Barcelona, Spain) and antidystrophin (Novocastra) antibodies,

Table 1. Summary of cases included in the present study

Patient	Age (years)/gender	Age at onset (years)	Site of muscle biopsy	Mutation
1	52/M	50	Lateral gastrocnemius	MYOT Ser55Phe
2	56/M	52	Soleus	MYOT Ser55Phe
3	70/M	58	Vastus lateralis	MYOT Ser60Cys
4	69/F	62	Deltoid	MYOT Ser60Cys
5	80/M	70	Deltoid	MYOT Ser60Phe
6	82/F	70	Vastus lateralis	MYOT Ser60Cys
7	73/F	69	Deltoid	MYOT Ser55Phe
8	80/F	77	Vastus lateralis	MYOT Lys36Glu
9	69/F	46	Deltoid	MYOT Ser55Phe
10	68/F	60	Lateral gastrocnemius	MYOT Ser60Cys
11	69/F	50	Vastus lateralis	MYOT Ser 60Cys
12	65/F	60	Lateral gastrocnemius	MYOT Ser60Cys
13	27/F	15	Biceps brachii	DES Arg406Trp
14	24/M	14	Deltoid	DES Arg406Trp
15	49/F	25	Lateral gastrocnemius	DES Pro419Ser
16	46/F	25	Biceps brachii	DES Leu392 Pro
17	27/M	25	Lateral gastrocnemius	DES Ile367Phe
18	25/F		Biceps brachii	
19	75/M		Deltoid	
20	64/M		Deltoid	
21	65/F		Vastus lateralis	
22	80/M		Vastus lateralis	
23	58/F		Lateral gastrocnemius	

F, female; M, male.

and rabbit polyclonal anti- α B-crystallin (Novocastra) and ubiquitin (Dako) antibodies, were used at dilutions of 1:150, 1:20, 1:20, 1:500 and 1:100, respectively. After washing, the sections were processed with the streptavidin-biotin Super Sensitive™ IHC detection system (BioGenex, The Hague, The Netherlands). The peroxidase reaction was visualized with diaminobenzidine and H₂O₂ in PBS.

UBB⁺¹ and p62 immunohistochemistry

UBB⁺¹ immunohistochemistry was also carried out following the streptavidin-biotin Super Sensitive™ IHC detection system using three different well-characterized rabbit polyclonal antibodies raised against different parts of UBB⁺¹ [19,20] – Ubi2A, Ubi 1+1 and Ubi 2+1 – all of them at a dilution of 1:1000. To test the staining specificity, consecutive sections were incubated with the secondary anti-mouse or anti-rabbit IgG without the primary antibody. In addition, some sections were incubated with pre-absorbed sera with the homologous antigens [19].

p62 immunoreactivity was examined using two different guinea pig polyclonal antibodies (Progen, Heidelberg, Germany). The antibodies were directed to the C-terminus

or to the N-terminus, and both were used at a dilution of 1:100.

Single- and double-labelling immunofluorescence analysis, and confocal microscopy

Cryostat sections were stained with a saturated solution of Sudan black B (Merck, Darmstadt, Germany) for 30 min to block autofluorescence of lipofuscin granules, rinsed in 70% ethanol and washed in distilled water. Sections were incubated at 4°C overnight with goat anti-UBB⁺¹ antibody (Ubi2A) at a dilution of 1:1000 and mouse monoclonal antimyotilin antibody (Novocastra) at a dilution of 1:200 in PBS. In addition, some samples were incubated with anti-p62 (C-terminus) diluted 1:100 as the first antibody, and antidesmin at a dilution of 1:15, or antimyotilin at a dilution of 1:150 as the second antibody. Secondary antibodies were Alexa488 anti-mouse or anti-rabbit and Alexa546 anti-mouse or anti-rabbit (all from Molecular Probes, Leyden, The Netherlands), used at a dilution of 1:400. After washing with PBS, the sections were incubated in a cocktail of secondary antibodies in the same vehicle solution for 3 h at room temperature. After

washing in PBS, the sections were mounted in immunofluorescence mounting medium (ICN Biomedicals, Illkirch, France), sealed and dried overnight. Sections were examined under a Leica TCS-SL confocal microscope (Barcelona, Spain). Sections incubated with the secondary antibodies only were used as controls. In addition, some sections were incubated with pre-absorbed sera with the homologous antigens [19].

Results

General aspects

Myotilinopathies Muscle biopsies in myotilinopathy were characterized by the presence of anywhere from a few to a large number of hyaline polymorphic inclusions of

varying shape and size. These inclusions stained bright pink with haematoxylin and eosin, and blue-red or red-purple with the modified trichrome Gomori stain. Cytoplasmic bodies and collections of dense spheroid bodies were observed in the majority of cases. Large numbers of rimmed and unrimmed vacuoles were found in every case. Hyaline inclusions and, particularly, spheroid bodies showed strong Thioflavin T positivity. Immunohistochemical studies showed strong myotilin, desmin, dystrophin and ubiquitin expression in the abnormal fibres in every case (Figure 1A–F).

Desminopathies Muscle biopsies in patients with desminopathy showed the presence of non-hyaline inclusions, which were best identified with modified Gomori trichrome as patches of blue-red or dark-blue material, located under the sarcolemma or in the cytoplasm.

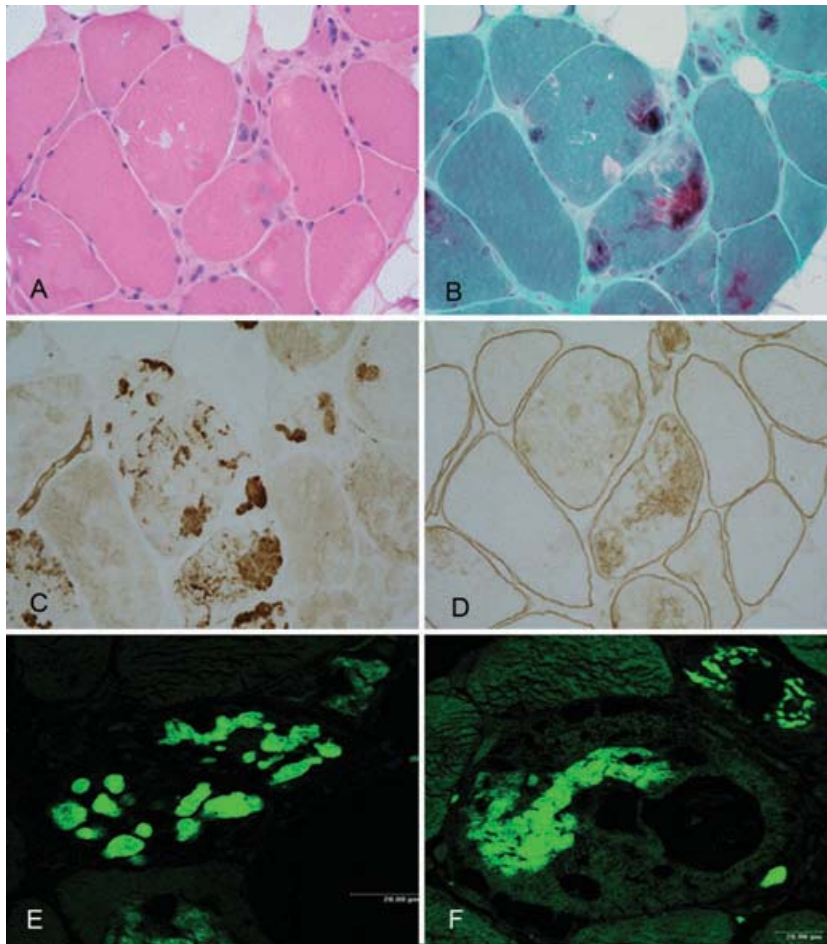


Figure 1. Muscle pathology in myotilinopathy showing several muscle fibres containing inclusions on haematoxylin and eosin (A), modified Gomori stains (B) displaying strong myotilin (C), dystrophin (D) immunoreactivity and Thioflavin T positivity (E,F). A–C $\times 200$; E and F $\times 400$.

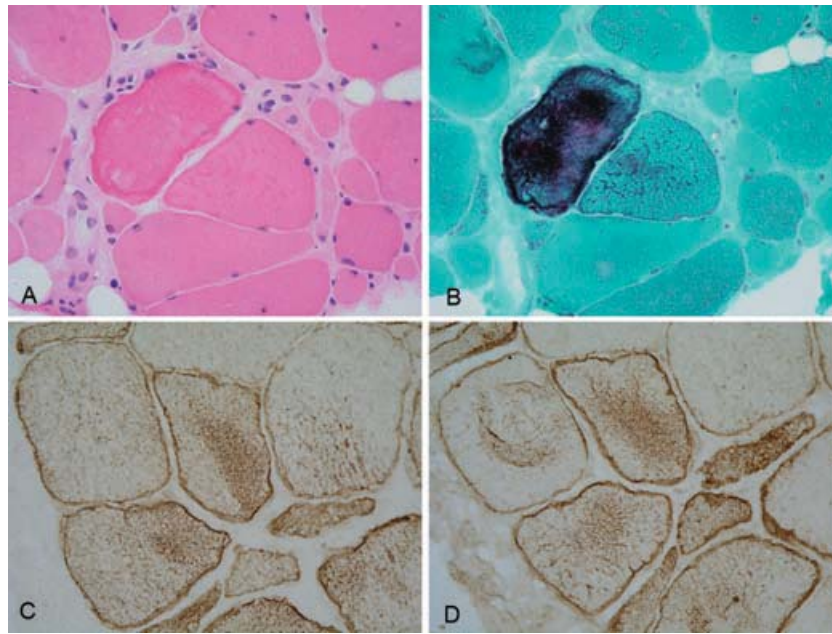


Figure 2. Muscle pathology in desminopathy showing two muscle fibres containing myofibrillar inclusions on haematoxylin and eosin (A) and modified Gomori stain (B). These inclusions are desmin (C) and α B-crystallin (D) immunoreactive $\times 400$.

Hyaline inclusions were only observed in a very small percentage (1–3%) of fibres. Cytoplasmic bodies were occasionally seen. Some rimmed vacuoles were observed in every case. No Thioflavin T-positive material was observed. Immunohistochemistry revealed strong desmin, α B-crystallin and dystrophin immunoreactivity in abnormal fibres, whereas myotilin and ubiquitin were weakly expressed (Figure 2A–D).

UBB⁺ and p62 immunohistochemistry

Controls UBB⁺ immunoreactivity was not observed in muscle fibres in control samples. Similarly, no p62 immunoreactivity was seen in any of the muscle biopsies from control cases.

Myotilinopathies Strong UBB⁺ immunoreactivity was observed in all the abnormal fibres in every case, although the number and size of UBB⁺ aggregates varied from one case to another. Yet, all the hyaline lesions and, particularly, the spheroid bodies, displayed strong UBB⁺ immunoreactivity (Figure 3C, upper panel). UBB⁺ seemed to colocalize with myotilin in abnormal muscle fibres as suggested in serial consecutive sections.

p62 (C-terminal and N-terminal) immunoreactivity decorating the myofibrillar inclusions was observed in every case. All muscle fibres containing myotilin aggregates displayed p62 immunoreactivity (Figure 3A,B, upper panel), which, in turn, colocalized with myotilin as seen in serial consecutive sections. Similar patterns were seen with the two anti-p62 antibodies. Finally, UBB⁺ immunoreactivity decorated the same lesions as those recognized with anti-p62 antibodies (Figure 3A–C, upper panel).

Desminopathies Faint to moderate UBB⁺ immunoreactivity was observed in muscle fibres containing desmin aggregates in desminopathies (Figure 3F, lower panel). The number of fibres containing UBB⁺, as well as the intensity of the immunoreaction, varied from one case to another, although UBB⁺ immunoreactivity was particularly strong in the few fibres (1–3%) which contained small inclusion bodies.

p62 (C-terminal and N-terminal) immunoreactivity was also observed in muscle fibres containing myofibrillar inclusions (Figure 3D,E). p62 largely colocalized with desmin, as seen in serial consecutive sections immunostained with desmin and p62.

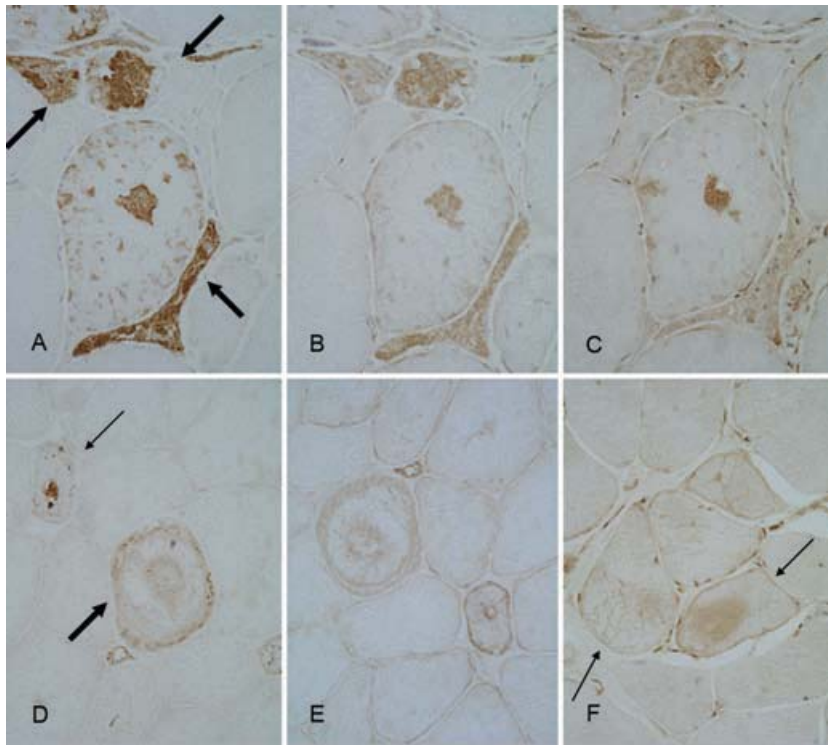


Figure 3. p62 and UBB⁺¹ immunoreactivity in myotilinopathies and desminopathies. Upper panel: myofibrillar inclusions in myotilinopathy located in the centre of one large fibre (thin arrow in A), and in several atrophic fibres (thick arrows in A) showing strong p62 C-terminal (A), p62 N-terminal (B) and UBB⁺¹ immunoreactivity (C). Lower panel: p62 C-terminal (D) and p62 N-terminal (E) immunoreactivity is seen in the centre of one fibre (thin arrow in D), or in the subsarcolemma area (thick arrow in D) in desminopathy. Non-serial section showing UBB⁺¹ immunoreactivity in the centre of two fibres (arrows) (F) ×400.

Double-labelling immunofluorescence analysis and confocal microscopy

Myotilinopathies UBB⁺¹ deposition in myotilinopathies was observed as multiple positive irregular aggregates or as numerous small confluent rod-like structures in abnormal muscle fibres (Figure 4A,D). Spheroid bodies were strongly immunostained with the anti-UBB⁺¹ antibodies at their periphery, whereas a lack of immunoreaction was observed in the central parts (Figure 5A). Complete or partial colocalization of UBB⁺¹ and myotilin was observed in selected fibres, as revealed in double-labelled sections stained for UBB⁺¹ and myotilin (Figures 4C,F and 5C).

Double-labelling immunofluorescence to p62 and myotilin revealed colocalization in all abnormal fibres examined (Figure 6A–I).

Desminopathies UBB⁺¹ deposition largely colocalized with desmin and myotilin as revealed in serial sections immunostained with UBB⁺¹. As for myotilinopathies, cytoplas-

mic bodies, which were observed in a few fibres in desminopathies, displayed strong UBB⁺¹ immunoreactivity (Figure 5D–F).

Strong p62 C-terminal deposition was observed as immunofluorescent patches located under the sarcolemma or in the cytoplasmic space. p62 largely colocalized with desmin (Figure 7A–C).

Discussion

Myotilinopathies and desminopathies are subgroups of MFM caused by mutations in the myotilin and desmin genes, respectively. Myotilinopathy usually presents as a late-onset distal myopathy and has a relatively mild progression [8,9]. By contrast, desminopathy is a much more disabling condition most often presenting in adolescents or in young adults with distal muscle weakness associated with a cardiopathy in a high proportion of cases [37–39]. Although myofibrillar inclusions containing protein aggregates are constantly found in both

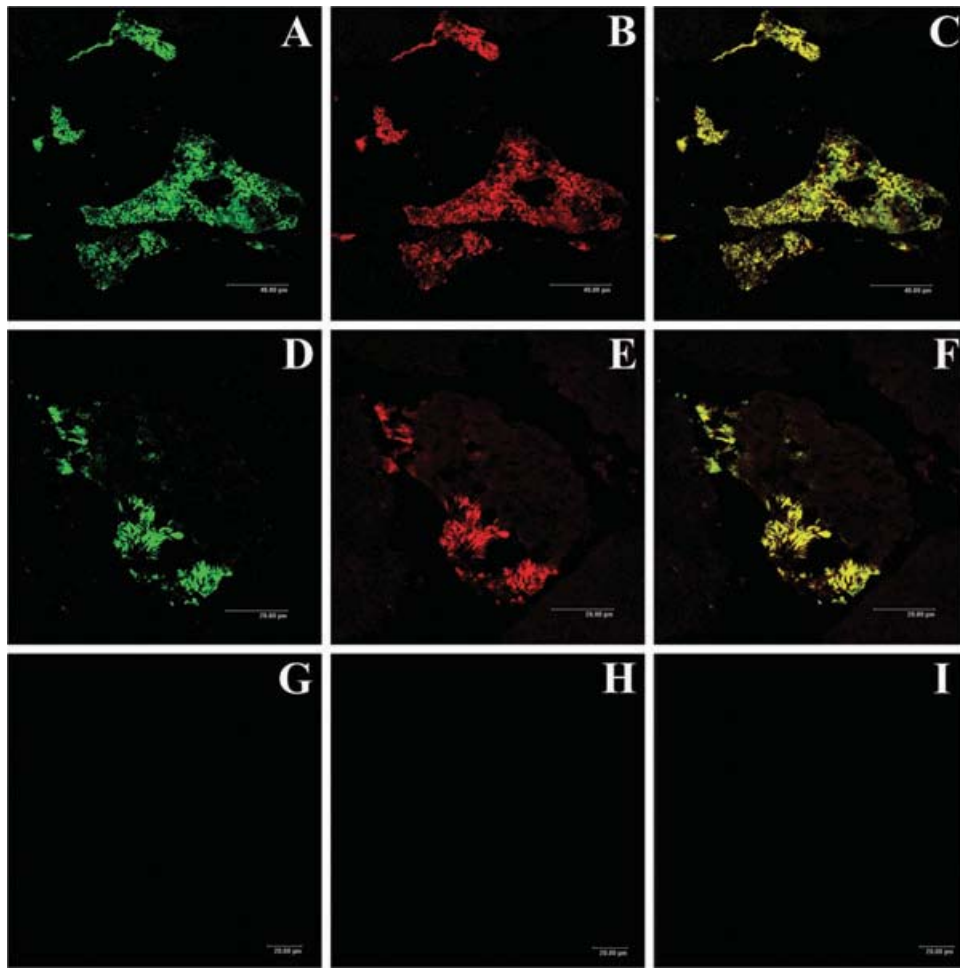


Figure 4. Double-labelling immunofluorescence to UBB⁺¹ (2A antibody) (green, A and D) and myotilin (red, B and E) in abnormal muscle fibres in myotilinopathy. Note colocalization of UBB⁺¹ and myotilin (merge yellow, C and F). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control.

disorders, some differences exist regarding the type of inclusions. While the inclusions found in myotilinopathies typically contain dense hyaline structures, muscle fibres in desminopathies most often show the presence of cytoplasmic or subsarcolemmal patches of non-hyaline structures. Moreover, inclusion bodies are commonly found in myotilinopathies but rarely seen in desminopathies [8,9,37–39].

Cells tend to avoid accumulation of misfolded or potentially toxic proteins by degrading them through the UPS [40]. In this line, previous studies in MFM and inclusion body myositis have shown abnormal expression of several proteasome subunits accompanied by preserved or even increased proteolytic activity *in vitro* [13]. Moreover, studies in heart muscle from a transgenic mouse

model of desminopathy have demonstrated over-expression of the 20S subunit and down-regulation of the 19S subunit of the proteasome together with increased proteolytic activity [41]. Together, these observations strongly suggest that abnormalities of the UPS in MFM are not the result of defective proteolytic activity *per se*, but rather they probably respond to a failure in the entry of ubiquitinated proteins into the 20S proteasome. UBB⁺¹ is an aberrant form of ubiquitin generated by a dinucleotide deletion at the level of the UBB mRNA. This mutant protein has a truncated C-terminal end and lacks the capacity to ubiquitinate other protein substrates [19,22]. The accumulation of UBB⁺¹ is considered a specific marker of proteasomal dysfunction in certain neurodegenerative disorders, such as Alzheimer disease,

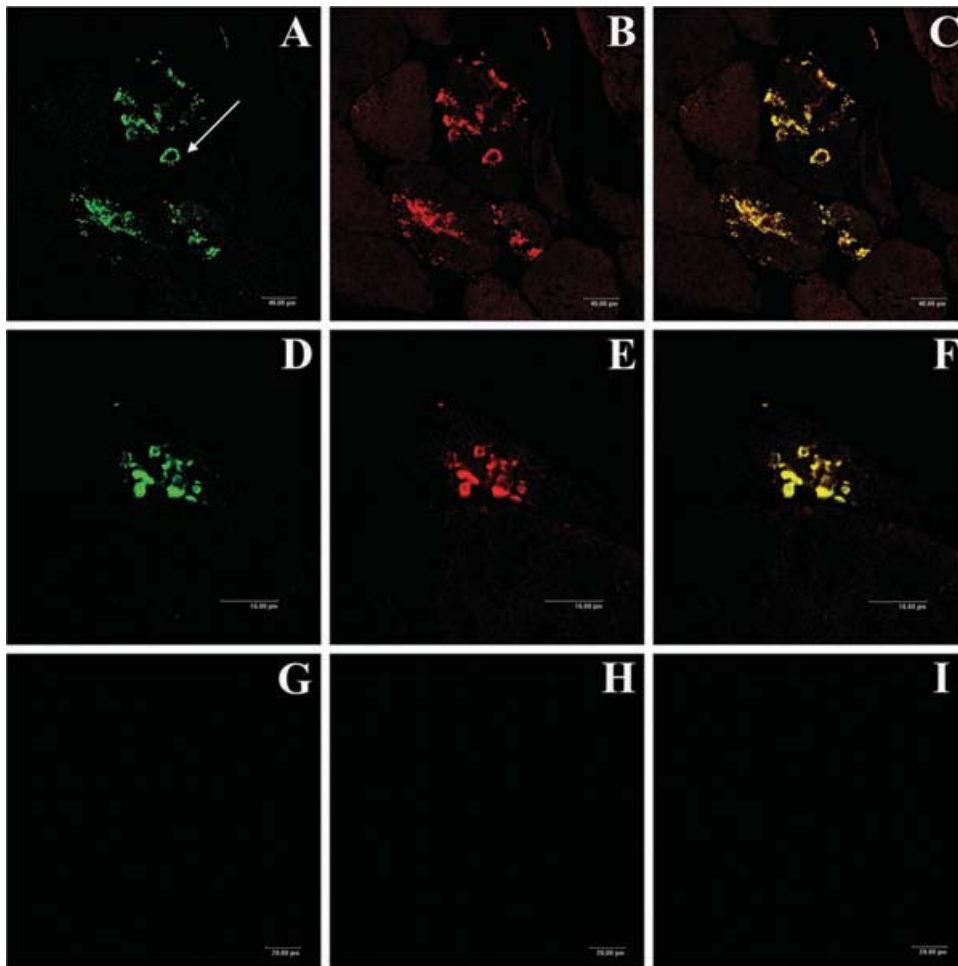


Figure 5. Double-labelling immunofluorescence to UBB⁺¹ (2A antibody) (green, A and D) and myotilin (red, B and E) in abnormal muscle fibres containing inclusion bodies in myotilinopathy (A–C) and in desminopathy (D–F). Spheroid bodies are immunostained at their periphery (arrow in A). Note colocalization of UBB⁺¹ and myotilin (merge yellow, C and F). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control.

Down syndrome and other tauopathies [20]. In the present study, strong UBB⁺¹ immunoreactivity was found colocalizing with protein aggregates in muscle fibres in myotilinopathies and desminopathies. These findings may explain, at least in part, the accumulation of abnormal proteins in these disorders.

p62 is a multimeric signal protein, which, besides playing a role in signal transduction, participates actively in the formation of protein aggregates by recruiting poly-ubiquitinated proteins through its UBA domain [29–31]. Studies of neurofibrillary tangles and Lewy bodies in human cases, and of Mallory bodies in a mouse model of toxic hepatic failure, indicate that p62 is incorporated at

the early stages of their formation, thus suggesting that p62 plays a major role in the process of aggregate formation [33–36]. Furthermore, p62 has been found to be induced in response to proteasomal inhibition in neuronal cells [42].

It has been proposed that p62 expression may contribute to a protective mechanism against misfolded proteins by promoting aggregation and sequestration of abnormal proteins as inert but reversible inclusions bodies [31,36]. In the present study, strong p62 colocalizing myotilin was observed in myofibrillar inclusions in myotilinopathies. p62 was also found in muscle fibres containing desmin inclusions in desminopathies.

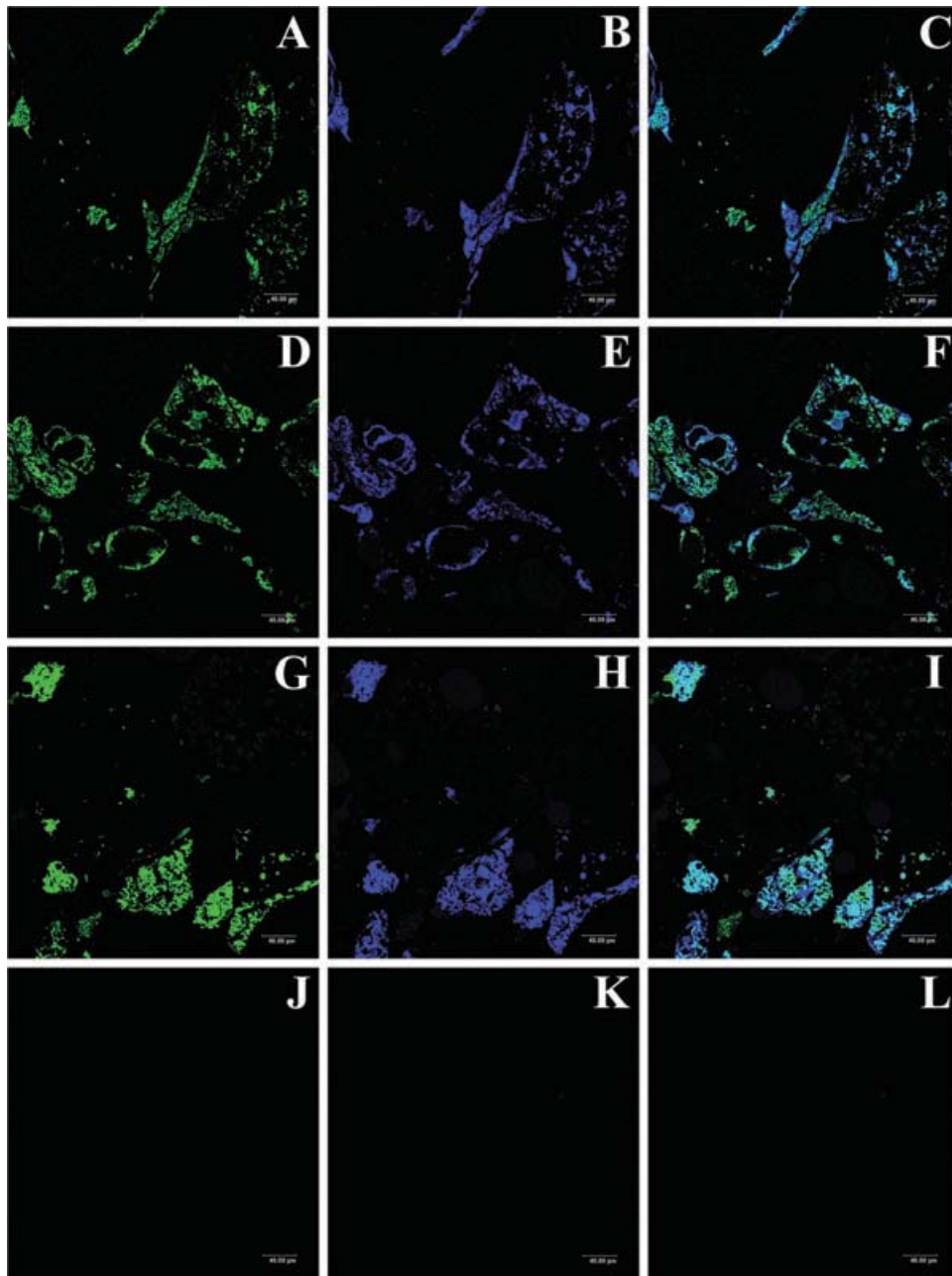


Figure 6. Double-labelling immunofluorescence to myotilin (green, A, D and G) and p62 C-terminal (blue, B, E and H) in muscle fibres containing protein aggregates in myotilinopathy. Note colocalization of myotilin and p62 (merge C, F and I). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control.

However, the intensity of p62 immunoreaction was stronger in myotilinopathies, which may be related to the different degree of compactation of myofibrillary inclusions in both disorders, as well as with the less common formation of inclusion bodies in desminopathies.

In summary, we have identified UBB⁺ and p62 as novel constituents of protein aggregates in myotilinopathies

and desminopathies. The presence of UBB⁺ in muscle fibres supports the hypothesis that dysfunction of the UPS participates in the pathogenesis of MFM. In contrast, the presence of p62 in myofibrillar inclusions in myotilinopathies and in desminopathies may reflect a protective response against cytoplasmic accumulation of noxious proteins.

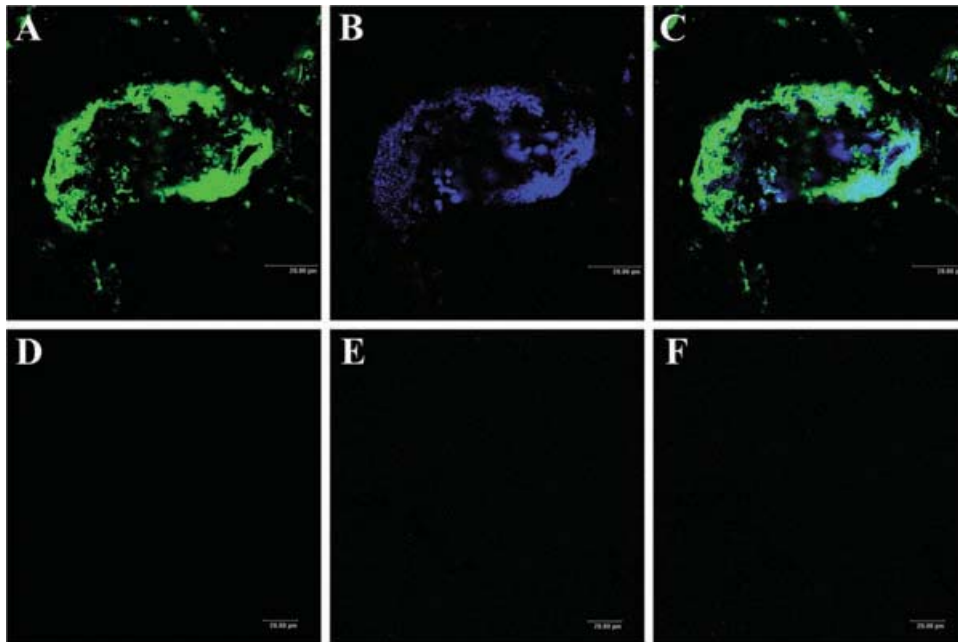


Figure 7. Double-labelling immunofluorescence to desmin (green, A) and p62 C-terminal (blue, B) in a muscle fibre containing protein aggregates in desminopathy. Note colocalization of myotilin and p62 (merge C). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control.

Acknowledgements

This work was funded by grants from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (PI05/1213 and PI05/1570). We wish to thank T. Yohannan for editorial assistance.

References

- 1 Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA. Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 549–62
- 2 De Blecker JL, Engel AG, Ertl B. Myofibrillar myopathy with foci of desmin positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 563–77
- 3 Selcen D, Ohno K, Engel AG. Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 2004; **127**: 439–51
- 4 Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998; **19**: 402–3
- 5 Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Fernandez-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalised myopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11312–17
- 6 Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998; **20**: 92–5
- 7 Ferreira A, Ceuterick-de Groote C, Marks JJ, Goemans N, Schreiber G, Hanefeld F, Fardeau M, Martin JJ, Goebel HH, Richard P, Guicheney P, Bonnemann CG. Desmin-related myopathy with Mallory body-like inclusions is caused by mutations of the selenoprotein N gene. *Ann Neurol* 2004; **55**: 676–86
- 8 Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004; **62**: 1363–71
- 9 Olive M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D, Ferrer I. Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* 2005; **128**: 2315–26
- 10 Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* 2005; **57**: 269–76
- 11 Vorgerd M, van der Ven PF, Bruchertseifer V, Lowe T, Kley RA, Schroder R, Lochmuller H, Himmel M, Koehler K, Furst DO, Huebner A. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet* 2005; **77**: 297–304

- 12 Goebel HH, Muller HD. Protein aggregate myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 2006; **13**: 96–103
- 13 Ferrer I, Martín B, Castaño JG, Lucas JJ, Moreno D, Olive M. Proteasomal expression and activity, and induction of the immunoproteasome in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; **63**: 484–98
- 14 Ferrer I, Carmona M, Blanco R, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Olivé M. Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol* 2005; **15**: 101–8
- 15 Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative disease. *Neuron* 2001; **29**: 15–32
- 16 Ellis RJ, Pinheiro TJT. Danger – misfolded proteins. *Nature* 2002; **416**: 483–4
- 17 Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997; **350**: 134–8
- 18 de Pril R, Fischer DF, van Leeuwen FW. Conformational diseases: an umbrella for various neurological disorders with an impaired ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Aging* 2006; **27**: 515–23
- 19 van Leeuwen FW, de Kleijn DP, van den Hurk HH, Neubauer A, Sonnemans MA, Sluijs JA, Koycu S, Ramdjielal RD, Salehi A, Martens GJ, Grosveld FG, Peter J, Burbach H, Hol EM. Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science* 1998; **279**: 242–7
- 20 Fischer DF, De Vos RA, Van Dijk R, De Vrij FM, Proper EA, Sonnemans MA, Verhage MC, Sluijs JA, Hobo B, Zouambia M, Steur EN, Kamphorst W, Hol EM, Van Leeuwen FW. Disease-specific accumulation of mutant ubiquitin as a marker for proteasomal dysfunction in the brain. *FASEB J* 2003; **17**: 2014–24
- 21 de Pril R, Fischer DF, Maat-Schieman ML, Hobo B, De Vos RA, Brunt ER, Hol EM, Roos RA, van Leeuwen FW. Accumulation of aberrant ubiquitin induces aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases. *Hum Mol Genet* 2004; **13**: 1803–13
- 22 Lindsten K, de Vrij FM, Verhoef LG, Fischer DF, van Leeuwen FW, Hol EM, Masucci MG, Dantuma NP. Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation. *J Cell Biol* 2002; **157**: 417–27
- 23 Terni B, Rey MJ, Boluda S, Torrejón-Escribano B, Pujol Sabate M, Calopa M, van Leeuwen FW, Ferrer I. Markers for tauopathies and synucleinopathies coexist differentially in the hallmarks of MSA patients with an intermingled pathology. *Acta Neuropathol* 2007; **113**: 403–16
- 24 French BA, van Leeuwen F, Riley NE, Yuan QX, Bardag-Gorce F, Gaal K, Lue YH, Marceau N, French SW. Aggresome formation in liver cells in response to different toxic mechanisms: role of the ubiquitin-proteasome pathway and the frameshift mutant of ubiquitin. *Exp Mol Pathol* 2001; **71**: 241–6
- 25 McPhaul LW, Wang J, Hol EM, Sonnemans MA, Riley N, Nguyen V, Yuan QX, Lue YH, Van Leeuwen FW, French SW. Molecular misreading of the ubiquitin B gene and hepatic Mallory body formation. *Gastroenterology* 2002; **122**: 1878–85
- 26 Fratta P, Engel WK, Van Leeuwen FW, Hol EM, Vattemi G, Askanas V. Mutant ubiquitin UBB⁺ is accumulated in sporadic inclusion-body myositis muscle fibers. *Neurology* 2004; **63**: 1114–17
- 27 De Vrij FM, Sluijs JA, Gregori L, Fischer DF, Hermens WT, Goldgaber D, Verhaagen J, Van Leeuwen FW, Hol EM. Mutant ubiquitin expressed in Alzheimer's disease causes neuronal death. *FASEB J* 2001; **15**: 2680–8
- 28 Lam YA, Pickart CM, Alban A, Landon M, Jamieson C, Ramage R, Mayer RJ, Layfield R. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **29**: 9902–6
- 29 Geetha T, Wooten MW. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS Lett* 2002; **512**: 19–24
- 30 Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 8055–68
- 31 Paine MG, Babu JR, Seibenhener ML, Wooten MW. Evidence for p62 aggregate formation: role in cell survival. *FEBS Lett* 2005; **579**: 5029–34
- 32 Zatloukal K, Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Schnoelzer M, Kenner L, Kleinert R, Prinz M, Aguzzi A, Denk H. p62 is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases. *Am J Pathol* 2002; **160**: 255–63
- 33 Kuusisto E, Salminen A, Alafuzoff I. Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation. *Neuropath Appl Neurobiol* 2002; **28**: 228–37
- 34 Kuusisto E, Parkkinen L, Alafuzoff I. Morphogenesis of Lewy bodies: dissimilar incorporation of α -synuclein, ubiquitin and p62. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; **62**: 1241–53
- 35 Kuusisto E, Salminen A, Alafuzoff I. Ubiquitin-binding protein p62 is present in neuronal and glial inclusions in human tauopathies and synucleinopathies. *Neuroreport* 2001; **12**: 2085–90
- 36 Stumptner C, Fuchsichler A, Heid H, Zatloukal K, Denk H. Mallory body: a disease-associated type of sequestosome. *Hepatology* 2002; **35**: 1053–62
- 37 Dagvadorj A, Olive M, Urtizberea JA, Halle M, Shatunov A, Bonnemann C, Park KY, Goebel HH, Ferrer I, Vicart P, Dalakas MC, Goldfarb L. A series of West European patients with severe cardiac and skeletal myopathy associated with a de novo R406W mutation in desmin. *J Neurol* 2004; **251**: 143–9
- 38 Kaminska A, Strelkov SV, Goudeau B, Olive M, Dagvadorj A, Fizdianska A, Simon-Castreras M, Shatunov A,

- Dalakas MC, Ferrer I, Kwiecinski H, Vicart P, Goldfarb LG. Small deletions disturb desmin architecture leading to breakdown of muscle cells and development of skeletal or cardioskeletal myopathy. *Hum Genet* 2004; **114**: 306–13
- 39 Goldfarb L, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC. Desmin myopathy. *Brain* 2004; **127**: 723–34
- 40 Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 2000; **10**: 524–30
- 41 Liu J, Chen Q, Huang W, Horak KM, Zheng H, Mestrlil R, Wang X. Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *FASEB J* 2006; **20**: 362–4
- 42 Kuusisto E, Suuronen T, Salminen A. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis and proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **12**: 223–8

Received 15 February 2007

Accepted after revision 25 February 2007

ORIGINAL ARTICLE

TAR DNA-Binding Protein 43 Accumulation in Protein Aggregate Myopathies

Montse Olivé, MD, Anna Janué, Biol, Dolores Moreno, Tech, Josep Gámez, MD,
Benjamín Torrejón-Escribano, Biol, and Isidre Ferrer, MD

Abstract

Protein aggregate myopathies, including myofibrillar myopathies and sporadic inclusion body myositis (sIBM), are characterized by abnormal protein aggregates composed of various muscular and ectopic proteins. Previous studies have shown the crucial role of dysregulated transcription factors such as neuron-restrictive silencer factor in the expression of aberrant proteins in myotilinopathies. Here, we assessed possible aberrant expression of TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), another factor involved in transcription regulation. TDP-43-immunoreactive intracytoplasmic inclusions were seen in all cases examined of myotilinopathy, desminopathy, and sIBM, and in 1 case of inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal degeneration (IBMPFD). TAR DNA-binding protein 43 colocalized with myotilin and valosin in myotilinopathies and IBMPFD, respectively, but only occasionally colocalized with ubiquitin in myotilinopathies, desminopathies, sIBM, and IBMPFD; this indicates that accumulated TDP-43 is largely not ubiquitinated. Moreover, phosphorylated TDP-43 at Ser403/404 and Ser409/410 accumulated in the cytoplasm of vulnerable fibers but did not always colocalize with nonphosphorylated TDP-43. Cytoplasmic deposition was accompanied by decreased TDP-43 localization in the nuclei of affected fibers. These findings indicate that TDP-43 not only is another protein accumulated in myofibrillar myopathies, sIBM, and IBMPFD but also likely has a role through altered microRNA processing in the abnormal protein production, modification, and accumulation in protein aggregate myopathies.

Key Words: Desminopathy, Inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal dementia, Myotilinopathy, Sporadic inclusion body myositis, TDP-43, Valosin.

From the Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge (MO, AJ, DM, IF), Universitat de Barcelona, Centro de Investigación en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), 08907 Hospitalet de Llobregat; Neurology Department (JG), Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona; Serveis Científics i Tècnics de la Universitat de Barcelona (BTE), Campus de Bellvitge, Hospitalet de Llobregat, Spain.

Send correspondence and reprint requests to: Prof. Isidre Ferrer, MD, Institut Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, carrer Feixa Llarga sn 08907 Hospitalet de Llobregat, Spain; E-mail: 8082ifa@gmail.com

This study was supported by an FIS grant PI080574.

INTRODUCTION

Intracellular accumulation of proteins is characteristic of several diverse human disorders. Protein aggregation has been recognized for a long time as a major morphologic hallmark of many neurodegenerative disorders (1–4) and is now also considered an important pathogenetic factor in a growing group of muscle disorders collectively termed “protein aggregate myopathies” (PAM) (5, 6). Myofibrillar myopathies (MFMs), the largest group of PAMs, are a group of heterogeneous muscle disorders having as a common feature the presence of focal dissolution of the myofibrils and ectopic expression of multiple proteins (7–10). Among MFMs, myotilinopathies and desminopathies are 2 genetically distinct subgroups caused by mutations in *MYOT* and *DES* genes, respectively (12–14). Protein aggregates in MFMs are composed of a wide variety of proteins (7–10). Some of them, such as desmin, myotilin, and dystrophin, are normal constituents of the myofibrils, but many proteins not specific to muscle are aberrantly expressed in muscle fibers as well. These include phosphorylated tau, ubiquitin, β -amyloid, and diverse neuronal proteins such as synaptophysin, SNAP25, α -internexin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (7–10, 15). Sporadic inclusion body myositis (sIBM) represents the nongenetic counterpart of protein aggregate myopathies, and it is characterized by the presence of ubiquitinated inclusion bodies containing β -amyloid, α -synuclein, apolipoprotein E, and phosphorylated tau among others (16, 17).

Recent studies have shown the crucial role of certain transcription factors in the pathogenesis of MFMs. Target genes of neuron-restrictive silencer factor are abnormally up-regulated in human myotilinopathy due to the reduced levels of neuron-restrictive silencer factor, a transcription factor expressed in nonneuronal tissues that represses the expression of several neuronal genes. As a consequence, synaptophysin, SNAP25, α -internexin, and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 are aberrantly produced and accumulated in protein aggregates in myotilinopathies (15).

Another potentially interesting transcription factor in the pathogenesis of PAMs and of MFMs in particular is TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43), a 414-amino acid nuclear protein encoded by the *TARDBP* gene on chromosome 1. The gene was first cloned from a genomic screen for cellular factors that bind to the TAR DNA of human immunodeficiency virus type 1, and it was later identified as part of a complex

involved in the splicing of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene (18–20). TAR DNA-binding protein 43 is highly conserved and widely expressed in several tissues, including brain and muscle. It contains 2 RNA recognition motifs and a glycine-rich C-terminal sequence that is required for exon skipping and splicing inhibitory activity. The C-terminal domain binds to several ribonucleoproteins involved in the biogenesis of mRNA. Although the biologic functions of TDP-43 are not fully known, it has a role in exon skipping, transcription regulation, and other biologic processes through its binding to DNA, RNA, and/or proteins (18–21).

Recent studies have identified TDP-43 as the major protein forming insoluble aggregates in neurons and glial cells in most patients with frontotemporal lobar degeneration with ubiquitin inclusions (FTLD-U) with and without motor neuron disease, as well as in sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) not caused by mutations in *SOD1* gene (22–25). Among the heterogeneous group of FTLD-U, up to 40% of cases show a familial pattern of inheritance and mutations in progranulin, and valosin-containing protein (VCP) have been recently described (26–29).

Mutations in the *VCP* gene, on chromosome 9p13.3-p12, cause hereditary inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD), a rare autosomal dominant disorder with a high variable expressivity of clinical symptoms (28–32). Ubiquitin-positive inclusions in brains in IBMPFD contain TDP-43 (32). TAR DNA-binding protein 43 accumulation has also been described in muscle fibers in IBMPFD (33). Abnormal TDP-43 in muscle fibers in IBMPFD seems not to be related to VCP mutations because TDP-43-immunoreactive cytoplasmic inclusions also occur in sIBM (33).

The aim of the present study was to analyze the expression of TDP-43 in muscle disorders characterized by the presence of protein aggregates in muscle cells. Muscle biopsies from patients who have myotilinopathy, desminopathy, sIBM, and IBMPFD, as well as samples from patients who have denervation atrophy showing target lesions, were examined with single and double labeling immunofluorescence and confocal microscopy and Western blotting to demonstrate possible modifications in the localization, distribution, and expression levels of TDP-43 in muscle cells. TAR DNA-binding protein 43, desmin, and myotilin gene expression was performed to investigate whether increased protein levels result from upregulation of the respective genes.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Muscle Biopsies

Muscle biopsies from 9 patients with MFM (5 myotilinoopathies and 4 desminopathies), 5 patients with sIBM, and 1 patient with IBMPFD were studied. Muscle samples from 5 cases of denervation atrophy that showed target lesions and 5 age-matched healthy controls were processed in parallel. Table 1 summarizes the clinical characteristics of the patients. The patients with myotilinopathy were 3 men and 2 women aged 49 to 81 years (mean, 65.8 years); they had the following *MYOT* mutations: Ser55Phe, Ser60Cys, Ser60Phe, and

TABLE 1. Summary of Cases

Patient	Age (years)/Sex	Diagnosis
1	52/M	Myotilinopathy (Ser60Cys)
2	49/M	Myotilinopathy (ser55Phe)
3	78/M	Myotilinopathy (Ser60Phe)
4	81/F	Myotilinopathy (Lys36Glu)
5	69/F	Myotilinopathy (Ser60Cys)
6	41/F	Desminopathy (Pro419Ser)
7	55/F	Desminopathy (Leu 392Pro)
8	28/M	Desminopathy (Ile367Phe)
9	22/M	Desminopathy (Arg406Trp)
10	61/M	IBM
11	61/F	IBM
12	62/M	IBM
13	66/M	IBM
14	58/F	IBM
15	57/M	IBMPFD (Arg159His)
16	76/M	Denervation atrophy
17	32/F	Denervation atrophy
18	56/M	Denervation atrophy
19	65/M	Denervation atrophy
20	67/F	Denervation atrophy
21	57/M	Control
22	63/M	Control
23	43/F	Control
24	30/M	Control
25	70/M	Control

F, female; IBM, inclusion body myositis; IBMPFD, inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal degeneration; M, male.

Lys36Glu. There were 2 female and 2 male desminopathy patients aged 22 to 55 years (mean, 36.5 years) with the following *DES* mutations: Pro419Ser, Leu392Pro, Ile367Phe, and Arg406Trp. Detailed clinical, pathologic, and genetic characterization of most of these patients has been described elsewhere (12, 34). There were 3 male and 2 female patients with sIBM aged 58 to 66 years (mean, 61.5 years). The diagnosis was established on the basis of well-established clinical and histopathologic criteria (17). The patient with IBMPFD was a 57-year-old man with proximal and distal muscle weakness in 4 limbs and scapular winging from the age of 49 years. He had no clinical, laboratory, or radiologic evidence of Paget disease of bone and had no cognitive symptoms. Sequencing analysis of *VCP* gene identified a R159H mutation. The patient's father had progressive muscle weakness starting at approximately 60 years and had died 5 years later of a heart attack. No other members of the family were known to be affected by muscle weakness, dementia, or Paget disease of bone.

In all cases, muscle biopsies were obtained for diagnostic purposes after informed consent and according to the guidelines of the Ethics Committee of the Hospital Universitari de Bellvitge. All samples had previously been examined by routine histochemical and electron microscopy techniques and by immunocytochemical analysis. Fresh frozen and mounted frozen samples were kept at -80°C until used.

Unfixed cryostat sections 6 μm thick were stained with hematoxylin and eosin and modified trichrome stain and processed for immunohistochemistry with the streptavidin-biotin Super Sensitive TM IHC detection system (BioGenex, San Ramon, CA), as previously described (35). Antibodies to myotilin (Novocastra, Servicios Hospitalarios, Barcelona, Spain), desmin (Dako, Barcelona, Spain), ubiquitin (Dako), and valosin (Affinity Bioreagents, Bionova Cientifica, Madrid, Spain) were used at dilutions of 1:100, 1:20, 1:100, and 1:1000, respectively (Table 2).

TDP-43 Immunofluorescence

TAR DNA-binding protein 43 was examined using 2 different antibodies: a mouse monoclonal antibody (Abnova, Tebu-Bio, Barcelona, Spain; H00023435-M01) raised against a full-length recombinant human TARDBP, used at a dilution of 1:1000, and a rabbit polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK; ab54502) raised against a synthetic peptide corresponding to C terminal (aa 350-414) of human TARDBP, used at a dilution of 1:2000. Phospho-TDP-43 was studied using 2 different antibodies: a mouse monoclonal antibody directed to CMDSKS(p)S(p)GWGM,S(p), Ser409/410, used at a dilution of 1:5000, and a rabbit polyclonal antibody raised against NGGFGS(p)S(p)MDSKC,S(p), Se403/404, used at a dilution of 1:2500 (both from Cosmo Bio, Ltd., Koto-ku, Japan) (Table 2). The secondary antibodies Alexa 488 and Alexa 455 (Molecular Probes, Invitrogen, Madrid, Spain) were used at a dilution of 1:400. Sections were mounted with Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Barcelona, Spain), sealed, and dried overnight at 4°C.

Double Labeling Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Cryostat sections 8 μm thick were blocked for 30 minutes at room temperature with 10% fetal bovine serum diluted in 1 × PBS to avoid nonspecific binding. Sections were incubated overnight at 4°C with different combinations of 2 primary antibodies as follows: 1) mouse monoclonal anti-myotilin antibody or mouse monoclonal anti-desmin antibody was used as the first primary antibody and rabbit polyclonal anti-TDP-43 antibody as a second primary antibody; 2) rabbit polyclonal anti-ubiquitin antibody and mouse monoclonal anti-TDP-43 antibody. In samples of sIBM and IBMPFD, the following combinations were made: 1) mouse monoclonal

anti-TDP-43 antibody and goat polyclonal anti-valosin antibody; 2) mouse monoclonal anti-TDP-43 antibody and rabbit polyclonal anti-ubiquitin antibody; 3) rabbit polyclonal anti-ubiquitin antibody and mouse monoclonal anti-TDP-43 antibody. After washing with PBS, the sections were incubated in a cocktail of secondary antibodies in the same vehicle solution for 3 hours at room temperature. The secondary antibodies were Alexa 488 and Alexa 546 anti-mouse or anti-rabbit (Molecular Probes) at a dilution of 1:400. Double labeling immunofluorescence was also performed using anti-TDP-43 (Abnova and Abcam) and anti-phospho-TDP-43 (Cosmo Bio) antibodies using a parallel combination of rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies and vice versa. Subsequently, the nuclei were stained using To-pro-3-iodide (Molecular Probes) at a dilution of 1:1000 for 20 minutes at room temperature. Sections were mounted with Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation), sealed, and dried overnight at 4°C. Sections were examined with a Leica TCS-SL confocal microscope. To rule out nonspecific reactions, some sections were incubated only with the secondary antibodies.

Gel Electrophoresis and Western Blotting

Samples from MFM, sIBM, IBMPFD, and control patients were processed for Western blot analysis using 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Briefly, extracted muscle proteins were transferred to nitrocellulose membrane in a Semi-Dry Transfer System (Bio-Rad, Madrid, Spain). The corresponding membranes were blocked and incubated with the mouse monoclonal anti-TDP-43 antibody (Abnova) at a dilution of 1:1000. Subsequently, the membranes were washed and then incubated with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako). The protein bands were detected by enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The myosin band of 205 kDa stained with Coomassie Brilliant Blue R (Sigma, Madrid, Spain) in the posttransfer gel was used as control of protein loading. Densitometric quantification of Western blot bands was performed with Total Lab v2.01 software, and the data obtained were analyzed using Statgraphics Plus v5.1 software. Statistical analysis was performed with the Student *t*-test.

mRNA Isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was purified from frozen muscle biopsies using the RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen, Las

TABLE 2. Antibodies Used in the Present Study

Antigen	Antibody	Species	Source	Dilution (IH;IF)	Dilution (WB)
Myotilin	Monoclonal	Mouse	Novocastra	1:100	—
Desmin	Monoclonal	Mouse	Dako	1:15	—
TDP-43 C terminal	Polyclonal	Rabbit	Abcam (ab54502)	1/2000	—
TDP-43	Monoclonal	Mouse	Abnova, (H00023435-M01)	1/1000	1/1000
Phospho-TDP-43 (ps409/410)	Monoclonal	Mouse	Cosmo Bio	1/5000	—
Phospho-TDP-43 (ps403/404)	Polyclonal	Rabbit	Cosmo Bio	1/2500	—
Valosin	Monoclonal	Mouse	Affinity Bioreagents MA3-004	1/1000	—
Ubiquitin	Polyclonal	Rabbit	Dako Z-458	1/100	—

IF, immunofluorescence; IH, immunohistochemistry; TDP-43, TAR DNA-binding protein 43; WB, Western blotting.

Matas, Madrid, Spain) following the instructions of the supplier. RNA integrity was assessed by using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Las Rozas, Spain). Then, total RNA of each sample was reverse-transcribed to a single-stranded cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Parallel reactions lacking MultiScribe Reverse Transcriptase were run as negative controls.

TaqMan MGB Probes and Endogenous Controls

TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) using specific primers and probes designed to detect TDP-43 (Hs00606522_m1) were performed. TAR DNA-binding protein 43 probe was located between the exon 3 and 4 boundary of the NM_007375.3 transcript and pro-

duced an amplicon of 130 bp. Two TaqMan endogenous controls were used to normalize TDP-43 expression levels: human β -glucuronidase (GUS; 4333767) and human β -2-microglobulin (B2M; 4333766).

TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction

TaqMan polymerase chain reaction (PCR) assays for TDP-43 (and desmin and myotilin in MFMs) were performed in duplicate on cDNA samples in a MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate sealed with MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). Each 20- μ l PCR reaction was prepared with 9 μ l of cDNA (diluted 1/10 in MFMs and 1/5 in IBMs, which corresponded to approximately 20 ng of input RNA in both cases) mixed with 1 μ l of 20 \times TaqMan Gene Expression Assay Mix and 10 μ l of 2 \times TaqMan Universal PCR Master

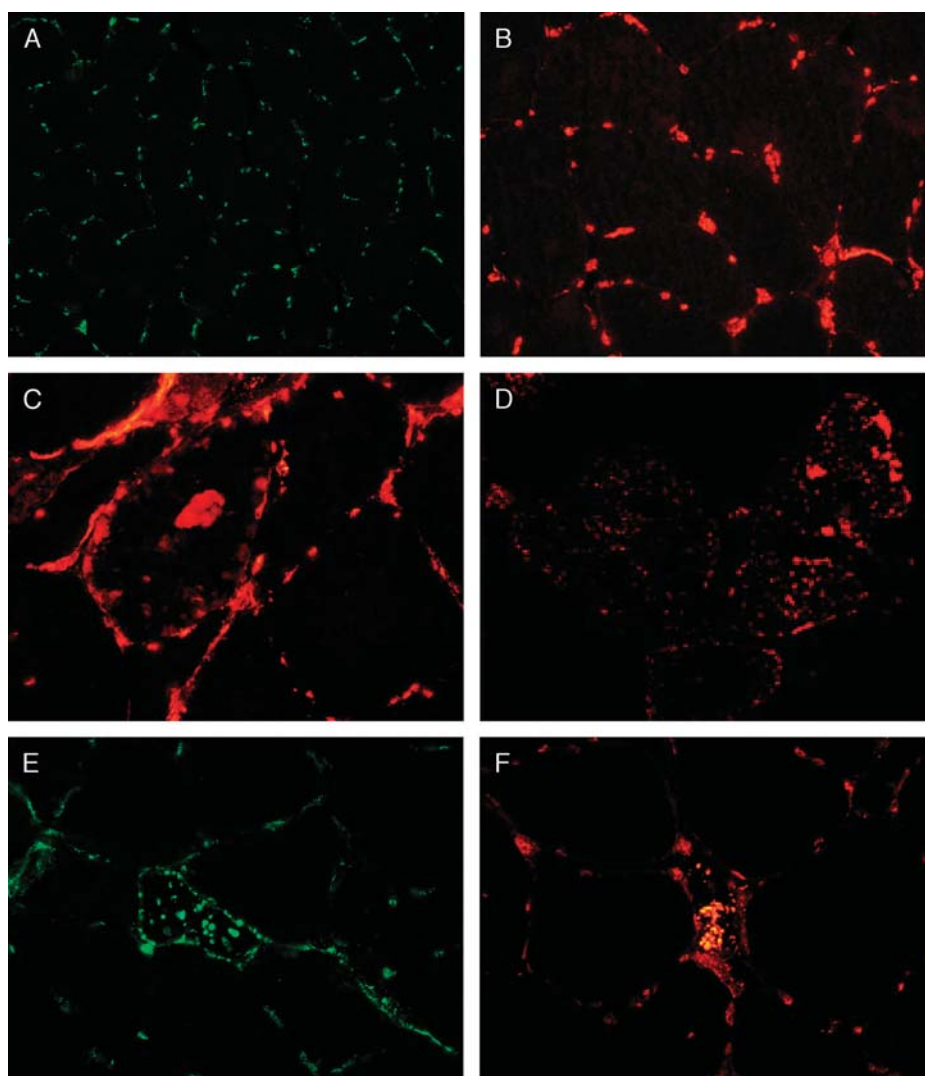


FIGURE 1. TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) immunofluorescence using the rabbit polyclonal antibody against the C-terminus of TDP-43 (**A, C, E**) and the mouse monoclonal antibody recognizing full-length recombinant human TDP-43 (**B, D, F**) in normal muscle (**A, B**), myotilinopathy (**C**), desminopathy (**D**), sporadic inclusion body myositis (sIBM) (**E**), and inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal degeneration (IBMPFD) (**F**). TAR DNA-binding protein 43 in normal muscle is restricted to the nuclei, whereas intracytoplasmic accumulation of TDP-43 is seen in myotilinopathy, sIBM, and IBMPFD, and in desminopathy to a lesser degree. Original magnification: (**A**) 100 \times ; (**B, D-F**) 200 \times ; (**C**) 400 \times .

Mix (Applied Biosystems), as indicated by the manufacturer. Parallel reactions of all samples were performed in duplicate using GUS and 2BM endogenous control assays for data normalization. Standard curves for each probe used in the study were obtained with serial dilutions of a muscle control sample. The thermal cycler parameters were set up for 2 minutes at 50°C (UNG activation), then 10 minutes at 95°C (enzyme activation), followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds (denaturation) and 1 minute at 60°C (annealing/extension). The fluorescent PCR product was measured with an ABI PRISM 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems), and the emerging data were captured with the Sequence Detector Software (SDS, 1.9; Applied Biosystems).

Data Processing and Statistical Analysis

ΔC_t values for each sample were promediated, and their equivalent amount of RNA were interpolated from the standards curves. These values were normalized, and acquired data were analyzed using Statgraphics Plus v5.1

software. Differences among control and pathologic samples were analyzed with ANOVA, followed by LSD post-hoc test.

RESULTS

TDP-43 Immunostaining in Normal and Diseased Muscle

In control muscles, TDP-43 immunofluorescence was restricted to the nuclei of muscle cells; cytoplasmic immunostaining was absent. Similar results were observed using the 2 different anti-TDP-43 antibodies (Fig. 1A, B).

In contrast, marked TDP-43 accumulation in the form of single, multiple, or diffuse deposits was seen in the cytoplasm of several muscle fibers in myotilinopathy (Fig. 1C). Muscle fibers from desminopathy cases also showed TDP-43-positive inclusions in the cytoplasm. TAR DNA-binding protein 43 accumulation in desminopathies was, however, usually less prominent than in myotilinopathies (Fig. 1D). TAR DNA-binding protein 43 immunostaining was also observed in the cytoplasm of several muscle fibers in all sIBM cases (Fig. 1E)

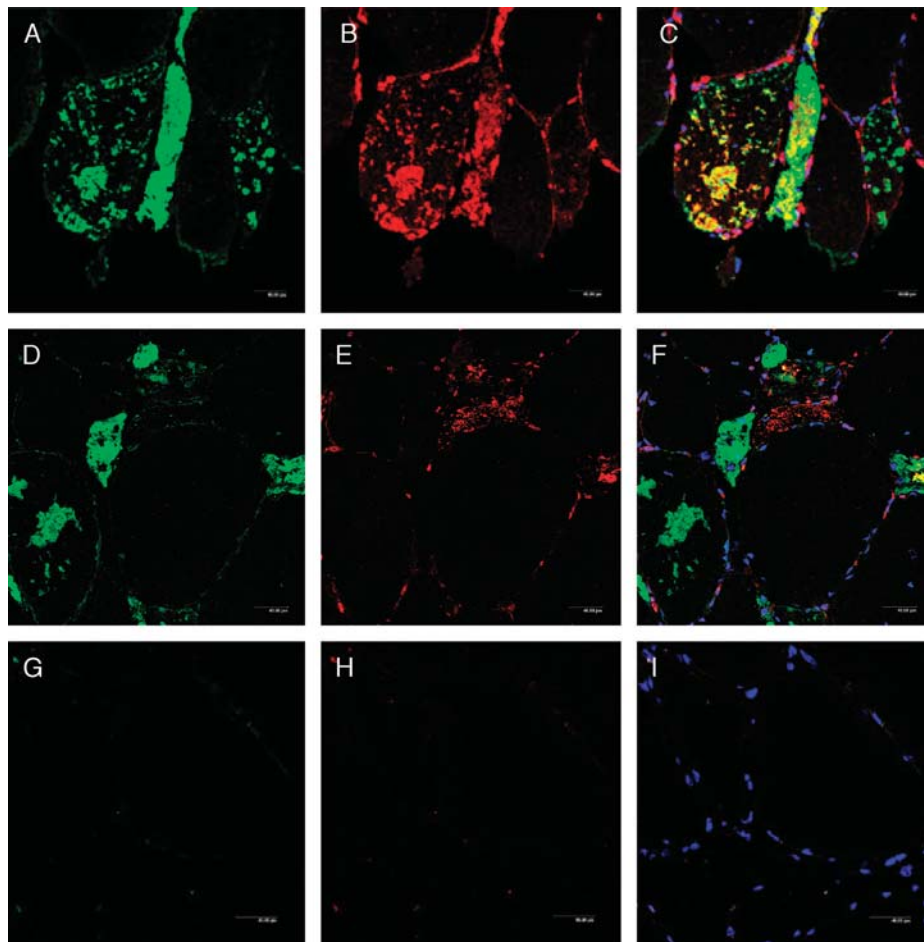


FIGURE 2. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to myotilin (green, **A**) and TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43; red, **B**); and ubiquitin (green, **D**) and TDP-43 (red, **E**) in myotilinopathy. Partial colocalization of myotilin and TDP-43 (merge, yellow, **C**) is seen in some inclusions. Ubiquitin and TDP-43 colocalization is much less common (merge, yellow, **F**). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**G-I**). Nuclei are visualized with To-pro-3-iodide (blue). Note decreased or absent TDP-43 immunoreactivity in the nuclei of fibers containing abnormal TDP-43 aggregates.

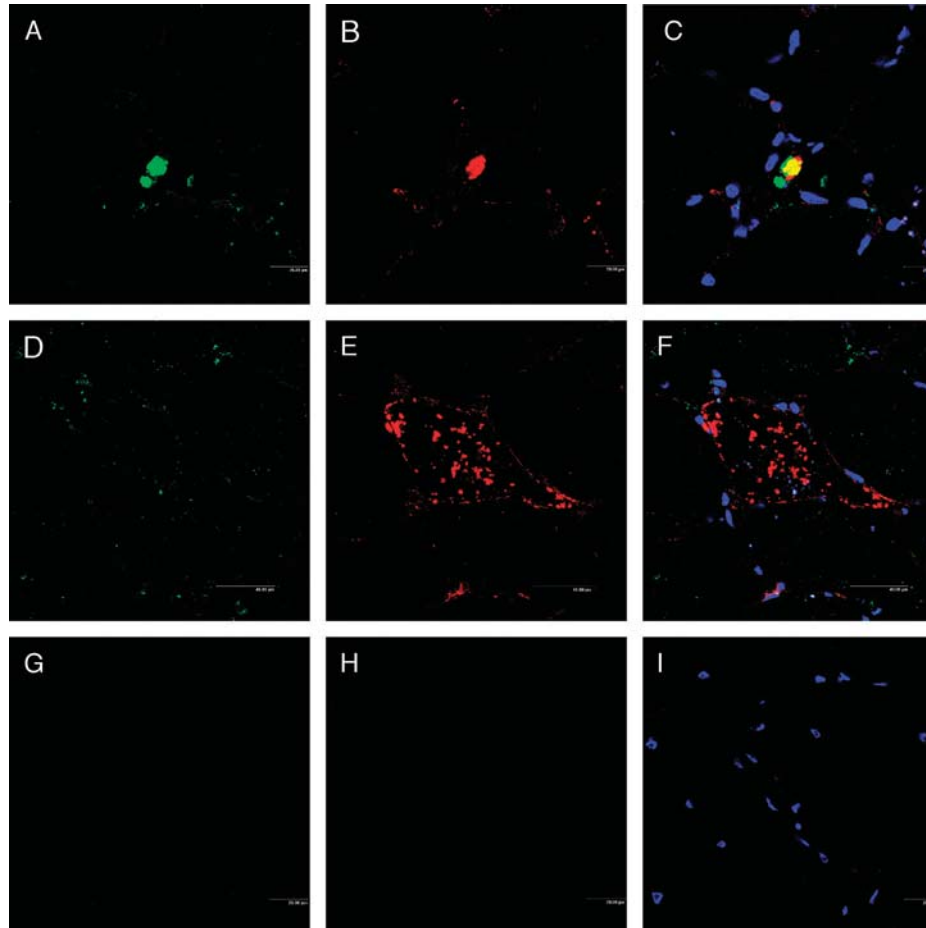


FIGURE 3. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to ubiquitin (green, **A, D**) and TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43; red, **B, E**) in myotilinopathy. Partial colocalization of ubiquitin and TDP-43 (merge, yellow, **C**) occurs in some fibers. Some round inclusions (small green dot in **A**) are not stained with TDP-43 antibodies (see **B** for comparison), whereas some TDP-43 granular cytoplasmic deposits (**E**) are barely stained with anti-ubiquitin antibodies (**D**), resulting in very little colocalization (merge, yellow **F**). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**G–I**). Nuclei are visualized with To-pro-3-iodide (blue). Note decreased or absent TDP-43 immunoreactivity in the nuclei of fibers containing abnormal TDP-43 aggregates.

and in the biopsy of the patient who had IBMPFD (Fig. 1F). TAR DNA-binding protein 43–positive deposits occurred as single or several rounded well-defined intracytoplasmic inclusion bodies or as small multiple granular intracytoplasmic aggregates. Both types of inclusions occurred equally in sIBM and IBMPFD. Nuclear TDP-43 immunostaining was also reduced in damaged fibers in sIBM and IBMPFD.

No TDP-43 staining was seen in target lesions in samples from cases with denervation-reinnervation (data not shown). As in control cases, TDP-43 immunostaining in denervated fibers was restricted to the nuclei.

Double Labeling Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Double labeling immunofluorescence in myotilinopathies showed that TDP-43 largely colocalized with myotilin (Fig. 2A–C), but TDP-43 colocalized less frequently with ubiquitin (Fig. 2D–F); only a few abnormal fibers were immunostained equally with anti-ubiquitin and anti-TDP-43 antibodies. Similarly, TDP-43 did not colocalize with desmin

or with ubiquitin in most desminopathy cases (data not shown).

In sIBM samples, TDP-43 immunofluorescence colocalized with ubiquitin in many, but not all, round intracytoplasmic inclusions (Fig. 3A–C), but much more rarely in TDP-43–immunoreactive small granular aggregates (Fig. 3D–F). TAR DNA-binding protein 43 largely colocalized with valosin in cytoplasmic inclusion bodies in IBMPFD (Fig. 4A–C) but not in small aggregates (Fig. 4D–F).

TAR DNA-binding protein 43 immunoreactivity was decreased or absent in the nuclei of fibers containing abnormal TDP-43–immunoreactive aggregates, as revealed by TDP-43 and To-pro-3-iodide staining (Figs. 2–4).

Phosphorylated TDP-43

In control muscle fibers, antibodies against phospho-TDP-43 were negative in both cytoplasm and nuclei. In contrast, antibodies to phospho-TDP-43 showed deposition in the cytoplasm of vulnerable fibers in myotilinopathy, desminopathy, sIBM, and IBMPFD. Similar deposits were observed

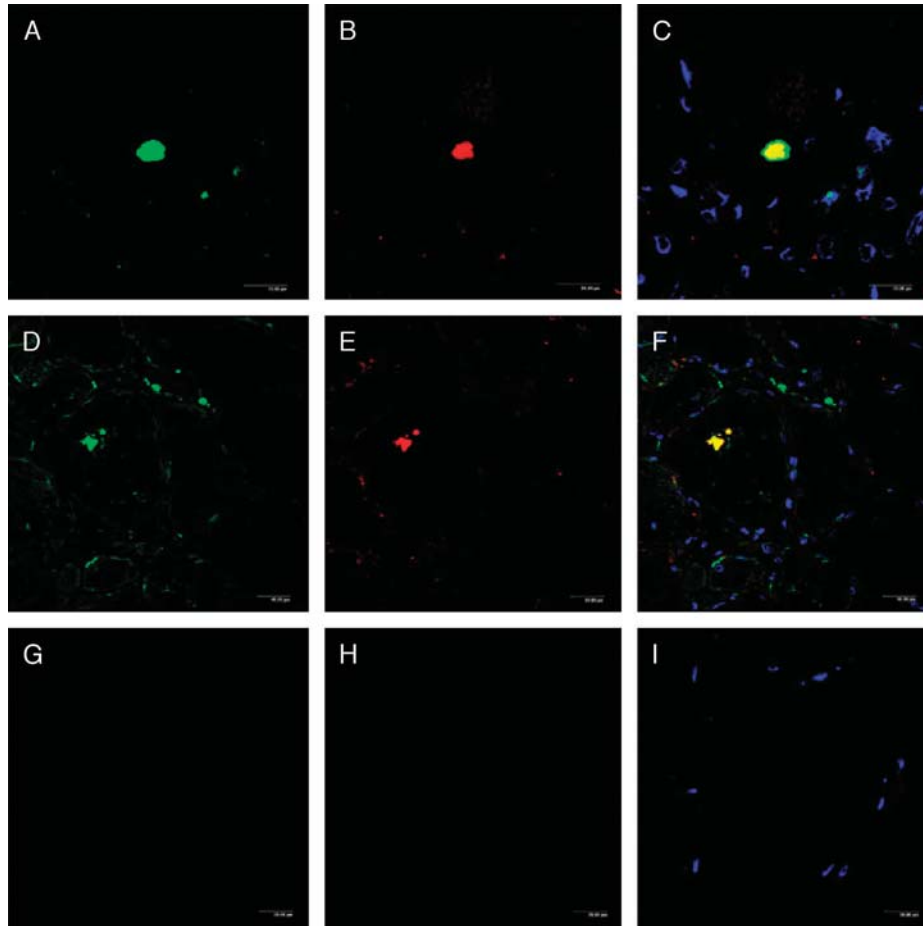


FIGURE 4. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43; green, **A**) and valosin (red, **B**) show colocalization in inclusion cytoplasmic bodies in inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal degeneration (IBMPFD; merge yellow, **C**). However, ubiquitin (green, **D**) only occasionally colocalizes with TDP-43 (red, **E**) in small granular inclusions (yellow merge, **F**). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**G–I**). Nuclei are visualized with To-pro-3-iodide (blue). Note the absence of TDP-43 immunoreactivity in the nuclei of fibers containing abnormal TDP-43 aggregates.

using the monoclonal and the polyclonal antibodies. The amount of aberrant deposition varied among cases (data not shown). To characterize phospho-TDP-43 deposition further, double labeling immunofluorescence and confocal microscopy disclosed partial colocalization of phospho-TDP-43 and TDP-43 in myotilinopathy and desminopathy (Fig. 5). Not all TDP-43-positive deposits were stained with anti-phospho-TDP-43 antibodies, and not all phospho-TDP-43-positive inclusions were recognized by anti-TDP-43 antibodies.

Similarly, double labeling immunofluorescence in sIBM (Fig. 6A–C) and IBMPFD (Fig. 6D–I) showed partial colocalization of phospho-TDP-43 and TDP-43 in abnormal protein inclusions. This was particularly clear in fibers with diffuse precipitates (Fig. 6G–I), whereas dense inclusions in IBMPFD were stained with anti-TDP-43 and phospho-TDP-43 antibodies equally (Fig. 6D–F).

Western Blotting

Western blots for TDP-43 revealed a band of approximately 43 kDa in myotilinopathies, desminopathies, sIBM,

and control cases. The density of this band was significantly higher in myotilinopathies, desminopathies, and sIBM than in control samples ($p < 0.01$; Student *t*-test; Fig. 7A). Additional bands of lower molecular weight were observed in both pathologic and control cases (data not shown).

TDP-43 mRNA Expression Levels

GUS and B2M were appropriate endogenous controls to be used for normalization (averaged ΔC_t value less than ± 0.5). No differences in TDP-43 mRNA expression levels were found in MFM and sIBM when compared with controls (Fig. 7B).

DISCUSSION

This study demonstrates prominent cytoplasmic accumulation of TDP-43 in damaged muscle fibers in myotilinopathy. TAR DNA-binding protein 43 colocalizes with myotilin and ubiquitin in some fibers but not in others; some fibers contain myotilin aggregates without accompanying TDP-43. Similarly, not all ubiquitinated inclusions colocalized with TDP-43, and, conversely, TDP-43 aggregates were

found in some fibers with no ubiquitin deposition. Similar results were obtained in desminopathy, although cytoplasmic TDP-43-immunoreactive deposition was less prominent in desminopathy than in myotilinopathy. In contrast to normal fibers in which TDP-43 immunoreactivity localized in nuclei, reduced or absent TDP-43 immunoreactivity occurred in the nuclei of damaged fibers with TDP-43-immunoreactive cytoplasmic inclusions in MFMs.

While this article was in preparation, Wehl et al (33) reported TDP-43 accumulation in the sarcoplasm of affected muscles in IBMPFD and in sIBM. Muscle fibers in sIBM

showed small cytoplasmic TDP-43 aggregates, whereas muscle biopsies from IBMPFD patients showed large peripherally located TDP-43-positive inclusions, suggesting a distinct pattern of TDP-43 immunostaining in sIBM compared with IBMPFD. Our results confirm that TDP-43 is a component of the inclusions in sIBM and IBMPFD. However, we observed both types of TDP-43-positive inclusions (i.e. small granular aggregates and large inclusion bodies) equally in all sIBM cases and in the only IBMPFD sample examined. As in MFMs, TDP-43 was reduced or absent in the nuclei of affected myofibers. TAR DNA-binding protein 43 largely colocalized

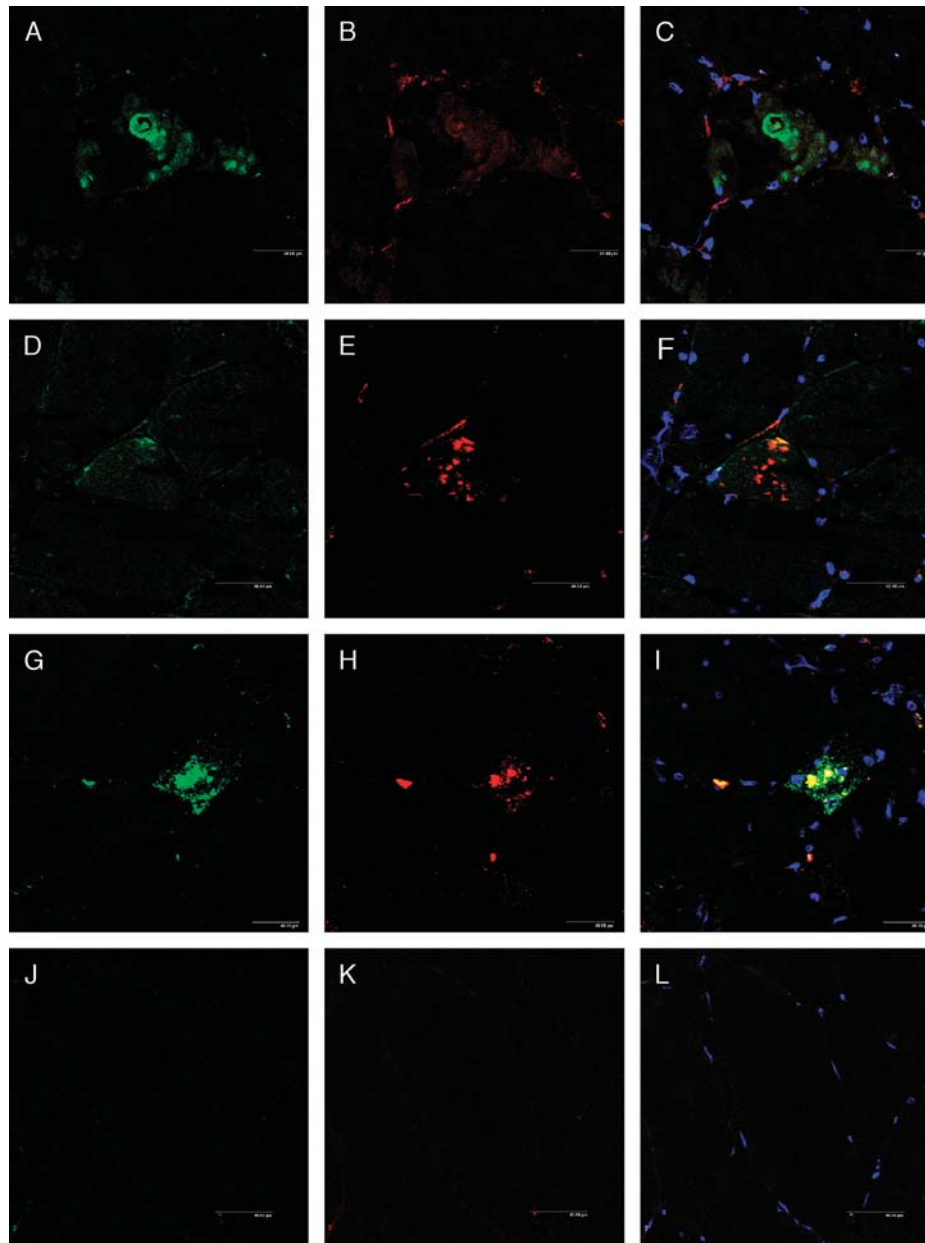


FIGURE 5. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to phospho-TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43; **A, D, G**, green) and anti-TDP-43 (**B, E, H**, red) in myotilinopathy (**A-C**) and desminopathy (**D-I**). Only partial colocalization of phospho-TDP-43 and TDP-43 is found in abnormal protein aggregates (**C, F, I**, merge, yellow). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**J-L**). Nuclei are visualized with To-pro-3-iodide (blue).

with ubiquitin in the large inclusion bodies in sIBM and IBMPFD but not in the small aggregates. As in myotilinopathies and desminopathies, TDP-43 was not always ubiquitinated in sIBM and IBMPFD. This is not surprising because TDP-43 has been found not to be the major target for ubiquitination in ALS, and TDP-43 immunoreactivity does not always colocalize with ubiquitin in skein-like inclusions in ALS (36).

In agreement with the immunohistochemical findings, increased TDP-43 expression levels, as revealed in Western

blots, were found in myotilinopathies, desminopathies, sIBM, and IBMPFD. Interestingly, a smear of high molecular weight, which is observed in TDP-43 proteinopathies (22–25), was also observed in all diseased samples but not in control cases. We do not know whether this corresponds to ubiquitinated or phosphorylated TDP-43 at present. Increased protein levels of TDP-43 in myotilinopathies, desminopathies, and sIBM were not accompanied by upregulation of the *TARBBP* gene. Therefore, increased TDP-43 protein levels and TDP-43

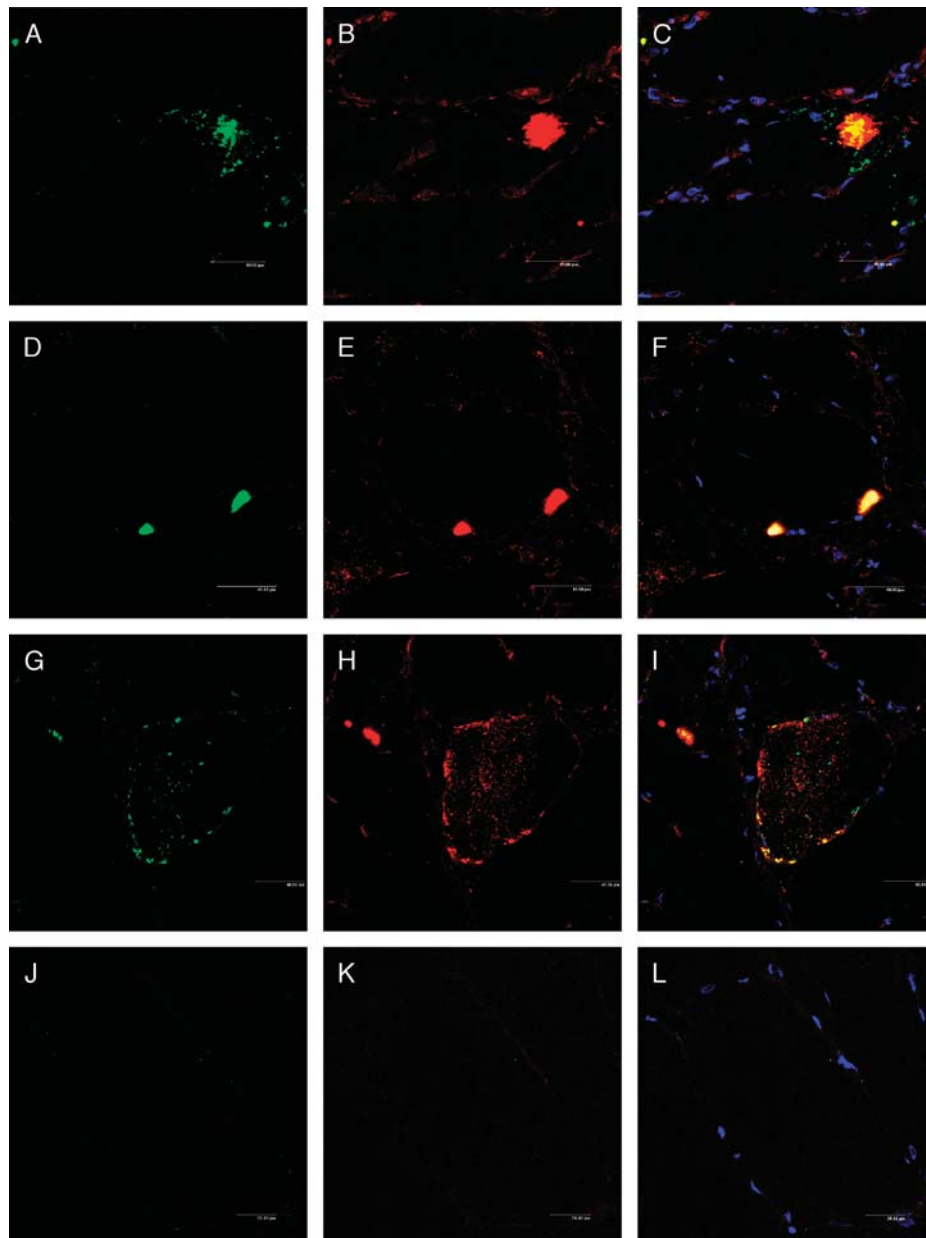


FIGURE 6. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy to phospho-TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43; **A, D, G**, green) and anti-TDP-43 (**B, E, H**, red) in sporadic inclusion body myositis (**A–C**) and inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal degeneration (IBMPFD; **D–I**). Partial colocalization of phospho-TDP-43 and TDP-43 is seen in most deposits except the dense inclusions in IBMPFD (**D–E**), as seen in corresponding merge images (**C, F, I**, yellow). One section of the same case stained only with the secondary antibodies is used as a negative control (**J–L**). Nuclei are visualized with To-pro-3-iodide (blue).

aggregates in MFMs and sIBM are not the result of increased protein synthesis.

Modifications in TDP-43 immunoreactivity were not seen in target fibers in denervation atrophy cases, thus indicating selective involvement of TDP-43 in PAM.

The presence of TDP-43-positive inclusions in nerve and glial cells is consistently found in many cases of FTLD with ubiquitin-immunoreactive inclusions, FTLD with motor neuron disease, and ALS (22–24, 37–39). TAR DNA-binding protein 43 mutations have been reported in familial and sporadic ALS (40–42). For this reason, it has been deduced that all of these disorders are within the same disease spectrum, which has been designated “TDP-43 proteinopathy” (25, 43). The number of neurologic disorders associated with pathologic aggregates of TDP-43 has increased, however, and TDP-43 pathology has been described in Guam ALS and parkinsonism-dementia complex, a subset of α -synucleinopathies and tauopathies, as well as in hippocampal sclerosis (39, 44–47). TAR DNA-binding protein 43 pathology has not been found in association with anoxia, neoplasia, or ischemia, but TDP-43 immunoreactivity is present in Rosenthal fibers and eosinophilic granular bodies (48). Abnormal TDP-43 distribution and localization in such varied and unrelated degenerative diseases of the nervous system, together with its aberrant accumulation in muscle in genetic diseases caused by mutations in *MYOT*, *DES*, and *VCP*, as well as in sporadic IBM cases, makes it unlikely that there is a common TDP-43 origin for these disorders.

As a transcription factor, active TDP-43 is primarily located in the nuclei, but in FTLD-U, ALS, and PMA, TDP-43

is sequestered in intracytoplasmic inclusions with associated reduced detection of nuclear TDP-43 by immunohistochemical methods. The reasons for cytoplasmic accumulation with reduced nuclear localization in affected fibers are not known. Two theories have been advanced: one of them indicates extrusion of TDP-43 from the nuclei; the other postulates abnormal transport from the cytoplasm where TDP-43 is produced to the nucleus. Whatever the reason, 2 different conclusions are suggested by these data. On one hand, cytoplasmic TDP-43 accumulation in MFMs may contribute to aggregate formation; on the other hand, reduced nuclear TDP-43 expression may impair gene processing.

The mechanisms leading to protein aggregation in muscle fibers in MFM and sIBM seem to be associated with impairment of the proteolytic function of the ubiquitin-proteasome protein system (10, 16, 49). Several factors, including mutant proteins, aggresome formation, mutant ubiquitin, and post-translational protein modifications such as phosphorylation, oxidation, and nitration, have been shown to play a role in MFMs (10, 35, 49–52). Recent studies have demonstrated that perturbation of endogenous TDP-43 trafficking between the nucleus and the cytoplasm leads to TDP-43 aggregation (53).

Finally, it is important to stress that accumulated TDP-43 in FTLD-U with and without motor neuron disease, as well as in sporadic and familial ALS, is phosphorylated (22, 23, 54, 55). The present study shows that phosphorylated TDP-43 is also accumulated in the cytoplasm in sIBM, IBMPFD, myotilinopathies, and desminopathies. Double labeling immunofluorescence and confocal microscopy disclosed, however, that there is not an exact colocalization of TDP-43 and

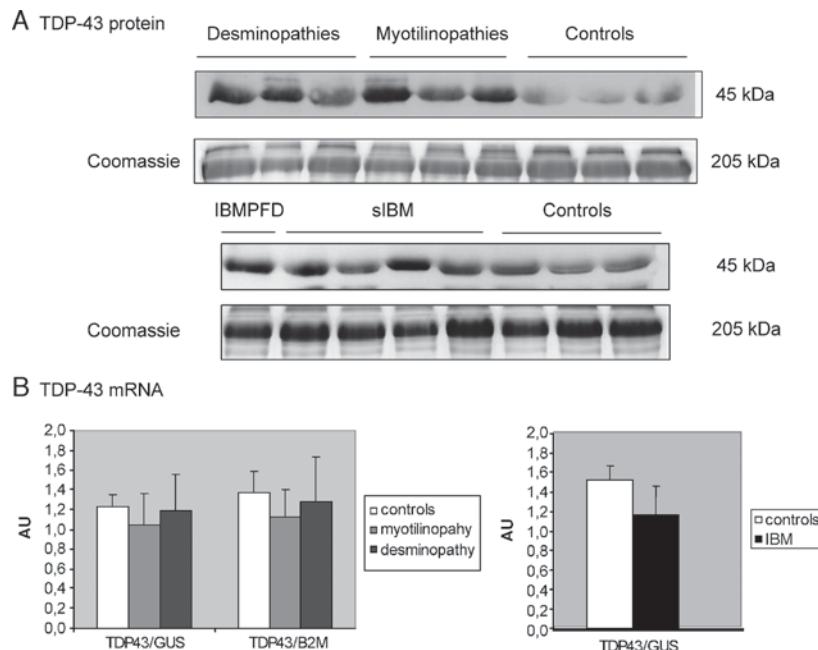


FIGURE 7. (A) Western blots to TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) in desminopathies, myotilinopathies, sporadic inclusion body myositis (sIBM), inclusion body myositis with Paget disease of bone and frontotemporal degeneration, and controls showing increased TDP-43 expression levels in diseased cases when compared with controls. Densitometric studies of all grouped cases showed significant differences between desminopathies, myotilinopathies, and sIBM when compared with controls ($p < 0.01$ in every group; not shown). **(B)** TAR DNA-binding protein 43 mRNA expression levels in myotilinopathies, desminopathies, and sIBM compared with controls. No differences in mRNA expression levels are seen between diseased cases and controls.

phosphorylated TDP-43, thus indicating that not all TDP-43 accumulated in the cytoplasm of vulnerable fibers is modified by phosphorylation, at least, at Ser409/410 and Ser403/404 as revealed by specific anti-phospho-TDP-43 antibodies. Therefore, increased TDP-43 phosphorylation in the cytoplasm further indicates that abnormal TDP-43 in PAM probably contributes to abnormal TDP-43 function, but phosphorylation of TDP-43 at those specific sites is not responsible for all the aberrant accumulation of TDP-43.

The functions of TDP-43 are not understood at present. It is involved in the control of gene transcription, transcription of selected splicing processes, and maintenance of mRNA stability (19). TAR DNA-binding protein 43 has been implicated in the promotion of mRNA stability of the human low molecular weight neurofilament (56), which may play a role in ALS (57). With respect to degenerative diseases of the nervous system and muscle, it is also important to stress that TDP-43 is associated with the Microprocessor complex Drosha/DGR8 (58), a major complex in the processing of microRNAs, which in turn regulates gene expression (59–61). Recent studies have demonstrated the crucial role of certain microRNAs in the development, physiology, and disease of striated muscle (62–66). Moreover, microRNA-206 seems to be uniquely expressed in muscle (67). It is also known that myogenic regulators regulate the expression of certain microRNAs (microRNA-1 and microRNA-206) in the chick embryo (68). Therefore, it seems clear that TDP-43 is a very robust candidate for the control of gene transcription in muscle. Whether this is the case, loss of TDP-43 in the nuclei and its aberrant accumulation in the cytoplasm of damaged fibers may disrupt part of the microRNA machinery controlling gene transcription in sIBM, IBMPFD, myotilinopathies, and desminopathies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. O. Soto for the clinical study of the IBMPFD patient; Dr. P. Camaño, Dr. A. López de Munain, Dr. J. Armstrong, Dr. L.G. Goldfarb, and Dr. A. Shatunov for genetic studies; and T. Yohanann for editorial advice.

REFERENCES

- Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: A cell biologist thinks about neurodegenerative disease. *Neuron* 2001; 29:15–32
- Ellis RJ, Pinheiro TJJ. Danger-misfolded proteins. *Nature* 2002;416: 483–84
- Carrell RW, Lomas DA. Conformational disease. *Lancet* 1997;350: 134–38
- de Pril R, Fischer DF, van Leeuwen FW. Conformational diseases: An umbrella for various neurological disorders with an impaired ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Aging* 2006;27:515–23.
- Goebel HH, Muller HD. Protein aggregate myopathies. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:96–103
- Goebel HH, Fardeau M, Olivé M, et al. 156th ENMC International Workshop: Desmin and protein aggregate myopathies, 9–11 November 2007, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2008;18: 583–92
- Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, et al. Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55:549–62
- De Bleecker JL, Engel AG, Ertl B. Myofibrillar myopathy with foci of desmin positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996;55: 563–77
- Selcen D, Ohno K, Engel AG. Myofibrillar myopathy: Clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 2004;127: 439–51
- Ferrer I, Olivé M. Molecular pathology of myofibrillar myopathies. *Expert Rev Mol Med* 2008;10:25
- Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004;62:1363–71
- Olive M, Goldfarb LG, Shatunov A, et al. Myotilinopathy: Refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* 2005;128:2315–26
- Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, et al. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998;19:402–3
- Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, et al. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalised myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11312–17
- Barrachina M, Moreno J, Juvé S, et al. Abnormal up-regulation of neuron-restrictive silencer factor target genes in human myotilinopathy. *Am J Pathol* 2007;171:1312–23
- Askanas V, Engel WK. Inclusion-body myositis: A myodegenerative conformational disorder associated with Abeta, protein misfolding, and proteasome inhibition. *Neurology* 2006;66:S39–48.
- Dalakas MC. Sporadic inclusion body myositis—diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Neurol* 2006;2:437–47
- Ou SH, Wu F, Harrich D, et al. Cloning and characterization of a novel cellular protein, TDP-43, that binds to human immunodeficiency virus type 1 TAR DNA sequence motifs. *J Virol* 1995;69:3584–96
- Buratti E, Baralle FE. Characterization and functional implications of the RNA binding properties of nuclear factor TDP-43, a novel splicing regulator of CFTR exon 9. *J Biol Chem* 2001;276:36337–43
- Buratti E, Brindisi A, Giombi M, et al. TDP-43 binds heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B through its C-terminal tail: An important region for the inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator exon 9 splicing. *J Biol Chem* 2005;280:37572–84
- Buratti E, Baralle FE. Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease. *Front Biosci* 2008;13: 867–78
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, et al. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2006;314:130–33
- Arai T, Hasegawa M, Akiyama H, et al. TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;351:602–11
- Mackenzie IR, Bigio EH, Ince PG, et al. Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 2007;61:427–34
- Neumann M, Kwong LK, Sampathu DM, et al. TDP-43 proteinopathy in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis: Protein misfolding diseases without amyloidosis. *Arch Neurol* 2007;64: 1388–94
- Cruts M, Gijssels I, van der Zee J, et al. Null mutations in progranulin cause ubiquitin-positive frontotemporal dementia linked to chromosome 17q21. *Nature* 2006;442:920–24
- Baker M, Mackenzie IR, Pickering-Brown SM, et al. Mutations in progranulin cause tau-negative frontotemporal dementia linked to chromosome 17. *Nature* 2006;442:916–19
- Watts GD, Wymer J, Kovach MJ, et al. Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein. *Nat Genet* 2004;36: 377–81
- Watts GD, Thomasova D, Ramdeen SK, et al. Novel VCP mutations in inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Clin Genet* 2007;72:420–26
- Kimonis VE, Mehta SG, Fulchiero EC, et al. Clinical studies in familial VCP myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia. *Am J Med Genet* 2008;146A:745–57
- Hübbers CU, Clemen CS, Kesper K, et al. Pathological consequences of VCP mutations on human striated muscle. *Brain* 2007;130:381–93

32. Neumann M, Mackenzie IR, Cairns NJ, et al. TDP-43 in the ubiquitin pathology of frontotemporal dementia with VCP gene mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:152–57
33. Wehl CC, Temiz P, Miller SE, et al. TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2008;79:1186–89
34. Olivé M, Armstrong J, Miralles F, et al. Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene. *Neuromusc Disord* 2007;17:443–50
35. Olivé M, van Leeuwen FW, Janué A, et al. Expression of mutant ubiquitin (UBB+1) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2008;34:76–87
36. Sanelli T, Xiao S, Horne P, et al. Evidence that TDP-43 is not the major ubiquitinated target within the pathological inclusions of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:1147–53
37. Dickson DW, Josephs KA, Amador-Ortiz C. TDP-43 in differential diagnosis of motor neuron disorders. *Acta Neuropathol* 2007;114:71–79
38. Fujita Y, Mizuno Y, Takamata M, Okamoto K. Anterior horn cells with abnormal TDP-43 immunoreactivities show fragmentation of the Golgi apparatus in ALS. *J Neurol Sci* 2008;269:30–34
39. Nishihara Y, Tan CF, Onodera O, et al. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis: Two pathological patterns shown by analysis of distribution of TDP-43-immunoreactive neuronal and glial cytoplasmic inclusions. *Acta Neuropathol* 2008;116:169–82
40. Sreedharan J, Blair IP, Tripathi VB, et al. TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 2008;319:1668–72
41. Kabashi E, Valdmanis PN, Dion P, et al. TARDBP mutations in individuals with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 2008;40:572–74
42. Gitcho MA, Baloh RH, Chakraverty S, et al. TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol* 2008;63:435–38
43. Kwong LK, Uryu K, Trojanowski JQ, et al. TDP-43 proteinopathies: Neurodegenerative protein misfolding diseases without amyloidosis. *Neurosignals* 2008;16:41–51
44. Uryu K, Nakashima-Yasuda H, Forman MS, et al. Concomitant TAR–DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:555–64
45. Geser F, Winton MJ, Kwong LK, et al. Pathological TDP-43 in parkinsonism-dementia complex and amyotrophic lateral sclerosis of Guam. *Acta Neuropathol* 2008;67:33–45
46. Higashi S, Iseki E, Yamamoto R, et al. Concurrence of TDP-43, tau and synuclein pathology in brains of Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain Res* 2007;1184:284–94
47. Freeman SH, Spires-Jones T, Hyman BT, et al. TAR–DNA binding protein 43 in Pick disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;67:62–67
48. Lee EB, Lee VM, Trojanowski JQ, et al. TDP-43 immunoreactivity in anoxic, ischemic and neoplastic lesions of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2008;115:305–11
49. Ferrer I, Martín B, Castaño JG, et al. Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, and local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:484–98
50. Ferrer I, Carmona M, Blanco R, et al. Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol* 2005;15:101–8
51. Janué A, Odena MA, Oliveira E, et al. Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:711–23
52. Janué A, Olivé M, Ferrer I. Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: A link between oxidative damage and abnormal protein aggregation. *Brain Pathol* 2007;17:377–88
53. Winton MJ, Igaz LM, Wong MM, et al. Disturbance of nuclear and cytoplasmic TAR DNA-binding protein (TDP-43) induces disease-like redistribution, sequestration, and aggregate formation. *J Biol Chem* 2008;283:13302–9
54. Hasegawa M, Arai T, Nonaka T, et al. Phosphorylated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 2008;64:60–70
55. Inukai Y, Nonaka T, Yoshida M, et al. Abnormal phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTLU and ALS. *FEBS Lett* 2008;582:2899–904
56. Strong MJ, Volkening K, Hammond R, et al. TDP43 is a human low molecular weight neurofilament (hNFL) mRNA-binding protein. *Mol Cell Neurosci* 2007;35:320–27
57. Ge WW, Leystra-Lantz C, Wen W, Strong MJ. Selective loss of rans-acting instability determinants of neurofilament mRNA in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *J Biol Chem* 2003;278:26558–63
58. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004;432:235–40
59. Shivdasani RA. MicroRNAs: Regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006;108:3636–53
60. Nelson PT, Keller JN. RNA in brain disease: No longer just “the messenger in the middle”. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007;66:461–8
61. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: Novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res* 2008;79:562–70
62. McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* 2007;102:306–13
63. Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell* 2007;129:303–17
64. McCarthy JJ, Esser KA, Andrade FH. MicroRNA-206 is overexpressed in the diaphragm but not the hindlimb muscle of mdx mouse. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C451–7
65. Callis TE, Deng Z, Chen JF, Wang DZ. Muscling through the microRNA world. *Exp Biol Med* 2008;233:131–38
66. van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* 2008;24:159–66
67. McCarthy JJ. MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomir. *Biochem Biophys Acta* 2008;1779:682–91
68. Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, et al. Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, mir-1, miur-206 and miR-133. *Dev Biol* 2008;321:491–99

4. DISCUSSIÓ

4. Discussió

Abans de comentar amb profunditat els diversos aspectes a discutir dels treballs presentats en aquesta tesi, cal esmentar que en tots i cada un d'ells les mostres amb les quals s'ha treballat havien estat prèviament diagnosticades dins dels subgrups de les MFM causades per mutacions al gen de la desmina (*DES*) o de la miotilina (*MYOT*), és a dir, que es classifiquen com a desminopaties o miotilinopaties (Olivé et al. 2005, Olivé et al. 2007, Goldfarb et al. 2008).

Això és així perquè del grup de pacients que han estat diagnosticats com a malalts de MFM a l'Institut de Neuropatologia (INP) de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB), que actualment són un total de 32, gairebé un 60% presenten mutacions al gen de la miotilina mentre que aproximadament el 20% les presenten al gen de la desmina. Per tant, les miotilinopaties i les desminopaties representen conjuntament la majoria de les MFM presents al nostre medi, en el qual les miotilinopaties són clarament les més abundants (Goebel et al. 2008).

A més, tot i que les desminopaties i les miotilinopaties no recullen l'àmpli ventall clínic que es pot trobar a les MFM, sí que representen els dos subgrups amb les diferències més marcades pel que fa a l'edat d'aparició dels primers símptomes, el patró d'afectació dels músculs observat mitjançant les tomografies coputeritzades, la presència de símptomes cardíacs i respiratoris, i sobretot, pel que fa a la morfologia de les inclusions que s'observen a les biòpsies musculars dels malalts. D'una manera generalitzada, es considera que els fenotips de les desminopaties i les α B-cristal·linopaties són força semblants entre ells, de la mateixa manera que les miotilinopaties i les zaspopaties comparteixen moltes característiques clíniques, radiològiques i morfològiques (Goebel et al. 2008).

Tenint en compte que l'esdeveniment patològic inicial de les MFM es troba sempre relacionat amb la desestructuració dels discs Z, i que totes les mutacions descrites fins ara que causen les MFM es produeixen a gens que codifiquen per proteïnes que són components dels discs Z (miotilina, ZASP, filamina C), o bé són imprescindibles per mantenir-ne la seva estructura (desmina, α B-cristal·lina) (Selcen 2008). Podria ser que aquest fet estigués íntimament relacionat amb la diferència que es troba entre la morfologia dels agregats proteïcs a les desminopaties i per extensió a les α B-cristal·linopaties, on aquests són més difusos i en forma de xarxa o placa; i les miotilinopaties i de manera semblant també a les zaspopaties i filaminopaties causades per mutacions a la isoforma C, on aquests són molt més densos i compactes

fins al punt, que en algunes miotilinopaties s'arriben a formar cossos esfèroides (Foroud et al. 2005).

Una altra de les diferències entre els diferents subtipus de les MFM que ens permet agrupar-los *a grosso modo* en dos grans grups (un format per les desminopaties i les α B-cristal·linopaties i l'altre per les miotilinopaties, les zaspopaties i les filaminopaties de la isoforma C) és el fet que les desminopaties i les α B-cristal·linopaties tendeixen a manifestar els seus primers símptomes en edats juvenils; mentre que quan aquests apareixen més tard de la quarta dècada de la vida acostuma a ser indicatiu d'un diagnòstic de MFM relacionades amb mutacions als gens de la miotilina, la ZASP o la filamina C (Schroder et al. 2009).

Altres característiques que també podrien dividir les MFM en aquests dos grups són la presència més abundant de fibres esborrades a les desminopaties i α B-cristal·linopaties, mentre que les vacuoles, ribetejades o no, acostumen a ser més freqüents a les miotilinopaties i zaspopaties (Claeys et al. 2009). A més, pel que fa a l'observació ultraestructural dels agregats proteics de les MFM mitjançant la microscopia electrònica, s'observa que a les desminopaties i les α B-cristal·linopaties aquests tenen forma de material granulofilamentós, mentre que a les miotilinopaties i zaspopaties les inclusions citoplasmàtiques són d'aspecte més filamentós (Claeys et al. 2008). En aquest mateix treball es comenta que, els feixos filamentosos que s'observen a les miotilinopaties i zaspopaties presenten una estructura diferent dels que es troben a les filaminopaties causades per mutacions a la isoforma de la filamina C, els quals també són d'aspecte filamentós (Kley et al. 2007, Claeys et al. 2008).

Per tant, tot i que en els treballs presentats en aquesta tesi només s'han estudiat mostres de desminopaties i miotilinopaties, creiem que els resultats obtinguts podrien ser representatius de les MFM en general. Primerament perquè en són els dos subgrups més abundants i després, perquè les diferències que presenten en les seves característiques fenotípiques i morfològiques, ens permetrien veure-les com a principals representants de dos grans grups fets entre els diferents subtipus de les MFM (un que estaria format per les desminopaties i les α B-cristal·linopaties i l'altre, per les miotilinopaties, les zaspopaties i les filaminopaties de la isoforma C).

4.1 L'estrès oxidatiu/nitratiu

Una de les primeres coses que seria important recalcar dels resultats obtinguts als dos treballs en els quals es van utilitzar els marcadors d'estrès oxidatiu i nitratiu, és la presència de proteïnes glicoxidades, lipoxidades i nitrades també a les mostres de múscul esquelètic dels casos control. Això és degut a què en condicions fisiològiques hi ha una producció constant de ROS i RNS en baixes concentracions (Moldovan et al. 2004), de manera que segurament és normal detectar nivells basals de dany oxidatiu i/o nitratiu. Se sap que tot i que les cèl·lules han desenvolupat mecanismes antioxidants, sobretot enzimàtics, per pal·liar els efectes d'aquestes substàncies altament reactives; els teixits amb alta demanda energètica i formats essencialment per cèl·lules postmitòtiques, com són el SNC i el múscul esquelètic (Grune et al. 2005), són més propensos a acumular aquests tipus de danys, fet que a més s'incrementa amb l'edat (Finkel et al. 2000). De manera que en aquest tipus d'estudis comparatius és molt important seleccionar casos control d'edats similars als casos patològics que es volen estudiar.

Com que les proteïnes representen la principal diana del dany oxidatiu/nitratiu (Davies et al. 1999, Dalle-Donne et al. 2006), la nostra primera aproximació es basa en l'ús de diferents marcadors d'aquests danys com són els marcadors de la glicoxidació (AGE, RAGE, CML i CEL), els marcadors de la lipoxidació (HNE i MDAL) i els marcadors de la nitració (N-Tyr); en mostres de teixit muscular de pacients control i de malalts de desminopaties i miotilinopaties mitjançant diferents tècniques en que s'utilitzen anticossos que reconeixen les proteïnes que han estat modificades per aquests marcadors.

A partir dels western blots de gels monodimensionals dels homogenats proteics de les diferents mostres, s'observa un augment general, i sobretot pel que fa a una banda d'uns 60kDa de pes molecular, no només dels nivells dels productes de la glicoxidació (CEL, CML i AGE), sinó també dels productes de la lipoxidació (HNE i MDAL) i dels nivells de nitració (N-Tyr), a les mostres musculars dels malalts de miotilinopaties i desminopaties. Per tant, es pot afirmar la presència de dany oxidatiu i nitratiu en aquests dos subgrups de les MFM.

Però tal com s'evidencia a l'estudi immunohistoquímic d'aquestes mostres, s'observen diferències pel que fa a la localització d'aquests productes. Mentre que el marcatge dels AGE colocalitza amb el dels agregats proteics, la immunoreactivitat pel MDAL es troba només al voltant d'aquests, a la vegada que el marcatge de l'HNE es concentra

al sarcolemma, fet que segurament està assenyalant les proteïnes de membrana com a principal diana del dany lipoxidatiu. Aquesta diferència queda confirmada en les observacions fetes per microscopia confocal de l'immunofluorescència de doble marcatge, i ens indica que segurament les proteïnes substrat de la glicoxidació i la lipoxidació són diferents.

També resulta interessant destacar l'intens marcatge observat per als enzims productors de NO (eNOS, iNOS and nNOS) a les miotilinospaties i les desminopaties, juntament amb la seva colocalització amb alguns dels agregats proteics presents en ambdues MFM. De fet, no se sap si aquesta alteració en la distribució subcel·lular de les NOS implica un augment o una disminució de la seva activitat. En altres patologies musculars on també s'ha observat, com seria a les distrofinopaties (Wells et al. 2003, Punkt et al. 2006), aquesta deslocalització s'ha associat amb la pèrdua de la seva funció protectora vers a la isquèmia associada a la contracció muscular (Thomas et al. 1998a, Thomas et al. 1998b), i per tant es creu que la degeneració muscular que es produeix en aquestes malalties podria estar lligada a la reducció del NO disponible per actuar com a mediador per reduir la susceptibilitat cel·lular al estrès metabòlic (Rando 2001).

Altres punts de vista defensen que quan les NOS estan lligades a la membrana són inactives, i que per tant la seva alliberació al citoplasma implicaria un augment de la seva producció de NO i dels seus possibles efectes tòxics. Quan aquest NO queda segrestat pels anions de superòxid (O_2^-) que es produeixen en una situació d'estrès oxidatiu, es forma peroxinitrit ($ONOO^-$), fet que explicaria l'augment de la nitració proteica en forma de nitrotirosina (Buchwalow et al. 2006, Punkt et al. 2006). Aquest segon punt de vista s'adapta millor als resultats que hem obtingut al estudiar les MFM, on sembla que el NO podria funcionar com a captador d'anions de superòxid amb la contrapartida d'augmentar a la vegada la modificació de les proteïnes a través de la formació de nitrotirosina, fet que també s'ha descrit que succeeix a les miopaties amb vacuoles ribetejades (Tsuruta et al. 2002).

Un cop arribats a la conclusió que les principals modificacions post-translacionals relacionades amb els agregats proteics d'aquests dos subtipus de MFM són de naturalesa glicoxidativa i nitrativa, es van triar els seus marcadors per tal de procedir a identificar-ne les principals proteïnes diana. Mitjançant la separació de les proteïnes a partir de gels bidimensionals, el marcatge de les seves modificacions per western blot i la posterior identificació de les proteïnes corresponents als *spots* diferencials entre els

casos control i els casos patològics mitjançant l'espectrometria de masses, es va identificar la desmina com a principal diana de les modificacions produïdes per l'oxidació i la nitració tant a les miotilinoses com a les desminosis, en aquest segon cas independentment de si aquesta desmina està mutada o no.

Trobar la desmina com a principal diana de la glicoxidació i la nitració en aquests dos subtipus de les MFM no sembla massa sorprenent, ja que també és una de les proteïnes que apareix en forma d'agregats als diferents subtipus de les MFM. Però potser és interessant destacar que aquesta proteïna només presenta mutacions a les desminosis, i per tant podria ser que la seva susceptibilitat a ser diana del dany oxidatiu i/o nitratiu estigués relacionada amb altres factors que no tenen perquè estar directament lligats a la possible alteració de l'estructura d'aquesta proteïna quan es troba mutada.

Un d'aquests factors que podria ser més rellevant és el fet que la desmina està implicada amb la distribució subcel·lular de les mitocòndries (Milner et al. 2000), que ja en condicions fisiològiques es creu que són una de les principals fonts de producció de les ROS i les RNS a les cèl·lules musculars (Murrant et al. 2001). Així doncs es podria tractar d'una simple qüestió de proximitat entre la font oxidant i el substrat d'aquesta oxidació (Dalle-Donne et al. 2006).

Però és que a més, a les MFM també s'han descrit alteracions de la cadena respiratòria mitocondrial caracteritzades per la disminució de l'activitat del complex I (Reimann et al. 2003), condició en la qual es creu que s'incrementa la producció d'anions de superòxid (O_2^-) i la d'altres ROS derivades d'aquest (Moldovan et al. 2004). Aquest fet juntament amb l'observació de l'augment del nombre de mitocòndries i l'alteració de la seva distribució en algunes biòpsies de pacients amb MFM, fa palesa la necessitat d'estudiar amb més profunditat les causes de les alteracions de les mitocòndries a les MFM. D'altra banda a l'únic model d'estudi dels diferents subgrups de MFM on s'han descrit alteracions en la distribució, morfologia i funció de les mitocòndries és en els ratolins knock-out per a la desmina (Milner et al. 2000). De manera que no sabem si les mutacions de les proteïnes estructurals del disc Z, com són les del gen de la miotilina a les miotilinoses, són suficients per alterar també la distribució i la funció de les mitocòndries i així poder explicar perquè la desmina és la principal diana del dany oxidatiu/nitratiu també en aquest subgrup de les MFM, i potser també en els altres subgrups que tampoc presenten mutacions al gen de la desmina.

Altres marcadors que podrien estar indicant la participació de les mitocondries a la fisiopatologia d'aquests dos subgrups de les MFM són l'acumulació de la SOD2 i la eNOS als agregats proteics característics d'aquestes malalties, ja que ambdós enzims es localitzen a les mitocondries de les fibres musculars (Yu 1994, Stamler et al. 2001).

D'altra banda, la desmina no és l'única diana de la glicoxidació a les miotilinopaties i a les desminopaties, ja que al fer estudis de doble marcatge amb tècniques d'immunofluorescència i la seva observació per mitjà del microscopi confocal s'observa la colocalització dels AGE amb la miotilina, en ambdós subtipus de MFM (resultats annexos 7.1). El marcatge dels AGE a les miotilinopaties no només s'observa a les fibres musculars amb agregats de miotilina, sinó també a d'altres zones on no n'hi ha. Mentre que el marcatge dels AGE a les desminopaties sovint es localitza al centre dels dipòsits de desmina. Per tant sabem que com a mínim una altra diana de glicoxidació d'aquests dos subtipus de les MFM és la miotilina, però en aquest cas no hem estat capaços d'identificar-la a partir de les tècniques de separació de les proteïnes en dues dimensions i l'espectrometria de masses.

4.2 Relació entre el dany oxidatiu i els agregats proteics

Al primer dels dos treballs sobre l'estrès oxidatiu a les MFM que es presenta en aquesta tesi, es va fer un pas més enllà per tal d'establir una relació directa entre els agregats de proteïnes i la seva oxidació a les miotilinopaties i les desminopaties.

A primer cop d'ull a l'estudi immunohistoquímic dels diferents marcadors de la glicoxidació, la lipoxidació i la nitració, s'observa que una altra de les diferències que trobem entre les miotilinopaties i les desminopaties pel que fa a la redistribució d'aquests productes està directament relacionada amb la morfologia dels seus agregats, i no tant en l'especificitat de la proteïna diana, que com s'ha esmentat anteriorment es tracta principalment de la desmina. A les miotilinopaties, on els agregats poden arribar a ser molt més compactes, també trobem un marcatge més intens pels marcadors que colocalitzen amb els agregats com són els AGE i les diferents formes de les NOS. Mentre que a les desminopaties, els agregats poden ser densos a les zones subsarcolèmiques, però en general presenten una forma de xarxa difusa al llarg de l'espai sarcoplasmàtic.

A més, mitjançant l'observació del triple marcatge d'immunofluorescència amb el microscopi confocal s'ha pogut corroborar la colocalització de la p62 i la ubiquitina amb els agregats de proteïnes oxidades i marcades pels AGE d'aquestes malalties. Però

alguns dels agregats proteics que trobem oxidats no apareixen marcats ni per l'ubiquitina ni per la p62, fet que fa pensar que el dany oxidatiu que observem podria ser més extens que la capacitat de la cèl·lula per marcar les proteïnes oxidades que haurien de ser degradades per l'UPS. Això està d'acord amb el que s'ha descrit referent a l'expressió de la p62, la qual pot ser induïda per l'augment de radicals lliures i també per la inhibició del proteosoma (Kuusisto et al. 2001).

Tot i que se sap que la degradació de les proteïnes oxidades es pot produir d'una manera independent al marcatge de l'ubiquitina mitjançant el proteosoma 20S (Davies 2001, Shringarpure et al. 2003), quan aquestes proteïnes oxidades s'enllacen entre elles i formen agregats és difícil que puguin travessar el porus que conformen les diferents subunitats del proteosoma i aleshores és quan es creu que la capacitat d'aquest per digerir-les s'excedeix, tot i que encara pugui mantenir la seva activitat catalítica (Ferrer et al. 2004, Ferrer et al. 2008,).

Es creu doncs que la colocalització de components del proteosoma amb els dipòsits de proteïnes insolubles, fet que no només ocorre a les MFM (Ferrer et al. 2004), i el fet que aquest estigui implicat en la proteòlisi de les proteïnes mal plegades indica que la causa de la formació d'aquests agregats podria ser l'existència d'un desequilibri crònic entre la producció i la degradació d'aquestes proteïnes (Sherman et al. 2001).

Una altra evidència que ens indica que el proteosoma presenta algun tipus de disfunció a les MFM és la colocalització de la ubiquitina mutada (UBB⁺¹) amb els agregats de miotilina i desmina de les miotilinopaties i les desminopaties respectivament. Aquests resultats es presenten al tercer treball inclòs en aquesta tesi, conjuntament amb els que descriuen la presència de la p62 a les inclusions d'aquests dos subtipus de MFM.

L'esdeveniment conegut amb el nom de *molecular misreading* que explica l'adquisició de delecions de dinucleòtids a nivell de l'ARN missatger (ARNm) i no de l'ADN (van Leeuwen et al. 1998, van Leeuwen et al. 2000), es creu específic d'algunes malalties conformacionals del cervell com són la malaltia d'Alzheimer, d'altres taupaties i la malaltia de Huntington, perquè no apareix en d'altres malalties conformacionals com són el Parkinson i d'altres sinucleïnopaties (Fischer et al. 2003, de Pril et al. 2006). Però en canvi, també es produeix en altres paradigmes de malalties conformacionals, com són algunes malalties que afecten als hepatòcits i en les quals es formen els cossos de Mallory (French et al. 2001), i altres del teixit muscular com són les IBM esporàdiques (Fratta et al. 2004) o com ara sabem també a les MFM.

L'acumulació d'ubiquitina mutada es considera un marcador de la disfunció de l'UPS (Lam et al. 2000, van Leeuwen et al. 2000, De Vrij et al. 2001, Lindsten et al. 2002, Fischer et al. 2003, de Pril et al. 2006), ja que aquesta deleció de l'ARNm de l'ubiquitina fa que la proteïna mutada resultant (UBB⁺¹) no pugui realitzar la seva funció biològica (van Leeuwen et al. 1998). S'ha descrit que la UBB⁺¹ ha perdut la capacitat d'ubiquitinitzar però que en canvi sí que pot ser ubiquitinitzada (van Leeuwen et al. 1998, van Leeuwen et al. 2000, De Vrij et al. 2001), fet que s'ha vist que és necessari que es produeixi perquè la UBB⁺¹ inhibeixi al proteosoma (Lam et al. 2000, Lindsten et al. 2002). Hi ha diferents teories que intenten explicar com es produeix aquesta inhibició. Uns creuen que possiblement es deu a que els enzims desubiquitinitzants no poden desubiquitinitzar la UBB⁺¹ de manera prou eficient (Lam et al. 2000); mentre que uns altres proposen que quan la UBB⁺¹ apareix ubiquitinitzada a la vegada a la lisina 29 i a la lisina 48, presenta una interacció amb el proteosoma més forta i duradora en el temps que impedeix l'accés d'altres substrats al sistema (Lindsten et al. 2002).

Realment no es coneix el mecanisme exacte d'inhibició del proteosoma per part de la UBB⁺¹, però és possible que la simple presència dels agregats de proteïnes produeixi petits canvis en l'eficiència de la proteòlisi de la cèl·lula que siguin suficients per afavorir l'acumulació de la UBB⁺¹, fet que a la vegada produiria una inhibició més general del proteosoma (Lindsten et al. 2002).

És interessant comentar que als estudis fets amb mostres de cervell, els transcrits de la UBB⁺¹ es troben també a les mostres control, però que en canvi a nivell de proteïna només apareixen a les neurones afectades de les mostres dels pacients amb certes malalties neurodegeneratives (Lindsten et al. 2002). Per tant, com que sembla que els proteosomes de les cèl·lules sanes poden desfer-se de la UBB⁺¹ quan aquesta s'hi troba en poca quantitat (Lindsten et al. 2002), segurament hi ha altres factors que estan determinant si aquesta UBB⁺¹ s'acumula o no.

El principal factor que s'assenyala com a determinant, al convertir un esdeveniment més o menys general com podria ser el *molecular misreading* en un de patològic, és l'edat (van Leeuwen et al. 2000). Pel que fa a les MFM, l'edat també és un factor de risc com ho és en la majoria de les malalties neurodegeneratives on s'ha descrit la presència de la UBB⁺¹. Encara que les desminopaties es presenten en edats més juvenils del que ho fan les miotilopaties. Tot i així, altres factors com són la presència de proteïnes mutades i/o modificades per altres tipus de modificacions post-translacionals, com són les produïdes pel dany oxidatiu i/o nitratiu, podrien explicar

millor perquè en aquest context l'acumulació de la UBB⁺¹ pot esdevenir un element patogènic a ser sumat als esmentats anteriorment.

A més, tampoc no es pot descartar la possible presència d'altres proteïnes afectades per aquest esdeveniment a les MFM, tal com s'ha vist que també succeeix amb la proteïna precursora del β -amiloid (β APP) a pacients amb la malaltia d'Alzheimer o la síndrome de Down (van Leeuwen et al. 1998). Per explorar aquesta possibilitat, seria interessant comprovar si les seqüències dels gens implicats en les MFM són riques amb motius GAGAG als seus exons, fet que representa que incrementa les possibilitats de patir la deleció del dinucleòtid (GA) que explica la formació d'aquestes proteïnes⁺¹ (van Leeuwen et al. 2000).

D'altra banda, mentre la presència de la UBB⁺¹ a les fibres musculars de malalts de miotilinoпатies i desminopaties podria implicar la participació de l'UPS a la patogènia de les MFM; l'observació en aquest mateix treball de la presència de la p62 a les inclusions citoplasmàtiques d'aquestes mateixes mostres podria indicar l'existència d'una resposta defensiva de la cèl·lula enfront de l'acumulació citoplasmàtica de proteïnes nocives (Zatloukal et al. 2002).

Tot i que de nou observem una diferència pel que fa a la intensitat de la immunoreacció de la p62 entre les miotilinoпатies i les desminopaties, la qual és més forta a les miotilinoпатies. Aquest fet s'atribueix al diferent nivell de compactació de les inclusions d'ambdues malalties i a la formació menys freqüent de cossos d'inclusió a les desminopaties.

A més, aquesta diferència de la morfologia de les inclusions entre les desminopaties i les miotilinoпатies també s'observa al comparar la seva colocalització amb la d'altres marcadors de l'agresoma com és la γ -tubulina (resultats annexos 7.2 i 7.3). En aquestes imatges de microscopia confocal observem que els agregats de miotilina colocalitzen fàcilment amb la γ -tubulina tan a les miotilinoпатies com a les desminopaties, mentre que a les desminopaties la desmina hi colocalitza només parcialment. Aquesta observació, tot i que hauria de ser més ampliada i contrastada (com a mínim per tal d'estudiar si hi ha colocalització de la desmina i la γ -tubulina a les miotilinoпатies), suggereix que a les miotilinoпатies les fibres musculars són capaces d'agrupar les diferents proteïnes en forma d'agregats més grans i compactes que encaixen perfectament amb la definició de l'agresoma; mentre que a les desminopaties

els agregats de desmina semblen estar més dispersos que els de miotilina. Aquesta suposada dificultat de les fibres musculars per formar un “autèntic” agregoma quan la desmina és la proteïna que es troba alterada, fet que de moment només hem observat a les desminopaties on aquesta a més a més es troba mutada, podria explicar perquè el pronòstic d'aquest subtipus de les MFM és molt més sever i l'edat d'aparició dels seus primers símptomes molt més primerenca.

Finalment cal destacar que a més del paper que s'otorga a la p62 en la formació dels agregomes, també se la considera una proteïna que fa de pont entre els agregats poliubiquitinats i la maquinària de l'autofàgia (Bjorkoy et al. 2006, Komatsu et al. 2007, Pankiv et al. 2007). Avui en dia l'estudi de l'autofàgia (o més ben dit, la macroautofàgia) a les malalties amb presència d'agregats proteics ha despertat molt d'interès, ja que s'entén com un mecanisme cel·lular amb capacitat per degradar el que no ha pogut ser-ho mitjançant l'UPS i que podria ser regulat farmacològicament (Keller et al. 2004, Lunemann et al. 2007, Askanas et al. 2009). Tot i que encara no se sap si l'autofàgia juga un paper protector o patològic en les diverses malalties on s'estudia (Shintani et al. 2004), alguns resultats ja apunten que no sempre és igual d'efectiva, ja que al comparar diferents models cel·lulars on s'hi expressen diferents tipus de proteïnes mutades, el model que expressa la desmina mutada és un dels que presenta resistència a l'autofàgia (Wong et al. 2008).

Seria molt interessant comprovar si aquest fet podria tenir alguna relació amb la proposada dificultat en la formació de l'agregoma en funció de quina és la proteïna mutada. Cosa que es podria realitzar a partir d'estudis comparatius entre les desminopaties i les miotilinopaties que també incloguessin models cel·lulars d'expressió de la miotilina i la desmina mutada.

4.3 Altres proteïnes agregades a les MFM

4.3.1 TDP-43

Una de les troballes més sorprenents que s'han fet a l'hora d'identificar noves proteïnes que formen part dels agregats proteics de les MFM ha estat la presència de la TDP-43. Aquests resultats es descriuen al quart article presentat en aquesta tesi, en el qual els casos estudiats no només inclouen les miotilinopaties i les desminopaties com a representants de les MFM, sinó també casos d'IBM i un cas d'IBMPFD (amb una mutació al gen de la valosina) amb fins comparatius.

La idea de buscar la TDP-43 al múscul sorgeix de la seva descripció a les inclusions ubiquïtinitzades de les FTLD-U, juntament amb l'existència d'un tipus de DFT causada per mutacions al gen de la valosina (*VCP*) que també presenta afectació al múscul en forma de IBM (IBMPFD). Mentre un altre grup se'ns avançava amb la publicació de la troballa de la TDP-43 a les inclusions citoplasmàtiques ubiquïtinitzades presents a les biòpsies dels pacients amb IBMPFD i IBM esporàdiques (sense causa genètica) (Weihl et al. 2008); nosaltres també treballàvem amb mostres de MFM causades per mutacions al gen de la desmina (*DES*) o al de la miotilina (*MYOT*).

Aleshores, la pregunta fonamental que es planteja és què tenen en comú les IBM i les MFM per compartir la presència de la TDP-43 a les seves inclusions citoplasmàtiques, tenint en compte que la ubicació majoritària d'aquesta proteïna al teixit muscular, i també en d'altres teixits, és a l'interior dels nuclis (Ayala et al. 2008).

A nivell clínic, el nou i creixent concepte de les miopaties d'agregats proteics (PAM) pretén englobar totes les miopaties que presenten acumulacions anòmales de proteïnes al citoplasma de les fibres musculars (Goebel et al. 2006, Goebel et al. 2008). Les MFM representen el grup majoritari dins de les malalties incloses a la definició de les PAM, a la vegada que les IBM es consideren el principal exemple de les PAM d'origen esporàdic o no genètic (Goebel et al. 2008). Per tant, les IBM i les MFM comparteixen l'acumulació anòmala de proteïnes com a principal tret morfològic de les fibres musculars afectades, i en molts casos, també comparteixen la identitat de moltes d'aquestes proteïnes acumulades com és el cas de la recentment trobada TDP-43.

Una diferència destacada que es troba al comparar ambdós treballs és que al primer (Weihl et al. 2008), les inclusions de la TDP-43 s'observen sempre ubiquïtinitzades a les IBMPFD mentre que a les sIBM els dos marcadors només colocalitzen en alguns casos, de manera que proposen l'existència d'un patró del marcatge de la TDP-43 diferent entre ambdues patologies. Els nostres resultats destaquen la falta de colocalització de la ubiquïtina i la TDP-43 en moltes de les inclusions de les mostres de les MFM estudiades (miotilinopaties i desminopaties), i també de les de sIBM i IBMPFD, és a dir, que en cap de les mostres estudiades la TDP-43 apareix sempre ubiquïtinitzada. A més, les malalties on la ubiquïtina i la TDP-43 sembla que colocalitzen més sovint són les mateixes en les que també s'observa la colocalització de la TDP-43 amb la proteïna que s'hi troba mutada, que són, amb la miotilina a les miotilinopaties i amb la valosina a la IBMPFD. Per tant, podria ser que la TDP-43 que

apareix acumulada a les malalties musculars que s'estudien en aquest treball no estigui realment ubiqüitinitzada, sinó simplement molt pròxima a altres proteïnes que sí que ho estan. Fet que suggereix que l'acumulació de la TDP-43 a aquestes malalties podria ser secundària a la d'altres proteïnes que segurament tenen molt més protagonisme en els esdeveniments patològics que s'hi produeixen.

En canvi la TDP-43 sí que es troba fosforilada a la Ser 403/404 i a la Ser 409/410 a moltes de les inclusions, tot i que no a totes on la TDP-43 apareix acumulada, que presenten les diferents mostres que s'examinen en aquest treball (miotilinopaties, desminopaties, sIBM i IBMPFD). Aquestes fosforilacions de la TDP-43 són les mateixes que s'han descrit associades a les malalties neurodegeneratives del sistema nerviós caracteritzades per l'acumulació citoplasmàtica de la TDP-43, com són la FTL-D-U, amb o sense afectació de les motoneurons, i l'ELA sigui de tipus esporàdica com familiar (Hasegawa et al. 2008, Inukai et al. 2008, Neumann et al. 2009b).

El fet que la fosforilació de la TDP-43 no sembla imprescindible perquè es produeixi l'acumulació de la proteïna (Zhang et al. 2009), i que es tenen en compte altres factors com serien el seu truncatge o l'alteració de les seves senyals d'importació cap al nucli per explicar-ne l'acumulació citoplasmàtica (Igaz et al. 2009, Nonaka et al. 2009, Zhang et al. 2009, Winton et al. 2008); no treu significació al fet que es trobin les mateixes fosforilacions de la TDP-43 en aquestes malalties musculars incloses en la definició de les PAM i a les del sistema nerviós caracteritzades per l'acumulació citoplasmàtica de la TDP-43. Podria ser que aquesta coincidència fós una conseqüència de l'activació de les mateixes quinases, i per tant, indicar la possible existència de mecanismes de senyalització comuns entre les patologies amb presència d'acumulacions anòmales de proteïnes de diferents teixits.

De tota manera el que resulta més intrigant de tots aquests resultats és que l'acumulació citoplasmàtica de la TDP-43, estigui fosforilada o no, sempre va acompanyada de la seva disminució o desaparició del nucli, on sembla que realitza la majoria de les seves funcions. Per tant, una de les principals conseqüències d'aquest fet podria ser la pèrdua d'aquestes funcions, ja sigui a nivell de la regulació de la transcripció i/o del *splicing* alternatiu, com de l'estabilitat dels ARNm (Buratti et al. 2008). Però és que a més, la TDP-43 també forma part del grup de proteïnes que s'associen amb el macrocomplex implicat en el processament dels microARNs anomenat *Microprocessor complex*, que principalment està format per una ARNasa del

tipus III de les endonucleases anomenada Drosha (o també RN3) i una proteïna que conté dominis d'unió a l'ARN de doble cadena anomenada DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) (Gregory et al. 2004, Filipowicz et al. 2008). Tot i que sembla que a les cèl·lules animals la TDP-43 participaria en la part del procés de maduració d'aquests microARNs que es produeix al citoplasma conjuntament amb una altra ARNasa del tipus III anomenada Dicer (Chendrimada et al. 2005, Filipowicz et al. 2008), creiem que segurament quan la TDP-43 queda atrapada als agregats proteics de les MFM tampoc pot continuar realitzant aquesta funció.

S'ha descrit que els microARNs regulen l'expressió gènica i la diferenciació cel·lular de molts teixits i també del múscul, ja sigui durant el seu desenvolupament com en condicions patològiques (Callis et al. 2007, Chen et al. 2009). Fins i tot ja se'n han identificat alguns que són específics del múscul, com per exemple el microARN-206 (McCarthy 2008); a la vegada que s'està començant a descriure la seva implicació en diverses patologies musculars primàries com són la distròfia muscular o la hipertròfia cardíaca (Chen et al. 2009). Ara per ara no sabem la implicació que podria tenir a les MFM i a les IBM la possible alteració de la maduració dels microARNs a causa d'una hipotètica pèrdua de funció de la TDP-43, però és un camp per explorar molt novedós, on a més s'obre la possibilitat d'entendre la relació, moltes vegades no equivalent, entre els nivells de ARNm d'una proteïna i la quantitat d'aquesta proteïna que s'expressa finalment.

Referent a aquest tema cal destacar que als subtipus de les MFM estudiades en aquest treball, les miotilinopaties i les desminopaties, l'augment dels nivells de les principals proteïnes que s'hi troben acumulades no és degut a un augment de l'expressió dels seus gens. Això ho vam comprovar tan per la desmina i la miotilina (proteïnes que es troben mutades a les desminopaties i a les miotilinopaties respectivament), com per la TDP-43 (els nivells d'ARNm de la qual també van ser mesurats a les mostres de IBM esporàdiques) (resultats annexos 7.4). Els nostres resultats són molt similars als obtinguts al estudiar els nivells d'expressió dels gens relacionats amb algunes d'aquestes proteïnes (desmina i miotilina) i d'altres que també apareixen acumulades a les mostres d'IBM hereditàries i de MFM de mutació no especificada (Raju et al. 2007). Mentre que a les mostres de FTLD-U amb o sense afectació de les motoneurons s'han trobat augments de l'expressió de la TDP-43, tot i que aquests no són gaire elevats (Mishra et al. 2007). A més, el fet que els nivells d'expressió de la TDP-43 tampoc es trobin alterats a les MFM, de la mateixa manera que no ho estan els de la desmina i la miotilina, reforça les hipòtesis que relacionen

aquestes patologies amb disfuncions dels sistemes de degradació proteica. Tot i que no deixa de sorprendre que davant de la producció de proteïnes mutades (que en principi són menys funcionals), la cèl·lula no respongui augmentant-ne la seva producció; a la vegada que s'obre l'interrogant de si podrien trobar-se activats mecanismes capaços d'atenuar-ne la seva expressió.

4.3.2 Tau

Una altra de les proteïnes que també podem trobar als agregats de les MFM és la proteïna tau fosforilada, fet que no és una novetat ja que fa temps que en tenim constància (Ferrer et al. 2004). Al cinquè i últim treball inclòs en aquesta tesi, tot i que es troba a l'apartat dels resultats annexos (7.5), es presenten els resultats obtinguts al intentar aprofundir en la caracterització de la proteïna tau que ara podem afirmar que també s'expressa al teixit muscular esquelètic.

Tot i que molts aspectes d'aquest últim treball queden sense resoldre, es plantegen una sèrie de qüestions que em semblen interessants de discutir, sobretot pensant amb coses que es podrien fer o tenir en compte en futurs estudis de les MFM. A més, com que l'acumulació de la proteïna tau és una altra de les característiques que comparteixen les MFM i les IBM, i en aquesta segona patologia el seu estudi és molt més extens (Askanas et al. 1994, Murakami et al. 1995a, Askanas et al. 1996, Mirabella et al. 1996, Maurage et al. 2004), també se'n inclouen mostres a l'estudi amb propòsits comparatius.

Per començar trobo important reafirmar que no tenim cap dubte que la proteïna tau s'expressa al teixit muscular tan en condicions fisiològiques com en patològiques, ja que n'hem detectat el seu ARNm a totes les mostres analitzades en aquest estudi. Aquesta detecció s'ha realitzat mitjançant una sonda TaqMan que és capaç de detectar les 6 isoformes que es troben al SNC, ja que els encebadors que inclou reconeixen una regió d'unió entre dos exons que es troba a la part final de les seves seqüències. A més molt possiblement aquesta sonda també pot reconèixer la isoforma d'elevat pes molecular de la tau que fins ara s'ha considerat específica del SNP; ja que aquesta isoforma es diferencia de les isoformes petites perquè inclou dos exons "extra" enmig de la regió amino-terminal de la seva seqüència (l'exó 4B i l'exó 6) que les isoformes del SNC no presenten, i en canvi sí que comparteixen la regió final de la seva seqüència (Couchie et al. 1992, Goedert et al. 1992).

Una altra de les maneres d'aprofundir en la caracterització de la tau present al múscul és ampliant la llista d'anticossos utilitzats per tal de reconèixer-la, i sobretot, incloent anticossos que reconeixen també la tau sense fosforilar (ex. tau 46). A nivell immunohistoquímic s'observa que aquests anticossos marquen de manera més o menys parcial els agregats proteics que trobem tan a les miotilinopaties com a les desminopaties. Una altra vegada el marcatge observat a les miotilinopaties és més intens que el que es troba a les desminopaties, de la mateixa manera que passa amb molts d'altres marcadors. D'altra banda, alguns dels anticossos com són els de la tau fosforilada a la Ser 396 i el PHF1 semblen reconèixer també zones del sarcolemma o pròximes a aquest, i fins i tot estructures membranoses que es troben pròximes als agregats i que potser podrien ser vacuoles autofàgiques. Aquest fet resulta força sorprenent ja que la tau és una proteïna que en condicions normals es troba associada als microtúbuls on exerceix una funció estabilitzadora de la seva polimerització (Weingarten et al. 1975).

Per tant, la primera necessitat que apareix és la de descriure quines són les isoformes de la proteïna tau que es troben al teixit muscular i si aquestes són iguals o diferents de les que es troben al SNC i al SNP, per tal de poder interpretar de manera més fiable els resultats que obtenim quan treballem amb anticossos i sondes TaqMan dissenyades per a l'estudi de les isoformes descrites al sistema nerviós.

L'aproximació més semblat que hem pogut fer en aquest sentit ha estat mirar quins patrons de bandes reconeixen els diferents anticossos de la tau i la tau fosforilada als homogenats totals dels diferents casos. Donada la limitació de quantitat de mostra que suposa treballar amb biòpsies musculars humanes, no s'ha pogut ni plantejar la possibilitat d'adaptar el protocol que tenim per a mostres de cervell per obtenir una fracció de la mostra enriquida amb PHF (*paired helical filaments*). Fet que segurament ha dificultat que poguéssim corroborar els resultats que han obtingut altres grups a partir de mostres d'IBM, els quals observen un doblet d'isoformes de la tau al múscul al voltant dels 60-62kDa o 66-68kDa (Mirabella et al. 1996, Maurage et al. 2004). Aquests mateixos grups també observen una banda d'elevat pes molecular al voltant de 110kDa, però la descarten sense fer més proves ja que ho consideren una contaminació del possible SNP que es pugui trobar a la mostra. No és la primera vegada que es detecta aquesta banda d'elevat pes molecular de la proteïna tau al teixit muscular, ja sigui humà o de rata (Lübke et al. 1994, Gu et al. 1996), però sembla que hi ha certa resistència a acceptar que aquesta isoforma anomenada *big tau* podria no ser específica del SNP. Treballant en aquesta mateixa línia vam voler estudiar-ne la

presència als homogenats totals de cèl·lules C2C12 (mioblasts de ratolí), les qual van ser homogeneïtzades amb el mateix tampó utilitzat per a les mostres de teixit i corregudes en paral·lel a la resta de mostres. D'aquesta manera també vam poder detectar una banda d'elevat pes molecular de la proteïna tau en mioblasts de ratolí, tot i que amb un pes molecular lleugerament inferior (100kDa) i sense presentar la forma de doblet que s'observa a les mostres de teixit. D'altra banda també vam intentar aïllar-la a partir de la separació de proteïnes en gels bidimensionals tan de mostres de teixit com de cèl·lules C2C12, per tal d'identificar-la mitjançant l'espectrometria de masses i així tenir la prova definitiva de la presència d'una isoforma d'elevat pes molecular de la proteïna tau al teixit muscular. Però de nou, la impossibilitat d'enriquir la mostra amb una fracció de PHF insolubles i la poca quantitat de mostra disponible no ho van fer possible.

La facilitat amb que es detecta aquest doblet d'elevat pes molecular tan a les mostres control com a les patològiques mitjançant diferents anticossos contra la tau fosforilada i sense fosforilar (excepte l'anticòs contra la tau fosforilada a la Ser 262), i només a partir d'homogenats totals de les mostres, fa pensar que segurament aquesta podria ser la isoforma més abundant de la tau al múscul, tal com ja s'ha demostrat en els teixits musculars esquelètic i cardíac de la rata (Gu et al. 1996). En aquest mateix treball on s'estudia la presència de la tau a diferents teixits de la rata també es comenta que al teixit muscular esquelètic es troben dues bandes d'elevat pes molecular d'aquesta proteïna, una de 120kDa i l'altra a 110kDa que després de ser defosforilades passen a ser de 110 i 100kDa (Gu et al. 1996). A més també s'hi comenta que als teixits on l'expressió de la *big* tau és abundant, com és al teixit muscular esquelètic de la rata, aquesta sovint apareix fosforilada a la Ser 396 (Gu et al. 1996). Els nostres resultats són molt similars als obtinguts en aquest treball, ja que els anticossos que reconeixen un doblet amb un pes molecular al voltant dels 120kDa a les nostres mostres control i patològiques de teixit muscular esquelètic humà són l'anticòs tau 46, el de la tau fosforilada a la Ser 396 i el PHF1. Se sap que l'epítot que reconeix l'anticòs PHF1 correspon a la meitat carboxi-terminal de la proteïna, part que també reconeix l'anticòs tau 46 (l'epítot del qual inclou els aminoàcids 404-441 de la tau humana), i que a més també inclou l'epítot de la tau fosforilada a la Ser 396/404 (Otvos et al. 1994, Maas et al. 2000).

Tot i que les mostres patològiques (miotilínopaties, desminopaties i IBM) mostren una tendència clara a l'increment del grau de fosforilació d'aquesta isoforma de la tau, no sabem si això es tradueix o no en una alteració del grau d'estabilització dels

microtúbuls del múscul, ja que la funció d'aquests en aquest teixit és encara poc coneguda (Clark et al. 2002). El que sí que se sap és que existeixen proteïnes específiques del múscul, com la MURF-2 i la MURF-3, que tenen un paper estabilitzador dels microtúbuls del múscul, i d'altres com la MAP4 que es creu que hi podrien col·laborar (McElhinny et al. 2004). D'altra banda se sap que l'alteració de la dinàmica dels microtúbuls pot tenir serioses conseqüències també al teixit muscular, com els passa a alguns malalts de càncer que han estat tractats amb colxicina (agent inhibidor de la polimerització dels microtúbuls) que desenvolupen un tipus de miopatia caracteritzada per l'acumulació de lisosomes anomenada miopatia de la colxicina (Kuncl et al. 2003, Sieb et al. 2003). L'observació que els microtúbuls del múscul podrien estar implicats en el sistema de transport intracel·lular de la via endosomal i lisosomal (Kuncl et al. 2003), com la seva implicació en la formació dels agrosomes (Johnston et al. 1998, Johnston et al. 2002); estructura que a més ha estat relacionada amb la possible activació dels mecanismes d'autofagia (Bjorkoy et al. 2006, Pankiv et al. 2007); són característiques que lliguen la implicació que podria tenir l'alteració de la xarxa dels microtúbuls a malalties com les MFM i les IBM, que també presenten l'acumulació de vacuoles autofàgiques com una altra de les seves característiques histopatològiques comunes (Selcen et al. 2004a, Dalakas 2006).

Finalment de les diferents quinases que se sap que fosforilen la tau a la Ser 396/404 *in vitro*, que són la MAPK (MAP quinasa ERK1/ERK2) i la GSK3 β (Biernat et al. 1993, Godemann et al. 1999), hem trobat que només la GSK3 β presenta una marcada immunoreactivitat pels agregats proteïcs que trobem tan a les mostres de les miotilinopaties i les desminopaties com a les d'IBM. En aquesta última ja s'havia descrit anteriorment la implicació de l'activitat de la GSK3 β en la fosforilació de la tau (Kitazawa et al. 2008). D'altra banda el marcatge de la suposada forma inactiva d'aquest enzim (GSK3 β fosforilada a la Ser 9) és molt més intens que el de la GSK3 total (α i β). Però com que al fer el ratio de la GSK3 β fosforilada a la Ser 9 respecte la GSK3 β total a partir dels resultats obtinguts per western blot, ens dóna una tendència a la baixa (tot i que només és estadísticament significativa a les mostres d'IBM que presenten molta menys variabilitat que les de les MFM); i el fet que també trobem un intens marcatge dels agregats per la xaperona 14-3-3 a totes les nostres mostres (resultats annexos 7.6), la qual se sap que és capaç de mantenir la capacitat de fosforilar la tau de la GSK3 β *in vitro* encara que estigui fosforilada a la Ser 9 (Yuan et al. 2004); creiem que molt possiblement la GSK3 β també és responsable de l'augment de la fosforilació de la tau que trobem a les mostres musculars de les MFM.

5. CONCLUSIONS

5. Conclusions

5.1 Modificacions per dany oxidatiu/nitratiu

- El dany proteic associat a l'estrès oxidatiu/nitratiu pot ser considerat com un dels factors patogènics que contribueix a la miodegeneració que es produeix a les MFM, primerament causada per l'expressió de proteïnes estructurals mutades.
- Aquest dany proteic, demostrat per la presència de modificacions post-translacionals a les biòpsies musculars de pacients amb desminopaties i miotilinopaties, afecta a proteïnes clau pel funcionament de les fibres musculars com és la desmina.
- La desmina no és la única proteïna afectada, ja que hi ha agregats oxidats/nitrats que només hi colocalitzen parcialment. Una de les altres proteïnes diana del dany glicoxidatiu podria ser la miotilina que també colocalitza amb algun dels seus marcadors tan a les miotilinopaties com a les desminopaties.
- La font d'aquest estrès oxidatiu/nitratiu es podria trobar a les mitocondries ja que alguns enzims associats a la producció del NO i a la regulació de l'estat redox que es localitzen a la mitocondria (eNOS i SOD2) també colocalitzen amb els agregats proteics d'ambdues patologies.

5.2 Relació entre el dany oxidatiu i els agregats proteics

- El dany oxidatiu/nitratiu apareix associat als agregats típics de les MFM, ja que s'ha establert la relació entre l'acumulació de la desmina i la seva oxidació/nitració tan si aquesta està mutada (desminopaties) com si no (miotilinopaties i desminopaties).
- Aquest dany oxidatiu/nitratiu podria ser previ a les alteracions de l'UPS associades a les malalties amb dipòsits de proteïnes, ja que s'observen agregats oxidats que encara no han estat marcats amb l'ubiquitina per a la seva posterior degradació.
- La presència als agregats proteics d'altres marcadors associats amb la disfunció del proteosoma com és la UBB⁺¹ assenyalen la incapacitat d'aquest sistema de degradació proteica per degradar aquests agregats com un dels altres mecanismes patològics implicats a les MFM.

- Altres marcadors associats a la formació de l'agresoma i a la vinculació d'aquests amb els diferents sistemes de degradació proteica, ja sigui el proteosomal com el lisosomal, com és la p62 que també trobem a les inclusions proteiques de les MFM; indiquen l'existència d'una resposta de les fibres musculars a la presència de proteïnes mal plegades, oxidades i/o nitrades i que al agregar-se no poden ser degradades per l'UPS. A la vegada que pot assenyalar la possible activació de la maquinària de l'autofagocitosi, camp que encara està per explorar a les MFM.

5.3 Altres proteïnes agregades a les MFM

- La TDP-43 que es troba agregada a les MFM no està tan ubiquitinitzada com la que es pot trobar en algunes malalties neurodegeneratives o com sí que ho estan altres proteïnes característiques dels agregats de les MFM. Aquest fet ens podria estar indicant que la seva agregació és secundària a la d'altres proteïnes que juguen un paper molt més rellevant en els esdeveniments patològics que s'hi produeixen.
- El fet de que aparegui fosforilada de la mateixa manera que ho està en algunes malalties neurodegeneratives ens indica que els mecanismes involucrats en la deslocalització de la TDP-43 del nucli i el seu anclatge als agregats proteics citoplasmàtics poden ser comuns en ambdós teixits o tipus cel·lulars.
- A més l'estudi de la seva expressió (ARNm) juntament amb la d'altres proteïnes característiques d'aquestes patologies (desmina i miotilina) reforça la idea que l'elevat nivell d'aquestes proteïnes a les MFM és degut a problemes en la seva degradació i no en l'augment de la seva producció.
- Una altra proteïna que també es troba agregada a les MFM és la tau, que s'expressa al teixit muscular tan en condicions fisiològiques com patològiques ja que es detecta a nivell de proteïna i de l'ARNm a totes les mostres musculars analitzades.
- Segurament la isoforma d'elevat pes molecular de la tau anomenada *big tau* podria no ser només específica del SNP, sinó també la isoforma més abundant de la tau al múscul esquelètic.

- A més, aquesta isoforma de la tau apareix fosforilada a la Ser 396, epítip que també reconeix l'anticòs PHF1, tan a les mostres control com a les patològiques. Tot i així, sembla que les mostres de les MFM presenten un augment d'aquesta fosforilació semblant al que presenten les mostres de les IBM, i que la GSK3 β podria ser la responsable d'aquest augment de la fosforilació a les mostres patològiques. Tot i que es desconeixen les conseqüències que aquest fet pot tenir a nivell funcional, podria estar destacant la necessitat d'un bon funcionament de la xarxa de microtúbuls també a les MFM, on processos com la formació dels agregats i l'autofagocitosi podrien ser-ne plenament dependents.

5.4. Conclusió general

- Molts dels marcadors que hem trobat associats als agregats proteics característics de les MFM als diferents treballs presentats en aquesta tesi són els mateixos que trobem en moltes malalties neurodegeneratives (marcadors d'estrès oxidatiu/nitratiu, p62, UBI⁺¹, TDP-43, tau fosforilada); fet que fa evident que ambdós teixits, SN i múscul, comparteixen molts dels mecanismes patològics associats a les malalties caracteritzades per la presència d'agregats proteics. Aquestes i d'altres característiques que comparteixen les malalties neurodegeneratives amb les MFM i d'altres PAM, com les IBM, potser farà que en un futur pròxim es defineixi d'una manera més concreta el concepte de la miodegeneració.

6. REFERÈNCIES

6. Referències:

ANDREADIS, A.; Broderick, J.A.; Kosik, K.S. Relative Exon Affinities and Suboptimal Splice Site Signals Lead to Non-Equivalence of Two Cassette Exons. *Nucleic Acids Research*, Sep 11, 1995, vol. 23, no. 17, pp. 3585-3593.

ARAI, T.; Hasegawa, M.; Akiyama, H.; Ikeda, K.; Nonaka, T.; Mori, H.; Mann, D.; Tsuchiya, K.; Yoshida, M.; Hashizume, Y.; Oda, T. TDP-43 is a Component of Ubiquitin-Positive Tau-Negative Inclusions in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20061030, Dec 22, 2006, vol. 351, no. 3, pp. 602-611.

ARIMURA, T.; Hayashi, T.; Terada, H.; Lee, S.Y.; Zhou, Q.; Takahashi, M.; Ueda, K.; Nouchi, T.; Hohda, S.; Shibutani, M.; Hirose, M.; Chen, J.; Park, J.E.; Yasunami, M.; Hayashi, H.; Kimura, A. A Cypher/ZASP Mutation Associated with Dilated Cardiomyopathy Alters the Binding Affinity to Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, 20031203, Feb 20, 2004, vol. 279, no. 8, pp. 6746-6752.

ASKANAS, V.; Engel, W.K.; Bilak, M.; Alvarez, R.B.; Selkoe, D.J. Twisted Tubulofilaments of Inclusion Body Myositis Muscle Resemble Paired Helical Filaments of Alzheimer Brain and Contain Hyperphosphorylated Tau. *The American Journal of Pathology*, Jan, 1994, vol. 144, no. 1, pp. 177-187.

ASKANAS, V.; Alvarez, R.B.; Mirabella, M.; Engel, W.K. Use of Anti-Neurofilament Antibody to Identify Paired-Helical Filaments in Inclusion-Body Myositis. *Annals of Neurology*, Mar, 1996, vol. 39, no. 3, pp. 389-391.

ASKANAS, V.; Engel, W.K.; Nogalska, A. Inclusion Body Myositis: A Degenerative Muscle Disease Associated with Intra-Muscle Fiber Multi-Protein Aggregates, Proteasome Inhibition, Endoplasmic Reticulum Stress and Decreased Lysosomal Degradation. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, Jul, 2009, vol. 19, no. 3, pp. 493-506.

ATOMI, Y.; Yamada, S.; Strohman, R.; Nonomura, Y. Alpha B-Crystallin in Skeletal Muscle: Purification and Localization. *Journal of Biochemistry*, Nov, 1991, vol. 110, no. 5, pp. 812-822.

ATOMI, Y.; Toro, K.; Masuda, T.; Hatta, H. Fiber-Type-Specific alphaB-Crystallin Distribution and its Shifts with T(3) and PTU Treatments in Rat Hindlimb Muscles. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, Apr, 2000, vol. 88, no. 4, pp. 1355-1364.

AU, Y.; Atkinson, R.A.; Guerrini, R.; Kelly, G.; Joseph, C.; Martin, S.R.; Muskett, F.W.; Pallavicini, A.; Faulkner, G.; Pastore, A. Solution Structure of ZASP PDZ Domain; Implications for Sarcomere Ultrastructure and Enigma Family Redundancy. *Structure (London, England : 1993)*, Apr, 2004, vol. 12, no. 4, pp. 611-622.

AYALA, Y. M.; Zago, P.; D'Ambrogio, A.; Xu, Y.F.; Petrucelli, L.; Buratti, E.; Baralle, F.E. Structural Determinants of the Cellular Localization and Shuttling of TDP-43. *Journal of Cell Science*, 20081028, Nov 15, 2008, vol. 121, no. Pt 22, pp. 3778-3785.

BAKER, M.; Mackenzie, I.R.; Pickering-Brown, S.M.; Gass, J.; Rademakers, R.; Lindholm, C.; Snowden, J.; Adamson, J.; Sadovnick, A.D.; Rollinson, S.; Cannon, A.; Dwosh, E.; Neary, D.; Melquist, S.; Richardson, A.; Dickson, D.; Berger, Z.; Eriksen, J.; Robinson, T.; Zehr, C.; Dickey, C.A.; Crook, R.; McGowan, E.; Mann, D.; Boeve, B.; Feldman, H.; Hutton, M. Mutations in Progranulin Cause Tau-Negative Frontotemporal Dementia Linked to Chromosome 17. *Nature*, 20060716, Aug 24, 2006, vol. 442, no. 7105, pp. 916-919.

Referències

BALLATORE, C.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q. Tau-Mediated Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Nature Reviews.Neuroscience*, Sep, 2007, vol. 8, no. 9, pp. 663-672.

BAR, H.; Strelkov, S.V.; Sjoberg, G.; Aebi, U.; Herrmann, H. The Biology of Desmin Filaments: How do Mutations Affect their Structure, Assembly, and Organisation?. *Journal of Structural Biology*, Nov, 2004, vol. 148, no. 2, pp. 137-152.

BAR, H.; Mucke, N.; Kostareva, A.; Sjoberg, G.; Aebi, U.; Herrmann, H. Severe Muscle Disease-Causing Desmin Mutations Interfere with in Vitro Filament Assembly at Distinct Stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20051010, Oct 18, 2005, vol. 102, no. 42, pp. 15099-15104.

BAR, H., Goudeau, B.; Walde, S.; Casteras-Simon, M.; Mucke, N.; Shatunov, A.; Goldberg, Y.P.; Clarke, C.; Holton, J.L.; Eymard, B.; Katus, H.A.; Fardeau, M.; Goldfarb, L.; Vicart, P.; Herrmann, H. Conspicuous Involvement of Desmin Tail Mutations in Diverse Cardiac and Skeletal Myopathies. *Human Mutation*, Apr, 2007, vol. 28, no. 4, pp. 374-386.

BAR, H., Sharma, S.; Kleiner, H.; Mucke, N.; Zentgraf, H.; Katus, H.A.; Aebi, U.; Herrmann, H. Interference of Amino-Terminal Desmin Fragments with Desmin Filament Formation. *CellMotility and the Cytoskeleton*, 20090615, Jun 15, 2009.

BARRACHINA, M.; Moreno, J.; Juves, S.; Moreno, D.; Olive, M.; Ferrer, I. Target Genes of Neuron-Restrictive Silencer Factor are Abnormally Up-Regulated in Human Myotilinopathy. *The American Journal of Pathology*, 20070906, Oct, 2007, vol. 171, no. 4, pp. 1312-1323.

BASSAGLIA, Y.; Cebrian, J.; Covan, S.; Garcia, M.; Foucrier, J. Proteasomes are Tightly Associated to Myofibrils in Mature Skeletal Muscle. *Experimental Cell Research*, Jan 15, 2005, vol. 302, no. 2, pp. 221-232.

BEAL, R. E.; Toscano-Cantaffa, D.; Young, P.; Rechsteiner, M.; Pickart, C.M. The Hydrophobic Effect Contributes to Polyubiquitin Chain Recognition. *Biochemistry*, Mar 3, 1998, vol. 37, no. 9, pp. 2925-2934.

BECHET, D.; Tassa, A.; Taillandier, D.; Combaret, L.; Attaix, D. Lysosomal Proteolysis in Skeletal Muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 20050323, Oct, 2005, vol. 37, no. 10, pp. 2098-2114.

BECKMAN, J. S.; Koppenol, W.H. Nitric Oxide, Superoxide, and Peroxynitrite: The Good, the Bad, and Ugly. *The American Journal of Physiology*, Nov, 1996, vol. 271, no. 5 Pt 1, pp. C1424-37.

BENAJIBA, L.; Le Ber, I.; Camuzat, A.; Lacoste, M.; Thomas-Anterion, C.; Couratier, P.; Legallic, S.; Salachas, F.; Hannequin, D.; Decousus, M.; Lacomblez, L.; Guedj, E.; Golfier, V.; Camu, W.; Dubois, B.; Campion, D.; Meininger, V.; Brice, A.; French Clinical and Genetic Research Network on Frontotemporal Lobar Degeneration/Frontotemporal Lobar Degeneration with Motoneuron Disease. TARDBP Mutations in Motoneuron Disease with Frontotemporal Lobar Degeneration. *Annals of Neurology*, Apr, 2009, vol. 65, no. 4, pp. 470-473.

BENNARDINI, F.; Wrzosek, A.; Chiesi, M. Alpha B-Crystallin in Cardiac Tissue. Association with Actin and Desmin Filaments. *Circulation Research*, Aug, 1992, vol. 71, no. 2, pp. 288-294.

BIERNAT, J.; Gustke, N.; Drewes, G.; Mandelkow, E.M.; Mandelkow, E. Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-Like Immunoreactivity and Microtubule Binding. *Neuron*, Jul, 1993, vol. 11, no. 1, pp. 153-163.

BJORKOY, G.; Lamark, T.; Johansen, T. P62/SQSTM1: A Missing Link between Protein Aggregates and the Autophagy Machinery. *Autophagy*, 20060414, Apr-Jun, 2006, vol. 2, no. 2, pp. 138-139.

BOELENS, W. C.; Croes, Y.; de Ruwe, M.; de Reu, L.; de Jong, W.W. Negative Charges in the C-Terminal Domain Stabilize the alphaB-Crystallin Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, Oct 23, 1998, vol. 273, no. 43, pp. 28085-28090.

BORRONI, B.; Bonvicini, C.; Alberici, A.; Buratti, E.; Agosti, C.; Archetti, S.; Papetti, A.; Stuani, C.; Di Luca, M.; Gennarelli, M.; Padovani, A. Mutation within TARDBP Leads to Frontotemporal Dementia without Motor Neuron Disease. *Human Mutation*, 20090804, Aug 4, 2009.

BOVA, M. P.; Yaron, O.; Huang, Q.; Ding, L.; Haley, D.A.; Stewart, P.L.; Horwitz, J. Mutation R120G in alphaB-Crystallin, which is Linked to a Desmin-Related Myopathy, Results in an Irregular Structure and Defective Chaperone-Like Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, May 25, 1999, vol. 96, no. 11, pp. 6137-6142.

BRADY, J. P.; Garland, D.L.; Green, D.E.; Tamm, E.R.; Giblin, F.J.; Wawrousek, E.F. AlphaB-Crystallin in Lens Development and Muscle Integrity: A Gene Knockout Approach. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Nov, 2001, vol. 42, no. 12, pp. 2924-2934.

BRAKENHOFF, R. H.; Guerts van Kessel, A.H.; Oldenburg, M.; Wijnen, J.T.; Bloemendal, H.; Meera Khan, P.; Schoenmakers, J.G. Human Alpha B-Crystallin (CRYA2) Gene Mapped to Chromosome 11q12-q23. *Human Genetics*, Jul, 1990, vol. 85, no. 2, pp. 237-240.

BROOKS, P.; Fuertes, G.; Murray, R.Z.; Bose, S.; Knecht, E.; Rechsteiner, M.C.; Hendil, K.B.; Tanaka, K.; Dyson, J.; Rivett, J. Subcellular Localization of Proteasomes and their Regulatory Complexes in Mammalian Cells. *The Biochemical Journal*, Feb 15, 2000, vol. 346 Pt 1, pp. 155-161.

BUCHWALOW, I. B.; Minin, E.A.; Muller, F.U.; Lewin, G.; Samoilova, V.E.; Schmitz, W.; Wellner, M.; Hasselblatt, M.; Punkt, K.; Muller-Werdan, U.; Demus, U.; Slezak, J.; Koehler, G.; Boecker, W. Nitric Oxide Synthase in Muscular Dystrophies: A Re-Evaluation. *Acta Neuropathologica*, 20060509, Jun, 2006, vol. 111, no. 6, pp. 579-588.

BURATTI, E.; Baralle, F.E. Multiple Roles of TDP-43 in Gene Expression, Splicing Regulation, and Human Disease. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 20080101, Jan 1, 2008, vol. 13, pp. 867-878.

BURKHARD, P.; Stetefeld, J.; Strelkov, S.V. Coiled Coils: A Highly Versatile Protein Folding Motif. *Trends in Cell Biology*, Feb, 2001, vol. 11, no. 2, pp. 82-88. I

CALLIS, T. E.; Chen, J.F.; Wang, D.Z. MicroRNAs in Skeletal and Cardiac Muscle Development. *DNA and Cell Biology*, Apr, 20 07, vol. 26, no. 4, pp. 219-225.

CAPETANAKI, Y.; Bloch, R.J.; Kouloumenta, A.; Mavroidis, M.; Psarras, S. Muscle Intermediate Filaments and their Links to Membranes and Membranous Organelles. *Experimental Cell Research*, 20070403, Jun 10, 2007, vol. 313, no. 10, pp. 2063-2076.

CARVER, J. A.; Lindner, R.A. NMR Spectroscopy of Alpha-Crystallin. Insights into the Structure, Interactions and Chaperone Action of Small Heat-Shock Proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, May-Jun, 1998, vol. 22, no. 3-4, pp. 197-209.

CHEN, J. F.; Callis, T.E.; Wang, D.Z. MicroRNAs and Muscle Disorders. *Journal of Cell Science*, Jan 1, 2009, vol. 122, no. Pt 1, pp. 13-20.

Referències

CHENDRIMADA, T. P.; Gregory, R.I.; Kumaraswamy, E.; Norman, J.; Cooch, N.; Nishikura, K.; Shiekhattar, R. TRBP Recruits the Dicer Complex to Ago2 for microRNA Processing and Gene Silencing. *Nature*, 20050622, Aug 4, 2005, vol. 436, no. 7051, pp. 740-744.

CLAEYS, K. G.; Fardeau, M.; Schroder, R.; Suominen, T.; Tolksdorf, K.; Behin, A.; Dubourg, O.; Eymard, B.; Maisonobe, T.; Stojkovic, T.; Faulkner, G.; Richard, P.; Vicart, P.; Udd, B.; Voit, T.; Stoltenburg, G. Electron Microscopy in Myofibrillar Myopathies Reveals Clues to the Mutated Gene. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 20080723, Aug, 2008, vol. 18, no. 8, pp. 656-666.

CLAEYS, K. G.; van der Ven, P.F.; Behin, A.; Stojkovic, T.; Eymard, B.; Dubourg, O.; Laforet, P.; Faulkner, G.; Richard, P.; Vicart, P.; Romero, N.B.; Stoltenburg, G.; Udd, B.; Fardeau, M.; Voit, T.; Furst, D.O. Differential Involvement of Sarcomeric Proteins in Myofibrillar Myopathies: A Morphological and Immunohistochemical Study. *Acta Neuropathologica*, 20090117, Mar, 2009, vol. 117, no. 3, pp. 293-307.

CLARK, K. A., McElhinny, A.S.; Beckerle, M.C.; Gregorio, C.C. Striated Muscle Cytoarchitecture: An Intricate Web of Form and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20020402, 2002, vol. 18, pp. 637-706.

CORRADO, L.; Ratti, A.; Gellera, C.; Buratti, E.; Castellotti, B.; Carlomagno, Y.; Ticozzi, N.; Mazzini, L.; Testa, L.; Taroni, F.; Baralle, F.E.; Silani, V.; D'Alfonso, S. High Frequency of TARDBP Gene Mutations in Italian Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Human Mutation*, Apr, 2009, vol. 30, no. 4, pp. 688-694.

COUCHIE, D.; Mavilia, C.; Georgieff, I.S.; Liem, R.K.; Shelanski, M.L.; Nunez, J. Primary Structure of High Molecular Weight Tau Present in the Peripheral Nervous System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, May 15, 1992, vol. 89, no. 10, pp. 4378-4381.

COUX, O.; Tanaka, K.; Goldberg, A.L. Structure and Functions of the 20S and 26S Proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 1996, vol. 65, pp. 801-847.

CRISP, M.; Liu, Q.; Roux, K.; Rattner, J.B.; Shanahan, C.; Burke, B.; Stahl, P.D.; Hodzic, D. Coupling of the Nucleus and Cytoplasm: Role of the LINC Complex. *The Journal of Cell Biology*, 20051227, Jan 2, 2006, vol. 172, no. 1, pp. 41-53.

CRUTS, M.; Gijssels, I.; van der Zee, J.; Engelborghs, S.; Wils, H.; Pirici, D.; Rademakers, R.; Vandenberghe, R.; Dermaut, B.; Martin, J.J.; van Duijn, C.; Peeters, K.; Sciot, R.; Santens, P.; De Pooter, T.; Mattheijssens, M.; Van den Broeck, M.; Cuijt, I.; Vennekens, K.; De Deyn, P.P.; Kumar-Singh, S.; Van Broeckhoven, C. Null Mutations in Progranulin Cause Ubiquitin-Positive Frontotemporal Dementia Linked to Chromosome 17q21. *Nature*, 20060716, Aug 24, 2006, vol. 442, no. 7105, pp. 920-924.

DAGVADORJ, A.; Olive, M.; Urtizberea, J.A.; Halle, M.; Shatunov, A.; Bonnemant, C.; Park, K.Y.; Goebel, H.H.; Ferrer, I.; Vicart, P.; Dalakas, M.C.; Goldfarb, L.G. A Series of West European Patients with Severe Cardiac and Skeletal Myopathy Associated with a De Novo R406W Mutation in Desmin. *Journal of Neurology*, Feb, 2004, vol. 251, no. 2, pp. 143-149.

DALAKAS, M. C.; Park, K.Y.; Semino-Mora, C.; Lee, H.S.; Sivakumar, K.; Goldfarb, L.G. Desmin Myopathy, a Skeletal Myopathy with Cardiomyopathy Caused by Mutations in the Desmin Gene. *The New England Journal of Medicine*, Mar 16, 2000, vol. 342, no. 11, pp. 770-780.

DALAKAS, M.C. Sporadic inclusion body myositis: diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 2006, vol 2, no. 8, pp. 437-447.

DALKILIC, I.;Schienda, J.; Thompson, T.G.; Kunkel, L.M. Loss of FilaminC (FLNc) Results in Severe Defects in Myogenesis and Myotube Structure. *Molecular and Cellular Biology*, Sep, 2006, vol. 26, no. 17, pp. 6522-6534.

DALLE-DONNE, I.; Aldini, G.; Carini, M.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A. Protein Carbonylation, Cellular Dysfunction, and Disease Progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Apr-Jun, 2006, vol. 10, no. 2, pp. 389-406.

DAOUD, H.; Valdmanis, P.N.; Kabashi, E.; Dion, P.; Dupre, N.; Camu, W.; Meininger, V.; Rouleau, G.A. Contribution of TARDBP Mutations to Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Medical Genetics*, 20081017, Feb, 2009, vol. 46, no. 2, pp. 112-114.

DAVIES, M. J.; Fu, S.; Wang, H.; Dean, R.T. Stable Markers of Oxidant Damage to Proteins and their Application in the Study of Human Disease. *Free Radical Biology & Medicine*, Dec, 1999, vol. 27, no. 11-12, pp. 1151-1163.

DAVIES, K. J. Degradation of Oxidized Proteins by the 20S Proteasome. *Biochimie*, Mar-Apr, 2001, vol. 83, no. 3-4, pp. 301-310.

DAVIES, K. J.; Shringarpure, R. Preferential Degradation of Oxidized Proteins by the 20S Proteasome may be Inhibited in Aging and in Inflammatory Neuromuscular Diseases. *Neurology*, Jan 24, 2006, vol. 66, no. 2 Suppl 1, pp. S93-6.

DE BLEECKER, J. L.; Engel, A.G.; Ertl, B.B. Myofibrillar Myopathy with Abnormal Foci of Desmin Positivity. II. Immunocytochemical Analysis Reveals Accumulation of Multiple Other Proteins. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, May, 1996, vol. 55, no. 5, pp. 563-577.

DE JONG, W. W.; Leunissen, J.A.; Voorter, C.E. Evolution of the Alpha-crystallin/small Heat-Shock Protein Family. *Molecular Biology and Evolution*, Jan, 1993, vol. 10, no. 1, pp. 103-126.

DE PRIL, R.; Fischer, D.F.; van Leeuwen, F.W. Conformational Diseases: An Umbrella for various Neurological Disorders with an Impaired Ubiquitin-Proteasome System. *Neurobiology of Aging*, 20051013, Apr, 2006, vol. 27, no. 4, pp. 515-523.

DE VRIJ, F. M.; Sluijs, J.A.; Gregori, L.; Fischer, D.F.; Hermens, W.T.; Goldgaber, D.; Verhaagen, J.; Van Leeuwen, F.W.; Hol, E.M. Mutant Ubiquitin Expressed in Alzheimer's Disease Causes Neuronal Death. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Dec, 2001, vol. 15, no. 14, pp. 2680-2688.

DEHMELT, L.; Halpain,S. The MAP2/Tau Family of Microtubule-Associated Proteins. *Genome Biology*, 20041223, 2005, vol. 6, no. 1, pp. 204.

DEL BO, R.; Ghezzi, S.; Corti, S.; Pandolfo, M.; Ranieri, M.; Santoro, D.; Ghione, I.; Prella, A.; Orsetti, V.; Mancuso, M.; Soraru, G.; Briani, C.; Angelini, C.; Siciliano, G.; Bresolin, N.; Comi, G.P. TARDBP (TDP-43) Sequence Analysis in Patients with Familial and Sporadic ALS: Identification of Two Novel Mutations. *European Journal of Neurology : The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 20090219, Jun, 2009, vol. 16, no. 6, pp. 727-732.

DJABALI, K.; de Nechaud, B.; Landon, F.; Portier, M.M. AlphaB-Crystallin Interacts with Intermediate Filaments in Response to Stress. *Journal of Cell Science*, Nov, 1997, vol. 110 (Pt 21), no. Pt 21, pp. 2759-2769.

Referències

DORMANN, D.; Capell, A.; Carlson, A.M.; Shankaran, S.S.; Rodde, R.; Neumann, M.; Kremmer, E.; Matsuwaki, T.; Yamanouchi, K.; Nishihara, M.; Haass, C. Proteolytic Processing of TAR DNA Binding Protein-43 by Caspases Produces C-Terminal Fragments with Disease Defining Properties Independent of Progranulin. *Journal of Neurochemistry*, 20090609, Aug, 2009, vol. 110, no. 3, pp. 1082-1094.

ECROYD, H.; Carver, J.A. Crystallin Proteins and Amyloid Fibrils. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, Jan, 2009, vol. 66, no. 1, pp. 62-81.

ESPOSITO, L. A.; Melov, S.; Panov, A.; Cottrell, B.A.; Wallace, D.C. Mitochondrial Disease in Mouse Results in Increased Oxidative Stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Apr 27, 1999, vol. 96, no. 9, pp. 4820-4825.

FABUNMI, R. P.; Wigley, W.C.; Thomas, P.J.; DeMartino, G.N. Activity and Regulation of the Centrosome-Associated Proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, Jan 7, 2000, vol. 275, no. 1, pp. 409-413.

FAULKNER, G.; Pallavicini, A.; Formentin, E.; Comelli, A.; Ievolella, C.; Trevisan, S.; Bortoletto, G.; Scannapieco, P.; Salamon, M.; Mouly, V.; Valle, G.; Lanfranchi, G. ZASP: A New Z-Band Alternatively Spliced PDZ-Motif Protein. *The Journal of Cell Biology*, Jul 26, 1999, vol. 146, no. 2, pp. 465-475.

FAULKNER, G.; Pallavicini, A.; Comelli, A.; Salamon, M.; Bortoletto, G.; Ievolella, C.; Trevisan, S.; Kojic', S.; Dalla Vecchia, F.; Laveder, P.; Valle, G.; Lanfranchi, G. FATZ, a Filamin-, Actinin-, and Telethonin-Binding Protein of the Z-Disc of Skeletal Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, Dec 29, 2000, vol. 275, no. 52, pp. 41234-41242.

FAULKNER, G.; Lanfranchi, G.; Valle, G. Telethonin and Other New Proteins of the Z-Disc of Skeletal Muscle. *IUBMB Life*, May, 2001, vol. 51, no. 5, pp. 275-282.

FERRER, I.; Martin, B.; Castano, J.G.; Lucas, J.J.; Moreno, D.; Olive, M. Proteasomal Expression, Induction of Immunoproteasome Subunits, and Local MHC Class I Presentation in Myofibrillar Myopathy and Inclusion Body Myositis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, May, 2004, vol. 63, no. 5, pp. 484-498.

FERRER, I.; Carmona, M.; Blanco, R.; Moreno, D.; Torrejon-Escribano, B.; Olive, M. Involvement of Clusterin and the Aggresome in Abnormal Protein Deposits in Myofibrillar Myopathies and Inclusion Body Myositis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, Apr, 2005a, vol. 15, no. 2, pp. 101-108.

FERRER, I.; Gomez-Isla, T.; Puig, B.; Freixes, M.; Ribe, E.; Dalfo, E.; Avila, J. Current Advances on Different Kinases Involved in Tau Phosphorylation, and Implications in Alzheimer's Disease and Tauopathies. *Current Alzheimer Research*, Jan, 2005b, vol. 2, no. 1, pp. 3-18.

FERRER, I.; and Olive, M. Molecular Pathology of Myofibrillar Myopathies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 20080903, Sep 3, 2008, vol. 10, pp. e25.

FILIPOWICZ, W.; Bhattacharyya, S.N.; Sonenberg, N. Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by microRNAs: Are the Answers in Sight?. *Nature Reviews. Genetics*, Feb, 2008, vol. 9, no. 2, pp. 102-114.

FINK, A. L. Protein Aggregation: Folding Aggregates, Inclusion Bodies and Amyloid. *Folding & Design*, 1998, vol. 3, no. 1, pp. R9-23.

FINKEL, T.; and Holbrook, N. J. Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. *Nature*, Nov 9, 2000, vol. 408, no. 6809, pp. 239-247.

FISCHER, D. F.; De Vos, R.A.; Van Dijk, R.; De Vrij, F.M.; Proper, E.A.; Sonnemans, M.A.; Verhage, M.C.; Sluijs, J.A.; Hobo, B.; Zouambia, M.; Steur, E.N.; Kamphorst, W.; Hol, E.M.; Van Leeuwen, F.W. Disease-Specific Accumulation of Mutant Ubiquitin as a Marker for Proteasomal Dysfunction in the Brain. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Nov, 2003, vol. 17, no. 14, pp. 2014-2024.

FONTAINE, J. M.; Sun, X.; Benndorf, R.; Welsh, M.J. Interactions of HSP22 (HSPB8) with HSP20, alphaB-Crystallin, and HSPB3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20051003, Nov 25, 2005, vol. 337, no. 3, pp. 1006-1011.

FORMAN, M. S.; Farmer, J.; Johnson, J.K.; Clark, C.M.; Arnold, S.E.; Coslett, H.B.; Chatterjee, A.; Hurtig, H.I.; Karlawish, J.H.; Rosen, H.J.; Van Deerlin, V.; Lee, V.M.; Miller, B.L.; Trojanowski, J.Q.; Grossman, M. Frontotemporal Dementia: Clinicopathological Correlations. *Annals of Neurology*, Jun, 2006, vol. 59, no. 6, pp. 952-962.

FORMAN, M. S.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. TDP-43: A Novel Neurodegenerative Proteinopathy. *Current Opinion in Neurobiology*, 20071023, Oct, 2007, vol. 17, no. 5, pp. 548-555.

FOROUD, T.; Pankratz, N.; Batchman, A.P.; Pauciulo, M.W.; Vidal, R.; Miravalle, L.; Goebel, H.H.; Cushman, L.J.; Azzarelli, B.; Horak, H.; Farlow, M.; Nichols, W.C. A Mutation in Myotilin Causes Spheroid Body Myopathy. *Neurology*, Dec 27, 2005, vol. 65, no. 12, pp. 1936-1940.

FRATTA, P.; Engel, W.K.; Van Leeuwen, F.W.; Hol, E.M.; Vattemi, G.; Askanas, V. Mutant Ubiquitin UBB+1 is Accumulated in Sporadic Inclusion-Body Myositis Muscle Fibers. *Neurology*, Sep 28, 2004, vol. 63, no. 6, pp. 1114-1117.

FRENCH, B. A.; van Leeuwen, F.; Riley, N.E.; Yuan, Q.X.; Bardag-Gorce, F.; Gaal, K.; Lue, Y.H.; Marceau, N.; French, S.W. Aggresome Formation in Liver Cells in Response to Different Toxic Mechanisms: Role of the Ubiquitin-Proteasome Pathway and the Frameshift Mutant of Ubiquitin. *Experimental and Molecular Pathology*, Dec, 2001, vol. 71, no. 3, pp. 241-246.

FREY, N.; Richardson, J. A.; Olson, E. N. Calsarcins, a Novel Family of Sarcomeric Calcineurin-Binding Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dec 19, 2000, vol. 97, no. 26, pp. 14632-14637.

FREY, N.; and Olson, E. N. Calsarcin-3, a Novel Skeletal Muscle-Specific Member of the Calsarcin Family, Interacts with Multiple Z-Disc Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 20020212, Apr 19, 2002, vol. 277, no. 16, pp. 13998-14004.

FUCHS, E.; Weber, K. Intermediate Filaments: Structure, Dynamics, Function, and Disease. *Annual Review of Biochemistry*, 1994, vol. 63, pp. 345-382.

FURST, D. O.; Osborn, M.; Weber, K. Myogenesis in the Mouse Embryo: Differential Onset of Expression of Myogenic Proteins and the Involvement of Titin in Myofibril Assembly. *The Journal of Cell Biology*, Aug, 1989, vol. 109, no. 2, pp. 517-527.

GARIBOLDI, M.; Maestrini, E.; Canzian, F.; Manenti, G.; De Gregorio, L.; Rivella, S.; Chatterjee, A.; Herman, G.E.; Archidiacono, N.; Antonacci, R. Comparative Mapping of the Actin-Binding Protein 280 Genes in Human and Mouse. *Genomics*, May 15, 1994, vol. 21, no. 2, pp. 428-430.

GARVEY, S. M.; Miller, S.E.; Claflin, D.R.; Faulkner, J.A.; Hauser, M.A. Transgenic Mice Expressing the Myotilin T57I Mutation Unite the Pathology Associated with LGMD1A and MFM. *Human Molecular Genetics*, 20060626, Aug 1, 2006, vol. 15, no. 15, pp. 2348-2362.

GARVEY, S. M.; Liu, Y.; Miller, S.E.; Hauser, M.A. Myotilin Overexpression Enhances Myopathology in the LGMD1A Mouse Model. *Muscle & Nerve*, May, 2008, vol. 37, no. 5, pp. 663-667.

Referències

GEETHA, T.; and Wooten, M. W. Structure and Functional Properties of the Ubiquitin Binding Protein p62. *FEBS Letters*, Feb 13, 2002, vol. 512, no. 1-3, pp. 19-24.

GEISLER, N.; Kaufmann, E.; Weber, K. Proteinchemical Characterization of Three Structurally Distinct Domains Along the Protofilament Unit of Desmin 10 Nm Filaments. *Cell*, Aug, 1982, vol. 30, no. 1, pp. 277-286.

GHOSH, J. G.; Clark, J. I. Insights into the Domains Required for Dimerization and Assembly of Human alphaB Crystallin. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, Mar, 2005a, vol. 14, no. 3, pp. 684-695.

GHOSH, J. G.; Estrada, M. R.; Clark, J. I. Interactive Domains for Chaperone Activity in the Small Heat Shock Protein, Human alphaB Crystallin. *Biochemistry*, Nov 15, 2005b, vol. 44, no. 45, pp. 14854-14869.

GHOSH, J. G.; Shenoy, A. K., Jr; Clark, J. I. N- and C-Terminal Motifs in Human alphaB Crystallin Play an Important Role in the Recognition, Selection, and Solubilization of Substrates. *Biochemistry*, Nov 21, 2006, vol. 45, no. 46, pp. 13847-13854.

GHOSH, J. G.; Houck, S. A.; Clark, J. I. Interactive Domains in the Molecular Chaperone Human alphaB Crystallin Modulate Microtubule Assembly and Disassembly. *PLoS ONE*, 20070606, Jun 6, 2007a, vol. 2, no. 6, pp. e498.

GHOSH, J. G.; Houck, S. A.; Clark, J. I. Interactive Sequences in the Stress Protein and Molecular Chaperone Human alphaB Crystallin Recognize and Modulate the Assembly of Filaments. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 20070510, 2007b, vol. 39, no. 10, pp. 1804-1815.

GITCHO, M. A.; Baloh, R.H.; Chakraverty, S.; Mayo, K.; Norton, J.B.; Levitch, D.; Hatanpaa, K.J.; White, C.L., 3rd; Bigio, E.H.; Caselli, R.; Baker, M.; Al-Lozi, M.T.; Morris, J.C.; Pestronk, A.; Rademakers, R.; Goate, A.M.; Cairns, N.J. TDP-43 A315T Mutation in Familial Motor Neuron Disease. *Annals of Neurology*, Apr, 2008, vol. 63, no. 4, pp. 535-538.

GLICKMAN, M. H.; Ciechanover, A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*, Apr, 2002, vol. 82, no. 2, pp. 373-428.

GODEMANN, R.; Biernat, J.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E.M. Phosphorylation of Tau Protein by Recombinant GSK-3beta: Pronounced Phosphorylation at Select Ser/Thr-Pro Motifs but no Phosphorylation at Ser262 in the Repeat Domain. *FEBS Letters*, Jul 2, 1999, vol. 454, no. 1-2, pp. 157-164.

GOEBEL, H. H. Desmin-Related Neuromuscular Disorders. *Muscle & Nerve*, Nov, 1995, vol. 18, no. 11, pp. 1306-1320.

GOEBEL, H. H.; Warlo, I. A. Surplus Protein Myopathies. *Neuromuscular Disorders : NMD*, Jan, 2001, vol. 11, no. 1, pp. 3-6.

GOEBEL, H. H.; Muller, H. D. Protein Aggregate Myopathies. *Seminars in Pediatric Neurology*, Jun, 2006, vol. 13, no. 2, pp. 96-103.

GOEBEL, H. H.; Fardeau, M.; Olive, M.; Schroder, R. 156th ENMC International Workshop: Desmin and Protein Aggregate Myopathies, 9-11 November 2007, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 20080701, Jul, 2008, vol. 18, no. 7, pp. 583-592.

GOEDERT, M.; Spillantini, M.G.; Jakes, R.; Rutherford, D.; Crowther, R.A. Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease. *Neuron*, Oct, 1989a, vol. 3, no. 4, pp. 519-526.

GOEDERT, M.; Spillantini, M.G.; Potier, M.C.; Ulrich, J.; Crowther, R.A. Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding an Isoform of Microtubule-Associated Protein Tau Containing Four Tandem Repeats: Differential Expression of Tau Protein mRNAs in Human Brain. *The EMBO Journal*, Feb, 1989b, vol. 8, no. 2, pp. 393-399. ISSN 0261-4189.

GOEDERT, M.; Spillantini, M.G.; Crowther, R.A. Cloning of a Big Tau Microtubule-Associated Protein Characteristic of the Peripheral Nervous System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Mar 1, 1992, vol. 89, no. 5, pp. 1983-1987.

GOLDFARB, L. G.; Park, K.Y.; Cervenakova, L.; Gorokhova, S.; Lee, H.S.; Vasconcelos, O.; Nagle, J.W.; Semino-Mora, C.; Sivakumar, K.; Dalakas, M.C. Missense Mutations in Desmin Associated with Familial Cardiac and Skeletal Myopathy. *Nature Genetics*, Aug, 1998, vol. 19, no. 4, pp. 402-403.

GOLDFARB, L. G.; Vicart, P.; Goebel, H.H.; Dalakas, M.C. Desmin Myopathy. *Brain : A Journal of Neurology*, 20040114, Apr, 2004, vol. 127, no. Pt 4, pp. 723-734.

GOLDFARB, L. G.; Olive, M.; Vicart, P.; Goebel, H.H. Intermediate Filament Diseases: Desminopathy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2008, vol. 642, pp. 131-164.

GOLENHOFEN, N.; Ness, W.; Koob, R.; Htun, P.; Schaper, W.; Drenckhahn, D. Ischemia-Induced Phosphorylation and Translocation of Stress Protein Alpha B-Crystallin to Z Lines of Myocardium. *The American Journal of Physiology*, May, 1998, vol. 274, no. 5 Pt 2, pp. H1457-64.

GOLENHOFEN, N.; Htun, P.; Ness, W.; Koob, R.; Schaper, W.; Drenckhahn, D. Binding of the Stress Protein Alpha B-Crystallin to Cardiac Myofibrils Correlates with the Degree of Myocardial Damage during ischemia/reperfusion in Vivo. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Mar, 1999, vol. 31, no. 3, pp. 569-580.

GOLENHOFEN, N.; Arbeiter, A.; Koob, R.; Drenckhahn, D. Ischemia-Induced Association of the Stress Protein Alpha B-Crystallin with I-Band Portion of Cardiac Titin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Mar, 2002, vol. 34, no. 3, pp. 309-319.

GOLL, D. E.; Thompson, V.F.; Li, H.; Wei, W.; Cong, J. The Calpain System. *Physiological Reviews*, Jul, 2003, vol. 83, no. 3, pp. 731-801.

GOLL, D. E.; Neti, G.; Mares, S.W.; Thompson, V.F. Myofibrillar Protein Turnover: The Proteasome and the Calpains. *Journal of Animal Science*, 20070820, Apr, 2008, vol. 86, no. 14 Suppl, pp. E19-35.

GONTIER, Y.; Taivainen, A.; Fontao, L.; Sonnenberg, A.; van der Flier, A.; Carpen, O.; Faulkner, G.; Borradori, L. The Z-Disc Proteins Myotilin and FATZ-1 Interact with each Other and are Connected to the Sarcolemma Via Muscle-Specific Filamins. *Journal of Cell Science*, 20050802, Aug 15, 2005, vol. 118, no. Pt 16, pp. 3739-3749.

GOUDEAU, B.; Rodrigues-Lima, F.; Fischer, D.; Casteras-Simon, M.; Sambuughin, N.; de Visser, M.; Laforet, P.; Ferrer, X.; Chapon, F.; Sjoberg, G.; Kostareva, A.; Sejersen, T.; Dalakas, M.C.; Goldfarb, L.G.; Vicart, P. Variable Pathogenic Potentials of Mutations Located in the Desmin Alpha-Helical Domain. *Human Mutation*, Sep, 2006, vol. 27, no. 9, pp. 906-913.

GREGORY, R. I.; Yan, K.P.; Amuthan, G.; Chendrimada, T.; Doratotaj, B.; Cooch, N.; Shiekhattar, R. The Microprocessor Complex Mediates the Genesis of microRNAs. *Nature*, 20041107, Nov 11, 2004, vol. 432, no. 7014, pp. 235-240.

Referències

GRIGGS, R.; Vihola, A.; Hackman, P.; Talvinen, K.; Haravuori, H.; Faulkner, G.; Eymard, B.; Richard, I.; Selcen, D.; Engel, A.; Carpen, O.; Udd, B. Zaspopathy in a Large Classic Late-Onset Distal Myopathy Family. *Brain : A Journal of Neurology*, 20070302, Jun, 2007, vol. 130, no. Pt 6, pp. 1477-1484.

GRUNE, T.; Reinheckel, T.; Davies, K.J. Degradation of Oxidized Proteins in Mammalian Cells. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, Jun, 1997, vol. 11, no. 7, pp. 526-534.

GRUNE, T.; Jung, T.; Merker, K.; Davies, K.J. Decreased Proteolysis Caused by Protein Aggregates, Inclusion Bodies, Plaques, Lipofuscin, Ceroid, and 'Aggresomes' during Oxidative Stress, Aging, and Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Dec, 2004, vol. 36, no. 12, pp. 2519-2530.

GRUNE, T.; Merker, K.; Jung, T.; Sitte, N.; Davies, K.J. Protein Oxidation and Degradation during Postmitotic Senescence. *Free Radical Biology & Medicine*, Nov 1, 2005, vol. 39, no. 9, pp. 1208-1215.

GU, Y.; Oyama, F.; Ihara, Y. Tau is Widely Expressed in Rat Tissues. *Journal of Neurochemistry*, Sep, 1996, vol. 67, no. 3, pp. 1235-1244.

HALEY, D. A.; Horwitz, J.; Stewart, P.L. The Small Heat-Shock Protein, alphaB-Crystallin, has a Variable Quaternary Structure. *Journal of Molecular Biology*, Mar 20, 1998, vol. 277, no. 1, pp. 27-35.

HASEGAWA, M.; Arai, T.; Nonaka, T.; Kametani, F.; Yoshida, M.; Hashizume, Y.; Beach, T.G.; Buratti, E.; Baralle, F.; Morita, M.; Nakano, I.; Oda, T.; Tsuchiya, K.; Akiyama, H. Phosphorylated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Annals of Neurology*, Jul, 2008, vol. 64, no. 1, pp. 60-70.

HASLBECK, K. M.; Friess, U.; Schleicher, E.D.; Bierhaus, A.; Nawroth, P.P.; Kirchner, A.; Pauli, E.; Neundorfer, B.; Heuss, D. The RAGE Pathway in Inflammatory Myopathies and Limb Girdle Muscular Dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 20050629, Sep, 2005, vol. 110, no. 3, pp. 247-254.

HAUSER, M. A.; Horrigan, S.K.; Salmikangas, P.; Torian, U.M.; Viles, K.D.; Dancel, R.; Tim, R.W.; Taivainen, A.; Bartoloni, L.; Gilchrist, J.M.; Stajich, J.M.; Gaskell, P.C.; Gilbert, J.R.; Vance, J.M.; Pericak-Vance, M.A.; Carpen, O.; Westbrook, C.A.; Speer, M.C. Myotilin is Mutated in Limb Girdle Muscular Dystrophy 1A. *Human Molecular Genetics*, Sep 1, 2000, vol. 9, no. 14, pp. 2141-2147.

HAYCOCK, J. W.; MacNeil, S.; Jones, P.; Harris, J.B.; Mantle, D. Oxidative Damage to Muscle Protein in Duchenne Muscular Dystrophy. *Neuroreport*, Dec 20, 1996, vol. 8, no. 1, pp. 357-361.

HERRMANN, H.; Hofmann, I.; Franke, W.W. Identification of a Nonapeptide Motif in the Vimentin Head Domain Involved in Intermediate Filament Assembly. *Journal of Molecular Biology*, Feb 5, 1992, vol. 223, no. 3, pp. 637-650.

HERRMANN, H.; Haner, M.; Brettel, M.; Muller, S.A.; Goldie, K.N.; Fedtke, B.; Lustig, A.; Franke, W.W.; Aebi, U. Structure and Assembly Properties of the Intermediate Filament Protein Vimentin: The Role of its Head, Rod and Tail Domains. *Journal of Molecular Biology*, Dec 20, 1996, vol. 264, no. 5, pp. 933-953.

HERRMANN, H.; Aebi, U. Structure, Assembly, and Dynamics of Intermediate Filaments. *Sub-Cellular Biochemistry*, 1998, vol. 31, pp. 319-362.

HERRMANN, H.; Haner, M.; Brettel, M.; Ku, N.O.; Aebi, U. Characterization of Distinct Early Assembly Units of Different Intermediate Filament Proteins. *Journal of Molecular Biology*, Mar 12, 1999, vol. 286, no. 5, pp. 1403-1420.

HERRMANN, H.; Aebi, U. Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. *Annual Review of Biochemistry*, 2004, vol. 73, pp. 749-789.

HERRMANN, H.; Bar, H.; Kreplak, L.; Strelkov, S.V.; Aebi, U. Intermediate Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, Jul, 2007, vol. 8, no. 7, pp. 562-573.

HIJIKATA, T.; Murakami, T.; Imamura, M.; Fujimaki, N.; Ishikawa, H. Plectin is a Linker of Intermediate Filaments to Z-Discs in Skeletal Muscle Fibers. *Journal of Cell Science*, Mar, 1999, vol. 112 (Pt 6), no. Pt 6, pp. 867-876.

HIJIKATA, T.; Murakami, T.; Ishikawa, H.; Yorifuji, H. Plectin Tethers Desmin Intermediate Filaments Onto Subsarcolemmal Dense Plaques Containing Dystrophin and Vinculin. *Histochemistry and Cell Biology*, 20030118, Feb, 2003, vol. 119, no. 2, pp. 109-123.

HIJIKATA, T.; Nakamura, A.; Isokawa, K.; Imamura, M.; Yuasa, K.; Ishikawa, R.; Kohama, K.; Takeda, S.; Yorifuji, H. Plectin 1 Links Intermediate Filaments to Costameric Sarcolemma through Beta-Synemin, Alpha-Dystrobrevin and Actin. *Journal of Cell Science*, 20080527, Jun 15, 2008, vol. 121, no. Pt 12, pp. 2062-2074.

HIMMEL, M.; Van Der Ven, P.F.; Stocklein, W.; Furst, D.O. The Limits of Promiscuity: Isoform-Specific Dimerization of Filamins. *Biochemistry*, Jan 21, 2003, vol. 42, no. 2, pp. 430-439.

HIMMLER, A.; Drechsel, D.; Kirschner, M.W.; Martin, D.W., Jr. Tau Consists of a Set of Proteins with Repeated C-Terminal Microtubule-Binding Domains and Variable N-Terminal Domains. *Molecular and Cellular Biology*, Apr, 1989, vol. 9, no. 4, pp. 1381-1388.

HOUBEN, F.; Ramaekers, F.C.; Snoeckx, L.H.; Broers, J.L. Role of Nuclear Lamina-Cytoskeleton Interactions in the Maintenance of Cellular Strength. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20060919, May, 2007, vol. 1773, no. 5, pp. 675-686.

HOWMAN, E. V.; Sullivan, N.; Poon, E.P.; Britton, J.E.; Hilton-Jones, D.; Davies, K.E. Syncoilin Accumulation in Two Patients with Desmin-Related Myopathy. *Neuromuscular Disorders : NMD*, Jan, 2003, vol. 13, no. 1, pp. 42-48.

HUANG, C.; Zhou, Q.; Liang, P.; Hollander, M.S.; Sheikh, F.; Li, X.; Greaser, M.; Shelton, G.D.; Evans, S.; Chen, J. Characterization and in Vivo Functional Analysis of Splice Variants of Cypher. *The Journal of Biological Chemistry*, 20021223, Feb 28, 2003, vol. 278, no. 9, pp. 7360-7365.

HUBBERS, C. U.; Clemen, C.S.; Kesper, K.; Boddrich, A.; Hofmann, A.; Kamarainen, O.; Tolksdorf, K.; Stumpf, M.; Reichelt, J.; Roth, U.; Krause, S.; Watts, G.; Kimonis, V.; Wattjes, M.P.; Reimann, J.; Thal, D.R.; Biermann, K.; Evert, B.O.; Lochmuller, H.; Wanker, E.E.; Schooser, B.G.; Noegel, A.A.; Schroder, R. Pathological Consequences of VCP Mutations on Human Striated Muscle. *Brain : A Journal of Neurology*, 20060919, Feb, 2007, vol. 130, no. Pt 2, pp. 381-393.

IGAZ, L. M.; Kwong, L.K.; Chen-Plotkin, A.; Winton, M.J.; Unger, T.L.; Xu, Y.; Neumann, M.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Expression of TDP-43 C-Terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *The Journal of Biological Chemistry*, 20090121, Mar 27, 2009, vol. 284, no. 13, pp. 8516-8524.

Referències

INAGAKI, N.; Hayashi, T.; Arimura, T.; Koga, Y.; Takahashi, M.; Shibata, H.; Teraoka, K.; Chikamori, T.; Yamashina, A.; Kimura, A. Ipha B-Crystallin Mutation in Dilated Cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20060208, Apr 7, 2006, vol. 342, no. 2, pp. 379-386.

INUKAI, Y.; Nonaka, T.; Arai, T.; Yoshida, M.; Hashizume, Y.; Beach, T.G.; Buratti, E.; Baralle, F.E.; Akiyama, H.; Hisanaga, S.; Hasegawa, M. Abnormal Phosphorylation of Ser409/410 of TDP-43 in FTL-D and ALS. *FEBS Letters*, 20080724, Aug 20, 2008, vol. 582, no. 19, pp. 2899-2904.

JOHNSTON, J. A.; Ward, C.L.; Kopito, R.R. Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *The Journal of Cell Biology*, Dec 28, 1998, vol. 143, no. 7, pp. 1883-1898.

JOHNSTON, J. A.; Illing, M.E.; Kopito, R.R. Cytoplasmic dynein/dynactin Mediates the Assembly of Aggresomes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, Sep, 2002, vol. 53, no. 1, pp. 26-38.

JOUNG, I.; Strominger, J.L.; Shin, J. Molecular Cloning of a Phosphotyrosine-Independent Ligand of the p56lck SH2 Domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jun 11, 1996, vol. 93, no. 12, pp. 5991-5995.

KABASHI, E.; Valdmanis, P.N.; Dion, P.; Spiegelman, D.; McConkey, B.J.; Vande Velde, C.; Bouchard, J.P.; Lacomblez, L.; Pochigaeva, K.; Salachas, F.; Pradat, P.F.; Camu, W.; Meininger, V.; Dupre, N.; Rouleau, G.A. TARDBP Mutations in Individuals with Sporadic and Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Nature Genetics*, 20080330, May, 2008, vol. 40, no. 5, pp. 572-574.

KAMETANI, F.; Nonaka, T.; Suzuki, T.; Arai, T.; Dohmae, N.; Akiyama, H.; Hasegawa, M. Identification of Casein Kinase-1 Phosphorylation Sites on TDP-43. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20090313, May 1, 2009, vol. 382, no. 2, pp. 405-409.

Kanski, J.; Alterman, M.A.; Schoneich, C. Proteomic Identification of Age-Dependent Protein Nitration in Rat Skeletal Muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, Nov 15, 2003, vol. 35, no. 10, pp. 1229-1239.

KAUFMAN, S. J.; Foster, R. F. Replicating Myoblasts Express a Muscle-Specific Phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dec, 1988, vol. 85, no. 24, pp. 9606-9610.

KELLER, J. N.; Dimayuga, E.; Chen, Q.; Thorpe, J.; Gee, J.; Ding, Q. Autophagy, Proteasomes, Lipofuscin, and Oxidative Stress in the Aging Brain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Dec, 2004, vol. 36, no. 12, pp. 2376-2391.

KETEMA, M.; Wilhelmsen, K.; Kuikman, I.; Janssen, H.; Hodzic, D.; Sonnenberg, A. Requirements for the Localization of Nesprin-3 at the Nuclear Envelope and its Interaction with Plectin. *Journal of Cell Science*, Oct 1, 2007, vol. 120, no. Pt 19, pp. 3384-3394.

KIMONIS, V. E.; Kovach, M.J.; Waggoner, B.; Leal, S.; Salam, A.; Rimer, L.; Davis, K.; Khardori, R.; Gelber, D. Clinical and Molecular Studies in a Unique Family with Autosomal Dominant Limb-Girdle Muscular Dystrophy and Paget Disease of Bone. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, Jul-Aug, 2000, vol. 2, no. 4, pp. 232-241.

KIMONIS, V. E.; Fulchiero, E.; Vesa, J.; Watts, G. VCP Disease Associated with Myopathy, Paget Disease of Bone and Frontotemporal Dementia: Review of a Unique Disorder. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20080918, Dec, 2008, vol. 1782, no. 12, pp. 744-748.

KITAZAWA, M.; Trinh, D.N.; LaFerla, F.M. Inflammation Induces Tau Pathology in Inclusion Body Myositis Model Via Glycogen Synthase Kinase-3beta. *Annals of Neurology*, Jul, 2008, vol. 64, no. 1, pp. 15-24.

KLAAVUNIEMI, T.; Kelloniemi, A.; Ylanne, J. The ZASP-Like Motif in Actinin-Associated LIM Protein is Required for Interaction with the Alpha-Actinin Rod and for Targeting to the Muscle Z-Line. *The Journal of Biological Chemistry*, 20040414, Jun 18, 2004, vol. 279, no. 25, pp. 26402-26410.

KLAAVUNIEMI, T.; Ylanne, J. Zasp/Cypher Internal ZM-Motif Containing Fragments are Sufficient to Co-Localize with Alpha-Actinin--Analysis of Patient Mutations. *Experimental Cell Research*, 20060214, May 1, 2006, vol. 312, no. 8, pp. 1299-1311.

KLEY, R. A.; Hellenbroich, Y.; van der Ven, P.F.; Furst, D.O.; Huebner, A.; Bruchertseifer, V.; Peters, S.A.; Heyer, C.M.; Kirschner, J.; Schroder, R.; Fischer, D.; Muller, K.; Tolksdorf, K.; Eger, K.; Germing, A.; Brodherr, T.; Reum, C.; Walter, M.C.; Lochmuller, H.; Ketelsen, U.P.; Vorgerd, M. Clinical and Morphological Phenotype of the Filamin Myopathy: A Study of 31 German Patients. *Brain : A Journal of Neurology*, Dec, 2007, vol. 130, no. Pt 12, pp. 3250-3264.

KOMATSU, M.;Waguri, S.; Koike, M.; Sou, Y.S.; Ueno, T.; Hara, T.; Mizushima, N.; Iwata, J.; Ezaki, J.; Murata, S.; Hamazaki, J.; Nishito, Y.; Iemura, S.; Natsume, T.; Yanagawa, T.; Uwayama, J.; Warabi, E.; Yoshida, H.; Ishii, T.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Yue, Z.; Uchiyama, Y.; Kominami, E.; Tanaka, K. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell*, Dec 14, 2007, vol. 131, no. 6, pp. 1149-1163.

KONIECZNY, P.; Fuchs, P.; Reipert, S.; Kunz, W.S.; Zeold, A.; Fischer, I.; Paulin, D.; Schroder, R.; Wiche, G. Myofiber Integrity Depends on Desmin Network Targeting to Z-Disks and Costameres Via Distinct Plectin Isoforms. *The Journal of Cell Biology*, May 19, 2008, vol. 181, no. 4, pp. 667-681.

KOPITO, R. R. Aggresomes, Inclusion Bodies and Protein Aggregation. *Trends in Cell Biology*, Dec, 2000, vol. 10, no. 12, pp. 524-530.

KOSTOVA, Z.; Wolf, D. H. For Whom the Bell Tolls: Protein Quality Control of the Endoplasmic Reticulum and the Ubiquitin-Proteasome Connection. *The EMBO Journal*, May 15, 2003, vol. 22, no. 10, pp. 2309-2317.

KUHNLEIN, P.; Sperfeld, A.D.; Vanmassenhove, B.; Van Deerlin, V.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q.; Kretschmar, H.A.; Ludolph, A.C.; Neumann, M. Two German Kindreds with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis due to TARDBP Mutations. *Archives of Neurology*, Sep, 2008, vol. 65, no. 9, pp. 1185-1189. ISSN 1538-3687.

KUNCL, R. W.; Bilak, M.M.; Craig, S.W.; Adams, R. Exocytotic "Constipation" is a Mechanism of tubulin/lysosomal Interaction in Colchicine Myopathy. *Experimental Cell Research*, May 1, 2003, vol. 285, no. 2, pp. 196-207.

KUSTERS, B.; van Hoeve, B.J.; Schelhaas, H.J.; Ter Laak, H.; van Engelen, B.G.; Lammens, M. TDP-43 Accumulation is Common in Myopathies with Rimmed Vacuoles. *Acta Neuropathologica*, 20081209, Feb, 2009, vol. 117, no. 2, pp. 209-211.

KUUSISTO, E.; Suuronen, T.; Salminen, A. Ubiquitin-Binding Protein p62 Expression is Induced during Apoptosis and Proteasomal Inhibition in Neuronal Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Jan 12, 2001, vol. 280, no. 1, pp. 223-228.

Referències

- LAM, Y. A.; Pickart, C.M.; Alban, A.; Landon, M.; Jamieson, C.; Ramage, R.; Mayer, R.J.; Layfield, R. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System in Alzheimer's Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Aug 29, 2000, vol. 97, no. 18, pp. 9902-9906.
- LAZARIDES, E. Desmin and Intermediate Filaments in Muscle Cells. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 1980a, vol. 11, pp. 124-131.
- LAZARIDES, E. Intermediate Filaments as Mechanical Integrators of Cellular Space. *Nature*, Jan 17, 1980b, vol. 283, no. 5744, pp. 249-256.
- LEMMENS, R.; Race, V.; Hersmus, N.; Matthijs, G.; Van Den Bosch, L.; Van Damme, P.; Dubois, B.; Boonen, S.; Goris, A.; Robberecht, W. TDP-43 M311V Mutation in Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, Mar, 2009, vol. 80, no. 3, pp. 354-355
- LEROY, O.; Dhaenens, C.M.; Schraen-Maschke, S.; Belarbi, K.; Delacourte, A.; Andreadis, A.; Sablonniere, B.; Buee, L.; Sergeant, N.; Caillet-Boudin, M.L. ETR-3 Represses Tau Exons 2/3 Inclusion, a Splicing Event Abnormally Enhanced in Myotonic Dystrophy Type I. *Journal of Neuroscience Research*, Sep, 2006, vol. 84, no. 4, pp. 852-859.
- LI, Z. L.; Lilienbaum, A.; Butler-Browne, G.; Paulin, D. Human Desmin-Coding Gene: Complete Nucleotide Sequence, Characterization and Regulation of Expression during Myogenesis and Development. *Gene*, May 30, 1989, vol. 78, no. 2, pp. 243-254.
- LI, Z.; Colucci-Guyon, E.; Pincon-Raymond, M.; Mericskay, M.; Pournin, S.; Paulin, D.; Babinet, C. Cardiovascular Lesions and Skeletal Myopathy in Mice Lacking Desmin. *Developmental Biology*, May 1, 1996, vol. 175, no. 2, pp. 362-366.
- LI, Z.; Mericskay, M.; Agbulut, O.; Butler-Browne, G.; Carlsson, L.; Thornell, L.E.; Babinet, C.; Paulin, D. Desmin is Essential for the Tensile Strength and Integrity of Myofibrils but Not for Myogenic Commitment, Differentiation, and Fusion of Skeletal Muscle. *The Journal of Cell Biology*, Oct 6, 1997, vol. 139, no. 1, pp. 129-144.
- LINDSTEN, K; de Vrij, F.M.; Verhoef, L.G.; Fischer, D.F.; van Leeuwen, F.W.; Hol, E.M.; Masucci, M.G.; Dantuma, N.P. Mutant Ubiquitin found in Neurodegenerative Disorders is a Ubiquitin Fusion Degradation Substrate that Blocks Proteasomal Degradation. *The Journal of Cell Biology*, 20020429, Apr 29, 2002, vol. 157, no. 3, pp. 417-427.
- LIPTON, A. M.; White, C. L., 3rd; Bigio, E. H. Frontotemporal Lobar Degeneration with Motor Neuron Disease-Type Inclusions Predominates in 76 Cases of Frontotemporal Degeneration. *Acta Neuropathologica*, 20040904, Nov, 2004, vol. 108, no. 5, pp. 379-385.
- LIU, J.; Chen, Q.; Huang, W.; Horak, K.M.; Zheng, H.; Mestril, R.; Wang, X. Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System in Desminopathy Mouse Hearts. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20051221, Feb, 2006, vol. 20, no. 2, pp. 362-364.
- LUBKE, U.; Six, J.; Villanova, M.; Boons, J.; Vandermeeren, M.; Ceuterick, C.; Cras, P.; Martin, J.J. Microtubule-Associated Protein Tau Epitopes are Present in Fiber Lesions in Diverse Muscle Disorders. *The American Journal of Pathology*, Jul, 1994, vol. 145, no. 1, pp. 175-188.
- LUNEMANN, J. D.; Schmidt, J.; Dalakas, M.C.; Munz, C. Macroautophagy as a Pathomechanism in Sporadic Inclusion Body Myositis. *Autophagy*, 20070709, Jul-Aug, 2007, vol. 3, no. 4, pp. 384-386.

MAAS, T.; Eidenmuller, J.; Brandt, R. Interaction of Tau with the Neural Membrane Cortex is Regulated by Phosphorylation at Sites that are Modified in Paired Helical Filaments. *The Journal of Biological Chemistry*, May 26, 2000, vol. 275, no. 21, pp. 15733-15740.

MACKENZIE, I. R.; Baker, M.; Pickering-Brown, S.; Hsiung, G.Y.; Lindholm, C.; Dwosh, E.; Gass, J.; Cannon, A.; Rademakers, R.; Hutton, M.; Feldman, H.H. The Neuropathology of Frontotemporal Lobar Degeneration Caused by Mutations in the Progranulin Gene. *Brain : A Journal of Neurology*, Nov, 2006, vol. 129, no. Pt 11, pp. 3081-3090.

MACKENZIE, I. R.; Bigio, E.H.; Ince, P.G.; Geser, F.; Neumann, M.; Cairns, N.J.; Kwong, L.K.; Forman, M.S.; Ravits, J.; Stewart, H.; Eisen, A.; McClusky, L.; Kretzschmar, H.A.; Monoranu, C.M.; Highley, J.R.; Kirby, J.; Siddique, T.; Shaw, P.J.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q. Pathological TDP-43 Distinguishes Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis from Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations. *Annals of Neurology*, May, 2007, vol. 61, no. 5, pp. 427-434.

MACRAE, T. H. Structure and Function of Small Heat shock/alpha-Crystallin Proteins: Established Concepts and Emerging Ideas. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, Jun, 2000, vol. 57, no. 6, pp. 899-913.

MAURAGE, C. A.; Bussiere, T.; Sergeant, N.; Ghestem, A.; Figarella-Branger, D.; Ruchoux, M.M.; Pellissier, J.F.; Delacourte, A. Tau Aggregates are Abnormally Phosphorylated in Inclusion Body Myositis and have an Immunoelectrophoretic Profile Distinct from Other Tauopathies. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, Dec, 2004, vol. 30, no. 6, pp. 624-634.

MCCARTHY, J. J. MicroRNA-206: The Skeletal Muscle-Specific myomiR. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 20080312, Nov, 2008, vol. 1779, no. 11, pp. 682-691.

MCELHINNY, A. S.; Perry, C.N.; Witt, C.C.; Labeit, S.; Gregorio, C.C. Muscle-Specific RING Finger-2 (MURF-2) is Important for Microtubule, Intermediate Filament and Sarcomeric M-Line Maintenance in Striated Muscle Development. *Journal of Cell Science*, 20040615, Jul 1, 2004, vol. 117, no. Pt 15, pp. 3175-3188.

MELKANI, G. C.; Cammarato, A.; Bernstein, S. I. AlphaB-Crystallin Maintains Skeletal Muscle Myosin Enzymatic Activity and Prevents its Aggregation Under Heat-Shock Stress. *Journal of Molecular Biology*, 20060303, May 5, 2006, vol. 358, no. 3, pp. 635-645.

MIKLOSSY, J.; Taddei, K.; Martins, R.; Escher, G.; Kraftsik, R.; Pillecuit, O.; Lepori, D.; Campiche, M. Alzheimer Disease: Curly Fibers and Tangles in Organs Other than Brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Aug, 1999, vol. 58, no. 8, pp. 803-814.

MILNER, D. J.; Weitzer, G.; Tran, D.; Bradley, A.; Capetanaki, Y. Disruption of Muscle Architecture and Myocardial Degeneration in Mice Lacking Desmin. *The Journal of Cell Biology*, Sep, 1996, vol. 134, no. 5, pp. 1255-1270.

MILNER, D. J.; Mavroidis, M.; Weisleder, N.; Capetanaki, Y. Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. *The Journal of Cell Biology*, Sep 18, 2000, vol. 150, no. 6, pp. 1283-1298.

MIRABELLA, M.; Alvarez, R.B.; Bilak, M.; Engel, W.K.; Askanas, V. Difference in Expression of Phosphorylated Tau Epitopes between Sporadic Inclusion-Body Myositis and Hereditary Inclusion-Body Myopathies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Jul, 1996, vol. 55, no. 7, pp. 774-786.

MISHRA, M.; Paunesku, T.; Woloschak, G.E.; Siddique, T.; Zhu, L.J.; Lin, S.; Greco, K.; Bigio, E.H. Gene Expression Analysis of Frontotemporal Lobar Degeneration of the Motor Neuron Disease Type with Ubiquitinated Inclusions. *Acta Neuropathologica*, 20070614, Jul, 2007, vol. 114, no. 1, pp. 81-94.

Referències

MOLDOVAN, L.; Moldovan, N. I. Oxygen Free Radicals and Redox Biology of Organelles. *Histochemistry and Cell Biology*, 20040925, Oct, 2004, vol. 122, no. 4, pp. 395-412.

MORNON, J. P.; Halaby, D.; Malfois, M.; Durand, P.; Callebaut, I.; Tardieu, A. Alpha-Crystallin C-Terminal Domain: On the Track of an Ig Fold. *International Journal of Biological Macromolecules*, May-Jun, 1998, vol. 22, no. 3-4, pp. 219-227.

MOZA, M.; Mologni, L.; Trokovic, R.; Faulkner, G.; Partanen, J.; Carpen, O. Targeted Deletion of the Muscular Dystrophy Gene Myotilin does Not Perturb Muscle Structure Or Function in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 20061030, Jan, 2007, vol. 27, no. 1, pp. 244-252.

MUNOZ-MARMOL, A. M.; Strasser, G.; Isamat, M.; Coulombe, P.A.; Yang, Y.; Roca, X.; Vela, E.; Mate, J. L.; Coll, J.; Fernandez-Figueras, M.T.; Navas-Palacios, J.J.; Ariza, A.; Fuchs, E. A Dysfunctional Desmin Mutation in a Patient with Severe Generalized Myopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep 15, 1998, vol. 95, no. 19, pp. 11312-1131

MURAKAMI, N.; Ihara, Y.; Nonaka, I. Muscle Fiber Degeneration in Distal Myopathy with Rimmed Vacuole Formation. *Acta Neuropathologica*, 1995a, vol. 89, no. 1, pp. 29-34.

MURAKAMI, N.; Ishiguro, K.; Ihara, Y.; Nonaka, I.; Sugita, H.; Imahori K. Tau Protein Immunoreactivity in Muscle Fibers with Rimmed Vacuoles Differs from that in Regenerating Muscle Fibers. *Acta Neuropathologica*, 1995b, vol. 90, no. 5, pp. 467-471.

MURAKAMI, N.; Oyama, F.; Gu, Y.; McLennan, I.S.; Nonaka, I.; Ihara, Y. Accumulation of Tau in Autophagic Vacuoles in Chloroquine Myopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Jul, 1998, vol. 57, no. 7, pp. 664-673.

MURRANT, C. L.; Reid, M. B. Detection of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species in Skeletal Muscle. *Microscopy Research and Technique*, Nov 15, 2001, vol. 55, no. 4, pp. 236-248.

NAKAKI, T.; Fujii, T. Nitration Modifying Function of Proteins, Hormones and Neurotransmitters. *Japanese Journal of Pharmacology*, Feb, 1999, vol. 79, no. 2, pp. 125-129.

NAKANO, S.; Engel, A.G.; Waclawik, A.J.; Emslie-Smith, A.M.; Busis, N.A. Myofibrillar Myopathy with Abnormal Foci of Desmin Positivity. I. Light and Electron Microscopy Analysis of 10 Cases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, May, 1996, vol. 55, no. 5, pp. 549-562. ISSN 0022-3069.

NAKANO, S.; Engel, A .G.; Akiguchi, I.; Kimura, J. Myofibrillar Myopathy. III. Abnormal Expression of Cyclin-Dependent Kinases and Nuclear Proteins. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Aug, 1997, vol. 56, no. 8, pp. 850-856.

NAKANO, S.; Akiguchi, I .; Nakamura, S.; Satoi, H.; Kawashima, S .; Kimura, J. Aberrant Expression of Cyclin-Dependent Kinase 5 in Inclusion Body Myositis. *Neurology*, Nov 10, 1999, vol. 53, no. 8, pp. 1671-1676.

NAKANO, S.; Shinde, A.; Kawashima, S .; Nakamura, S.; Akiguchi, .; Kimura, J. Inclusion Body Myositis: Expression of Extracellular Signal-Regulated Kinase and its Substrate. *Neurology*, Jan 9, 2001, vol. 56, no. 1, pp. 87-93.

NEUMANN, M.; Sampathu, D.M.; Kwong, L.K.; Truax, A.C.; Micsenyi, M.C.; Chou, T.T.; Bruce, J.; Schuck, T.; Grossman, M.; Clark, C.M.; McCluskey, L.F.; Miller, B.L.; Masliah, E.; Mackenzie, I.R.; Feldman, H.; Feiden, W.; Kretzschmar, H.A.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Ubiquitinated TDP-43 in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, Oct 6, 2006, vol. 314, no. 5796, pp. 130-133.

NEUMANN, M.; Kwong, L.K.; Sampathu, D.M.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. TDP-43 Proteinopathy in Frontotemporal Lobar Degeneration and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Protein Misfolding Diseases without Amyloidosis. *Archives of Neurology*, Oct, 2007a, vol. 64, no. 10, pp. 1388-1394.

NEUMANN, M.; Mackenzie, I.R.; Cairns, N.J.; Boyer, P.J.; Markesbery, W.R.; Smith, C.D.; Taylor, J.P.; Kretzschmar, H.A.; Kimonis, V.E.; Forman, M.S. TDP-43 in the Ubiquitin Pathology of Frontotemporal Dementia with VCP Gene Mutations. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Feb, 2007b, vol. 66, no. 2, pp. 152-157.

NEUMANN, M. Molecular Neuropathology of TDP-43 Proteinopathies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20090109, Jan, 2009a, vol. 10, no. 1, pp. 232-246.

NEUMANN, M.; Kwong, L.K.; Lee, E.B.; Kremmer, E.; Flatley, A.; Xu, Y.; Forman, M.S.; Troost, D.; Kretzschmar, H.A.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Phosphorylation of S409/410 of TDP-43 is a Consistent Feature in all Sporadic and Familial Forms of TDP-43 Proteinopathies. *Acta Neuropathologica*, 20090106, Feb, 2009b, vol. 117, no. 2, pp. 137-149.

NEUMANN, M.; Tolnay, M.; Mackenzie, I. R. The Molecular Basis of Frontotemporal Dementia. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 20090729, Jul 29, 2009c, vol. 11, pp. e23.

NEVE, R. L.; Harris, P.; Kosik, K.S.; Kurnit, D.M.; Donlon, T.A. Identification of cDNA Clones for the Human Microtubule-Associated Protein Tau and Chromosomal Localization of the Genes for Tau and Microtubule-Associated Protein 2. *Brain Research*, Dec, 1986, vol. 387, no. 3, pp. 271-280.

NONAKA, T.; Kametani, F.; Arai, T.; Akiyama, H.; Hasegawa, M. Truncation and Pathogenic Mutations Facilitate the Formation of Intracellular Aggregates of TDP-43. *Human Molecular Genetics*, 20090610, Sep 15, 2009, vol. 18, no. 18, pp. 3353-3364.

OJIMA, K.; Lin, Z.X.; Zhang, Z.Q.; Hijikata, T.; Holtzer, S.; Labeit, S.; Sweeney, H.L.; Holtzer, H. Initiation and Maturation of I-Z-I Bodies in the Growth Tips of Transfected Myotubes. *Journal of Cell Science*, Nov, 1999, vol. 112 (Pt 22), no. Pt 22, pp. 4101-4112.

OLIVE, M.; Goldfarb, L.; Dagvadorj, A.; Sambuughin, N.; Paulin, D.; Li, Z.; Goudeau, B.; Vicart, P.; Ferrer, I. Expression of the Intermediate Filament Protein Synemin in Myofibrillar Myopathies and Other Muscle Diseases. *Acta Neuropathologica*, 20030401, Jul, 2003, vol. 106, no. 1, pp. 1-7.

OLIVE, M.; Unzeta, M.; Moreno, D.; Ferrer, I. Overexpression of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase in Human Myopathies. *Muscle & Nerve*, Feb, 2004a, vol. 29, no. 2, pp. 261-266.

OLIVE, M.; Goldfarb, L.; Moreno, D.; Laforet, E.; Dagvadorj, A.; Sambuughin, N.; Martinez-Matos, J.A.; Martinez, F.; Alio, J.; Farrero, E.; Vicart, P.; Ferrer, I. Desmin-Related Myopathy: Clinical, Electrophysiological, Radiological, Neuropathological and Genetic Studies. *Journal of the Neurological Sciences*, Apr 15, 2004b, vol. 219, no. 1-2, pp. 125-137.

OLIVE, M.; Goldfarb, L.G.; Shatunov, A.; Fischer, D.; Ferrer, I. Myotilinopathy: Refining the Clinical and Myopathological Phenotype. *Brain : A Journal of Neurology*, 20050609, Oct, 2005, vol. 128, no. Pt 10, pp. 2315-2326.

OLIVE, M.; Armstrong, J.; Miralles, F.; Pou, A.; Fardeau, M.; Gonzalez, L.; Martinez, F.; Fischer, D.; Martinez Matos, J.A.; Shatunov, A.; Goldfarb, L.; Ferrer, I. Phenotypic Patterns of Desminopathy Associated with Three Novel Mutations in the Desmin Gene. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 20070405, Jun, 2007, vol. 17, no. 6, pp. 443-450.

Referències

ONTELL, M.; Ontell, M.P.; Sopper, M.M.; Mallonga, R.; Lyons, G.; Buckingham, M. Contractile Protein Gene Expression in Primary Myotubes of Embryonic Mouse Hindlimb Muscles. *Development (Cambridge, England)*, Apr, 1993, vol. 117, no. 4, pp. 1435-1444.

OTT, M. O.; Bober, E.; Lyons, G.; Arnold, H.; Buckingham, M. Early Expression of the Myogenic Regulatory Gene, Myf-5, in Precursor Cells of Skeletal Muscle in the Mouse Embryo. *Development (Cambridge, England)*, Apr, 1991, vol. 111, no. 4, pp. 1097-1107.

OTVOS, L., Jr; Feiner, L.; Lang, E.; Szendrei, G.I.; Goedert, M.; Lee, V.M. Monoclonal Antibody PHF-1 Recognizes Tau Protein Phosphorylated at Serine Residues 396 and 404. *Journal of Neuroscience Research*, Dec 15, 1994, vol. 39, no. 6, pp. 669-673.

PACHOLSKY, D.; Vakeel, P.; Himmel, M.; Lowe, T.; Stradal, T.; Rottner, K.; Furst, D.O.; van der Ven, P.F. Xin Repeats Define a Novel Actin-Binding Motif. *Journal of Cell Science*, 20040928, Oct 15, 2004, vol. 117, no. Pt 22, pp. 5257-5268.

PAMPHLETT, R.; Luquin, N.; McLean, C.; Jew, S.K.; Adams, L. TDP-43 Neuropathology is Similar in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis with Or without TDP-43 Mutations. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, Apr, 2009, vol. 35, no. 2, pp. 222-225.

PANKIV, S.; Clausen, T.H.; Lamark, T.; Brech, A.; Bruun, J.A.; Outzen, H.; Overvatn, A.; Bjorkoy, G.; Johansen, T. P62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 20070619, Aug 17, 2007, vol. 282, no. 33, pp. 24131-24145.

PETERSEN, D. R.; Doorn, J. A. Reactions of 4-Hydroxynonenal with Proteins and Cellular Targets. *Free Radical Biology & Medicine*, Oct 1, 2004, vol. 37, no. 7, pp. 937-945.

PIEC, I.; Listrat, A.; Alliot, J.; Chambon, C.; Taylor, R.G.; Bechet, D. Differential Proteome Analysis of Aging in Rat Skeletal Muscle. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20050414, Jul, 2005, vol. 19, no. 9, pp. 1143-1145. ISSN 1530-6860.

PILLAY, C. S.; Elliott, E.; Dennison, C. Endolysosomal Proteolysis and its Regulation. *The Biochemical Journal*, May 1, 2002, vol. 363, no. Pt 3, pp. 417-429.

POPOWICZ, G. M.; Schleicher, M.; Noegel, A.A.; Holak, T.A. Filamins: Promiscuous Organizers of the Cytoskeleton. *Trends in Biochemical Sciences*, 20060616, Jul, 2006, vol. 31, no. 7, pp. 411-419.

PUNKT, K.; Schering, S.; Loffler, S.; Minin, E.A.; Samoilova, V. E.; Hasselblatt, M.; Paulus, W.; Muller-Werdan, U.; Demus, U.; Koehler, G.; Boecker, W.; Buchwalow, I.B. Nitric Oxide Synthase is Up-Regulated in Muscle Fibers in Muscular Dystrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 20060720, Sep 15, 2006, vol. 348, no. 1, pp. 259-264.

RAJU, R.; Dalakas, M. C. Absence of Upregulated Genes Associated with Protein Accumulations in Desmin Myopathy. *Muscle & Nerve*, Mar, 2007, vol. 35, no. 3, pp. 386-388.

RANDO, T. A. Role of Nitric Oxide in the Pathogenesis of Muscular Dystrophies: A "Two Hit" Hypothesis of the Cause of Muscle Necrosis. *Microscopy Research and Technique*, Nov 15, 2001, vol. 55, no. 4, pp. 223-235.

RANDO, T. A. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Muscular Dystrophies. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*, Nov, 2002, vol. 81, no. 11 Suppl, pp. S175-86.

REIMANN, J.; Kunz, W.S.; Vielhaber, S.; Kappes-Horn, K.; Schroder, R. Mitochondrial Dysfunction in Myofibrillar Myopathy. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, Feb, 2003, vol. 29, no. 1, pp. 45-51.

REINHECKEL, T.; Sitte, N.; Ullrich, O.; Kuckelkorn, U.; Davies, K.J.; Grune, T. Comparative Resistance of the 20S and 26S Proteasome to Oxidative Stress. *The Biochemical Journal*, Nov 1, 1998, vol. 335 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 637-642.

REIPERT, S.; Steinbock, F.; Fischer, J.; Bittner, R.E.; Zeold, A.; Wiche G. Association of Mitochondria with Plectin and Desmin Intermediate Filaments in Striated Muscle. *Experimental Cell Research*, Nov 1, 1999, vol. 252, no. 2, pp. 479-491.

REZNICZEK, G. A.; Abrahamsberg, C.; Fuchs, P.; Spazierer, D.; Wiche, G. Plectin 5'-Transcript Diversity: Short Alternative Sequences Determine Stability of Gene Products, Initiation of Translation and Subcellular Localization of Isoforms. *Human Molecular Genetics*, 20031014, Dec 1, 2003, vol. 12, no. 23, pp. 3181-3194.

RIVETT, A. J. Proteasomes: Multicatalytic Proteinase Complexes. *The Biochemical Journal*, Apr 1, 1993, vol. 291 (Pt 1), no. Pt 1, pp. 1-10.

RODRIGUEZ, M. C.; and Tarnopolsky, M. A. Patients with Dystrophinopathy show Evidence of Increased Oxidative Stress. *Free Radical Biology & Medicine*, May 1, 2003, vol. 34, no. 9, pp. 1217-1220.

RUTHERFORD, N. J.; Zhang, Y.J.; Baker, M.; Gass, J.M.; Finch, N.A.; Xu, Y.F.; Stewart, H.; Kelley, B.J.; Kuntz, K.; Crook, R.J.; Sreedharan, J.; Vance, C.; Sorenson, E.; Lippa, C.; Bigio, E.H.; Geschwind, D.H.; Knopman, D.S.; Mitsumoto, H.; Petersen, R.C.; Cashman, N.R.; Hutton, M.; Shaw, C.E.; Boylan, K.B.; Boeve, B.; Graff-Radford, N.R.; Wszolek, Z.K.; Caselli, R.J.; Dickson, D.W.; Mackenzie, I.R.; Petrucelli, L.; Rademakers, R. Novel Mutations in TARDBP (TDP-43) in Patients with Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS Genetics*, 20080919, Sep 19, 2008, vol. 4, no. 9, pp. e1000193.

SALAJEGHEH, M.; Pinkus, J.L.; Taylor, J.P.; Amato, A.A.; Nazareno, R.; Baloh, R.H.; Greenberg, S.A. Sarcoplasmic Redistribution of Nuclear TDP-43 in Inclusion Body Myositis. *Muscle & Nerve*, Jul, 2009, vol. 40, no. 1, pp. 19-31.

SALMIKANGAS, P.; Mykkanen, O.M.; Gronholm, M.; Heiska, L.; Kere, J.; Carpen, O. Myotilin, a Novel Sarcomeric Protein with Two Ig-Like Domains, is Encoded by a Candidate Gene for Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Human Molecular Genetics*, Jul, 1999, vol. 8, no. 7, pp. 1329-1336.

SALMIKANGAS, P.; van der Ven, P.F.; Lalowski, M.; Taivainen, A.; Zhao, F.; Suila H.; Schroder, R.; Lappalainen, P.; Furst, D.O.; Carpen, O. Myotilin, the Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1A (LGMD1A) Protein, Cross-Links Actin Filaments and Controls Sarcomere Assembly. *Human Molecular Genetics*, Jan 15, 2003, vol. 12, no. 2, pp. 189-203.

SANGER, J. W.; Kang, S.; Siebrands, C.C.; Freeman, N.; Du, A.; Wang, J.; Stout, A.L.; Sanger, J.M. How to Build a Myofibril. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 2005, vol. 26, no. 6-8, pp. 343-354.

SCHRODER, R.; Furst, D.O.; Klasen, C.; Reimann, J.; Herrmann, H.; van der Ven, P.F. Association of Plectin with Z-Discs is a Prerequisite for the Formation of the Intermyoibrillar Desmin Cytoskeleton. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, Apr, 2000, vol. 80, no. 4, pp. 455-464.

SCHRODER, R.; Schoser, B. Myofibrillar Myopathies: A Clinical and Myopathological Guide. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, Jul, 2009, vol. 19, no. 3, pp. 483-492.

Referències

SEIBENHENER, M. L.; Seibenhener, M.L.; Babu, J.R.; Geetha, T.; Wong, H.C.; Krishna, N.R.; Wooten, M.W. Sequestosome 1/p62 is a Polyubiquitin Chain Binding Protein Involved in Ubiquitin Proteasome Degradation. *Molecular and Cellular Biology*, Sep, 2004, vol. 24, no. 18, pp. 8055-8068.

SELCEN, D.; Engel, A. G. Myofibrillar Myopathy Caused by Novel Dominant Negative Alpha B-Crystallin Mutations. *Annals of Neurology*, Dec, 2003, vol. 54, no. 6, pp. 804-810.

SELCEN, D.; Ohno, K.; Engel, A. G. Myofibrillar Myopathy: Clinical, Morphological and Genetic Studies in 63 Patients. *Brain : A Journal of Neurology*, 20040107, Feb, 2004a, vol. 127, no. Pt 2, pp. 439-451.

SELCEN, D.; Engel, A. G. Mutations in Myotilin Cause Myofibrillar Myopathy. *Neurology*, Apr 27, 2004b, vol. 62, no. 8, pp. 1363-1371.

SELCEN, D.; Engel, A. G. Mutations in ZASP Define a Novel Form of Muscular Dystrophy in Humans. *Annals of Neurology*, Feb, 2005, vol. 57, no. 2, pp. 269-276.

SELCEN, D. Myofibrillar Myopathies. *Current Opinion in Neurology*, Oct, 2008, vol. 21, no. 5, pp. 585-589.

SHERMAN, M. Y.; Goldberg, A. L. Cellular Defenses Against Unfolded Proteins: A Cell Biologist Thinks about Neurodegenerative Diseases. *Neuron*, Jan, 2001, vol. 29, no. 1, pp. 15-32.

SHINTANI, T.; Klionsky, D. J. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science (New York, N.Y.)*, Nov 5, 2004, vol. 306, no. 5698, pp. 990-995.

SHRINGARPURE, R.; Grune, T.; Davies, K.J. Protein Oxidation and 20S Proteasome-Dependent Proteolysis in Mammalian Cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, Sep, 2001, vol. 58, no. 10, pp. 1442-1450.

SHRINGARPURE, R.; Grune, T.; Mehlhase, J.; Davies, K.J. Ubiquitin Conjugation is Not Required for the Degradation of Oxidized Proteins by Proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*, 20021024, Jan 3, 2003, vol. 278, no. 1, pp. 311-318.

SIEB, J. P.; Gillessen, T. Iatrogenic and Toxic Myopathies. *Muscle & Nerve*, Feb, 2003, vol. 27, no. 2, pp. 142-156.

SIMON, S.; Fontaine, J.M.; Martin, J.L.; Sun, X.; Hoppe, A.D.; Welsh, M.J.; Benndorf, R.; Vicart, P. Myopathy-Associated alphaB-Crystallin Mutants: Abnormal Phosphorylation, Intracellular Location, and Interactions with Other Small Heat Shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 20070925, Nov 23, 2007, vol. 282, no. 47, pp. 34276-34287.

SORARU, G.; Orsetti, V.; Buratti, E.; Baralle, F.; Cima, V.; Volpe, M.; D'Ascenzo, C.; Palmieri, A.; Koutsikos, K.; Pegoraro, E.; Angelini, C. TDP-43 in Skeletal Muscle of Patients Affected with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis : Official Publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases*, 20090320, Mar 20, 2009, pp. 1-5.

SREEDHARAN, J.; Blair, I.P.; Tripathi, V.B.; Hu, X.; Vance, C.; Rogelj, B.; Ackerley, S.; Durnall, J.C.; Williams, K.L.; Buratti, E.; Baralle, F.; de Belleruche, J.; Mitchell, J.D.; Leigh, P.N.; Al-Chalabi, A.; Miller, C.C.; Nicholson, G.; Shaw, C.E. TDP-43 Mutations in Familial and Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 20080228, Mar 21, 2008, vol. 319, no. 5870, pp. 1668-1672.

STAMLER, J. S.; Meissner, G. Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiological Reviews*, Jan, 2001, vol. 81, no. 1, pp. 209-237.

STOSSEL, T. P.; Condeelis, J.; Cooley, L.; Hartwig, J.H. Noegl, A.; Schleicher, M.; Shapiro, S.S. Filamins as Integrators of Cell Mechanics and Signalling. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, Feb, 2001, vol. 2, no. 2, pp. 138-145.

STRELKOV, S. V.; Strelkov, S.V.; Herrmann, H.; Geisler, N.; Wedig, T.; Zimbelmann, R.; Aebi, U.; Burkhard, P. Conserved Segments 1A and 2B of the Intermediate Filament Dimer: Their Atomic Structures and Role in Filament Assembly. *The EMBO Journal*, Mar 15, 2002, vol. 21, no. 6, pp. 1255-1266.

SUGIYAMA, Y.; Suzuki, A.; Kishikawa, M.; Akutsu, R.; Hirose, T.; Wayne, M.M.; Tsui, S.K.; Yoshida, S.; Ohno, S. Muscle Develops a Specific Form of Small Heat Shock Protein Complex Composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during Myogenic Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, Jan 14, 2000, vol. 275, no. 2, pp. 1095-1104.

TAKADA, F.; Vander Woude, D.L.; Tong, H.Q.; Thompson, T.G.; Watkins, S.C.; Kunkel, L.M.; Beggs, A.H. Myozenin: An Alpha-Actinin- and Gamma-Filamin-Binding Protein of Skeletal Muscle Z Lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20010206, Feb 13, 2001, vol. 98, no. 4, pp. 1595-1600.

TATEYAMA, M.; Takeda, A.; Onodera, Y.; Matsuzaki, M.; Hasegawa, T.; Nunomura, A.; Hirai, K.; Perry, G.; Smith, M.A. Itoyama, Y. Oxidative Stress and Predominant Abeta42(43) Deposition in Myopathies with Rimmed Vacuoles. *Acta Neuropathologica*, 20030305, Jun, 2003, vol. 105, no. 6, pp. 581-585.

TATSUTA, T. Protein Quality Control in Mitochondria. *Journal of Biochemistry*, 20090807, Aug 7, 2009. vol.146, no. 4, pp. 455-461.

TEWS, D. S.; Goebel, H. H. Cell Death and Oxidative Damage in Inflammatory Myopathies. *Clinical Immunology and Immunopathology*, Jun, 1998, vol. 87, no. 3, pp. 240-247.

THOMAS, G. D.; Sander, M.; Lau, K.S.; Huang, P. L.; Stull, J.T.; Victor, R.G. Impaired Metabolic Modulation of Alpha-Adrenergic Vasoconstriction in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Dec 8, 1998a, vol. 95, no. 25, pp. 15090-15095.

THOMAS, G. D.; Victor, R. G. Nitric Oxide Mediates Contraction-Induced Attenuation of Sympathetic Vasoconstriction in Rat Skeletal Muscle. *The Journal of Physiology*, Feb 1, 1998b, vol. 506 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 817-826.

THOMPSON, T. G.; Chan, Y.M; Hack, A.A.; Brosius, M.; Rajala, M.; Lidov, H.G.; McNally, E.M; Watkins, S; Kunkel, L.M. Filamin 2 (FLN2): A Muscle-Specific Sarcoglycan Interacting Protein. *The Journal of Cell Biology*, Jan 10, 2000, vol. 148, no. 1, pp. 115-126.

THORNELL, L.; Carlsson, L.; Li, Z.; Mericskay, M.; Paulin, D. Null Mutation in the Desmin Gene Gives Rise to a Cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Aug, 1997, vol. 29, no. 8, pp. 2107-2124.

TSURUTA, Y.; Furuta, A.; Taniguchi, N.; Yamada, T. Kira, J.; Iwaki, T. Increased Expression of Manganese Superoxide Dismutase is Associated with that of Nitrotyrosine in Myopathies with Rimmed Vacuoles. *Acta Neuropathologica*, Jan, 2002, vol. 103, no. 1, pp. 59-65.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A Product and Mediator of Oxidative Stress. *Progress in Lipid Research*, Jul, 2003, vol. 42, no. 4, pp. 318-343.

VADLAMUDI, R. K.; Joung, I.; Strominger, J.L.; Shin, J. P62, a Phosphotyrosine-Independent Ligand of the SH2 Domain of p56lck, Belongs to a New Class of Ubiquitin-Binding Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug 23, 1996, vol. 271, no. 34, pp. 20235-20237.

Referències

VAN DEERLIN, V. M.; Leverenz, J.B.; Bekris, L.M.; Bird, T.D.; Yuan, W.; Elman, L.B.; Clay, D.; Wood, E.M.; Chen-Plotkin, A.S.; Martinez-Lage, M.; Steinbart, E.; McCluskey, L.; Grossman, M.; Neumann, M.; Wu, I.L.; Yang, W.S.; Kalb, R.; Galasko, D.R.; Montine, T.J.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.; Schellenberg, G.D.; Yu, C.E. TARDBP Mutations in Amyotrophic Lateral Sclerosis with TDP-43 Neuropathology: A Genetic and Histopathological Analysis. *Lancet Neurology*, 20080407, May, 2008, vol. 7, no. 5, pp. 409-416.

VAN DER VEN, P. F.; Obermann, W.M.; Lemke, B.; Gautel, M.; Weber, K.; Furst, D.O. Characterization of Muscle Filamin Isoforms Suggests a Possible Role of Gamma-filamin/ABP-L in Sarcomeric Z-Disc Formation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, Feb, 2000a, vol. 45, no. 2, pp. 149-162.

VAN DER VEN, P. F.; Wiesner, S.; Salmikangas, P.; Auerbach, D.; Himmel, M.; Kempa, S.; Hayess, K.; Pacholsky, D.; Taivainen, A.; Schroder, R.; Carpen, O.; Furst, D.O. Indications for a Novel Muscular Dystrophy Pathway. Gamma-Filamin, the Muscle-Specific Filamin Isoform, Interacts with Myotilin. *The Journal of Cell Biology*, Oct 16, 2000b, vol. 151, no. 2, pp. 235-248.

VAN DER VEN, P. F.; Ehler, E.; Vakeel, P.; Eulitz, S.; Schenk, J.A.; Milting, H.; Micheel, B.; Furst, D.O. Unusual Splicing Events Result in Distinct Xin Isoforms that Associate Differentially with Filamin c and Mena/VASP. *Experimental Cell Research*, 20060424, Jul 1, 2006, vol. 312, no. 11, pp. 2154-2167.

VAN LEEUWEN, F. W.; de Kleijn, D.P.; van den Hurk, H.H.; Neubauer, A.; Sonnemans, M.A.; Sluijs, J.A.; Koycu, S.; Ramdjelal, R.D.; Salehi, A.; Martens, G.J.; Grosveld, F.G.; Peter, J.; Burbach, H.; Hol, E.M. Frameshift Mutants of Beta Amyloid Precursor Protein and Ubiquitin-B in Alzheimer's and Down Patients. *Science (New York, N.Y.)*, Jan 9, 1998, vol. 279, no. 5348, pp. 242-247.

VAN LEEUWEN, F. W.; Fischer, D.F.; Kamel, D.; Sluijs, J.A.; Sonnemans, M.; Benne, R.; Swaab, D.F.; Salehi, A.; Hol, E.M. Molecular Misreading: A New Type of Transcript Mutation Expressed during Aging. *Neurobiology of Aging*, Nov-Dec, 2000, vol. 21, no. 6, pp. 879-891.

VATTA, M.; Mohapatra, B.; Jimenez, S.; Sanchez, X.; Faulkner, G.; Perles, Z.; Sinagra, G.; Lin, J.H.; Vu, T.M.; Zhou, Q.; Bowles, K.R.; Di Lenarda, A.; Schimmenti, L.; Fox, M.; Chrisco, M.A.; Murphy, R.T.; McKenna, W.; Elliott, P.; Bowles, N.E.; Chen, J.; Valle, G.; Towbin, J.A. Mutations in Cypher/ZASP in Patients with Dilated Cardiomyopathy and Left Ventricular Non-Compaction. *Journal of the American College of Cardiology*, Dec 3, 2003, vol. 42, no. 11, pp. 2014-2027.

VICART, P.; Caron, A.; Guicheney, P.; Li, Z.; Prevost, M.C.; Faure, A.; Chateau, D.; Chapon, F.; Tome, F.; Dupret, J.M.; Paulin, D.; Fardeau, M. A Missense Mutation in the alphaB-Crystallin Chaperone Gene Causes a Desmin-Related Myopathy. *Nature Genetics*, Sep, 1998, vol. 20, no. 1, pp. 92-95.

VIEGAS-PEQUIGNOT, E.; Li, Z.L.; Dutrillaux, B.; Apiou, F.; Paulin, D. Assignment of Human Desmin Gene to Band 2q35 by Nonradioactive in Situ Hybridization. *Human Genetics*, Aug, 1989, vol. 83, no. 1, pp. 33-36.

VON NANDELSTADH, P.; Gronholm, M.; Moza, M.; Lamberg, A.; Savilahti, H.; Carpen, O. Actin-Organising Properties of the Muscular Dystrophy Protein Myotilin. *Experimental Cell Research*, Oct 15, 2005, vol. 310, no. 1, pp. 131-139.

VON NANDELSTADH, P.; Ismail, M.; Gardin, C.; Suila, H.; Zara, I.; Belgrano, A.; Valle, G.; Carpen, O.; Faulkner, G. A Class III PDZ Binding Motif in the Myotilin and FATZ Families Binds Enigma Family Proteins: A Common Link for Z-Disc Myopathies. *Molecular and Cellular Biology*, 20081201, Feb, 2009, vol. 29, no. 3, pp. 822-834.

VORGERD, M.; van der Ven, P.F.; Bruchertseifer, V.; Lowe, T.; Kley, R.A.; Schroder, R.; Lochmuller, H.; Himmel, M.; Koehler, K.; Furst, D.O.; Huebner, A. A Mutation in the Dimerization Domain of Filamin c Causes a Novel Type of Autosomal Dominant Myofibrillar Myopathy. *American Journal of Human Genetics*, 20050531, Aug, 2005, vol. 77, no. 2, pp. 297-304.

WANG, X.; Osinska, H.; Klevitsky, R.; Gerdes, A.M.; Nieman, M.; Lorenz, J.; Hewett, T.; Robbins, J. Expression of R120G-alphaB-Crystallin Causes Aberrant Desmin and alphaB-Crystallin Aggregation and Cardiomyopathy in Mice. *Circulation Research*, Jul 6, 2001, vol. 89, no. 1, pp. 84-91.

WATTS, G. D.; Wymer, J.; Kovach, M.J.; Mehta, S.G.; Mumm, S.; Darvish, D.; Pestronk, A.; Whyte, M.P.; Kimonis, V.E. Inclusion Body Myopathy Associated with Paget Disease of Bone and Frontotemporal Dementia is Caused by Mutant Valosin-Containing Protein. *Nature Genetics*, 20040321, Apr, 2004, vol. 36, no. 4, pp. 377-381.

WEIHL, C. C.; Temiz, P.; Miller, S.E.; Watts, G.; Smith, C. Forman, M.; Hanson, P Kimonis, V.; Pestronk, A. TDP-43 Accumulation in Inclusion Body Myopathy Muscle Suggests a Common Pathogenic Mechanism with Frontotemporal Dementia. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, Oct, 2008, vol. 79, no. 10, pp. 1186-1189.

WEINGARTEN, M. D.; Lockwood, A.H.; Hwo, S.Y.; Kirschner, M.W. A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, May, 1975, vol. 72, no. 5, pp. 1858-1862.

WELLS, K. E.; Torelli, S.; Lu, Q.; Brown, S.C.; Partridge, T.; Muntoni, F.; Wells, D.J. Relocalization of Neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) as a Marker for Complete Restoration of the Dystrophin Associated Protein Complex in Skeletal Muscle. *Neuromuscular Disorders : NMD*, Jan, 2003, vol. 13, no. 1, pp. 21-31.

WELSH, M. J.; Gaestel, M. Small Heat-Shock Protein Family: Function in Health and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jun 30, 1998, vol. 851, pp. 28-35.

WETZEL, R. Mutations and Off-Pathway Aggregation of Proteins. *Trends in Biotechnology*, May, 1994, vol. 12, no. 5, pp. 193-198.

WILCZYNSKI, G. M.; Engel, W. K.; Askanas, V. Association of Active Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase with Paired Helical Filaments of Inclusion-Body Myositis Muscle Suggests its Role in Inclusion-Body Myositis Tau Phosphorylation. *The American Journal of Pathology*, Jun, 2000a, vol. 156, no. 6, pp. 1835-1840.

WILCZYNSKI, G. M.; Engel, W. K.; Askanas, V. Cyclin-Dependent Kinase 5 Colocalizes with Phosphorylated Tau in Human Inclusion-Body Myositis Paired-Helical Filaments and may Play a Role in Tau Phosphorylation. *Neuroscience Letters*, Oct 20, 2000b, vol. 293, no. 1, pp. 33-36.

WILHELMSEN, K.; Litjens, S.H.; Kuikman, I.; Tshimbalanga, N.; Janssen H.; van den Bout, I.; Raymond, K.; Sonnenberg, A. Nesprin-3, a Novel Outer Nuclear Membrane Protein, Associates with the Cytoskeletal Linker Protein Plectin. *The Journal of Cell Biology*, Dec 5, 2005, vol. 171, no. 5, pp. 799-810.

WINTON, M. J.; Igaz, L.M.; Wong, M.M.; Kwong, L.K.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M. Disturbance of Nuclear and Cytoplasmic TAR DNA-Binding Protein (TDP-43) Induces Disease-Like Redistribution, Sequestration, and Aggregate Formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 20080227, May 9, 2008, vol. 283, no. 19, pp. 13302-13309.

WONG, E. S.; Tan, J.M.; Soong, W.E.; Hussein, K.; Nukina, N.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M.; Cuervo, A.M.; Lim, K.L. Autophagy-Mediated Clearance of Aggregates is Not a Universal Phenomenon. *Human Molecular Genetics*, 20080523, Aug 15, 2008, vol. 17, no. 16, pp. 2570-2582.

Referències

- WOOTEN, M. W.; Hu, X.; Babu, J.R.; Seibenhener, M.L.; Geetha, T.; Paine, M.G.; Wooten, M.C. Signaling, Polyubiquitination, Trafficking, and Inclusions: Sequestosome 1/p62's Role in Neurodegenerative Disease. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2006, vol. 2006, no. 3, pp. 62079.
- XIE, Z.; Xu, W.; Davie, E.W.; Chung, D.W. Molecular Cloning of Human ABPL, an Actin-Binding Protein Homologue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Oct 29, 1998, vol. 251, no. 3, pp. 914-919.
- YAN, L.; Ge, H.; Li, H.; Lieber, S.C.; Natividad F.; Resuello, R.R.; Kim, S.J.; Akeju, S.; Sun, A.; Loo, K.; Peppas, A.P.; Rossi, F.; Lewandowski, E.D.; Thomas, A.P.; Vatner, S.F.; Vatner, D.E. Gender-Specific Proteomic Alterations in Glycolytic and Mitochondrial Pathways in Aging Monkey Hearts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Nov, 2004, vol. 37, no. 5, pp. 921-929.
- YANG, C. C.; Alvarez, R.B.; Engel, W.K.; Askanas, V. Increase of Nitric Oxide Synthases and Nitrotyrosine in Inclusion-Body Myositis. *Neuroreport*, Dec 20, 1996, vol. 8, no. 1, pp. 153-158.
- YANG, C. C.; Alvarez, R.B.; Engel, W.K.; Heller, S.L.; Askanas, V. Nitric Oxide-Induced Oxidative Stress in Autosomal Recessive and Dominant Inclusion-Body Myopathies. *Brain : A Journal of Neurology*, Jun, 1998, vol. 121 (Pt 6), no. Pt 6, pp. 1089-1097.
- YU, B. P. Cellular Defenses Against Damage from Reactive Oxygen Species. *Physiological Reviews*, Jan, 1994, vol. 74, no. 1, pp. 139-162.
- YUAN, Z.; Agarwal-Mawal, A.; Paudel, H.K. 14-3-3 Binds to and Mediates Phosphorylation of Microtubule-Associated Tau Protein by Ser9-Phosphorylated Glycogen Synthase Kinase 3beta in the Brain. *The Journal of Biological Chemistry*, 20040408, Jun 18, 2004, vol. 279, no. 25, pp. 26105-26114.
- ZATLOUKAL, K.; Stumptner, C.; Fuchsbichler, A.; Heid, H.; Schnoelzer, M.; Kenner, L.; Kleinert, R.; Prinz, M.; Aguzzi, A.; Denk, H. P62 is a Common Component of Cytoplasmic Inclusions in Protein Aggregation Diseases. *The American Journal of Pathology*, Jan, 2002, vol. 160, no. 1, pp. 255-263.
- ZHANG, M.; Liu, J.; Cheng, A.; Deyoung, S.M.; Saltiel, A.R. Identification of CAP as a Costameric Protein that Interacts with Filamin C. *Molecular Biology of the Cell*, 20070926, Dec, 2007, vol. 18, no. 12, pp. 4731-4740.
- ZHANG, Y. J.; Xu, Y.F.; Dickey, C.A.; Buratti, E.; Baralle, F.; Bailey, R.; Pickering-Brown, S.; Dickson, D.; Petrucelli, L. Progranulin Mediates Caspase-Dependent Cleavage of TAR DNA Binding Protein-43. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Sep 26, 2007, vol. 27, no. 39, pp. 10530-10534.
- ZHANG, Y. J.; Xu, Y.F.; Cook, C.; Gendron, T.F.; Roettges, P.; Link, C.D.; Lin, W.L.; Tong, J.; Castanedes-Casey, M.; Ash, P.; Gass, J.; Rangachari, V.; Buratti, E.; Baralle, F.; Golde, T.E.; Dickson, D.W.; Petrucelli, L. Aberrant Cleavage of TDP-43 Enhances Aggregation and Cellular Toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20090421, May 5, 2009, vol. 106, no. 18, pp. 7607-7612.
- ZHOU, Q.; Ruiz-Lozano, P.; Martone, M.E.; Chen, J. Cypher, a Striated Muscle-Restricted PDZ and LIM Domain-Containing Protein, Binds to Alpha-Actinin-2 and Protein Kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, Jul 9, 1999, vol. 274, no. 28, pp. 19807-19813.
- ZHOU, Q.; Chu, P.H.; Huang, C.; Cheng, C.F.; Martone, M.E.; Knoll, G.; Shelton, G.D.; Evans, S.; Chen, J. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM Domain Z-Line Protein, Causes a Severe Form of Congenital Myopathy. *The Journal of Cell Biology*, 20011105, Nov 12, 2001, vol. 155, no. 4, pp. 605-612.

7. RESULTATS ANNEXOS

7. Resultats annexos

7.1 Confocals de la miotilina i els AGE a les desminopaties

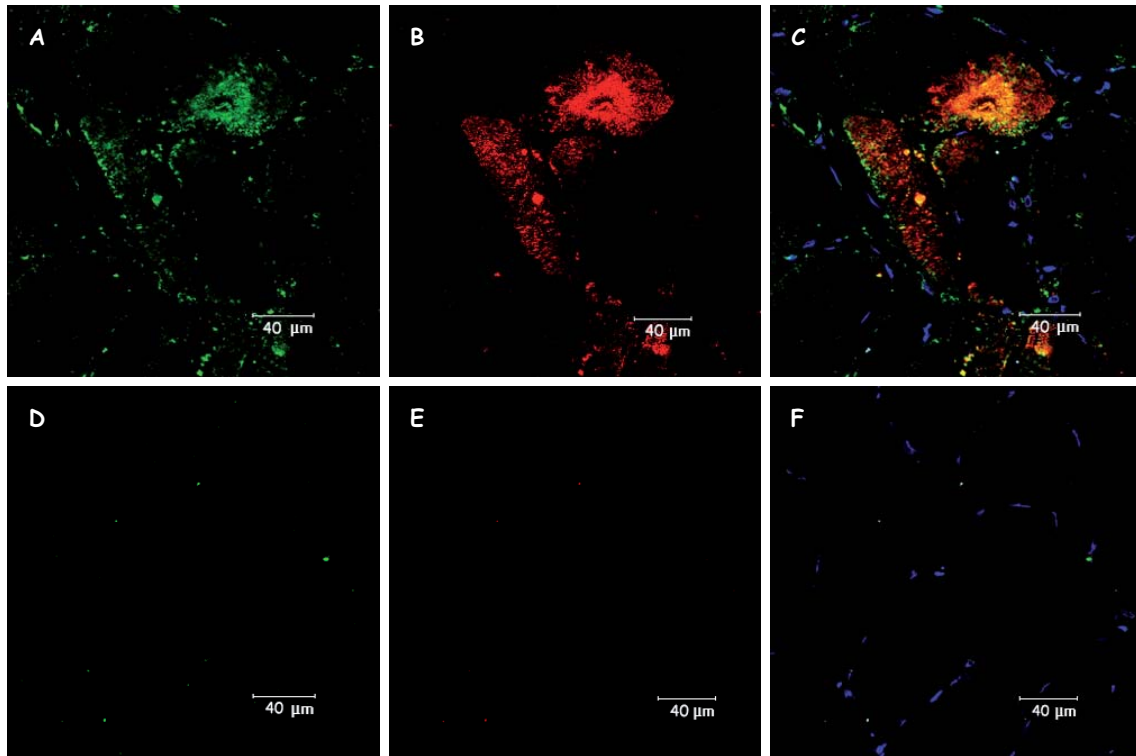


Fig 1. Immunofluorescència de doble marcatge observada per microscopia confocal de la miotilina (verd, A) i els AGE (vermell, B) a les desminopaties. En aquest cas la colocalització de la miotilina i els AGE (solapament en groc, C) és gairebé total. Com a control negatiu (D-F) s'utilitza una secció del mateix cas incubat només amb els anticossos secundaris. Els nuclis cel.lulars es visualitzen per mitjà de la tinció amb To-pro®-3-iodide (blau). Els materials i mètodes corresponents a aquesta figura són els mateixos que es troben descrits al primer article presentat en aquesta tesi (3.1).

7.2 Confocals de la γ -tubulina i la miotilina a les miotilinopaties

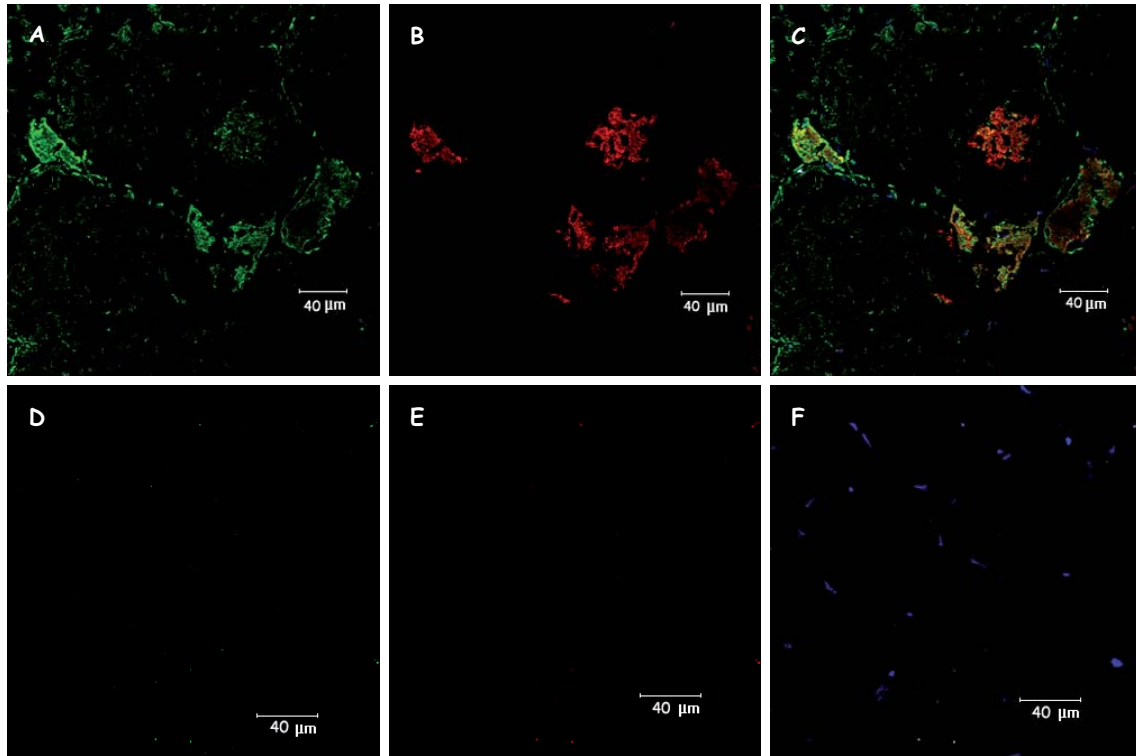


Fig 2. Immunofluorescència de doble marcatge observada per microscopia confocal de la γ -tubulina (verd, A) i la miotilina (vermell, B) a les miotilinopaties. S'observa una colocalització de la miotilina i la γ -tubulina a la majoria dels agregats proteics, sobretot a les fibres més atrofiques. Com a control negatiu (D-F) s'utilitza una secció del mateix cas incubat només amb els anticossos secundaris. Els nuclis cel.lulars es visualitzen per mitjà de la tinció amb To-pro®-3-iodide (blau). Els materials i mètodes corresponents a aquesta figura són els mateixos que es troben descrits al primer article presentat en aquesta tesi (3.1). L'anticòs de la γ -tubulina utilitzat en aquesta tècnica correspon a un anticòs policlonal de la casa Sigma utilitzat a una concentració de 1:100.

7.3 Confocals de la γ -tubulina i la desmina o la miotilina a les desminopaties

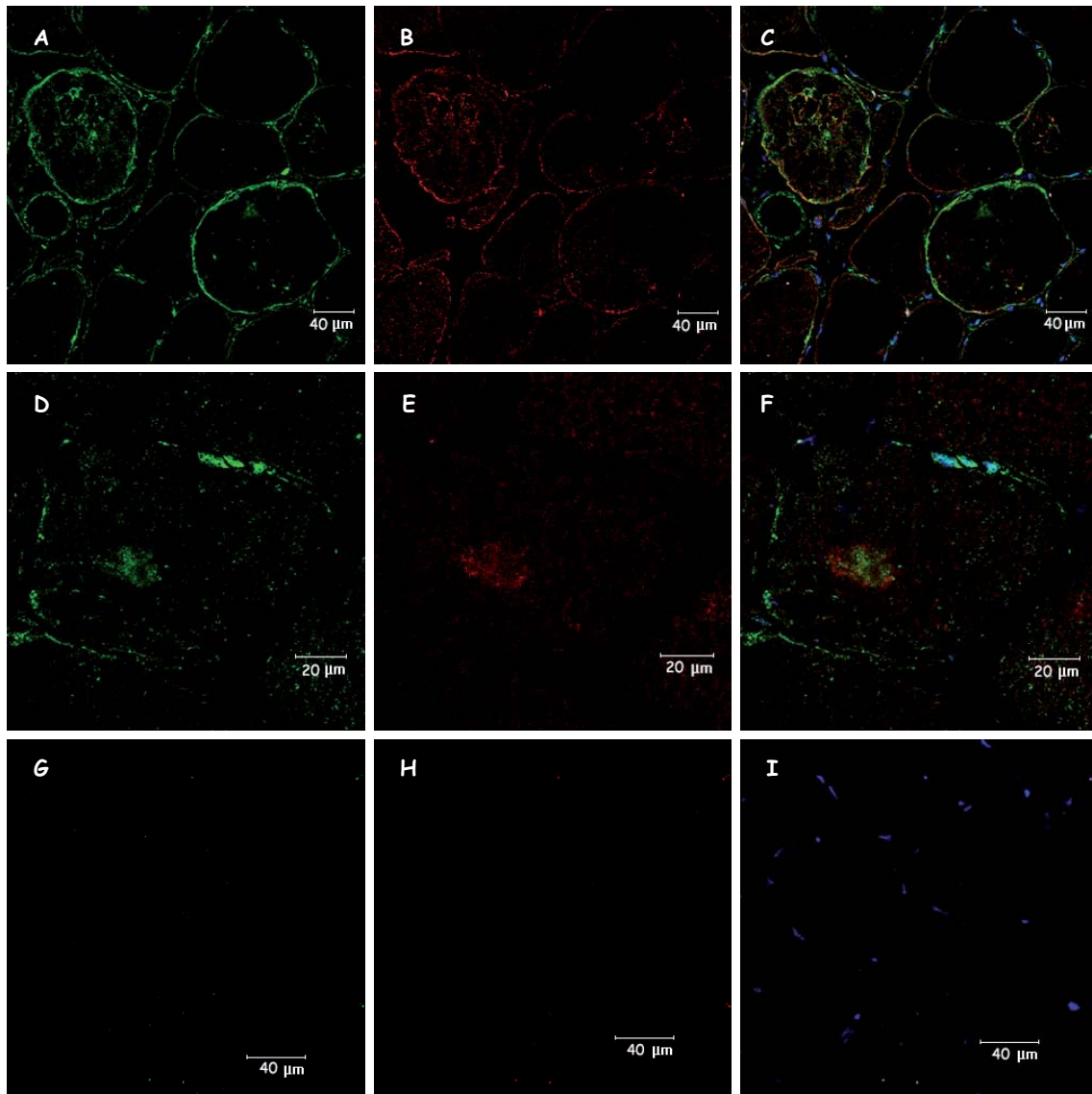


Fig 3. Immunofluorescència de doble marcatge observada per microscòpia confocal de la γ -tubulina (verd, A i D) i la desmina (vermell, B) o la miotilina (vermell, E) a les desminopaties. La desmina i la γ -tubulina colocalitzen parcialment sobretot a nivell dels agregats subsarcolèmics (solapament en groc, C), en canvi els agregats de miotilina, tot i ser menys freqüents hi colocalitzen totalment (solapament en groc, F). Com a control negatiu (G-I) s'utilitza una secció del mateix cas incubat només amb els anticossos secundaris. Els nuclis cel.lulars es visualitzen per mitjà de la tinció amb To-pro®-3-iodide (blau). Els materials i mètodes corresponents a aquesta figura són els mateixos que es troben descrits al primer article presentat en aquesta tesi (3.1). L'anticòs de la γ -tubulina utilitzat en aquesta tècnica correspon a un anticòs policlonal de la casa Sigma utilitzat a una concentració de 1:100.

7.4 RT-PCR de la miotilina i la desmina a les MFM

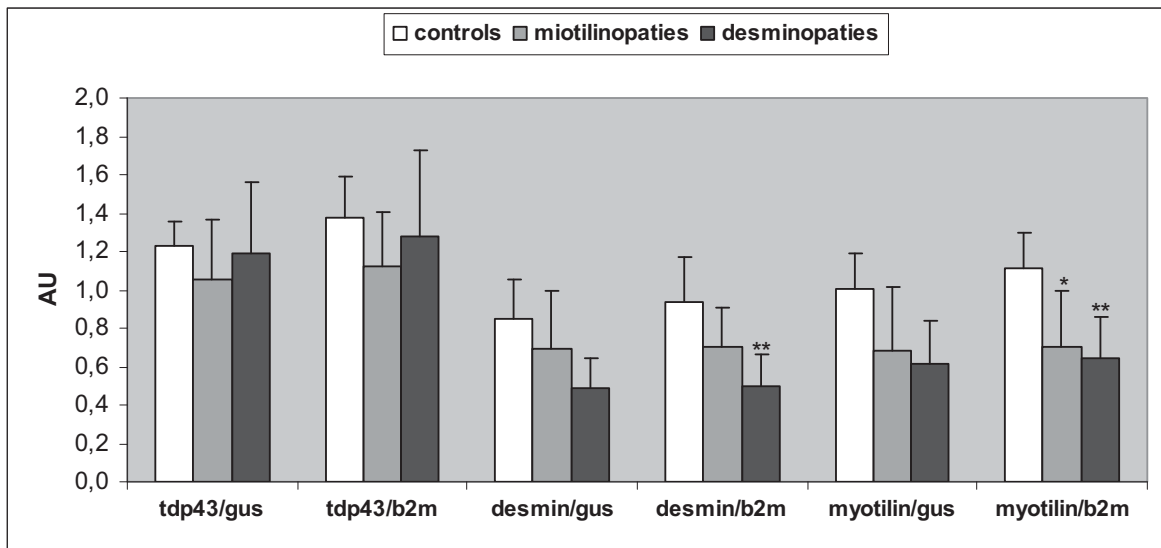


Fig 4. Nivells d'expressió de la TDP-43 (Hs00606522_m1) i altres gens diana de les MFMs com són la desmina (Hs01090875_m1) i la miotilina (Hs00199016_m1) utilitzant TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems). A partir de l'extracció d'ARN amb RINs (RNA integrity number) superiors a 6 per 5 mostres de miotilinopaties, 4 de desminopaties i 6 controls, es procedeix a la seva conversió a cDNA i a la real-time PCR. A continuació es pot realitzar la quantificació relativa dels gens diana mitjançant la normalització de les dades obtingudes utilitzant dos controls endògens diferents (GUS i B2M). En ambdues patologies, tan la TDP-43 com els altres gens diana mesurats (miotilina i desmina), no presenten cap variació en el seu nivell d'expressió. Els materials i mètodes corresponents a aquesta figura són els mateixos que es troben descrits al quart article presentat en aquesta tesi (3.4).

7.5 Article de la fosforilació de la tau a les MFM

Tau phosphorylation in myotilinopathies and desminopathies

Anna Janué, Montse Olive, Isidre Ferrer

Institut de Neuropatologia, Servei Anatomia Patològica, IDIBELL-Hospital Universitari de Bellvitge, Universitat de Barcelona, 08907 Hospitalet de Llobregat, CIBERNED, Spain

CA: I. Ferrer, e-mail: 8082ifa@gmail.com

Abstract

Tau expression and tau phosphorylation were examined in muscle biopsies of sporadic inclusion body myositis (sIBM), myotilinopathies and desminopathies compared with controls. A panel of anti-tau antibodies including 3Rtau, 4Rtau, phospho-specific tau Thr181, Ser262, Ser396, Ser422 and antibody AT8 (recognizing phosphorylation sites Ser202 and Thr205) and Alzh50 (conformation-dependent) showed diffuse staining in scattered fibers and peripheral or central aggregates in sIBM and myotilinopathies, and to a much lesser degree in desminopathies, when compared with controls. This was accompanied by significantly increased tau expression on western blots immunostained with PHF1 antibody, which recognizes a band of 120 kDa corresponding to big tau and several bands of lower molecular weight between 60 and 70 kDa, in sIBM and some myotilinopathy cases. Increased tau accumulation is not accompanied by increased tau mRNA expression levels but by increased focal immunoreactivity in damaged fibers which is variable from one case to another. Increased tau immunoreactivity is associated with increased focal expression of several kinases known to be involved in tau phosphorylation *in vitro* such as AKT-P, MAPK/ERK-P, GSK-3 β Ser9, GSK-3 β Tyr, and stress kinases SAPK/JNK-P and p38-P. These findings confirm previous observations in sIBM, demonstrate tau hyper-phosphorylation and abnormal deposition in damaged muscular fibers in myotilinopathies and suggest the involvement of varied kinases in this process. GSK-3 $\alpha\beta$ appears to be a cardinal kinase accompanied by stress kinases SAPK/JNK-P and p38-P, linking the later previously described oxidative stress with tau phosphorylation in sIBM and myofibrillar myopathies. On the basis of these data, sIBM and myotilinopathies can be considered secondary tauopathies affecting the skeletal muscle.

Key words: sporadic inclusion body myositis, myotilinopathy, desminopathy, myofibrillar myopathy, protein aggregate myopathy, tau, tau kinases

Introduction

Protein aggregate myopathy (PAM) is a term that serves to define myopathies with abnormal protein aggregates [15]. Sporadic inclusion body myositis (sIBM) is a common sporadic inflammatory muscle disease in people older than 50 years which is pathologically characterized by the accumulation of aberrant protein aggregates, rimmed vacuoles, groups of atrophic fibres and focal lymphocyte infiltrates [2, 3, 8, 36]. Myofibrillar myopathies (MFM) are a clinically, pathologically and genetically heterogeneous group of muscle disorders defined by focal dissolution of myofibrils, accumulation of the products of myofibrillar degradation and ectopic expression of multiple proteins forming intracellular protein aggregates [9, 13, 15, 32, 42, 43]. MFMs are caused by mutations in different genes, most of which encode proteins of the sarcomeric Z-disc, including desmin [17, 18, 29, 37], α B-crystallin [46], myotilin [38, 44], ZASP [45], and filamin C [47]. In addition to the corresponding mutated protein, protein aggregates in MFM are composed of several additional proteins of the Z-disc and cytoskeleton, and dystrophin, chaperones, phospho-tau and β -amyloid, plectin, gelsolin, cyclin-dependent kinases, clusterin, proteosomal subunits, ubiquitin, mutant ubiquitin and p62 [9, 10, 12, 13, 33, 39, 43].

Microtubule-associated protein tau (MAPT) or tau protein is a major component of neurons, but it is also found in other non-neuronal tissues including the skeletal muscle [19]. Accumulation of tau protein in muscle disorders was first reported in vacuoles and inclusions in sIBM [1]. Tau is also accumulated in regenerating fibres in oculopharyngeal and Becker muscular dystrophy, dermatomyositis, central core disease, and neurogenic atrophy, as well as in the recovery phase of an attack of malignant hyperthermia [24]. The phosphorylation state of tau has been suggested as the main difference between regenerating fibres and fibres with aberrant tau accumulation [30]. Yet phosphorylated tau in sIBM is found in atrophic non-vacuolated fibres, non-necrotic fibres in the vicinity of inflammatory cells, and fibres with rimmed vacuoles [26]. Finally, tau also appears accumulated in autophagic vacuoles in rat models of vacuolar myopathy induced by chloroquine [31]. Several kinases such as cyclin-dependent kinase 5 (cdk5), extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) and glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) have been described as being involved in tau phosphorylation in sIBM [23, 34, 35, 48, 49]. Yet little is known about the characteristics of tau phosphorylation in MFMs. Possible involvement of these kinases, as well as of stress-activated protein kinase/Jun kinase (SAPK/JNK), p38, and protein kinase B (AKT), has not been explored in MFMs.

The present study examines tau phosphorylation in myotilinopathies and desminopathies, in comparison with sIBM to analyze commonalities and differences of tau phosphorylation in these different types of PAM.

Materials and methods

Patients and muscle biopsies

Muscular biopsy samples from seven controls, five sIBM, five desminopathies and six myotilinopathies were used in the present study. A summary of cases is shown in Table I.

Immunohistochemistry

Cryostat sections, 8 µm-thick, were fixed with acetone at -20°C for 10 min, incubated with 1% hydrogen peroxide for 5 min followed by 3% horse normal serum for 2 h, and then incubated overnight with one of the primary antibodies listed in Table II. After washing, the sections were processed with LSAB+ System-HRP (Dako, Barcelona, Spain) following the instructions of the manufacturer. The immunoreaction was visualized as a dark blue precipitate using NH₄NiSO₄ (0,05M) diluted in phosphate buffer (0.1M) with 0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.04% NH₄Cl and 0.001% hydrogen peroxide. Sections processed only with the secondary antibody were used as negative controls.

Western blotting

50 mg of frozen muscle samples were homogenized with a manual glass homogenizer in ice with 1 ml of homogenizer buffer (75mM Tris-HCl pH 6.8, 0.001% (w/v) bromophenol blue, 15% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 5% (v/v) β-mercaptoethanol) and a mixture of protease inhibitors containing 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 µg/ml pepstatin A, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin. Total homogenates were boiled at 94°C for 4 min and centrifuged at 9,500xg for 5 min. Pellets were discarded, protein concentration of the resulting supernatant was determined by RC DC protein Assay (Bio-Rad, Madrid, Spain) and aliquots were stored at -80°C. For western blot studies, 30 µg of each sample was processed for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (20 mA/gel) and then transferred to nitrocellulose membranes (100 mA/gel overnight at 4°C) in a Trans-Blot Cell Transfer System (Bio-rad). Membranes were stained with Ponceau Solution (Sigma, Madrid, Spain) as a transfer quality control, and were immediately blocked with 5% skimmed milk TBS-T (100 mM Tris base, 1.4 M NaCl and 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. Then the membranes were incubated with one of the primary antibodies, as shown in Table II, overnight at 4°C. Subsequently, the membranes were washed with TBS-T and then incubated with the corresponding secondary antibody labeled with horseradish peroxidase (Dako) at a dilution of 1:1,000 in the same buffer (TBS-T with 5% skimmed milk) for 45 min at room temperature. After washing the membranes with TBS-T, protein bands were detected by the chemiluminescence ECL method (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The myosin band of 205 kDa stained with Coomassie Brilliant Blue R (Sigma) in the post-transfer gel was used as a control of protein loading. The densitometric quantification of western blot bands was carried out with TotalLab TL100 v2006 software, and the data obtained were analyzed using Statgraphics Plus v5.1 software. Differences between control and pathologic samples were considered significant when the p value in a t-Student or Wilcoxon test was lower than 0.05 (*). All cases in Table I were processed in triplicate; representative western blots currently included four controls and four diseased cases.

Cell culture

C2C12 myoblasts from C3H mouse strain (CRL 1772, ATCC, Rockville, USA) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco® Invitrogen, Barcelona, Spain) containing 15% fetal bovine serum (Gibco® Invitrogen) and 1X GIBCO Penicillin-Streptomycin liquid (Gibco® Invitrogen) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. To make cell lysates, cells were scrapped and resuspended in the same homogenizer buffer used for tissue.

mRNA isolation and cDNA Synthesis

Total RNA was purified from frozen muscle biopsies using the RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen, Madrid, Spain) following the instructions of the supplier. RNA integrity was assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent, Las Rozas, Spain). Then, total RNA of each sample was reverse-transcribed to a single stranded cDNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Madrid, Spain). Parallel reactions lacking MultiScribe Reverse Transcriptase were run as negative controls. Cases analyzed are those shown in Table I with RIN values.

TaqMan probes and endogenous control

TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) to detect MAPT mRNA were performed by using interrogated sequences NM_016834.3 (exon boundary 9-10), NM_016835.3 (exon boundary 13-14), NM_016841.3 (exon boundary 8-9), NM_001123066.2 (exon boundary 14-15), NM_001123067.2 (exon boundary 10-11), and NM_005910.4 (exon boundary 11-12). The human β -glucuronidase (GUS; 4333767) TaqMan endogenous control was used to normalize MAPT expression levels.

TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction

TaqMan polymerase chain reaction (PCR) assays were performed in duplicate on cDNA samples in a MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate sealed with MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). Each 20 μ l PCR reaction was prepared with 9 μ l of cDNA (diluted 1/5 in all cases) mixed with 1 μ l of 20X TaqMan Gene Expression Assay Mix and 10 μ l of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), as indicated by the manufacturer. Parallel reactions of all samples were performed in duplicate using GUS endogenous control assay for data normalization. Standard curves for each probe used in the study were obtained with serial dilutions of a muscle control sample. The thermal cycler parameters were set up for 2 min at 50°C (UNG activation), then 10 min at 95°C (enzyme activation), followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec (denaturation) and 1 min at 60°C (annealing/extension). The fluorescent PCR product was measured with an ABI PRISM 7900HT Fast Sequence Detection System (Applied Biosystems), and the emerging data were captured with the Sequence Detector Software (SDS, 1.9; Applied Biosystems).

Data processing and statistical analysis

Ct values for each sample were measured, and their equivalent amount of RNA was interpolated from the standard curves. These values were normalized, and acquired data were analyzed using Statgraphics Plus v5.1 software. Differences among control and pathologic samples were analyzed with ANOVA, followed by LSD post-hoc test.

Results

Immunohistochemistry

IBM: Increased tau immunoreactivity was observed in scattered muscle fibres, as previously reported [1, 27]. Increased immunoreactivity was demonstrated by using different anti-tau antibodies including those produced against phosphorylated tau, and recognizing 3Rtau and 4R tau isoforms (Fig. 1). Although not represented in these images, phospho-tau was found in atrophic fibers, in about 60% of fibers with rimmed vacuoles, and in non-vacuolated fibers with cytoplasmic protein aggregates in the same way as previously reported [27, 28].

Increased immunoreactivity for active kinases SAPK/JNK-P, MAPK/ERK-P, p38-P and AKT-P, and active and inactive GSK-3 β Tyr and GSK-3 β Ser9, was also found in the same fibers that accumulate tau (Fig. 1 and 2).

Myotilinopathies: Increased tau immunoreactivity was diffusely present in groups of small fibers, as well as in scattered muscle fibres with abnormal aggregates either located at the periphery or forming central and irregular clumps. Tau deposits were stained with antibodies against 3Rtau and 4Rtau, as well as with the phosphospecific anti-tau antibodies P-tau Thr181, Ser396, Ser 422, and with the monoclonal antibody AT8, and the conformation-dependent Alz50 (Fig. 3).

Increased immunoreactivity to active kinases AKT-P, MAPK/ERK-P, SAPK/JNK-P and p38-P, as well as GSK-3 β Tyr and GSK-3 β Ser9, was also observed in abnormal muscle fibers containing abnormal protein aggregates (Fig. 4).

Desminopathies: In contrast to sIBM and myotilinopathies, accumulation of 3Rtau, 4Rtau and phospho-tau was very discrete and restricted to very small diffuse amounts in scattered fibres in most cases. Yet increased tau immunoreactivity was present in some cases (Fig. 5). Increased immunoreactivity for tau kinases was barely discernible in tissue sections (data not shown).

Western blotting

Antibodies to PHF1 showed a band of about 120 kDa in control and diseased cases. A band of slightly lower molecular weight was detected in C2C12 cells run in parallel. In addition to the big tau, several bands of lower molecular weight, some of them between 60 and 70 kDa, and others of about 40 kDa, were detected after long exposure (Fig. 6). Densitometric studies revealed significantly increased levels of the big tau in sIBM when compared with controls (t-Student or Wilcoxon test, $p < 0.05$). Increased expression levels were seen in two cases with myotilinopathy but not in the other two when compared with controls. Differences were not significant between controls and myotilinopathies as a group (Fig. 6). Expression levels of PHF1 in desminopathies were variable from one case to another; but total expression levels were not significantly different from those found in controls (Fig. 6).

Antibodies to GSK-3 α/β showed two bands of 51 kDa and 47 kDa corresponding to α and β , respectively, in control and diseased samples. Increased expression of GSK-3 α/β was found in sIBM, myotilinopathy and desminopathy cases when compared with controls. Densitometric studies of all cases revealed significant differences (t-Student or Wilcoxon test, $p < 0.05$) of the band corresponding to GSK-3 α but not of GSK-3 β between control and sIBM and myotilinopathy. No significant differences were seen between controls and desminopathies.

MAPT mRNA expression levels

MAPT mRNA expression was detected in all cases analysed in this study including controls, sIBM, myotilinopathies and desminopathies. No significant differences were seen between control and diseased cases when MAPT values were normalized with GUS (data not shown).

Discussion

PHF1 antibody recognizes a protein of about 120 kDa in total homogenates of skeletal muscle biopsies in the present series. The molecular weight of this isoform correlates with that previously described as big tau in the peripheral nervous system [7, 16]. Big tau is generated as a result of alternative splicing from the same gene that encodes other tau isoforms. The protein has the same sequence as the longest known tau isoform in the central nervous system with an additional 254 amino acid insert in the amino terminal half [16]. High molecular tau in skeletal muscle was first described in dermatomyositis and central core disease, and in the recovery phase of an attack of malignant hyperthermia [24]. A doublet of 60-62 kDa was previously reported in sIBM cases [26]. Other bands between 60 and 70 kDa, as well as bands of lower molecular weight were also recognized with the PHF1 antibody in the skeletal muscle in the present series of sIBM and myotilinopathy cases. It is known that the epitope recognized by the PHF1 antibody corresponds to amino acids 404-441 of human tau and also comprising the phospho-epitope Ser 396/404 [25, 40]. Thus, the phosphorylation of this site appears to be an event involved in the normal function of this tau isoform in skeletal muscle. The detection of the band of 120 kDa and the lower bands between 60 and 70 kDa in control and diseased cases does not support the concept of a pattern specific to a particular pathology. The difference between control and pathological cases is quantitative rather than qualitative. The expression of PHF1 is significantly increased in sIBM when compared with controls, and markedly increased in some biopsies of myotilinopathy.

Tau deposition and increased tau phosphorylation in sIBM was reported many years ago [1] and was clearly characterized by using several antibodies in optical and immunoelectronmicroscopical sections [27]. More recent immunohistochemical studies evidenced tau phosphorylation in MFMs as well [10, 13]. A recent study has suggested that immunostaining of tau in sIBM, as recognized by antibodies tau-5, pS422, and SMI-31, is not specific, as these antibodies stain myonuclei and proteins other than tau [41]. However, the present findings further support tau accumulation and focal deposition of phospho-tau in sIBM and certain MFMs. Myotilinopathies have a similar pattern of tau phosphorylation and tau deposition when compared with sIBM. Deposits of tau isoforms recognized with antibodies against 3R and 4R are found equally in sIBM and myotilinopathy. Furthermore, phospho-specific antibodies against Thr181, Ser396 and Ser422, as well as antibodies AT8 (recognizing phosphorylation sites Ser202 and Thr205) and Alz50 (conformation-dependent) [4], facilitate the immunodetection of aberrant tau accumulation in the form of diffuse deposits in small fibers, peripheral aggregates in muscle fibres, and central deposits. Although not always accompanied by increased total levels on western blots (data not shown), the focal positivity for different antibodies raised against different phosphorylated and non-phosphorylated tau epitopes is a robust confirmation of aberrant tau deposition in sIBM and myotilinopathies. In contrast, only small amounts of abnormal tau are seen in desminopathies, thus further supporting the different pathology and pathogenesis of desminopathy when compared with myotilinopathy [5, 13, 14, 38, 39].

Several kinases have the capacity to phosphorylate tau *in vitro* and *in vivo*. MAPK/ERK and GSK-3 β , among others, have been described as being involved in tau phosphorylation in sIBM [23, 34, 35, 48, 49]. The present immunohistochemical data support the suggested involvement of AKT, MAPK/ERK and GSK-3 in tau phosphorylation in sIBM and myotilinopathies as well. In addition, phosphorylated stress kinases SAPK/JNK and p38 are also accumulated in fibres with abnormal tau phosphorylation. Whether these kinases activate tau phosphorylation, or are merely sequestered by abnormal protein aggregates in myotilinopathy, can not be resolved on the basis of the present biopsy series. However, the demonstration of oxidative stress

and oxidative cell damage in MFMs [13, 21, 22] puts forward a link among oxidative stress, activation of stress kinases and tau phosphorylation.

The consequences of hyper-tau phosphorylation in sIBM and myotilinopathy can only be hypothesized on the basis of the few available data. As in other cell types, microtubules in skeletal muscle are probably implicated in muscle differentiation, morphology and contractile activity [6]. This process is modulated by interaction with several proteins including microtubule-associated proteins of high molecular weight, tau and muscle specific proteins such as members of the RING finger (MURF) family, specifically MURF-2 and MURF-3 [28]. Regarding myotilinopathies, cellular models are probably needed to elucidate the interactions of all these components under normal conditions and in muscle cells bearing mutant myotilin.

Finally, the term tauopathy is currently used to name degenerative diseases of the nervous system with abnormal hyper-phosphorylated tau aggregates such as Alzheimer disease, progressive supranuclear palsy, corticobasal degeneration, argyrophilic grain disease, Pick disease and frontotemporal lobe degeneration linked to mutations in MAPT gene, among others, in all of which specific kinases play pivotal roles in tau hyper-phosphorylation [11, 20]. sIBM and myotilinopathies can be properly considered secondary tauopathies because of the accumulation of hyper-phosphorylated tau in association with abnormal protein aggregates.

Acknowledgements

This work was supported with FIS PI08-0574 grant . We wish to thank P. Davies for the gift of the antibody PHF1 and Alz50, M. Martinez for the preparation of C2C12 cells, D. Moreno for help in immunohistochemistry, and T. Yohannan for editorial assistance.

References

- [1] Askanas V, Engel WK, Bilak M, Alvarez RB, Selkoe DJ. Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau. *Am J Pathol* 1994;144:177-187.
- [2] Askanas V, Engel WK. Inclusion-body myositis, a multifactorial muscle disease associated with aging: current concepts of pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19:550-559.
- [3] Askanas V, King Engel WK. Inclusion-body myositis: muscle-fiber molecular pathology and possible pathogenic significance of its similarity to Alzheimer's and Parkinson's disease brains. *Acta Neuropathol* 2008; 116:583-595.
- [4] Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 1996; 271: 32789-32795.
- [5] Claeys KG, van der Ven PF, Behin A, Stojkovic T, Eymard B, Dubourg O, Laforêt P, Faulkner G, Richard P, Vicart P, Romero NB, Stoltenburg G, Udd B, Fardeau M, Voit T, Fürst DO. Differential involvement of sarcomeric proteins in myofibrillar myopathies: a morphological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol* 2009; 117: 293-307.
- [6] Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002; 18: 637-706.
- [7] Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liemi RKH, Shelanski ML, Nunez J. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 4378-4381.
- [8] Dalakas MC. Sporadic inclusion body myositis-diagnosis, pathogenesis and therapeutic strategies. *Neurology* 2006; 2: 437-447.
- [9] De Bleecker JL, Engel AG, Ertl B. Myofibrillar myopathy with foci of desmin positivity. II. Immunocytochemical analysis reveals accumulation of multiple other proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 563-577.
- [10] Ferrer I, Martín B, Castaño JG, Lucas JJ, Moreno D, Olivé M. Proteasomal expression and activity, and induction of the immunoproteasome in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63: 484-488.
- [11] Ferrer I. Stress kinases involved in tau phosphorylation in Alzheimer's disease, tauopathies and APP transgenic mice. *Neurotox Res* 2004; 6: 469-475.
- [12] Ferrer I, Carmona M, Blanco R, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Olivé M. Involvement of clusterin and the aggresome in abnormal protein deposits in myofibrillar myopathies and inclusion body myositis. *Brain Pathol* 2005;15: 101-108.
- [13] Ferrer I, Olive M. Molecular pathology of myofibrillar myopathies. *Exp Rev Molec Med* 2008; 10: e25.
- [14] Fischer D, Clemen CS, Olive M, Ferrer I, Goudeau B, Roth U, Badorf P, Wattjes MP, Lutterbey G, Kral T, van der Ven PF, Furst DO, Vicart P, Goldfarb LG, Moza M,

Carpen O, Reichelt J, Schroder R. Different early pathogenesis in myotilinopathy compared to primary desminopathy. *Neuromusc Disord* 2006; 16: 361-367.

[15] Goebel HH, Fardeau M, Olivé M, Schröder R. 156th ENMC International Workshop: Desmin and protein aggregate myopathies, 9-11 November 2007, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 2008; 18: 583-592.

[16] Goedert MG, Spillantini MG, Crowther RA. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 1983-1987.

[17] Goldfarb LG, Park KY, Cervenáková L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* 1998;19: 402-403.

[18] Goldfarb LG, Vicart P, Goebel HH, Dalakas MC. Desmin myopathy. *Brain* 2004; 127: 723-734.

[19] Gu Y, Oyama F, Ihara Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem* 1996; 67: 1235-1244.

[20] Hernández F, Avila J. Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2219-2233.

[21] Janue A, Odena MA, Oliveira E, Olive M, Ferrer I. Desmin is oxidized and nitrated in affected muscles in myotilinopathies and desminopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007a; 66: 711-723.

[22] Janué A, Olive M, Ferrer I. Oxidative stress in desminopathies and myotilinopathies: a link between oxidative damage and abnormal protein aggregation. *Brain Pathol* 2007b; 17: 377-388.

[23] Kitazawa M, Trinh DN, LaFerla FM. Inflammation induces tau pathology in inclusion body myositis model via glycogen synthase kinase-3beta. *Ann Neurol* 2008; 64: 15-24.

[24] Lübke U, Six J, Villanova M, Boons J, Vandermeeren M, Ceuterick C, Cras P, Martin JJ. Microtubule-associated protein tau epitopes are present in fiber lesions in diverse muscle disorders. *Am J Pathol* 1994;145: 175-188.

[25] Maas T, Eidenmüller J, Brandt R. Interaction of tau with the neural membrane cortex is regulated by phosphorylation at sites that are modified in paired helical filaments. *J Biol Chem* 2000; 275: 15733-15740.

[26] Maurage CA, Bussièrre T, Sergeant N, Ghestem A, Figarella-Branger D, Ruchoux MM, Pellissier JF, Delacourte A. Tau aggregates are abnormally phosphorylated in inclusion body myositis and have an immunoelectrophoretic profile distinct from other tauopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004; 30: 624-634.

[27] Mirabella, M.; Alvarez, R.B.; Bilak, M.; Engel, W.K.; Askanas, V. Difference in expression of phosphorylated tau epitopes between sporadic inclusion-body myositis and hereditary inclusion-body myopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 774-786.

- [28] McElhinny AS, Perry CN, Witt CC, Labeit S, Gregorio CC. Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development. *J Cell Sci* 2004; 117: 3175-3188.
- [29] Muñoz-Mármol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernandez-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E. A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalised myopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11312-11317.
- [30] Murakami N, Ishiguro K, Ihara Y, Nonaka I, Sugita H, Imahori K. Tau protein immunoreactivity in muscle fibers with rimmed vacuoles differs from that in regenerating muscle fibers. *Acta Neuropathol* 1995; 90: 467-471.
- [31] Murakami N, Oyama F, Gu Y, McLennan IS, Nonaka I, Ihara Y. Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 1998; 57: 664-673.
- [32] Nakano S, Engel AG, Waclawik AJ, Emslie-Smith AM, Busis NA. Myofibrillar myopathy with abnormal foci of desmin positivity. I. Light and electron microscopy analysis of 10 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 549-562.
- [33] Nakano S, Engel AG, Akiguchi I, Kimura J. Myofibrillar myopathy. III. Abnormal expression of cyclin-dependent kinases and nuclear proteins. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 850-856.
- [34] Nakano S, Akiguchi I, Nakamura S, Satoi H, Kawashima S, Kimura J. Aberrant expression of cyclin-dependent kinase 5 in inclusion body myositis. *Neurology* 1999; 53: 1671-1676.
- [35] Nakano S, Shinde A, Kawashima S, Nakamura S, Akiguchi I, Kimura J. Inclusion body myositis: expression of extracellular signal-regulated kinase and its substrate. *Neurology* 2001; 56: 87-93.
- [36] Needham M, Mastaglia FL. Inclusion body myositis: current pathogenetic concepts and diagnostic and therapeutic approaches. *Lancet Neurol* 2007; 6: 620-631.
- [37] Olive M, Armstrong J, Miralles F, Pou A, Fardeau M, Gonzalez L, Martinez F, Fischer D, Martinez Matos JA, Shatunov A, Goldfarb L, Ferrer I. Phenotypic patterns of desminopathy associated with three novel mutations in the desmin gene. *Neuromusc Disor* 2007a; 17: 443-450.
- [38] Olivé M, Goldfarb LG, Shatunov A, Fischer D, Ferrer I. Myotilinopathy: refining the clinical and myopathological phenotype. *Brain* 2005;128: 2315-2326.
- [39] Olivé M, van Leeuwen FW, Janué A, Moreno D, Torrejón-Escribano B, Ferrer I. Expression of mutant ubiquitin (UBB⁺¹) and p62 in myotilinopathies and desminopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007b; 34:76-87.
- [40] Otvos L Jr, Feiner L, Lang E, Szendrei GI, Goedert M, Lee VM. Monoclonal antibody PHF-1 recognizes tau protein phosphorylated at serine residues 396 and 404. *J Neurosci Res* 1994; 39: 669-673.
- [41] Salajegheh M, Pinkus JL, Nazareno R, Amato AA, Parker KC, Greenberg SA. Nature of "Tau" immunoreactivity in normal myonuclei and inclusion body myositis. *Muscle Nerve* 2009; 40: 520-528.

- [42] Selcen D. Myofibrillar myopathies. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 585-589.
- [43] Selcen D, Ohno K, Engel AG. Myofibrillar myopathy: clinical, morphological and genetic studies in 63 patients. *Brain* 2004a;127: 439-451.
- [44] Selcen D, Engel AG. Mutations in myotilin cause myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004b; 62: 1363-1371.
- [45] Selcen D, Engel AG. Mutations in ZASP define a novel form of Muscular Dystrophy in humans. *Ann Neurol* 2005;57: 269-276.
- [46] Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the α B-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 1998; 20: 92-95.
- [47] Vorgerd M, van de Ven PF, Bruchertseifer V, Lowe T, Kley RA, Schroder R, Lochmuller H, Himmel M, Koehler K, Furst DO, Huebner A. A mutation in the dimerization domain of filamin causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy. *Am J Hum Genet* 2005;77: 297-304.
- [48] Wilczynski GM, Engel WK, Askanas V. Association of active extracellular signal-regulated protein kinase with paired helical filaments of inclusion-body myositis muscle suggests its role in inclusion-body myositis tau phosphorylation. *Am J Pathol* 2000a; 156: 1835-1840.
- [49] Wilczynski GM, Engel WK, Askanas V. Cyclin-dependent kinase 5 colocalizes with phosphorylated tau in human inclusion-body myositis paired-helical filaments and may play a role in tau phosphorylation. *Neurosci Lett* 2000b; 293: 33-36.

Table I. Summary of the cases. RIN: RNA quality number. *DES*: demin gene; *MYOT*: myotilin gene.

	Age	Mutation	RIN
Controls			
1	70	-	-
2	64	-	9.7
3	68	-	9.5
4	29	-	9.3
5	52	-	9.5
6	36	-	9.1
7	77	-	8.8
sIBM			
8	61	-	7
9	79	-	-
10	62	-	6.9
11	66	-	6.9
12	58	-	7.7
Desminopathies			
13	41	<i>DES Pro419Ser</i>	9.2
14	27	<i>DES Arg406Trp</i>	9.3
15	55	<i>DES Leu392Pro</i>	9.4
16	28	<i>DES Ile367Phe</i>	-
17	22	<i>DES Arg406Trp</i>	7.2
Myotilinopathies			
18	53	<i>MYOT Ser55Phe</i>	-
19	52	<i>MYOT Ser60Cys</i>	9.2
20	49	<i>MYOT Ser55Phe</i>	9.1
21	78	<i>MYOT Ser60Phe</i>	9.5
22	81	<i>MYOT Lys36Glu</i>	9.6
23	69	<i>MYOT Ser60Cys</i>	9.6

Table II. Antibodies used in the present study. WB: dilutions used in western blots; IHQ: dilutions used in immunohistochemistry. P: polyclonal; M: monoclonal

Antibody	Type	Species	Manufacturer	WB	IHQ	City, Country
Phospho-tau Thr181	P	rabbit	Calbiochem	-	1:250	San Diego, USA
Phospho-tau Ser396	P	rabbit	Biosource	-	1:100	Nivelles, Belgium
Phospho-tau Ser422	P	rabbit	Calbiochem	-	1:50	San Diego, USA
PHF1	M	mouse	Davies P	1:500	-	Albert Einstein College, NY, USA
Alz50	M	mouse	Davies P	-	1:100	Albert Einstein College, NY, USA
3Rtau	M	mouse	Upstate, Millipore Corporation	-	1:200	Billerica, USA
4Rtau	M	mouse	Upstate, Millipore Corporation	-	1:25	Billerica, USA
AT8	M	mouse	Pierce	-	1:50	Rockford, USA
Phospho-MAPK 1/2Thr 202/Tyr 204 (MAPK/ERK-P)	M	mouse	Calbiochem	1:100	1:10	San Diego, USA
Phospho-SAPK/JNK Thr183/Tyr185 (SAPK/JNK-P)	P	rabbit	Cell Signaling	1:100	1:10	Danvers, USA
Phospho-p38 Thr180/Tyr182 (p38-P)	P	rabbit	Cell Signaling	1:250	1:25	Danvers, USA
Phospho Akt Thr308 (Akt-P)	P	rabbit	Cell Signaling	1:100	1:25	Danvers, USA
GSK-3 α/β	M	mouse	Stressgen	1:500	1:50	Ann Arbor, USA
Phospho-GSK-3 β Ser9 (GSK-3 β Ser9)	P	rabbit	Calbiochem	1:250	1:200	San Diego, USA
Phospho-GSK-3 β Tyr216 (GSK-3 β Tyr)	P	rabbit	Santa Cruz	-	1:250	Heidelberg, Germany

Figure legends

Figure 1: sIBM. Serial sections showing muscle fibres immunostained with the following antibodies, A: SAPK/JNK-P; B: MAPK/ERK-P; C: GSK-3 β Ser9; D: GSK-3 β Tyr; E: AT8; F: Alz50; G: P-tau Ser422; H: 4Rtau; and I: 3Rtau. Cryostat sections without counterstaining. x200

Figure 2: sIBM. Positive fibers immunoreactive for A: AKT-P; B: MAPK/ERK-P; C: p38-P; D: SAPK/JNK-P; E: GSK-3 β Ser9; F: GSK-3 β Tyr. Cryostat sections without counterstaining. x200

Figure 3: Myotilinopathies. Positive fibers immunoreactive for A: 3Rtau; B: 4Rtau; C: P-tau Thr181; D: Alz50; E: P-tau Ser422; F: AT8; G: 3Rtau; H: P-tau Ser396; I: P-tau-Thr181. A-F, correspond to one case; G-I: correspond to another case. Cryostat sections without counterstaining. x200

Figure 4: Myotilinopathy. Positive fibers immunoreactive for A: AKT-P; B: MAPK/ERK-P; C: SAPK/JNK-P; D: p38-P; E: GSK-3 β Tyr; F: GSK-3 β Ser9. Cryostat sections without counterstaining. x200

Figure 5: Desminopathy. Rare immunoreactive fibers are immunostained with antibodies A: 3Rtau; B: 4Rtau. Cryostat sections without counterstaining. x200

Figure 6: Representative gel electrophoresis and western blotting of total homogenates of controls, sIBM, myotilinopathy and desminopathy cases run in parallel with C2C12 cells of muscular origin using the PHF1 antibody. Two exposure times are shown in every case. A band of about 120 kDa is observed in control and diseased cases. A band of slightly lower molecular weight is also present in C2C12 cells (arrow) after longer exposure of the membranes. In addition, other bands of molecular weight between 60 and 70 kDa are observed in all muscle samples. Therefore, this pattern appears not to be disease-dependent. However, increased immunoreactivity of the bands is found in certain sIBM cases, and especially in two cases with myotilinopathy. The myosin band of 205 kDa stained with Coomassie Brilliant Blue R in the post-transfer gel was used as a control of protein loading. Densitometric studies of all cases (7 controls, 5 sIBM, 5 desminopathies and 6 myotilinopathies) revealed significantly increased levels of the big tau in sIBM when compared with controls (t-Student or Wilcoxon test, $p < 0.05$) but not in myotilinopathies (considered as a group) due to individual variations.

Figure 7: Representative gel electrophoresis and western blotting of total homogenates of controls, sIBM, myotilinopathy and desminopathy cases using the GSK-3 α/β antibody. Increased expression is found in sIBM, myotilinopathy and desminopathy cases when compared with controls. Comparison between pathologic cases and corresponding controls was carried out in samples run in parallel. The myosin band of 205 kDa stained with Coomassie Brilliant Blue R in the post-transfer gel was used as a control of protein loading. Densitometric study of the α band revealed significant differences (t-Student or Wilcoxon test, $p < 0.05$) between control and sIBM and myotilinopathy. Yet no significant differences were seen between control and desminopathy cases.

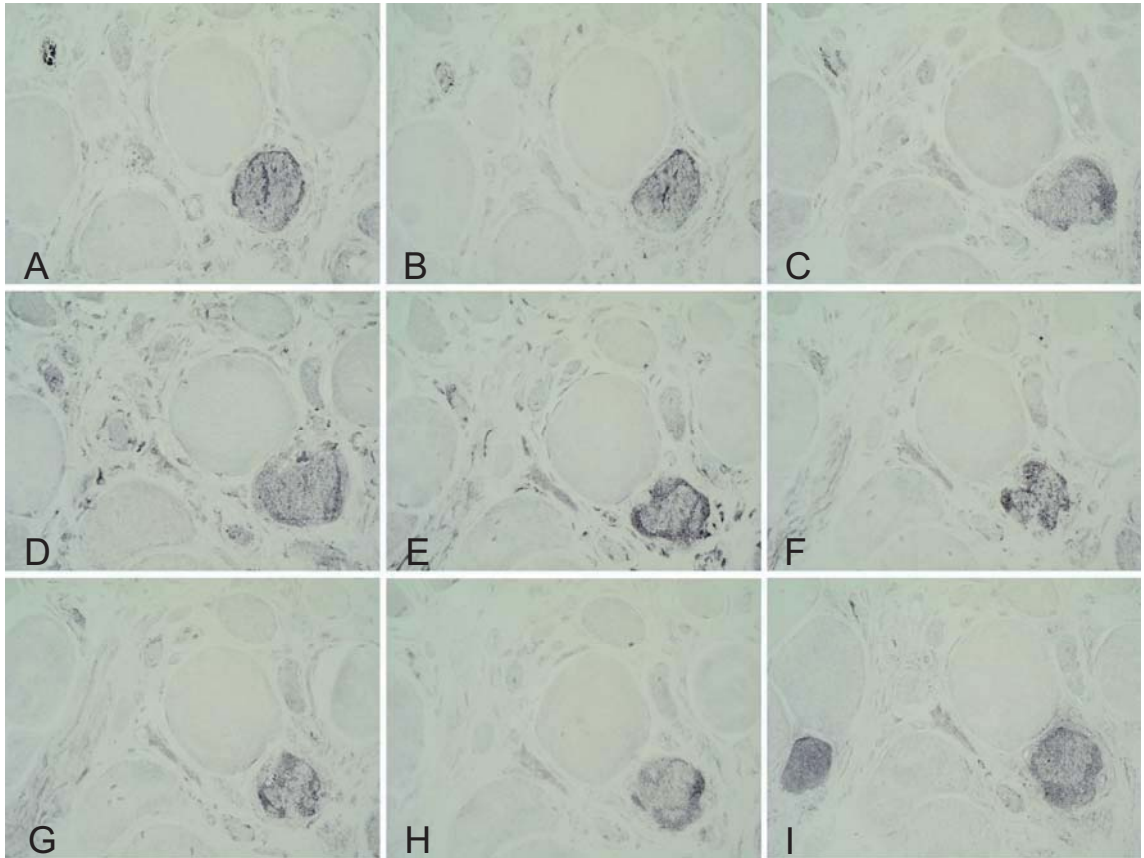


Fig. 1

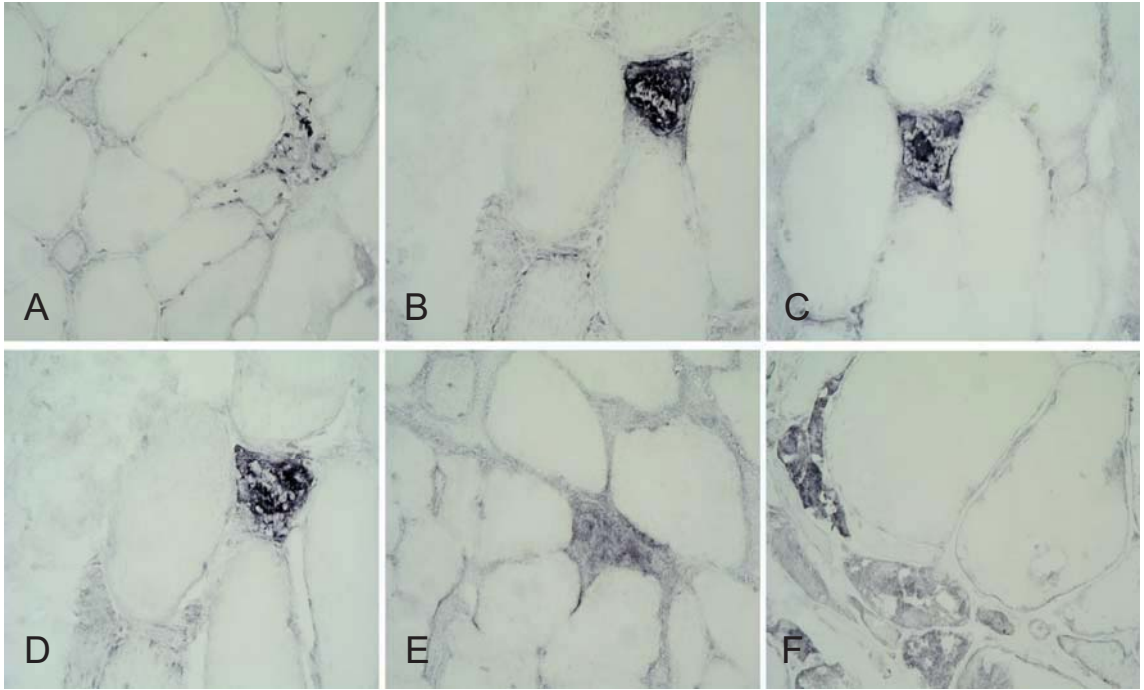


Fig. 2

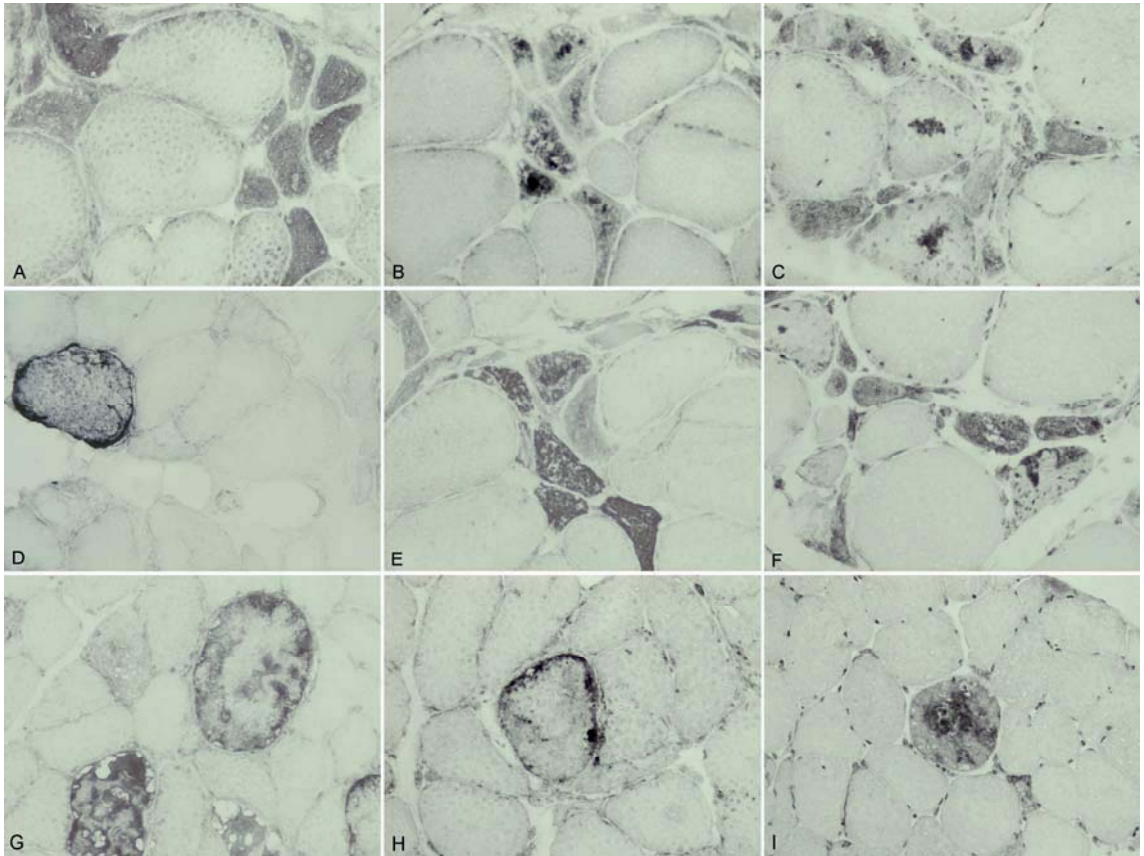


Fig. 3

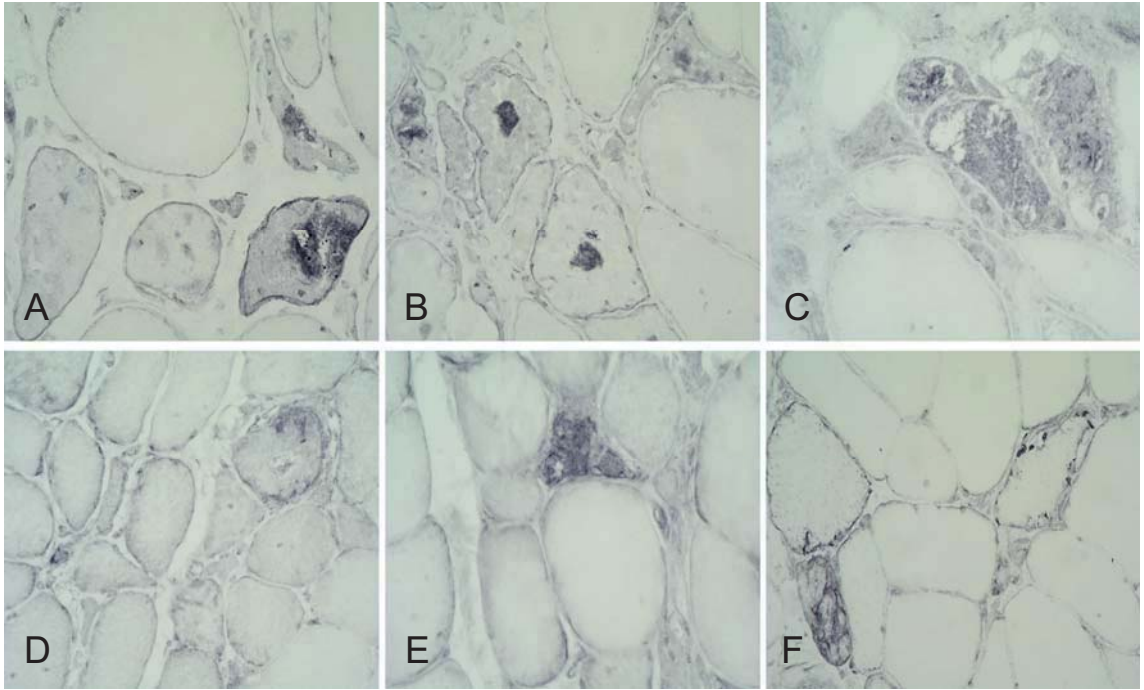


Fig. 4

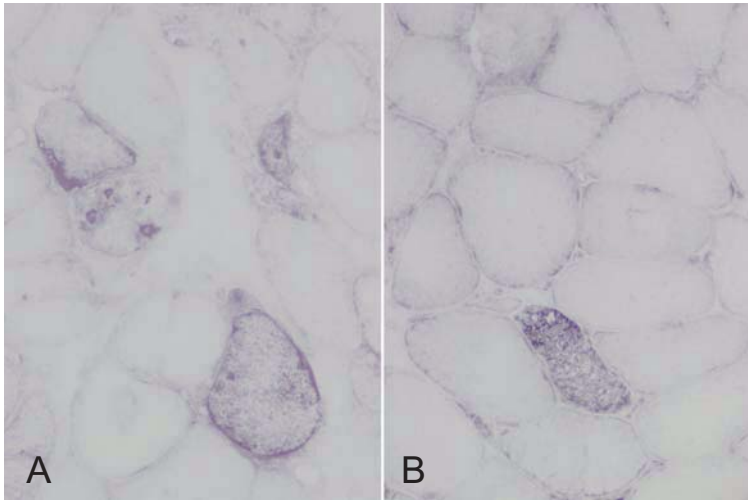


Fig. 5

PHF1 antibody

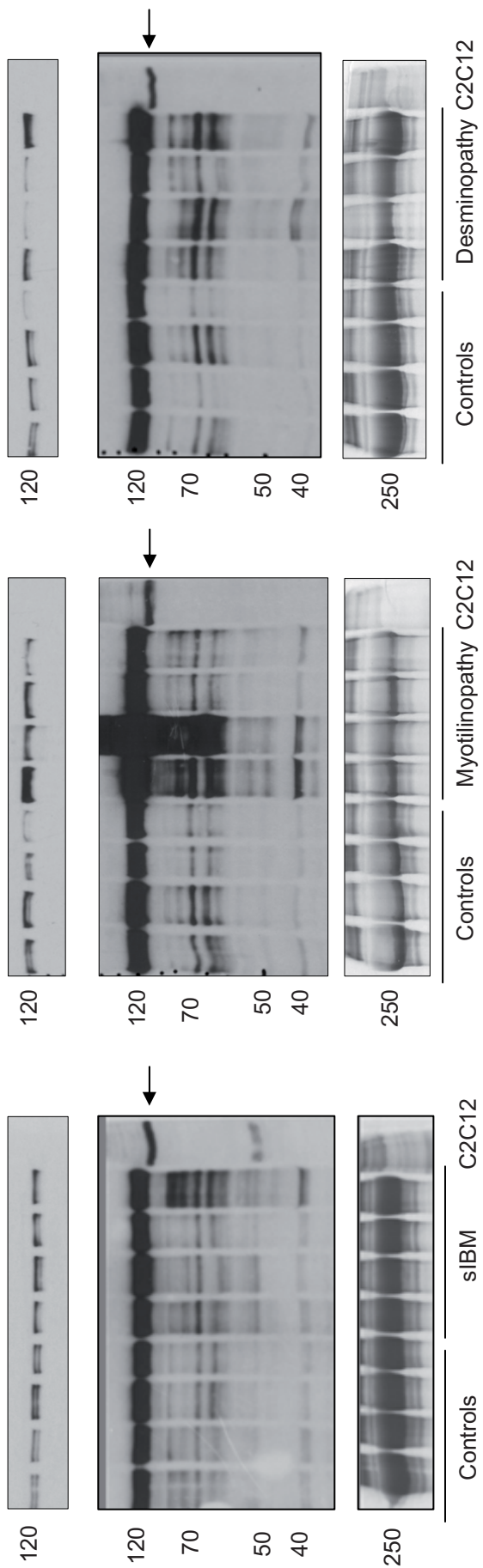


Fig. 6

GSK-3 α/β

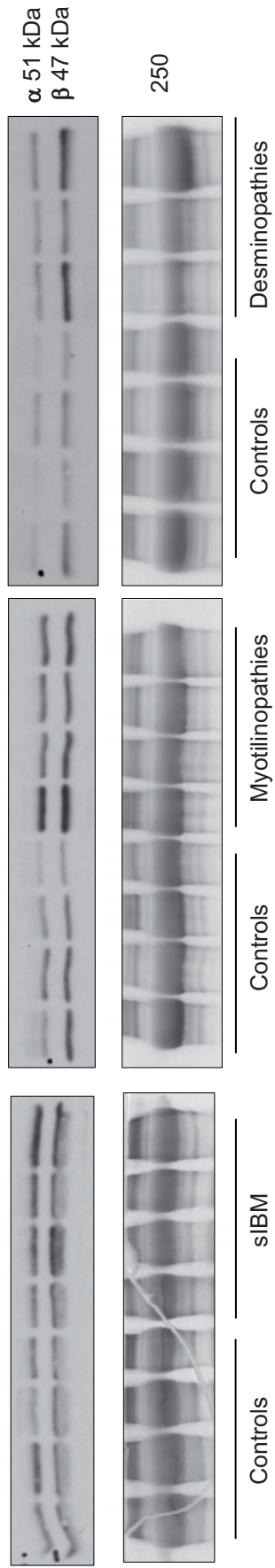


Fig. 7

7.6 Immunohistoquímica de la 14-3-3 a les MFM

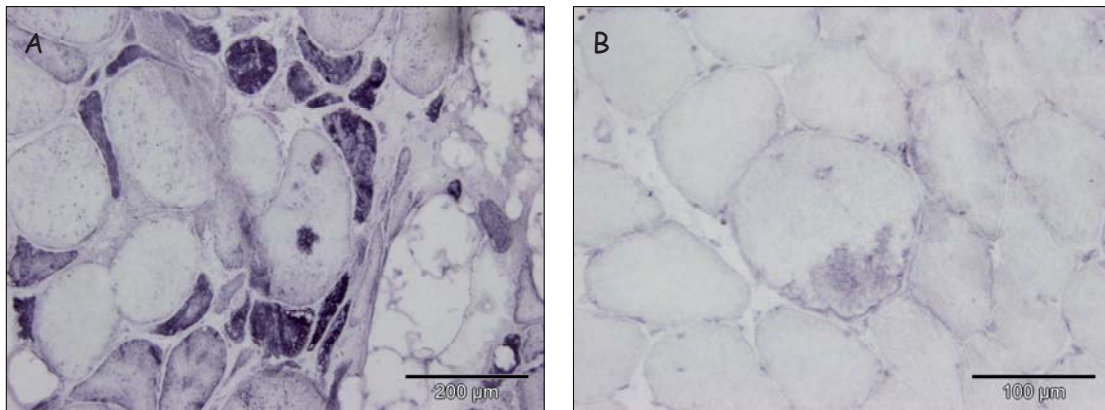


Fig 6. Immunohistoquímica de la 14-3-3 a un cas de miotilinopatia (A) i un altre de desminopatia (B). Si es comparen amb els resultats obtinguts amb els anticossos de la **GSK3 β** de l'article presentat a l'apartat de resultats annexos anterior, es pot observar que aquesta xaperona també s'acumula a les mateixes fibres on ho fa aquest enzim. Els materials i mètodes corresponents a aquesta figura són els mateixos que es troben descrits al article presentat a l'apartat de resultats annexos d'aquesta tesi (7.5). L'anticòs de la 14-3-3 utilitzat en aquesta tècnica correspon a un anticòs policlonal de la casa Abcam utilitzat a una concentració de 1:100.

III. AGRAÏMENTS

III. Agraïments

Doncs finalment ha arribat el moment d'escriure les últimes paraules d'aquesta tesi que ha costat una mica de parir, però és que després de tres anys frenètics, parar una mica per reflexionar i endreçar les idees resulta inevitable. I com que amb les presses d'avui en dia no tenim massa ocasions de donar les gràcies a les persones que ajuden o fan possible que arribin aquests moments, aprofitaré aquest ara que puc.

Primer de tot és imprescindible dir que l'elaboració d'aquesta tesi no hauria estat possible si el Dr. Isidre Ferrer no m'hagués donat l'oportunitat de treballar al seu grup, i en especial a l'Institut de Neuropatologia (INP) de l'Hospital Universitari de Bellvitge (HUB). Tampoc hauria estat possible sense el treball en equip realitzat amb el grup de malalties musculars de l'Institut de Neuropatologia (INP) format per la Dra. Montserrat Olivé i la tècnica de laboratori Dolores Moreno, que m'han ensenyat tot el que sé sobre les miopaties miofibril·lars i la manera de treballar amb el teixit muscular esquelètic. Gràcies Montse per les estones passades al microscopi multicapçal i gràcies Loli per ensenyar-me a treballar amb ordre i bones mans.

També cal destacar la col·laboració amb el grup de proteòmica del Parc Científic de Barcelona, que han fet tota la feina d'identificació de les proteïnes mitjançant l'espectrometria de masses, i que també ens han ajudat sempre a l'hora d'interpretar-ne els resultats.

Tampoc no hauria estat possible si no fós per totes les preguntes que pacientment m'han intentat respondre tots els meus companys i companyes. Com l'Agustí, el meu bon company de "poyata", o com es digui, el ratolí que em vas regalar encara m'acompanya. La Meri de qui vaig heretar el lloc a la "poyata". La Judith amb el seu riure tan contagiós o la Lourdes amb els seus bons consells. I després la Rosi amb la seva energia imparable o la Susana sempre tan enfeïnada. I tota la tropa del 4141 amb qui també he pogut treballar colze a colze. Les post-docs com la Dalfó, la Berta que em va donar un cop de mà amb els gels bidimensionals, la Marta Barrachina que ho va fer amb el RNA i les *real time*, la Marta Martínez amb les cèl·lules C2C12 i la Beatrice que sempre pregunta com et va. També la Marga amb la seva santa paciència i els altres tècnics, en Jesús i en Salva, que si cal també et donen un cop de mà. La Núria per fer-me un lloc al seu costat i en Benja amb el seu suport al confocal.

I com no, tots els altres becaris i becàries com la Laia, les altres Annes (Gómez i Martínez), la Sandra, l'Esther P, en Guido, en Gerard i en Gabriel amb qui em fet pinya tan dins com a fora del laboratori, a les calçotades, trasllats, sopars o excursions, ja sigui al Montseny, al Matarranya o al Canigó. I un bis per a en Gabriel per la seva ajuda inestimable amb la tau. I els i les noves, Gema, Anton i Esther sento no haver-vos pogut conèixer millor.

Finalment tampoc no ho hauria aconseguit sense l'ajuda dels meus pares, que sempre hi són tan si els necessito com si no, gràcies pel suport d'aquest últim any. I també la meva germana sempre amb un somriure a la cara, això sí que és un exemple a seguir. I sobretot a les meves incansables amigues, Fornells, Llimós, Bruna i Melo, que ja fa molt temps que fem el camí juntes i és un plaer. I els amics també incansables, Carlos, Txaume, Sergi i Víctor a qui no cansen ni les cerveses ni les partides al billar.

I a les de la uni, les "biolocas", per sopars inacabables i viatgets. Un especial a la Miris, que mentre intercanviàvem ànims, una per començar la tesi i l'altre per acabar-la, també compartíem hores de biblioteca a l'estiu o caps de setmana a la muntanya. I també a la Laia, l'Ada i l'Alfons per l'expedició a Càdiz. I també a la Joana per embolicar-me amb el projecte de la cooperativa, i a tots els de la Karabassa que gairebé farà un any que em senten parlar de la tesi entre verdures ecològiques. I per acabar, gràcies als companys de ball, sobretot a l'Alba i a en Pere, per ajudar-me a desfogar els nervis a ritme de swing.

En resum, gràcies a tots.