



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana

Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

GSK-3 β ren inhibizio bidezko TDP-43aren lokalizazioaren eta kopuruaren azterketa C2C12 zeluletan, muskulu distrofiatan izan dezakeen eragina finkatzeko

Egilea:

Beñat Salegi Ansa

Zuzendaria:

Ametz Sáenz Peña

Zuzendarikidea:

Mercedes Martinez Bilbao

© 2020, Beñat Salegi Ansa

Leioa, 2020ko ekainaren 19a

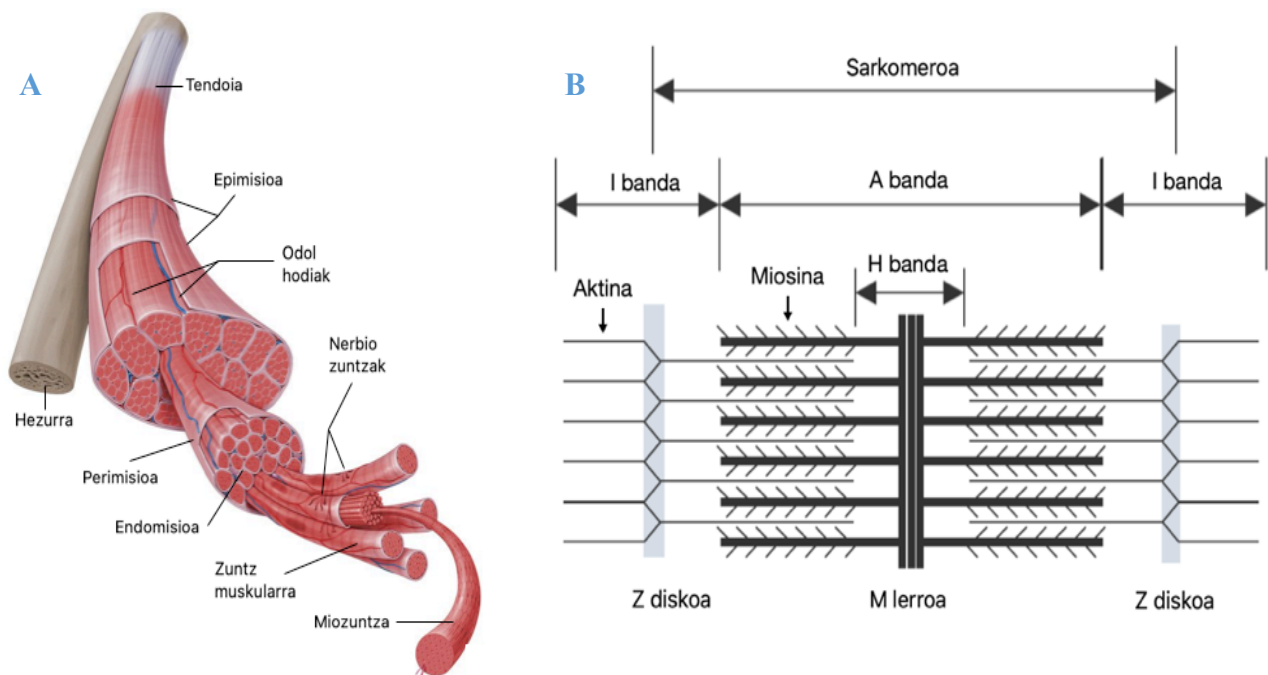
AURKIBIDEA

1	SARRERA	1
2	HELBURUAK	3
3	MATERIALA ETA METODOAK	3
	Hazkuntza zelularrak	3
	Farmako bidezko tratamendua.....	4
	Adierazpen genetikoaren azterketa	5
	Proteina mailaren azterketa.....	6
	Immunofluoreszentzia saioa	7
4	EMAITZAK	7
	Litioak <i>Ky</i> , <i>Myh3</i> eta <i>Frzb</i> geneen adierazpena handitzen du baina <i>Capn3</i> genearena murriztu.....	7
	Litioak, Wnt bidezidorra aktibatu arren, ez du TDP-43 proteinaren adierazpena areagotzen.....	8
	β -katenina mioblastoen zitoplasman ugariago adieraztea eragiten dute erabilitako farmako guztiek .	9
	LiCl bidezko tratamenduak TDP-43 proteinaren nukleorako sarrera eragiten du.....	10
5	EZTABAIDA	11
6	ONDORIOAK	14
7	BIBLIOGRAFIA	14
8	INFORMAZIO GEHIGARRIA	16
	Informazio gehigarria 1	16
	Informazio gehigarria 2	17
	Informazio gehigarria 3	18
	Informazio gehigarria 4	19
	Informazio gehigarria 5	21

1 SARRERA

Muskulu eskeletikoa ehun dinamiko eta plastikoa da, gizakion pisu guztiaren %40a osatzen duena. Funtzio ugari betetzen ditu, baina ikuspuntu mekaniko batetik aztertutik, energia kimikoa energia mekaniko bihurtzea da haren funtzio nagusia, honela, besteak beste, indarra eta mugimendua ahalbideratzen baitzizkigu (Frontera & Ochala, 2015). Muskulu eskeletikoaren unitate egitura zuntz muskularra da, sarkolemak (mintz zitoplasmatikoa) inguratutako zelula multinukleatu bat dena, nukleo horiek periferian kokatzen direlarik. Odol hodiak eta nerbio zuntzak dituzte inguruan eta ehun konektiboz osaturiko 3 geruza ezberdinek babesten eta egituratzen dituzte muskulu zuntzak: endomisioa, perimisioa eta epimisioa. Endomisioak zuntz muskularra inguratzen du, perimisioak zuntz muskularren taldekapean eta epimisioak muskulu guztiak (Mukund & Subramaniam, 2020) (1A. irudia). Zuntzez gain, muskulu eskeletikoan satellite zelulak daude, mononukleatuak eta multipotenteak direnak, kalte zelularrak egotekotan aktibatu eta horiek konpontzeko funtzioa dutenak (Frontera & Ochala, 2015).

Muskulu zuntz bakoitzaren %80a proteinaz osaturik dago, oso antolatutako dauden miozuntzetan egituratuak. Miozuntzak sarkomero deituriko egitura proteikoaren errepikapenak dira, zeintzuk, aldi berean, zuntz finez (α -aktina eta asoziatutako proteinak) eta zuntz lodiez (miosina eta asoziatutako proteinak) osaturik dauden. Zuntz horiek muskulu zuntzarekiko paraleloki antolatzen dira eta bisualki hainbat egitura ezberdintzen dira (1B. irudia): A banda, zuntz lodiez osatua; I banda, zuntz finez osatua; Z diskoa, I bandak erdibitzen dituena; eta H banda, M lerroa erdibitzen duena (zuntz finak Z diskora heltzen dira eta M lerroak zuntz lodiak elkartzen ditu). Egitura hau da muskularen uzkurduz arduratzen dena (Frontera & Ochala, 2015; Mukund & Subramaniam, 2020). Kostameroak sarkomeroak eta sarkolema lotzen ditu, sarkomeroak sortutako indar-uzkurduaren sarkolemarako eta kanpo matrizerako transmisioaz arduratzen delarik (Henderson *et al.*, 2017).



1. irudia. Muskulu eskeletikoaren irudi zehatza. (A) Muskulu eskeletikoaren egitura anatomikoa. Muskulua loturik dagoeneko hezurra eta tendoia, zuntz muskularrak inguratzen dituzten ehun konektibozko geruzak eta miozuntzak deskribatzen dira. Marieb, E., 2015 liburutik eraldatua. (B) Muskulu eskeletikoaren sarkomeroaren irudikapen eskematikoa, zuntz fin zein lodiak erakusten direlarik eta gainjartzen direnko bandak eta guneak izendaturik. Mukund & Subramaniam, 2020 artikulutik eraldatua.

Gerrietako muskulu-distrofiak, *Limb-girdle muscular dystrophies* (LGMDs) bezala ezagutuak bere ingeleseko izenagatik, eskapulako eta pelbiseko muskuluen ahuldura eta endekapena ezaugarri dituzten gaixotasun arraro eta heterogeneoak dira. LGMDek herentzia autosomikoa dute eta dominante (LGMD1) eta azpirakor (LGMD2) arteko sailkapena egin zen hasiera batean. Gaur egun, aldiz, gaixotasunaren 30 forma genetiko baino gehiago ezagutzen direnez (Domingos *et al.*, 2017) sailkapen berria proposatu da (Straub *et al.*, 2018). Lan honetan LGMD R1 calpain3-related (LGMDR1) azpimota izango da landuko duguna (kalpainopatia gisara ere ezagutua), gerrietako muskulu-distrofien artean ohikoenetarikoa, Gipuzkoan mundu mailako prebalentziarik handiena duena (Urtasun *et al.*, 1998). LGMDR1 gaixotasuna *CAPN3* genean emandako mutazioek eragiten dute, kalpaina 3 proteina kodetzen duena (Richard *et al.*, 1995). Proteina hau Ca^{2+} menpeko zisteina proteasa intrazelular ez-lisosomikoa da eta titinari batzen zaio (muskulu eskeletikoko proteina, sarkomeroa osatzen duten zuntzak batzen dituena), proteina sarkomerikoen proteolisia eraginez eta, beraz, haien aktibitatea erregulatuz. Proteina hau berezia da, 10-30 minuturen buruan autodegradatu egiten baita (Sorimachi *et al.*, 1993; Ono *et al.*, 2016).

LGMDR1 gaixoek ez dute kalpainarik adierazten, edo proteina ez funtzionala adierazten dute, horrek zelularen homeostasia aldatu eta beste hainbat generen adierazpena aldatzea eraginez (Sáenz *et al.*, 2008). Horietako bat da *FRZB*, zeinak “frizzled-related protein” proteina kodetzen duen, Wnt bidezidorreko (garapen eta homeostasi prozesu ugartan parte hartzen duen bidezidorra) Wnt1aren, Wnt5aren, Wnt8aren eta Wnt9aren antagonista extrazelularra dena (Kawano & Kypta, 2003). Gaixoek proteina hau gainadierazirik dute eta, beraz, Wnt bidezidorra inhibiturik (Jaka *et al.*, 2017). Bidezidor honetan bi bide bereizten dira, kanonikoa eta ez-kanonikoa. Bide kanonikoan, β -katenina zitosolikoaren egonkortasuna eta haren nukleorako translokazioa erregulatzen dira; translokazioa ematean, ugalketa zelularrean jarduten duten geneak adierazten dira. Wnt bidezidorra inhibiturik edukitzean, gaixoek β -katenina fosforilatu eta degradatu egiten dute (McCord *et al.*, 2017). Gainera, gaixoek kostameroaren osagai den β 1A integrinaren β 1Drako isoforma aldaketa oztopaturik dute eta *FRZB* genearen isilaraztearekin isoforma aldaketarako gaitasuna berreskuratzen dela ikusi da (Jaka *et al.*, 2017).

Litioa desoreka bipolarra, alzheimerra edota tiroideko minbizia tratatzeko erabiltzen den farmako bat da. Farmako honek Wnt bidezidor kanonikoa aktibatzen du glukogeno sintasa kinasa- 3β (GSK- 3β) inhibituz. Horrela, β -kateninaren degradazioa ekiditen da (Yang *et al.*, 2011). Litio kloruro (LiCl) bidezko *in vitro* tratamenduak eragin onuragarriak erakutsi ditu: txerri mioblastoen (MB) miotuborako (MT) ezberdintzapenaren eragitea (Yang *et al.*, 2011) eta muskulu-distrofia okulofaringeoko modelo zelular batean hilkortasun murrizketa (Abu-Baker *et al.*, 2013). Era berean, *in vivo* egindako ikerketek erakutsi dute epe luzeko litio tratamenduak eragin babesgarria duela atrofia espinalaren sagu modelo progresibo motelean (Biagioni *et al.*, 2017) eta 2019ko ikerketa batek LGMD1D modelo prekliniko baten ahultasuna eta miopatia zuzentzen dituela ikusi da (Findlay *et al.*, 2019). Gainera, giza miotuboen LiCl bidezko tratamenduak *FRZB* genearen isilarazteak eragindako efektu gehienak imitatzen ditu, *FRZB* genearen azpiadierazpena horien artean (Jaka *et al.*, 2017).

Era berean, GSK- β beste hainbat patologia tratatzeko iturri gisa erabiltzen ari da, Alzheimerre kasu. Entzima honen inhibitzaileen artean, batzuk alosterikoak dira, kinasa honentzako selektiboak (Martinez *et al.*, 2002). Inhibitzaile espezifiko horien artean tiadiazolidinonen analogo diren Tideglusib eta VPO.7 farmakoak ditugu. Tideglusiba Alzheimerre tratatzeko diseinatu zen eta GSK-3 β era ez-itzulgarrian inhibitzen duen arren, gaixoetan ez du emaitza positiborik erakutsi (Lovestone *et al.*, 2015). Hala ere, Wnt bidezidorra aktibatzen duen gaitasunagatik, 1. motako sortzetiko distrofia miotonikoaren aurkako tratamendu gisara proposatu da eta saguetan miopatia mailak murrizten dituela frogatu da (Timchenko, 2019). VPO.7a, aldiz, GSK-3 β ren inhibitzaile itzulgarria da (Palomo *et al.*, 2011) eta haren deribatu batek 1. motako sortzetiko distrofia miotonikoa duten pazienteen mioblastoen miogenesi atzeratua zuzentzen duela ikusi da (Palomo *et al.*, 2017).

Zenbait miopatiatan eta distrofiatan, DNA batzen duen TAR 43 (TDP-43) proteina nuklearraren agregatu zitoplasmatikoak topatu dira. Proteina hau gene ezberdinen adierazpenaren erregulatuzailea da, muskulu eraketan (miogenesian) agregatu gisara (miogranulu deituak, amiloide plaken konformazio berdinekoak) existitzen dena: sarkomeroetako proteinak kodetzen dituzten mRNA-tara batuz, mRNA horien lokalizazioan eta erregulazioan parte hartzen du, muskulu eskeletikoaren birsorkuntzarako ezinbesteko proteina egiten duena. Prozesua amaitu ostean, TDP-43 proteina nukleora translokatzeko da (Vogler *et al.*, 2018).

Muskulu eskeletikoko gaixotasunetan, non zelulen birsortze maila oso handia den, TDP-43 miogranulu kantitatea handiturik dago, TDP-43 agregatuak zein amiloide fibrak sortzeko arriskua nabarmenki handituz. Era berean, TDP-43 nuklearra gutxiturik egon ohi da. (Kraemer *et al.*, 2010; Vogler *et al.*, 2018).

2 HELBURUAK

Lan honen bidez lortu nahi den helburu nagusia LiCl bidezko tratamenduak TDP-43 proteinaren kontzentrazioa zein lokalizazio zelularra aldatzen duen finkatzea da. Halaber, ikerketa honen bidez lortu nahi diren gainerako helburuak ondokoak dira:

- Litioa bezala, GSK3 β ren inhibitzaileak diren Tideglusib eta VPO.7 bidezko tratamenduek TDP-43aren lokalizazio zelularrean eraginik duten behatzea.
- Erabilitako farmakoek, Wnt bidezidorraren bidez β -kateninarengan eragiten dutenez, TDP-43rekiko efektua β -kateninarekiko menpekota ote den azaltzea.

Azkenik, litio, Tideglusib eta VPO.7 farmakoek muskulu distrofiatan agertzen den TDP-43 miogranulu zitoplasmatikoen kontzentrazio patologikoaren murrizketa lortuko balute, farmako hauek distrofia muskularren tratamendurako proposatuak izango lirarteke.

3 MATERIALA ETA METODOAK

Hazkuntza zelularrak

Lan osoan zehar ATCC® CRL-1772™ C2C12 lerro zelularra erabili zen. Zelula hauek sagu (*Mus musculus*) mioblastoak dira, muskulu zelula ugaztunen eredu, azkar diferentziatzeko gaitasuna baitute, lau egunetan miotubo uzkurkorak garatuz eta muskuluko proteina bereizgarriak adieraziz (McMahon *et al.*, 1994).

Nitrogeno likidotan izozturik zeuden C2C12 mioblastoak 37°Ctako ur bainuan desizoztu eta 3 mL proliferazio mediotan (DMEM %89, FBS %10, P/S F %1) bersuspenditu ziren ($5,3 \cdot 10^5$ zelula). Zelulak 5 minutuz 1.500 rpm-tara (22°C) zentrifugatu ostean (Allegra® X-15R centrifuge, *Beckman Coulter*), jalkina 1,5 mL proliferazio mediotan bersuspenditu zen. Ondoren, 5 mL proliferazio medio zituzteneko 3 p100 plaketan banatu ziren zelulak (bakoitzean 0,5 mL) eta inkubagailuan gorde 37°Ctara eta %5 CO₂tan 3 egunez. Zelula guztiei bi egunean behin medioa aldatu zitzaien, hazkuntza optimoa bermatzeko. Hiru egunen buruan, 3 p100etako zelulen medioa baztertu, DPBSaz garbitu eta T75 edukiontzietara pasa ziren. Horretarako, 2,5 mL tripsina %0,25 (w/v) gehitu zitzaien (tripsina (%2,5) %10 eta DPBS %90) zelulei eta 37°Ctan 15 minutuz inkubatu. Jarraian, zelula guztiak jaso eta 1.500 rpm-tara zentrifugatu ziren 10 minutuz (22°C), jalkina 6 mL proliferazio mediotan bersuspenditu eta 6 T75etan banatu (bakoitzean $1,66 \cdot 10^5$ zelula). Zelulak inkubagailuan gorde ziren beste hiru egunez. T75etatik zelulak p6etan eta p24etan plakeatu ziren, proteina mailaren eta gene adierazpenaren azterketa egiteko lehen kasuan eta immunofluoreszentziarako bigarren kasuan. Zelulei, hauek plakara hobeto heldu zitezten, gelatina gehitu zitzaien: %0,5 den gelatina (gelatina (%1,5) %33,2 eta ur destilatua %66,8) 1 mL p6 plaketan eta 0,5 mL p24etan mioblastoak haziko baziren eta %0,1 den gelatina (gelatina (%1,5) %6,6 eta ur destilatua %93,4) 1 mL p6 plaketan eta 0,5 mL p24etan mioblastoak miotuboetara desberdinduko baziren (gelatina gutxiago jartzen zaie zelulen mugimendua erraztu eta beraien arteko fusioa bultzatzeko).

Bi p6 plaka erabili ziren: batean 4 putzu 2 mL proliferazio medioz eta 25.000 zelulaz bete ziren eta bestean beste 4 putzu 2 mL proliferazio medioz eta 50.000 zelulaz. Bigarren kasuan gehituriko zelula kopurua bikoitza izan zen mioblastoak errazago fusionatu eta desberdindu zitezten. P24en kasuan aldiz, 6 erabili ziren: horietako batean mioblastoak haziko zirenez 5.000 zelula jarri ziren 20 putzutan, eta gainontzeko 5etan 10.000 zelula 55 putzutan, miotuboak lortzeko ([informazio gehigarria 1](#)). Gainera, p24ak immunofluoreszentziak egiteko erabiliko zirenez, lentillak gehitu ziren putzuetako bakoitzean, zelulak bertan hazi zitezten. Zelulak plakeaturik, inkubagailuan gorde ziren.

Mioblastoetako batzuk miotuboetara desberdintzatu behar izan ziren eta horretarako gutxienez 3 egunez ugaldtu ziren mioblastoei proliferazio medioa kendu eta diferentziazio medioa gehitu zitzaien (DMEM %97, Horse serum %2 eta P/S F %1). Medio aldaketa egin zitzaienteko unetik zenbatzen hasita, zelula horiek MT1 kontsideratu ziren egun bat igaro ostean, eta igarotzen zen egun kopurua izeneko zenbakiaren bidez adierazi zen. Honela, ikerketan zehar MT1-MT4 eta MT7ak erabili ziren miotuboen formakuntzan farmako bidezko tratamenduak eraginik zuen ikusteko, eta hala izatekotan, noiz eman zen ebazteko.

Farmako bidezko tratamendua

C2C12 zelulak hiru farmako ezberdinekin tratatu ziren: LiCl (10 mM), Tideglusib (2 µM) eta VPO.7 (2 µM). Horretarako, zelulak hazten ari zireneko medioa kendu eta farmakoa adieraziriko kontzentrazioan zuten proliferazio zein diferentziazio medioa gehitu zitzaien, zelulen beharren arabera. Kontrol gisara dimetilsulfoxidoa (DMSO) erabili zen, bai Tideglusiba eta baita VPO.7a ere disolbatzaile horretan kontserbaturik zeuden eta.

Farmakoa gehitu eta handik bi egunetara RNA eta proteina erauzketa eta immunofluoreszentziarako zelulen fixapena egin zen, honela zelula guztietan farmakoek eragina denbora berdinez eduki zutela bermatu zelarik.

Informazio gehigarria 1 atalean plaka guztiak nola tratatu ziren adierazirik dago.

Adierazpen genetikoaren azterketa

RNA erauzketa

p6 plakak **informazio gehigarria 1** atalean adierazi bezala LiClaz tratatu ziren (desberdintzapeneko bigarren egunean, MT2 zirenean, alegia, gehitu zitzaien litioa). Honela, 4 lagin ezberdin genituen: MB, MB+LiCl, MT4 eta MT4+LiCl. Horiek DPBSaz garbitu eta 700 µL trizol bidez tratatu ziren. Rasketarekin zelulak apurto eta RNAasa-rik gabeko eppendorfetan jaso ziren laginak. Azkenik, minutu batez *vortex*-ean irabiatu eta -80°Ctan gorde ziren.

Laginetako RNA isolatu zen hurrena. Laginetako bakoitzari 230 µL kloroformo gehitu, 15 segunduz *vortex*-ean irabiatu eta, 3 minutuz giro tenperaturan itxaron ostean, zentrifugatu (4°Ctan, 15 minutuz 12.000 g-tara) egin ziren. Honela hiru fase ezberdin zitueneko eppendorfak lortu ziren, fase gardenean gure RNA zegoelarik. Hura isolatu eta 500 µL isopropanol gehitu zitzaien, beste 15 segunduz *vortex*-ean irabiatu eta 10 minutuz (giro tenperaturan) utzi ziren. Ondoren, beste 10 minutuz zentrifugatu ziren (12.000 g-tara, 4°Ctan). Jalkina berreseki gabe 700 µL etanol gehitu ziren eppendorfa garbitzeko eta berriro ere zentrifugatu ziren laginak (5 minutuz, 12.000 g-tara, 4°Ctan). Jarraian, gainjalkina kendu eta 2 minutuz etanol arrastoak lehortu zitezten utzi ziren laginak (giro tenperaturan). 25 µL ur esteriletan (*RNAase free*) RNA bersuspenditu eta NanoDrop ND 1000 (*Thermo Fisher Scientific*) bidez RNA kontzentrazioa ebatzi zen 1 µL laginetan. Horretarako laginaren 260 nm-tako eta 280 nm-tako absorbantziak neurtu ziren eta bien arteko erlazioa 1,8 eta 2 artean zutenak puruak kontsideratu (**informazio gehigarria 2**).

Gene adierazpenaren kuantifikazioa RT-qPCR bidez

Ondoko geneen adierazpena aztertu zen: (1) Kalpaina-3 (*Capn3*) eta Diferentziazio miogenikoa 1 (*Myod1*) geneak, *Frzb*^{-/-} saguetan bi horiek gainadierazirik daudenez, Wnt bidezidorraren aktibatzaile den LiClak zein eragin duen aztertzeko (*Casas-Fraile et al., 2020*); (2) Frizzled-rekin erlazionaturiko proteina (*Frzb*) genea, litioak LGMDR1 gaixoen muskuluetan gene honen adierazpena gutxitzea eragiten duenez (gaixoek gainadierazirik dute), esperimentua ongi irten den ikusteko (*Sáenz et al., 2008*); (3) Miosina kate enbrionario astuna 3 (*Myh3*) genea, desberdintzapen prozesua jarraitzeko (*Schiaffino et al., 2015*); eta (4) Kyfoskoliosis peptidasa (*Ky*) genea, C3KO saguetan (*Capn3* gabeko saguak, LGMDR1aren modelo) azpiadierazirik dagoenez, litioak (Wnt bidezidorraren aktibazioaz) zein eragin duen ikusteko (*Jaka et al., 2012*) (**informazio gehigarria 2**). Lehenik eta behin, Master Mix nahastea eta lagina nahastu ziren (1:1) DEPCz trataturiko eppendorfetan RT-PCR bat eginez RNAtik cDNA lortzeko (**informazio gehigarria 2**). cDNA lorturik, laginak 5,5 ng/µL kontzentrazioa diluitu ziren: aztergai genituen 6 geneetako bakoitzarentzako disoluzioak prestatu ziren (disoluzio bakoitzean gene batekiko espezifikoa zen zunda zegoen) Master Mix-arekin (4,5 µL cDNA + 5,5 µL Master Mix) eta qPCRa burutu (**informazio gehigarria 2**).

Proteina mailaren azterketa

Proteina erauzketa

Aurreko atalean egin bezala, p6 plakak LiClarekin tratatu eta 4 lagin lortu ziren: MB, MB+LiCl, MT4 eta MT4+LiCl. Oraingoan, proteinak erauzteko, zelulak DPBSaz garbitu eta 80 µL Nicholson indargetzailea gehitu zitzairen. Rasketarekin zelulak apurtu eta eppendorf batean jaso ziren proteinak. Ondoren, lagina minutu batez *vortex*-ean irabiatu eta -80°Ctan gorde ziren erabili bitartean.

Lagineko proteina kontzentrazioa Bradford teknikaren bidez ebatzi zen. Horretarako laginak desnaturalizatu egin ziren (5 minutuz, 100°Ctara) eta DPBSan diluitu (1:50). BSA bidez zuzen patroia egin zen 1 mg/mL kontzentrazioetik hasita diluzio seriatuen bidez (1:2) eta lagin bakoitzean Western blot (WB) azterketa egiteko beharrezko 10 µg proteina lortzeko erabili beharreko lagin bolumena ebatzi zen ([informazio gehigarria 3](#)).

Proteina mailaren kuantifikazioa Western blot bidez

Azkenik, WB burutu zen (erabilitako disoluzio eta gelei buruz, [informazio gehigarria 4](#) atala). Aztergai genituen proteinak hurrengoak izan ziren: (1) fosforilaturiko GSK-3β (P-GSK3β) eta β-*katena*, LiCl bidezko tratamenduaren arrakasta egiaztatzeko; (2) Miosina kate astuna (MHC), litioak eragindako mioblastoen desberdintzapenaren adierazle; (3) TDP-43a, aztergai dugun proteina; eta (4) glizeraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), kontrol endogeno gisara ([informazio gehigarria 4](#)). Lehenik eta behin gel banatzailea eta gel biltzailea prestatu ziren eta 15 kaleko orraziarekin solidotzen utzi. Gelak solidoturik, running buffer 1x disoluzioan (running buffer 10x %10 eta ur distilatua %90) murgildu, orrazia kendu, kaleak garbitu eta laginak gehitu ziren (15 µL kale bakoitzean). Laginen 3 errepika egin ziren eta, beraz, 12 kale bete ziren guztira. *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™* markatzailea erabili zen (#1610375, *Bio Rad*), 4,5 µL errepika bakoitzean. Ondoren, elektroforesia burutu zen 2 orduz 50 mA-tan (*PowerPac Universal Power Supply*, *Bio Rad*). Gel elektroforesia amaiturik, gelak atera eta transfer buffer 1x disoluzioan (transfer buffer 5x %20, ur distilatua %60 eta metanola %20) murgildurik nitrozelulosazko mintzerako transferentzia burutu zen (hotzean, 400 mA-tan eta ordubetez).

Transferentzia amaiturik, mintzak Ponceau gorriarekin tindatu ziren, eta bisturiaren bidez moztu. Zati horiek blokeatu egin ziren hurrena (%5 esne zen TBS-T 1x disoluzian) ordubetez (giro tenperaturan). Amaitzean, TBS-T 1x-tan garbitu ziren 5 minutuz, hiru aldiz. Ondoren, %5 BSA zen 5 ml TBS-T 1x-tan antigorputzak gehitu eta mintzak hibridatzen utzi ziren 4°Ctan (gau osoan zehar). Erabilitako antigorputzak anti-β-*katena* (1:1.250), anti-TDP-43 (1:1.000), anti-P-GSK3β (1:1.000), anti-GAPDH (1:12.500) eta anti-MHC (1:10.000) izan ziren ([informazio gehigarria 4](#)). MHCren aurkako antigorputzak izan ezik (sagu jatorrikoak zirenak), gainontzeko guztiak untxi jatorrikoak ziren. Inkubazioaren ostean, TBS-T 1x-tan 7 minutuz garbitu ziren mintz zatiak, hiru aldiz, eta anti-rabbit eta anti-mouse antigorputz sekundarioekin (1:1.000 kontzentrazioan, %5 esnea den TBS-T 1x-tan) inkubatzen utzi gero ordubetez (giro tenperaturan). Jarraian, mintzak 5 minutuz TBS 1x-tan garbitu ziren bi aldiz, beste behin beste 5 minutuz TBS-T 1x-tan eta errebelatu egin ziren (*iBright Western Blot Imaging Systems*, *Thermo Fisher Scientific*) SignalFire™ ECL erreaktiboaren bidez. Emaitzen analisirako, kontrola zen GAPDHarekiko normalizatu ziren erantzunak dentsitometria analisi batean, NIH-ren ImageJ programaren bidez.

Immunofluoreszentzia saioa

6 lagin ezberdin ikertu ziren immufluoreszentzia saioen bidez: MB, MT1, MT2, MT3, MT4 eta MT7. Horietako hiruri (MB, MT4 eta MT7) farmako bidezko tratamendua aplikatu zitzairen zelulak fixatu baino bi egun lehenago (**informazio gehigarria 1**). Eguna iristean, zegokion plaka jaso eta zelulak lentilletan fixatu ziren. Horretarako, zelulak hazten ari zireneko medioa kendu, zelulak garbitu eta 300 µL paraformaldehido %4 (PFA) gehitu zitzairen, eta 10 minutuz inkubatzen utzi. Inkubazio denboraren ostean, PFA kendu, DPBSaz 2 aldiz garbitu eta 1 ml DPBSan hozkailuan gorde ziren p24 plakak (parafilmaz estalita).

Lentilletan fixaturiko zelulak pintzen laguntzaz jaso eta iragazkortu egin genituen %0,2 Triton X-100 eta %1 BSA zen DPBS disoluzioarekin, hamar minutuz. Ondoren, zelulak antigorputz primarioekin inkubatu ziren gau osoan zehar 4°Ctan: anti-MHC eta anti-β-katenina antigorputzekin batzuk (1:100 kontzentrazioan biak) eta anti-MHC eta anti-TDP-43 antigorputzekin besteak (1:100 kontzentrazioan biak). Inkubazioaren ostean zelulak DPBSaz garbitu eta antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren ordubetez giro tenperaturan: anti-rabbit (anti-MHC detektatzeko) eta anti-mouse (anti-β-katenina eta anti-TDP-43 detektatzeko) antigorputzak (1:500 kontzentrazioan biak) (**informazio gehigarria 4**). Antigorputz sekundario hauek Alexa Fluor fluoroforoekin konjugatuak zeuden: lehena Alexa Fluor 488arekin (berdea) eta bigarrena Alexa Fluor 555arekin (gorria). Azkenik, zelulak DPBSaz garbitu ziren eta bi minutuz Hoechst disoluzioan inkubatu ziren (giro tenperaturan) nukleoan markaketarako (urduz). Markaketak eginik, zelulak DPBSaz 3 minutuz 3 aldiz garbitu ziren, ur distilatuaz hiru minutuz beste bi aldiz eta MiliQ bidez bi minutuz beste pare bat aldiz .

Esperimentu hau beste behin errepikatu zen, antigorputz sekundarioek konjugaturik zuten fluoroforoak trukaturik: lehen esperimentuan anti-MHC antigorputz primarioa ikusteko Alexa Fluor 488arekin konjugaturiko anti-rabbit antigorputz sekundarioa erabili baldin bazen, bigarren esperimentuan antigorputz primario bera ikusteko Alexa Fluor 555arekin konjugaturiko anti-rabbit antigorputz sekundarioa erabili zen. Gauza bera egin zen gainontzeko antigorputz primarioak ikusteko. Zelulak ikusteko Nikon 80i epifluoreszentziatzko mikroskopia erabili zen. Esposizio denborak hurrengoak izan ziren: nukleoak 600 ms eta MHC, TDP-43 eta β-katenina 4 segundu.

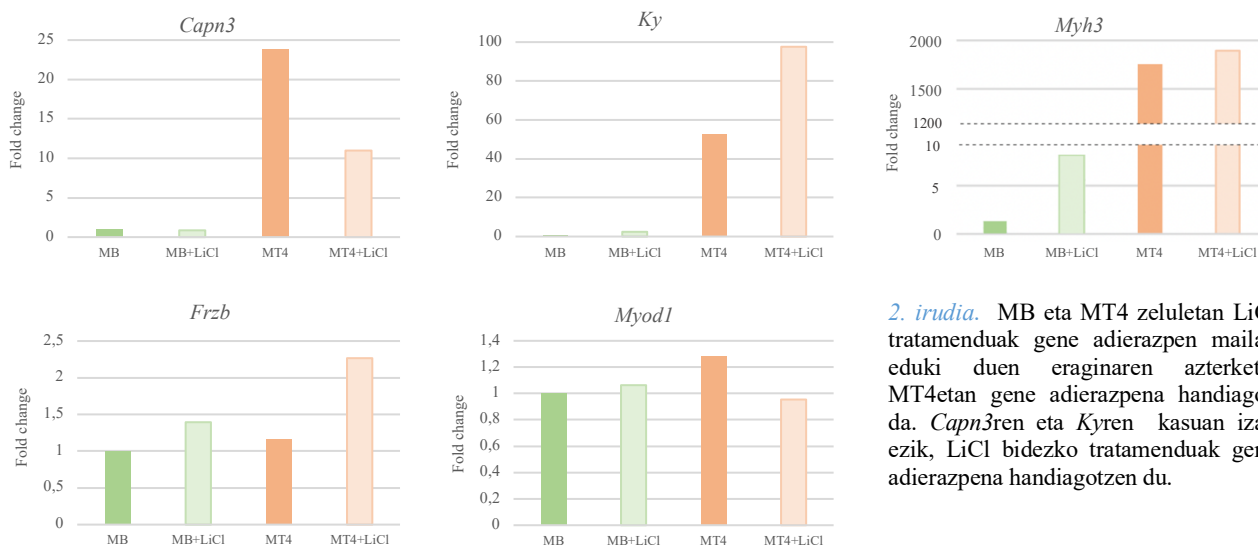
4 EMAITZAK

Litioak *Ky*, *Myh3* eta *Frzb* geneen adierazpena handitzen du baina *Capn3* genearena murriztu

Lehenik eta behin, C2C12 sagu mioblastoen eta miotuboen artean zegoen gene adierazpen ezberdintasuna aztertu nahi izan genuen, ondoren litioak adierazpen hori aldatzen ote zuen ikusteko eta bi zelula populazioetan eman zitezkeen erantzunaren ezberdintasunak aztertzeko. Horretarako, mioblasto zein desberdintzapeneko 2. eguneko zelulei (MT2) LiCl (10 mM) gehitu eta 48 ordutara laginak jaso genituen (MT2ak MT4 zirenean, alegia). Denbora tarte horretan zelulek jasandako gene adierazpen ezberdintasunak ikertzeko RT-qPCR bat burutu genuen 4 kasu ezberdinetan: MB, MB+LiCl, MT4 eta MT4+LiCl. Honela, 5 gene ezberdinen adierazpen maila neurtu genuen: *Capn3*, *Ky*, *Myh3*, *Frzb* eta *Myod1*.

5 kasuetan proteina adierazpen handitze bat ikusi genuen C2C12 zelulak mioblasto izatetik miotubotara desberdintzatzearekin batera, *Capn3*, *Ky* eta *Myh3* geneen kasua bereziki nabarmena izanik (**2. irudia**). LiClak

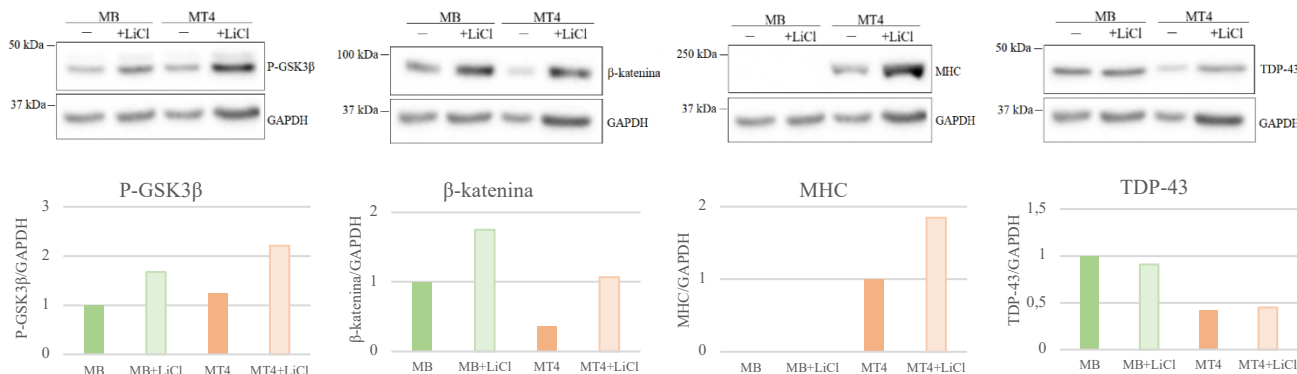
izandako eraginean, ordea, gene guztietan ez zen berdina izan. *Capn3* genearen kasuan LiCl tratamenduak haren adierazpenaren murrizpena eragin zuen diferentziazioko 4. egunean (mioblastoen kasuan ez dago ezberdintasun esangarririk). *Myod1* genearen kasuan, LiClak diferentziazioko 4. egunean gene adierazpena gutxitzea eragin zuen arren, eragindako aldaketa hori oso txikia izan zen. Gainontzeko hiru geneei dagokienez (*Ky*, *Myh3* eta *Frzb*), baina, LiClak haien adierazpena handitu egin zuen mioblasto zein miotubotan. *Myh3*ren kasuan mioblastoetako igoera oso handia izan zen, baina txikia desberdintzapeneko 4. egunean (**2. irudia**).



2. irudia. MB eta MT4 zeluletan LiCl tratamenduak gene adierazpen mailan eduki duen eraginaren azterketa. MT4etan gene adierazpena handiagoa da. *Capn3*ren eta *Ky*ren kasuan izan ezik, LiCl bidezko tratamenduak gene adierazpena handiagotzen du.

Litioak, Wnt bidezidorra aktibatu arren, ez du TDP-43 proteinaren adierazpena areagotzen

LiCl bidezko tratamenduak C2C12 zelulen proteina ezberdinen ugaritasunean zer nolako eragina zuen ikusi nahi izan genuen hurrena. Horretarako, Western blot bat burutu genuen 4 kasu ezberdinetan (MB, MB+LiCl, MT4 eta MT4+LiCl) lau proteina detektatu eta kuantifikatzeko: P-GSK3 β , β -katenina, MHC eta TDP-43 (**3. irudia**). P-GSK3 β apur bat gehiago zegoen desberdintzapeneko 4. egunean mioblastoetan baino, eta LiCl tratamenduak nabarmen handitu zuen haren kopurua bi zelula populazioetan. β -katenina gutxiago zegoen desberdintzapeneko 4. egunean mioblastoetan baino, baina LiCl tratamenduak proteina kopurua igotzea eragin zuen kasu bietan. MHCa desberdintzapeneko 4. egunean soilik detektatu genuen, eta LiCl bidezko tratamenduak proteina kantitatea bikoiztea eragin zuen ia. TDP-43-ren kasuan β -kateninarekin gertaturiko berdina ikusi genuen, baina LiCl tratamenduak ez zuen proteina kantitatean aldaketa nabarmenik eragin (ez mioblasto ezta miotubotan ere).

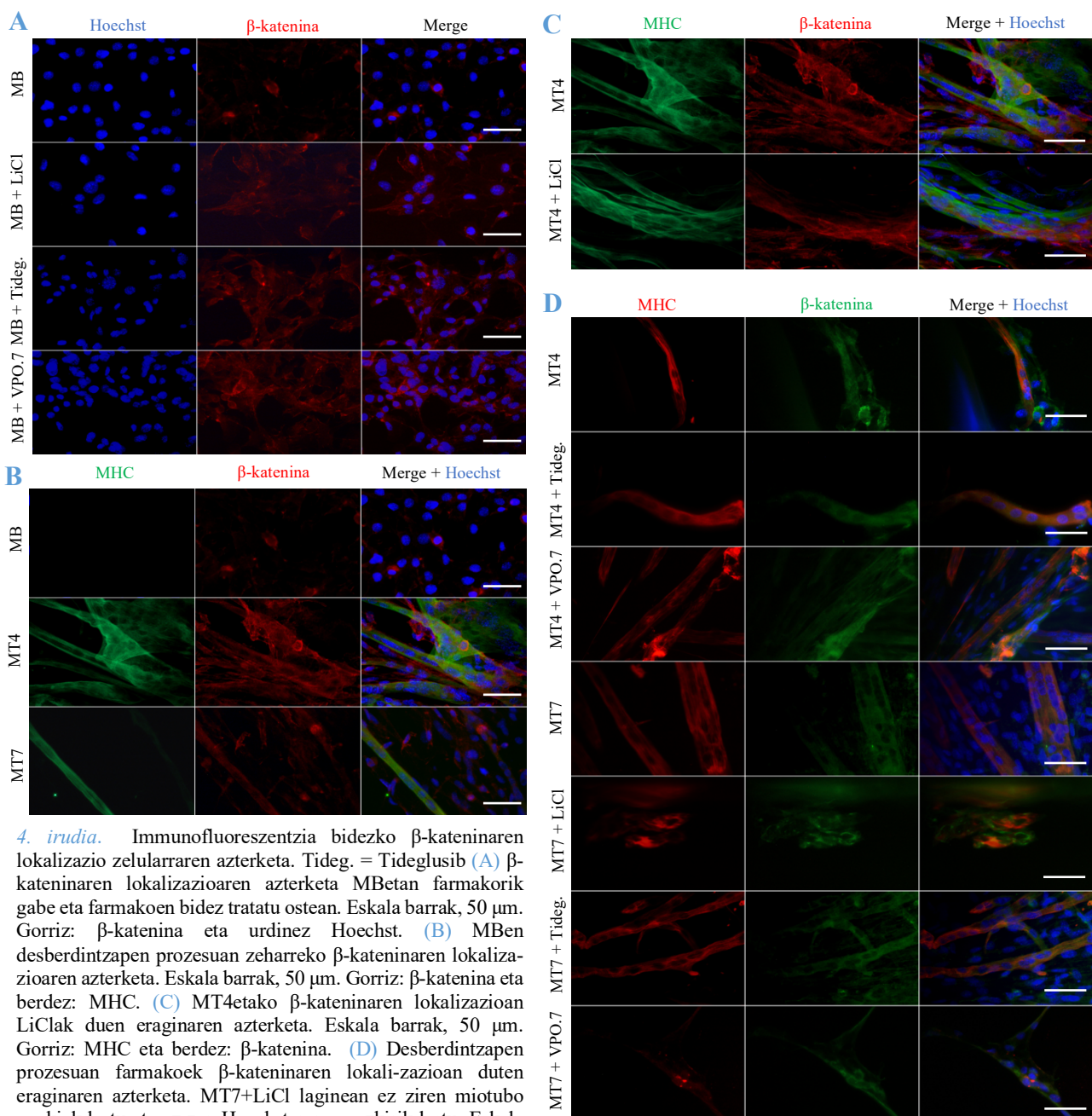


3. irudia. MB eta MT4 zeluletan LiCl tratamenduak proteina ugaritasunean eduki duen eraginaren azterketa. TDP-43aren kasuan izan ezik, non LiClak ez duen proteina mailako aldaketa nabaririk eragin, LiClak proteina gehiago egotea eragin du.

β -katenina mioblastoen zitoplasman ugariago adieraztea eragiten dute erabilitako farmako guztiek

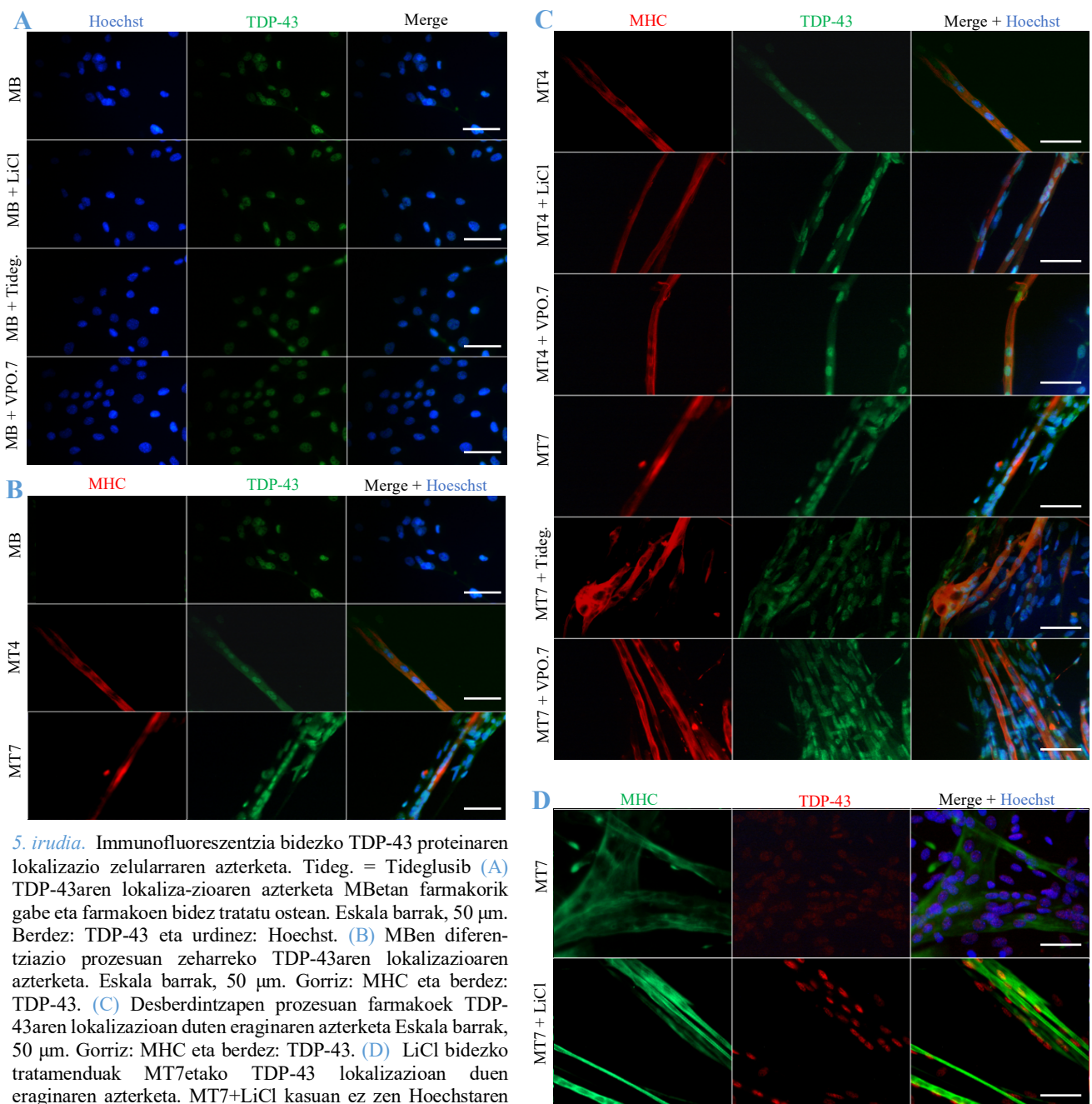
Azkenekoz, β -kateninaren eta TDP-43aren lokalizazio zelularra aztertu genuen C2C12 sagu mioblastoen diferentziazio prozesuan zehar. Gainera, litoak, Tideglusibak eta VPO.7ak lokalizazio horretan zuten eragina behatu genuen. Horretarako, immunofluoreszentzia bat burutu genuen Hoechst markatzailea eta anti-MHC antigorputzak erabiliz zelulen nukleoak eta miotuboen zitoplasma ezberdintzeko, hurrenez hurren.

Mioblastoetan β -kateninak lokalizazio zitoplasmatikoa erakusten du, baina gehituriko hiru farmakoek zitoplasman β -katenina gehiago egotea eragiten dute, antzeko neurrian hiru kasuetan (**4A. irudia**). Desberdintzapen prozesuan zehar β -katenina gehiago azaltzen da zitoplasman (**4B. irudia**). Zelula desberdintzatuetan farmakoek ez dute β -kateninaren lokalizazioan eraginik eduki (MT7+LiCl laginean ez ziren miotubo egokiak lortu eta ezin izan zen Hoechstaren argazkirik atera) (**4C. eta 4D. irudiak**).



LiCl bidezko tratamenduak TDP-43 proteinaren nukleorako sarrera eragiten du

Mioblastoetan TDP-43 proteinak lokalizazio nuklearra adierazi zuen farmakorik gabeko kasuan, eta gehituriko farmakoek ez zuten inolako eraginik eduki (5A. irudia). Mioblastoak miotuboetara desberdintzatzen ziren heinean, inongo tratamendurik jaso ez zuten zelulen TDP-43a zitoplasman zehar zabaldu da (5B. irudia). Desberdintzapen prozesuan zehar, baina, gehituriko farmakoek eragin ezberdina eduki zuten: LiClak desberdintzapeneko 4. egunean TDP-43aren lokalizazioa nuklearragoa izatea eragin zuen, baina VPO.7ak ez zuen inolako eraginik azaldu (ez genuen Tideglusibarekin trataturiko zelulen irudirik lortu) (5C. irudia). Desberdintzapeneko 7. egunean, aldiz, Tideglusib eta VPO.7 bidezko tratamenduek ez zuten TDP-43aren lokalizazio aldatu (5C. irudia), baina LiCl bidezko tratamenduak nukleoan proteina gehiago egotea eragin zuen (MT7+LiCl kasuan ez genuen Hoechstaren irudirik lortu) (5D. irudia).



5. irudia. Immunofluoreszentzia bidezko TDP-43 proteinaren lokalizazio zelularren azterketa. Tideg. = Tideglusib (A) TDP-43aren lokalizazioaren azterketa MBetan farmakorik gabe eta farmakoek bidez tratatu ostean. Eskala barrak, 50 μ m. Berdez: TDP-43 eta urdinez: Hoechst. (B) MBen diferentziazio prozesuan zeharreko TDP-43aren lokalizazioaren azterketa. Eskala barrak, 50 μ m. Gorriz: MHC eta berdez: TDP-43. (C) Desberdintzapen prozesuan farmakoek TDP-43aren lokalizazioan duten eraginaren azterketa Eskala barrak, 50 μ m. Gorriz: MHC eta berdez: TDP-43. (D) LiCl bidezko tratamenduak MT7etako TDP-43 lokalizazioan duen eraginaren azterketa. MT7+LiCl kasuan ez zen Hoechstaren argazkirik lortu. Eskala barrak, 50 μ m. Gorriz: TDP-43 eta berdez: MHC.

5 EZTABAIDA

Muskulu eskeletikoko gaixotasunetan TDP-43 proteinaren agregatu zitoplasmatikoak topatu dira, zeintzuek amiloide fibrak sortzeko arriskua nabarmenki handitzen duten (Vogler *et al.*, 2018). Muskulu zelulak arrisku horretatik babesteko saiakera batean, beste hainbat muskulu-distrofiatan eragin onuragarriak erakutsi dituen LiCl bidezko tratamenduak TDP-43 proteinaren kontzentrazioa zein lokalizazio zelularra aldatzen dituen ikertu da. Era berean, GSK-3 β ren inhibitzaile diren Tideglusib eta VPO.7 farmakoek eraginik duten aztertu da.

Hasteko, LiCl bidezko tratamendua egokia izan dela ikusi dugu, mioblasto zein miotuboetan P-GSK3 β proteina kantitate gehiago topatu baitugu tratamenduaren ostean (3. irudia). Izan ere, LiClak kinasa honen fosforilazioa eragiten du (Chuang *et al.*, 2011). Era berean, LiClak GSK-3 β inaktibatzen du, β -katenina degradaziotik babestuz (Yang *et al.*, 2011). Hori dela eta, gure proteina analisisian ikusi dugu LiCl tratamenduaren ostean β -katenina gehiago zegoela mioblasto zein miotuboetan (3. irudia).

LiCl bidezko tratamenduak gene adierazpenean zein eragin duen aztertzerakoan *Myh3* genearen adierazpen esanguratsua behatu ahal izan dugu miotuboetan. Gene honek muskulu uzkurduraren jarduten duen (sarkomero zuntz lodiak eratzen ditu) miosina proteinaren formakuntzan jarduten du. Miosina bi kate astunetz (MHC) eta bi kate arinen parez (MLC) osaturik dago. Kate astuna hainbat *MYH* genek kodeturik dago, *MYH3* horietako bat izanik (Berg *et al.*, 2001). Gene honen adierazpena garapen enbrionarioan emateaz gain muskulu zelulen birsortze prozesuan zehar ematen denez (Schiaffino *et al.*, 2015), non mioblastoak fusionatu eta desberdintzatu egiten diren, mioblastoak miotubotara desberdintzatu ahala gene honen adierazpena handitu egin dela ikusi dugu (2. irudia).

Gainera, LiCl bidezko tratamenduak *Myh3*aren adierazpena handitzen duela ikusi dugu (2. irudia). Adierazpenaren handitze hori c-Fos transkripzio faktorearen bidezkoa dela esan genezake, c-Fos-ak gizakion *MYH3* genearen GH17J010789 promotorea ezagutzen baitu (www.genecards.org). Transkripzio faktore hau β -kateninaren itua da eta LiCl bidezko tratamenduaren ostean gizaki muskulu zeluletan gainadierazirik topatu da (Jaka *et al.*, 2017). Gizakietan hori gertatzen dela ikusirik, saguetan berdin gertatzen ote zen ikusteko *in silico* azterketak egin genituen (AliBaba v.2.1), zeintzuek, *Myh3* promotorea aztertu ostean, c-Fos transkripzio faktorea bertara batzen ez dela erakutsi zuten. Dena den, β -kateninak itu gene ugari ditu, c-Jun transkripzio faktorea horietako bat, zeina *Myh3* genearen promotorera batzen dela ikusi dugun *in silico* eginiko azterketetan (informazio gehigarria 5). Honela, *Myh3* genearen adierazpena Wnt bidezidorraren aktibazioagatik ematen dela esan dezakegu.

Miosinaren kate astunaren proteina mailako azterketa egitean mioblastoetan adierazi ez dela ikusi dugu, proteina hau mioblastoak miotubotara desberdintzatzean agertzen baita soilik. Jakina da litioak, β -kateninaren metaketaz, mioblastoen miotubotarako desberdintzapena eragiten duela (Yang *et al.*, 2011) eta, beraz, miotuboetan proteina hau kopuru handiagoan ikusi dugu litio bidezko tratamendua eta gero (3. irudia). Proteina kopuruaren igoera honetan *Myh3* genearen adierazpen igoerak eragin zuzena eduki dezakeela pentsa daiteke, miosina kate astuna ezagutzeko erabilitako antigorputzak hainbat isoforma ezberdin ezagutzen ditu eta (informazio gehigarria 4).

c-Fos transkripzio faktoreak, gainera, gizakion *KY* genearen hainbat areagotzaile ere ezagutzen ditu (GH03J134650 areagotzailea, adibidez) (www.genecards.org). Gene honek lotura neuromuskularren eta sarkomeroen garapena eragiten duen zitoeskeletoari asoziatutako proteina kodetzen duenez, gainadierazirik ikusi dugu desberdintzapeneko 4. egunean (**2. irudia**). Baina, LGMDR1 gaixotasunaren eredu diren C3KO saguetan gene honen adierazpena murrizturik dago (*Jaka et al., 2012*), eta gure emaitzetan LiCl bidezko tratamenduak haren adierazpena handitzen duela ikusi dugu (**2. irudia**). Horregatik, saguaren *Ky* genearen promotorearen *in silico* azterketa egin genuen (AliBaba v.2.1), saguetan ere erregulazio hau eman ote zitekeen begiratzeko. Honela, *in silico* topatu genuen *Ky* genearen promotorera c-Fos eta c-Jun ez direla batzen (**informazio gehigarria 5**). Hala ere, aurretiaz aipatu bezala, Wnt bidezidorra aktibatzean asko dira adierazten diren transkripzio faktoreak, eta baliteke horietako batek eragitea guk ikusi dugun litio bidezko tratamenduaren osteko *Ky* genearen adierazpena.

LiCl bidezko tratamenduak giza miotuboetan *FRZB* genearen adierazpena gutxitzen duela ikusi da, gene horren isilarazte batek eragiten duen antzera (*Jaka et al., 2017*), baina, guk kontrakoa ikusi dugu, litioak *Frzb* gehiago adieraztea eragin baitu (**2. irudia**). LiClak eduki dezakeen eraginean ezberdintasunak topatu izana azterketak sagu zeluletan egiten ari garelako izan daiteke. Izan ere, saguak ez dira LGMDR1 gaixotasunaren eredu onak, C3KO saguek ez baitute kalpainopatiaren fenotiporik agertzen (*Kramerova et al., 2007*). Beraz, gizaki eta saguen artean behaturiko desberdintasunak direla eta, C2C12 sagu mioblastoen lerro zelularra erabiltzean lorturiko emaitzak kontu handiz tratatu behar dira. Hau gutxi balitz, LiCl bidezko tratamendu osteko *Frzb* genearen adierazpen gehiagotuak *Capn3* adierazpenaren murriztea justifikatzen du (**2. irudia**), *Frzb*^{-/-} saguetan ikusi denez *Capn3* eta *Frzb* geneek elkarrekiko kontrako erregulazioa baitute: *Frzb* gainadierazirik egotean, *Capn3* azpiadierazirik dagoela ikusi baita (*Casas-Fraile et al., 2020*).

Bestalde, garapenean zehar gene ezberdinen adierazpena ezberdina bada ere, aipagarria da *Frzb* eta *Myod1* geneetan ikusi duguna, bi gene hauen adierazpena ia berdina mantendu dela desberdintzapen prozesu osoan zehar, hain zuzen ere. Honek bi gene hauek desberdintzapen prozesuko une ezberdinetan behar fisiologiko garrantzitsuak betetzen dituztela adieraziko liguke (**2. irudia**).

β -katenina zitoplasman eta mintzean dagoen proteina da, ubikitina-proteasoma sistemak haren maila zitoplasmatikoa erregulatzen duelarik. Proteina hau fosforilatzean degradatu egiten da, baina Wnt bidezidorra aktibatzean β -kateninaren degradazio konplexua inaktibatu eta proteina akumulatu egiten da, haren nukleorako translokazioa gertatzen delarik (*Ha et al., 2014*). **4A. irudian** ikus dezakegunez mioblastoetan β -katenina zitoplasman dago gehienbat, eta LiCl, Tideglusib eta VPO.7 bidezko tratamenduek, GSK-3 β ren inhibitzaileak hirurak, proteinaren kopurua handiagotu dute. Antzeko emaitzak lortu ditugu mioblastoen desberdintzapen prozesuan, β -kateninaren lokalizazioa zitoplasmatikoa izan baita nagusiki (**4B. irudia**). Erabilitako tratamenduek β -katenina egonkortzen dute eta, horregatik, proteina honen nukleorako translokazioa espero genezakeen (*Yang et al., 2011; Palomo et al., 2017; Timchenko, 2019*). Badaezpada, esperimentera errepikatu genuen anti-mouse eta anti-rabbit antigorputz sekundario ezberdinak erabiliz. Honela, mioblastoetan β -kateninaren lokalizazio berdina ikusi genuen, eta baita desberdintzapen prozesuan zehar ere (**erakutsi gabeko datuak**). Gainera, **4.D irudia** lortu genuen, non β -kateninaren lokalizazioak, farmakorik gabeko eta farmakoak

gehuriko kasuetan, zitoplasmatikoa izaten jarraitzen zuen. Honen guztiaren arrazoia honako hau da: esperimentuan erabilitako anti- β -katenina antigorputz primarioa β -katenina totala ezagutzen duena da eta nukleora translokatzeko den β -katenina ikusi ahal izateko β -katenina aktiboa ezagutzen duen antigorputza behar da. Ikerketa hau egin zen garaian, antigorputz hau ez zegoen laborategian eskuragarri, eta β -katenina osoa ezagutzen zuen antigorputza nahikoa izango zela pentsatu zen. Gauzak honela, antigorputz honek sortarazi digun sentzibilitate falta dela eta ezin izan da β -kateninaren nukleorako translokazioa ikusi, ezta farmako bidezko tratamenduek β -kateninaren lokalizazioan eragina ote duten ere. Dena dela ere, farmakoen eraginez β -kateninaren kopuruaren igoera eman dela antzeman ahal izan dugu (**4A. irudia**).

TDP-43a, aldiz, proteina nuklearra da, mRNA-tara batzen dena haien egonkortasuna emendatuz, garraioa ahalbideratuz eta itzulpena modulatu (*Birsa et al., 2020*). Honela, sarkomeroetako proteinak kodetzen dituzten mRNA-tara batu eta muskulu eskeletikoaren birsorkuntzan parte hartzen du (*Vogler et al., 2018*). Guk lorturiko emaitzetan mioblastoetan TDP-43 gehiago ikusi dugu desberdintzapeneko 4. egunean baino, baina LiCl-ek ez du haren adierazpenean eragin nabaririk eduki (**3. irudia**). Birsorkuntza horretan parte hartzeko TDP-43a nukleotik atera eta zitoplasmara translokatzeko da, hau da, mioblastoetatik miotuboetarako desberdintzapen prozesuan zehar TDP-43aren lokalizazio zitoplasmatikoa handiagotu egiten da desberdintzapenerako behar diren mRNA molekulen egonkortasuna eta itzulpena modulatu duelarik (*Vogler et al., 2018; Birsa et al., 2020*). Gure emaitzetan hau gertatzen dela ikusi dugu: mioblastoetan TDP-43aren lokalizazioa nuklearra izan da (**5A. irudia**) eta desberdintzapeneko 4. eta 7. egunetan proteinaren lokalizazio zitoplasmatikoa handiturik ikusi dugu (**5B. irudia**).

TDP-43aren lokalizazioan litioak eduki duen eraginari dagokionean, desberdintzapeneko 4. egunean haren nukleorako sarrera eragin duela ikusi dezakegu, nahiz eta eragin hori desberdintzapeneko 7. egunean ez den hain argia izan (**5.C eta 5.D irudiak**). Izan ere, **5.D irudia** lortzeko erabilitako antigorputzari konjugaturiko fluoroforoak arazoak ematen ditu, fluoreszentzia seinalea berehala galtzen baitu. Horregatik, **5.D irudian** ikusi dugu LiCl bidez tratatu ostean TDP-43ak lokalizazio nuklearra besterik ez duela, **5.C irudian** lorturiko emaitzekin bat ez datorrena, non lokalizazio nuklearrak gain zitoplasmatikoa ere erakutsi duen. Hala ere, Tideglusib eta VPO.7 bidezko tratamenduek TDP-43 proteinaren lokalizazio zelularrean inolako eraginik eduki ez dutela ikusi dugu (**5.C irudia**).

Laburbilduz, LiCl-ek TDP-43aren nukleorako sarrera eragin du desberdintzapeneko 4. egunean, baina Tideglusib eta VPO.7 bidezko tratamenduek ez dute inolako eraginik eduki (**5C. eta 5D. irudiak**). Honela, zenbait muskulu distrofiatan ematen diren TDP-43 miogranuluen sorrera saihesteko tratamendu gisara litioa proposatu daiteke. Aipatu beharrekoa da zelula lerro bakarra erabili dugula eta esperimentu gehiago egitea beharrezkoa litzatekeela eragin hau benetan ematen den frogatzeko. Gainera, LiCl-ek muskulu eskeletikoko gaixotasun ugarian ikusi diren TDP-43 agregatuaren sorrera ekiditeko izan dezakeen gaitasuna aztertzeaz gain, agregatu horiek disipatzeko ahalmenik ote duen aztertu beharko litzateke.

6 ONDORIOAK

Lan honetan jasotako emaitzetatik honako ondorioak jaso daitezke:

1. C3KO sagu ereduan ikusiriko *Ky* genearen azpiadierazpena litio bidezko tratamenduarekin berreskuratu daiteke, *Ky* genearen gainadierazpena eragiten baitu tratamendu honek.
2. *Frzb* geneak eta *Capn3* geneak nolabait erlazonaturik daude, orain arte giza miotuboetan eta *Frzb*^{-/-} saguetan ikusi den elkarrekiko kontrako erregulazioa C2C12 sagu mioblastoetan ere ematen dela ikusi baitugu.
3. Giza miotuboetan litio bidezko tratamenduak *FRZB* genearen adierazpenaren gutxitzea eragiten duen arren, sagu zeluletan *Frzb* genearen adierazpena igo izanak bi organismo hauetan erregulazio mekanismoak ezberdinak direla erakusten digu.
4. GSK-3βren inhibitzaileak diren Tideglusib eta VPO.7 farmakoek LiClak erakutsi duen β-kateninaren kopuruaren handitzea eragin dute mioblastoetan.
5. LiClak TDP-43 proteinaren nukleorako sarrera eragiten du, hura muskulu eskeletikoko gaixotasun ugaritan ikusi diren TDP-43 agregatuen disipaziorako terapia izan daitekeelarik.

7 BIBLIOGRAFIA

- Abu-Baker, A., Laganier, J., Gaudet, R., Rochefort, D., Brais, B., Neri, C., ... Rouleau, G. A. (2013). Lithium chloride attenuates cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy by perturbing Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Death & Disease*, 4, e821. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.342>
- Berg, J. S., Powell, B. C., & Cheney, R. E. (2001). A millennial myosin census. *Molecular Biology of the Cell*, 12(4), 780–794. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.4.780>
- Biagioni, F., Ferrucci, M., Ryskalin, L., Fulceri, F., Lazzeri, G., Caliendo, M. T., ... Fornai, F. (2017). Protective effects of long-term lithium administration in a slowly progressive SMA mouse model. *Archives Italiennes de Biologie*, 155(4), 118–130. <https://doi.org/10.12871/00039829201749>
- Birsa, N., Bentham, M. P., & Fratta, P. (2020). Cytoplasmic functions of TDP-43 and FUS and their role in ALS. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 99, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.05.023>
- Casas-Fraile, L., Cornelis, F. M., Costamagna, D., Rico, A., Duellen, R., Sampaolesi, M. M., ... Sáenz, A. (2020). Frizzled related protein deficiency impairs muscle strength, gait and calpain 3 levels. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01372-1>
- Chuang, D.-M., Wang, Z., & Chiu, C.-T. (2011). GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4(August), 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00015>
- Domingos, J., Sarkozy, A., Scoto, M., & Muntoni, F. (2017). Dystrophinopathies and Limb-Girdle Muscular Dystrophies. *Neuropediatrics*, 48(4), 262–272. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601860>
- Findlay, A. R., Bengoechea, R., Pittman, S. K., Chou, T.-F., True, H. L., & Weihl, C. C. (2019). Lithium chloride corrects weakness and myopathology in a preclinical model of LGMD1D. *Neurology Genetics*, 5(2), e318. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000318>
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Ha, J. R., Hao, L., Venkateswaran, G., Huang, Y. H., Garcia, E., & Persad, S. (2014). β-catenin is O-GlcNAc glycosylated at Serine 23: implications for β-catenin's subcellular localization and transactivator function. *Experimental Cell Research*, 321(2), 153–166. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.021>
- Henderson, C. A., Gomez, C. G., Novak, S. M., Mi-Mi, L., & Gregorio, C. C. (2017). Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Comprehensive Physiology*, 7(3), 891–944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>
- Jaka, O., Casas-Fraile, L., Azpitarte, M., Aiastui, A., López de Munain, A., & Sáenz, A. (2017). FRZB and melusin, overexpressed in LGMD2A, regulate integrin β1D isoform replacement altering myoblast fusion and the integrin-signalling pathway. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 19, e2. <https://doi.org/DOI:10.1017/erm.2017.3>

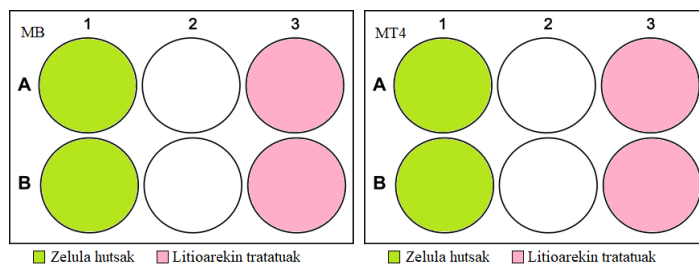
- Jaka, O., Kramerova, I., Azpitarte, M., López de Munain, A., Spencer, M., & Sáenz, A. (2012). C3KO mouse expression analysis: downregulation of the muscular dystrophy Ky protein and alterations in muscle aging. *Neurogenetics*, *13*(4), 347–357. <https://doi.org/10.1007/s10048-012-0336-7>
- Kawano, Y., & Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of Cell Science*, *116*(13), 2627 LP – 2634. <https://doi.org/10.1242/jcs.00623>
- Kraemer, B. C., Schuck, T., Wheeler, J. M., Robinson, L. C., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. Y., & Schellenberg, G. D. (2010). Loss of murine TDP-43 disrupts motor function and plays an essential role in embryogenesis. *Acta Neuropathologica*, *119*(4), 409–419. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0659-0>
- Kramerova, I., Beckmann, J. S., & Spencer, M. J. (2007). Molecular and cellular basis of calpainopathy (limb girdle muscular dystrophy type 2A). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1772*(2), 128–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.07.002>
- Lovestone, S., Boada, M., Dubois, B., Hüll, M., Rinne, J. O., Huppertz, H.-J., ... del Ser, T. (2015). A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, *45*(1), 75–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>
- Martinez, A., Alonso, M., Castro, A., Pérez, C., & Moreno, F. J. (2002). First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) inhibitors: thiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(6), 1292–1299. <https://doi.org/10.1021/jm011020u>
- McCord, M., Mukouyama, Y.-S., Gilbert, M. R., & Jackson, S. (2017). Targeting WNT Signaling for Multifaceted Glioblastoma Therapy. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*, 318. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00318>
- McMahon, D. K., Anderson, P. A., Nassar, R., Bunting, J. B., Saba, Z., Oakeley, A. E., & Malouf, N. N. (1994). C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties. *The American Journal of Physiology*, *266*(6 Pt 1), C1795-802. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.6.C1795>
- Mukund, K., & Subramaniam, S. (2020). Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, *12*(1), e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>
- Ono, Y., Ojima, K., Shinkai-Ouchi, F., Hata, S., & Sorimachi, H. (2016). An eccentric calpain, CAPN3/p94/calpain-3. *Biochimie*, *122*, 169–187. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.09.010>
- Palomo, V., Perez, D. I., Roca, C., Anderson, C., Rodríguez-Muela, N., Perez, C., ... Martinez, A. (2017). Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3 β : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, *60*(12), 4983–5001. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00395>
- Palomo, V., Soteras, I., Perez, D. I., Perez, C., Gil, C., Campillo, N. E., & Martinez, A. (2011). Exploring the binding sites of glycogen synthase kinase 3. Identification and characterization of allosteric modulation cavities. *Journal of Medicinal Chemistry*, *54*(24), 8461–8470. <https://doi.org/10.1021/jm200996g>
- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., ... Roudaut, C. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, *81*(1), 27–40. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90368-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90368-2)
- Sáenz, A., Azpitarte, M., Armañanzas, R., Leturcq, F., Alzualde, A., Inza, I., ... López de Munain, A. (2008). Gene expression profiling in limb-girdle muscular dystrophy 2A. *PLoS One*, *3*(11), e3750–e3750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003750>
- Schiaffino, S., Rossi, A. C., Smerdu, V., Leinwand, L. A., & Reggiani, C. (2015). Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skeletal Muscle*, *5*, 22. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0046-6>
- Sorimachi, H., Toyama-Sorimachi, N., Saido, T. C., Kawasaki, H., Sugita, H., Miyasaka, M., ... Suzuki, K. (1993). Muscle-specific calpain, p94, is degraded by autolysis immediately after translation, resulting in disappearance from muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*(14), 10593–10605.
- Straub, V., Murphy, A., & Udd, B. (2018, August). 229th ENMC international workshop: Limb girdle muscular dystrophies - Nomenclature and reformed classification Naarden, the Netherlands, 17-19 March 2017. *Neuromuscular Disorders : NMD*, Vol. 28, pp. 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.05.007>
- Timchenko, L. (2019). Correction of RNA-Binding Protein CUGBP1 and GSK3 β Signaling as Therapeutic Approach for Congenital and Adult Myotonic Dystrophy Type 1. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 94. <https://doi.org/10.3390/ijms21010094>
- Urtasun, M., Saenz, A., Roudaut, C., Poza, J. J., Urtizberea, J. A., Cobo, A. M., ... Lopez de Munain, A. (1998). Limb-girdle muscular dystrophy in Guipuzcoa (Basque Country, Spain). *Brain: A Journal of Neurology*, *121* (Pt 9), 1735–1747. <https://doi.org/10.1093/brain/121.9.1735>
- Vogler, T. O., Wheeler, J. R., Nguyen, E. D., Hughes, M. P., Britson, K. A., Lester, E., ... Parker, R. (2018). TDP-43 and RNA form amyloid-like myo-granules in regenerating muscle. *Nature*, *563*(7732), 508–513. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0665-2>
- Yang, Y., Yang, J., Liu, R., Li, H., Luo, X., & Yang, G. (2011). Accumulation of beta-catenin by lithium chloride in porcine myoblast cultures accelerates cell differentiation. *Molecular Biology Reports*, *38*(3), 2043–2049. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0328-3>

8 INFORMAZIO GEHIGARRIA

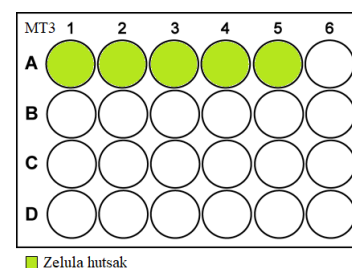
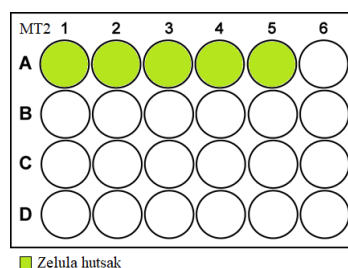
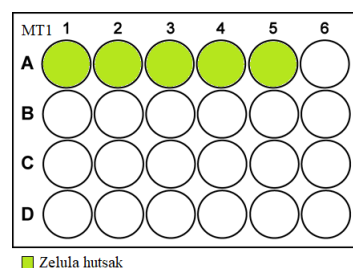
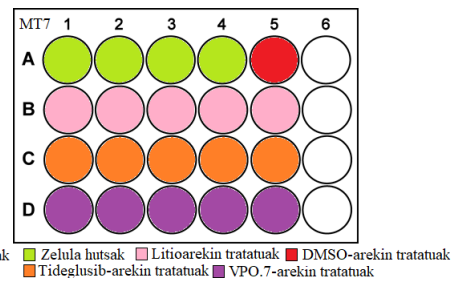
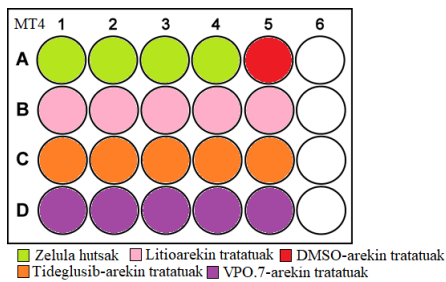
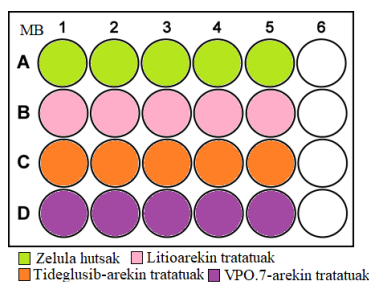
Informazio gehigarria 1

Zelulak hurrengo eran hazi ziren esperimentu ezberdinetarako:

- **Gene adierazpenaren analisisetarako eta proteina mailaren analisisetarako:** bi p6 plaka hauek erabili ziren. A lerroko putzuak gene adierazpenaren analisiak egiteko erabili ziren eta B lerrokoak proteina mailaren analisisirako.



- **Immunofluoreszentzia azterketetarako:** p24 plakak erabili ziren. Horietako 3tan farmakoak gehitu ziren, MBak, MT4ak eta MT7ak hazi zirenetan hain zuzen ere, eta gainontzekoetan ez.



Informazio gehigarria 2

- RNA kuantifikazioa egiteko isolaturiko **RNA laginaren kontzentrazioa** NanoDrop ND 1000-ren bidez ebatzi zen:

Lagina	Kontzentrazioa (ng/μl)	260/280
MB	458,3	1,9
MB+LiCl	249	1,89
MT4	498,4	1,97
MT4+LiCl	683,1	1,95

- PCRa egiteko erabilitako **Master Mix** nahastea honakoa da:

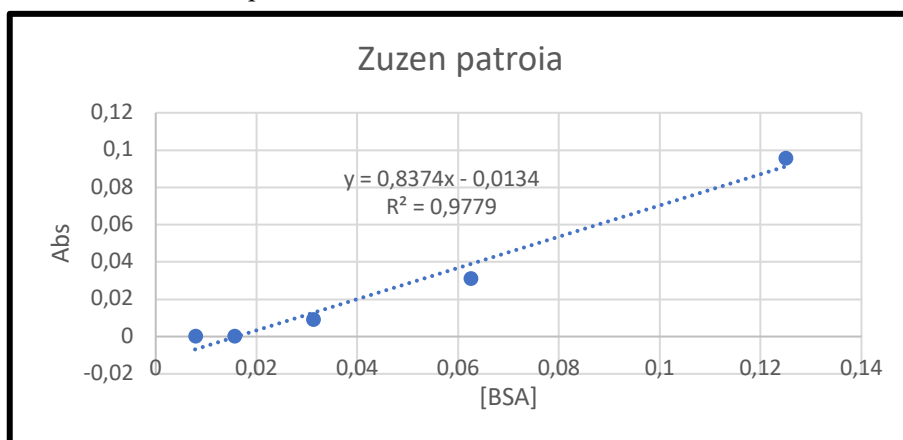
Master Mix	1 laginentzako (uL)
10 x RT Buffer	5
100mM 25x dNTPs	2
10x Ausazko hexamero	5
Multicribe RT entzima	2,5
RNase inhibitzailea	2,5
H2O	8

- RT-PCR baldintzak:** 25°Ctan 10 minutuz inkubatu ostean, 120 minutuz 37°Ctara jarri zen nahastea. Azkenik, 5 minutuz 85°Ctara utzi ziren laginak eta 4°Ctara hoztu. Laginak hozturik, -20°Ctan gorde ziren.
- RT-qPCR baldintzak:** 10 minutuz laginak 95°Ctara inkubatu ziren. Amaitzean, beste 15 segunduz 95°Ctara utzi ziren eta minutu batez 60°Ctan inkubatu ziren amaitzeko.
- Erabilitako zundak:**

	KODIGOA	Katalogo zenbakia	Espeziea	Amplicon luzera
<i>Capn3</i>	Mm00482985_m1	# 4331182	MOUSE	53
<i>Ky</i>	Mm01224823_m1	# 4331182	MOUSE	105
<i>Myh3</i>	Mm01332463_m1	# 4331182	MOUSE	96
<i>Frzb</i>	Mm00441378_m1	#4331182	MOUSE	61
<i>MyoD1</i>	Mm00440387_m1	# 4331182	MOUSE	86

Informazio gehigarria 3

- Proteina kontzentrazioa ebazteko eginiko **Bradford** teknikaren bidez lorturiko BSA kontzentrazioaren zuzen patroia:



- Zuzen patroia definiturik, lagin bakoitzean zein **proteina kontzentrazio** zegoen ebatzi zen eta 10 µg proteina lortzeko beharrezkoa izango zen lagin bolumena definitu:

Lagina	Abs	[Lagin diluitua] (µg/µl)	[Lagina] (µg/µl)	10 µg proteina lortzeko beharrezko lagin bolumena (µl)	10 µg proteina lortzeko beharrezko lagin bolumena (µl) (biribildua)	10 µl osatzeko beharrezko indargetzaile bolumena (µl)
MB	0,01533	0,0343	1,716	5,829	6	4
MB+LiCl	0,01033	0,0283	1,417	7,057	7	3
MT4	0,06833	0,0976	4,880	2,049	2	8
MT4+LiCl	0,06867	0,0980	4,900	2,041	2	8

Informazio gehigarria 4

Western Blot azterketa egiteko erabilitako nahasteen konposara:

- **Gel banatzailea (R) eta gel biltzailea (S):**

Erreaktiboak	Resolving (R) %8		Stacking (S) %3	
	%	2 gel egiteko	%	2 gel egiteko
Tris 1,875 pH = 8,8	22,32	4 mL	-	-
Tris 1,25 pH = 6,8	-	-	9,83	0,625 mL
Glizerol %50	22,32	4 mL	9,83	0,625 mL
Ura (MilliQ)	23,16	4,15 µL	64,86	4,125 mL
SDS %25	0,89	160 µL	0,79	50 µL
Akrilamida 29:1 %30	29,58	5,3 mL	9,83	0,625 mL
TEMED*	0,056	10 µL	0,16	10 µL
APS*	1,67	300 µL	4,72	300 µL
Guztira	100	17,92 mL	100	6,36 mL

- **Running bufferra 10x:** 1 L H₂O distilatuan jartzeko.

Tris (n°20)	30,3 g	[Tris] = 0,25 M
Glizina (n°151)	144 g	[Glizina] = 1,918 M
SDS (n°45)	15 g	[SDS] = 0,05 M

- **Transfer bufferra 5x:** 1 L H₂O distilatuan jartzeko.

Tris (n°20)	30 g	[Tris] = 0,248 M
Glizina (n°151)	144 g	[Glizina] = 1,918 M
SDS (n°45)	0,05 g	[SDS] = 0,17 µM

- **TBS 10x (pH 8):**

TBS 10x	%10	200 ml
H₂O (Elix)	%90	1800 ml
Tween	%0,1	2 ml

- **TBS-T 1x:**

TBS 10x	%10	200 ml
H₂O (Elix)	%90	1800 ml
Tween	%0,1	2 ml

- **Antigorputzak:**

	Erreferentzia	Etxe komertziala	Espeziea	Pisu molekularra	Antigorputz sekundarioa
TDP-43	#3448	CST	RABBIT	45 kDa	α -rabbit
B-kenatena	#9582S	CST	RABBIT	92 kDa	α -rabbit
p-GSK3B (Ser9)	#9323	CST	RABBIT	46 kDa	α -rabbit
MHC Clone: A4-1025	05-716	DSHB	MOUSE	~223 kDa	α -mouse
GAPDH	#2118	CST	RABBIT	37 kDa	α -rabbit
anti-rabbit	7074S	CST			
anti-mouse	P0260	DAKO			

Informazio gehigarria 5

In silico eginiko azterketa AliBaba v.2.1 baliabide informatikoaren bidez egin zen. Horretarako, Ensembl genoma bilatzailean saguaren *Myh3* eta *Ky* geneen promotorearen sekuentziak bilatu ziren eta AliBaba bidez sekuentzia horietara zein transkripzio faktore batzen ziren bilatu.

- **AliBaba v.2.1 baliabidea:** <http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html>
- **AliBaba baliabidean eginiko bilaketaren baldintzak:**

PARAMETERS

Pairsim to known sites	<input type="text" value="50"/>
Mat. width in bp	<input type="text" value="10"/>
Min num of sites	<input type="text" value="4"/>
Min mat. conservation	<input type="text" value="75%"/>
Sim. of seq to mat.	<input type="text" value="1%"/>
Factor class level	<input type="text" value="4 (e.g. RAR-b')"/>
<i>Optional:</i>	
Search only one factor (e.g. T00820)	<input type="text"/>
Search only one class (e.g. 4.3.2.0.)	<input type="text"/>
Position offset in bp (e.g. 300)	<input type="text"/>
Output format	<input type="text" value="seq"/>

- ***Myh3*ren promotorearen sekuentzia:**

```
5' -AGCTCCCTGTCATTTACTTGCTTGTGGTCTGCTAGTGCTTAAGAAAGGATTAAGTAAATAATTATAGTAA
TGAGACAGAAAAGTAATGAGGGGAAGGAGAGAGATGGAGAAGGAGAAAAAAAAAACTATAATCCAAC TGCACAAGT
TTTACAGAGTTTGGCTCATAACCGTGAGGGGACTTCAACAAGTTC AATTCTACTTTATCTTCGATGAGCTTTCTA
AGCAAATAGCACAACTGTGTGTCCCCTGTTCCAAGTGGTAGTGGCTTCAGCTGATTT CAGGTTGGGATGGCCCTG
CAGGATGGAGCCAGGTAGGGGCTCCTAAAGCAAAGGAGATCCCATTTGTCTAGGTGGAGAAGCTACAGCCCTGAG
TTCACAGAGCAAGGCATCTCAAATCCCAGCTTTCTACAGTTGGAAAAAATGGTTTCGGACCCTGCTCATTTCTA
TATATACTTTTCCCTTGGCAACGGCGAAAAATACGTGTGGAGGGGGCCAGTTCTCAGCCTGTGGTGT CAGTCATT
CTCTTTCCAAATATAGAGGAAGAATGAGCCAGGGGGTTAGTGGTGGCCTATAAAAGCCAGGGGGCAGCTCTCC
TCT-3'
```

- ***Ky*ren promotorearen sekuentzia:**

```
5' -TATTACCTGTGTCAACACAAAATTAGGGAATTGTCTCCCACCTGGTTGAACCACAGTGCCAAAGGCTCCCAAG
CAAAAGCCATGTAAACACTCCTTGGACCTACAGCCAAAATGCCCTGTCGCTGTTGGCTGGGCAGAGCAGGCCCTGGC
TAAAAATAGAAGGGGCTCTCAGGTCCAGCTCCCTGACAGCAGCTGGCAGCTCCCAGTTCCCTTTCTTTCTCTCTCT
CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GCTAGTCTTCCCGAAGGAATGGGGAATTTTAAGACCTCCATCTCAGGAAAAATAAGATTGTTAGCTTGATGCCCA
GTACATATGACCCAGGGTCTGACACAGTCATCAATGACAGTTGGGGACTTCACCATAAAGCCTCAATCTACGAAA
ACTATCGACTTTTACAATCTACCCAAGGGAACAAAGAAGTCAAGGCTAAAGATGTGGCCAACATCTGCTCACTCT
GCAATTC AACCTTCTTGCCTTTCTTTTCCAAAAC TATAACCAGTTCTGATTTGAGGTTTCAGGGTTGGCCAGTGAC
TTC-3'
```

- **β -kateninaren itu geneak:** The Wnt homepage web orrialdean bilatu ziren β -kateninaren itu ziren geneak. <https://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>