

Anal. Real Acad. Nac. Farm. 2002, 68:

—————Artículo Original—————

Señalización diferencial de la insulina en el desarrollo del músculo esquelético *

RUBEN CONEJO Y MARGARITA LORENZO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense. 28040-Madrid.

RESUMEN

En músculo esquelético, la expresión de proteínas codificadas por oncogenes virales y celulares, donde se incluyen ciertas tirosina quinasas (v-src), ciertos factores de transcripción (myc, fos, jun) y formas activas de mediadores de las rutas de señalización acopladas a las proteínas G (H-ras, N-ras), inhiben el proceso de diferenciación muscular. En la línea celular C2C12 transformada con Ras activo no se produce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, necesarias para la activación del factor de transcripción NF- κ B durante el proceso de diferenciación muscular. Además presenta una elevada actividad de p44/p42 MAP quinasa y del factor de transcripción AP-1, lo que impide la parada del ciclo celular. Esto hace que fracase el proceso de diferenciación muscular (no se produce la activación de la Creatina quinasa, la expresión de la Caveolina 3 y la formación de miotubos multinucleados). El tratamiento de esta línea celular, transformada por v-ras, con el PD098058, inhibidor de MEK-1, produce la parada del ciclo celular necesaria para el proceso de diferenciación muscular, pero provoca un efecto apoptótico que impide que los mioblastos diferencien. La adición de insulina junto con PD098058 impide dicho efecto apoptótico, se produce la parada del ciclo celular, se induce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, que llevan a la activación del factor de transcripción NF- κ B y se produce la formación de miotubos multinucleados. Al igual que en el proceso de diferenciación

* Premio FAES de la Real Academia de Farmacia. Año 2001

de la línea celular C2C12, la activación de las rutas de la PI3 quinasa y de p38 MAP quinasa es necesaria para la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras, como hemos observado mediante el uso de inhibidores específicos de ambas rutas. Finalmente, una construcción constitutivamente activa de Akt (siempre en presencia de PD) es capaz de imitar a la insulina induciendo la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras. Además en estas condiciones Akt constitutivamente activo induce las rutas p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa.

Palabras clave: desarrollo muscular-transformación por Ras-C2C12-insulina-NFκB

Differential insulin signaling involved in skeletal muscle development

SUMMARY

v-H-ras transformed C2C12 (C2Ras) myoblasts, overexpressing p21-Ras protein in the Ras-GTP active form, showed a differentiation-defective phenotype when cultured in low serum as compared with C2C12 myoblasts. Accordingly, the purpose of the present study was to delineate the signaling pathways that restore C2Ras myoblasts differentiation. Inhibition of p42/p44-MAPK with the chemical inhibitor PD98059, and activation of AKT/P70S6K and p38-MAPK with insulin, produced growth arrest (precluding the expression of PCNA, cyclin-D1 and retinoblastoma at the hyperphosphorylated state and inducing the expression of the cell cycle inhibitor p21^{Cip}) and myogenesis (multinucleated myotubes formation and induction of creatine kinase, caveolin-3 and α -actin). Both events were accompanied by down-regulation of AP-1 and up-regulation of NF- κ B transcriptional activities. Furthermore, inhibition of NF- κ B transcriptional activity by the use of the proteasome inhibitor MG132 totally precluded differentiation by insulin+PD98059, demonstrating a direct role for NF- κ B on C2Ras myogenesis. C2Ras myoblasts failed to restore differentiation when rapamycin or PD169316 were added in the presence of insulin+PD98059, indicating that the activation of both P70S6K and p38-MAPK was necessary to reach a fully differentiated phenotype. Finally, transient transfection of a constitutively active Myr-EGFP-AKT-HA construct (in the presence of PD98059) restored C2Ras myogenesis by its ability to activate P70S6K and p38-MAPK. A crosstalk between P70S6K and p38-MAPK was observed under rapamycin treatment in both insulin or active AKT induced myogenesis. Our results are delineating an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway involved in skeletal muscle differentiation.

Key words: muscle differentiation-Ras transformation-C2C12-Insulin-NFκB

INTRODUCCION

El músculo estriado esquelético es el tejido más abundante en los vertebrados, en los que constituye la musculatura somática. Se inserta en los huesos para permitir el movimiento de las diversas partes del cuerpo. Está inervado por axones provenientes de las neuronas motoras del sistema cerebroespinal. Sus células, también llamadas fibras, son multinucleadas, extremadamente largas y dispuestas paralelamente unas a otras. El primer signo de desarrollo del músculo en la vida embrionaria es la aparición de células fusiformes mononucleadas, denominadas mioblastos, que sufren repetidas mitosis con gran rapidez. Existe una regulación coordinada de los procesos de proliferación y muerte celular programada durante el desarrollo embrionario. Durante este periodo se produce la apoptosis de células precursoras proliferativas limitando así el depósito de masa muscular durante el desarrollo. Finalmente, algunas de estas células dejan de dividirse, se hacen resistentes al proceso apoptótico y se funden entre sí constituyendo estructuras alargadas denominadas miotubos. A ellos continúan adhiriéndose mioblastos, dando lugar a tubos alargados multinucleados en los que poco a poco van apareciendo zonas estriadas, hasta que el miotubo se transforma en una fibra muscular [1].

La diferenciación muscular es un proceso altamente ordenado que se puede subdividir en cuatro etapas [2]. La primera es la entrada en la ruta de diferenciación muscular a través de la expresión de un factor de transcripción de la familia de los factores básicos miogénicos hélice-lazo-hélice (bHLH), la Miogenina. Además de la miogenina a esta familia de factores de transcripción pertenecen MyoD, Myf5 y MRF4. Cada uno de estos factores de transcripción, cuando son expresados ectópicamente mediante transfección, es capaz de activar la expresión de genes específicos de músculo esquelético y los genes de su propia familia en una amplia variedad de sistemas celulares no musculares.

Todos estos factores de la familia bHLH comparten un 80% de homología en su dominio básico hélice-lazo-hélice, que media los procesos de dimerización y unión al DNA de estos factores. Estos factores forman heterodímeros con proteínas ubicuas de estructura básica hélice-lazo-hélice, llamadas proteínas E. Estos heterodímeros se unen a la secuencia consenso, llamada caja E, de los promotores y enhancers de los genes específicos de músculo esquelético. Tanto MyoD, como Myf5 son expresados en mioblastos. MyoD ha sido implicado en la inducción de los primeros genes relacionados con la diferenciación muscular, como la miogenina y genes necesarios en la parada del ciclo celular que se produce en el proceso de diferenciación muscular, como Retinoblastoma, p21 y la ciclina D3. Es necesaria la presencia de la proteína p300, proteína coactivadora de la transcripción, para la inducción de estos primeros genes implicados en la diferenciación muscular por parte de MyoD.

La expresión de la Miogenina se produce con el comienzo del proceso de diferenciación muscular. Ratones con una mutación puntual en el gen de la miogenina son inmóviles y mueren perinatalmente debido a sus defectos en la diferenciación del músculo esquelético. La expresión del factor MRF4 se produce en las etapas finales del proceso de diferenciación muscular. Los factores de transcripción de la familia bHLH regulan la activación de algunos genes específicos de músculo esquelético de un modo directo, pero también, a través de la interacción con otros factores de transcripción, como son los factores de transcripción de la familia MEF2. También, estos factores son capaces de interactuar con genes y proteínas relacionadas con el control de la progresión del ciclo celular y señales de proliferación celular como retinoblastoma, p21 y c-jun. Los factores de transcripción de la subfamilia MEF2 pertenecen a la familia de los factores de transcripción con un dominio en su estructura denominado caja MADS [3]. Estos factores comparten un 80% de homología en este dominio. Junto a este dominio se encuentra el denominado dominio MEF2, importante para la orientación de unión al DNA y en la especificidad de dimerización de estos factores de la subfamilia MEF2. El dominio caja MADS de estos factores media los procesos de dimerización y de unión al DNA. Los miembros de la subfamilia MEF2 son capaces de

homo- y heterodimerizar, y así unirse a una secuencia consenso rica en nucleótidos de timina y adenina del DNA.

Durante el proceso de diferenciación muscular la expresión de los diferentes factores MEF2 se produce de forma secuencial. MEF2D se expresa en mioblastos; con el comienzo del proceso de diferenciación muscular se produce un aumento en la expresión de MEF2A mientras que MEF2C se expresa en las últimas etapas de la diferenciación muscular. Ambas familias son los factores de transcripción miogénicos mayoritariamente descritos [4], recientemente se ha relacionado la activación del factor NF- κ B con el proceso de diferenciación muscular. Rel/NF- κ B es una familia de factores de transcripción expresados ubicuamente y que juegan un importante papel en la inducción de muchos genes celulares y virales. En la mayoría de las células las proteínas Rel/NF- κ B están retenidas en el citoplasma en una forma inactiva por asociación con proteínas inhibitoras denominadas I κ B. Después de la estimulación NF- κ B es liberado de su unión a I κ B y se transloca al núcleo donde se une a regiones específicas del DNA (sitios κ B) regulando la actividad transcripcional de los genes diana. La familia Rel/NF- κ B presenta un dominio de homología Rel en la región amino-terminal que incluye los dominios de unión al DNA y de dimerización y la señal de localización nuclear, que es el sitio más probable de unión a I κ B [5]. Esta familia ha sido dividida en dos grupos, de acuerdo con las diferencias detectadas en su estructura, función y vías de síntesis. El primer grupo está formado por las proteínas p50 y p52, las cuales son sintetizadas como proteínas precursoras p105 y p100, respectivamente. La región carboxi-terminal de p105 y p100 se asemeja a la molécula inhibitora I κ B ya que contiene repeticiones de anquirina que impiden su translocación al núcleo y su unión a los sitios κ B. La generación de las formas maduras p50 y p52 tiene lugar mediante procesamiento proteolítico. El segundo grupo de proteínas Rel incluye p65 (RelA), c-Rel, Rel B y las proteínas Dorsal y Dif de *Drosophila*, las cuales no son sintetizadas como precursores y, a diferencia de p50 y p52, poseen un dominio de activación transcripcional en el extremo carboxi-terminal. La mayoría de los miembros de ambos grupos pueden formar homo o heterodímeros excepto Rel B, el cual únicamente forma dímeros con p50 y p52.

La segunda etapa es la parada del ciclo celular de los mioblastos, el ciclo celular consiste en duplicar la información genética de una célula, y una vez duplicada, repartirla con una precisión absoluta, generando dos células hijas idénticas a la progenitora. El ciclo celular consta de cuatro fases: G_1 , S, G_2 , M. La duplicación del DNA ocurre durante la fase S, y su reparto equitativo en dos durante la mitosis o fase M. Antes de que la célula inicie la fase S, existe un periodo de tiempo necesario para sintetizar todas las moléculas que se requieren durante la síntesis de DNA, y que se denomina fase G_1 ; del mismo modo, existe otro intervalo antes de la fase M, conocido como fase G_2 , en el que la célula se prepara para la iniciación de la mitosis. En las células que se encuentran en proliferación estas cuatro fases se suceden de forma continua y ordenada, sujetas a un estricto control molecular. Cuando la señal proliferativa cesa, la célula para su ciclo de división, normalmente en G_1 antes de duplicar nuevamente su DNA, y entra en un periodo de quiescencia o fase G_0 , que corresponde a un estado de célula en reposo.

Para la progresión a través del ciclo celular se necesita la asociación entre unas proteínas quinasas conocidas como CDK (Quinasas Dependientes de Ciclinas) y sus subunidades reguladoras, las ciclinas. Las CDKs, además de estar reguladas por su unión a las ciclinas, lo están por distintas fosforilaciones y por la asociación de proteínas inhibitoras (CIPs). Hasta el momento se han descrito ocho CDKs (CDK1-CDK 8) y ocho ciclinas (ciclina A-H), pero sólo unas cuantas combinaciones juegan un papel en la regulación del ciclo celular. Cuando las células quiescentes son estimuladas a proliferar, la primera ciclina que se sintetiza es la ciclina D. La diana principal de la ciclina D es el producto del gen del retinoblastoma. La ciclina E se expresa periódicamente al final de la fase G_1 y forma complejos preferencialmente con CDK 2. La ciclina A se asocia también a CDK 2 y es activa en las fases S y G_2 . Durante la mitosis, ciclinas y CDC2 (una CDK) parecen reorganizar la maquinaria celular durante la mitosis. Durante el proceso de diferenciación muscular se produce una caída en la expresión de las ciclinas D1, A, B2 y C y la quinasa dependiente de ciclina de tipo 2. Sin embargo, un aumento en los niveles de expresión de la ciclina D3 se ha descrito durante la diferenciación muscular. También

un aumento en la expresión de p18 y p21, inhibidores de las CDKs ha sido relacionado con el proceso de diferenciación muscular.

El aumento de la forma activa (hipofosforilada) de la proteína retinoblastoma también se produce durante el proceso de diferenciación muscular. Líneas celulares deficientes en retinoblastoma expresan niveles normales de Miogenina y de p21, pero expresan niveles reducidos de la cadena pesada de la Miosina y de la Creatina quinasa. También, ratones transgénicos que expresan bajos niveles de retinoblastoma sufren un gran proceso apoptótico y presentan defectos en la parada del ciclo celular, en la expresión de genes específicos de músculo, en la fusión y en la aparición de miotubos multinucleados.

En la tercera etapa numerosas proteínas son inducidas durante la diferenciación muscular. Dentro de estas proteínas se incluyen los componentes del aparato contráctil del músculo como la α Actina, la proteína C, la Miomesina, la Miosina, la Tropomiosina y la Troponina, las enzimas metabólicas y proteínas de membrana. Una de las enzimas más importantes en músculo es la Creatina quinasa, enzima implicada en la obtención de energía (ATP) para la contracción muscular. Se han descrito tres isoformas de dicha enzima: la isoforma muscular (M-CK), la isoforma del cerebro (B-CK) y la isoforma mitocondrial (Mt-CK). Normalmente, estas isoformas citoplasmáticas, la isoforma M-CK y la isoforma B-CK, se encuentran formando homo- o heterodímeros. Durante el desarrollo embrionario y en cultivos miogénicos se produce el intercambio del homodímero BB-CK por el homodímero MM-CK y un aumento en la actividad enzimática de la Creatina quinasa total. La Caveolina 3 es una proteína de la membrana plasmática cuya expresión se induce durante el proceso de diferenciación muscular [6]. Esta proteína forma parte de una serie de invaginaciones ricas en glicoesfingolípidos de la membrana plasmática celular. Se ha relacionado a la Caveolina 3 con la biogénesis del sistema de túbulos T que se produce durante el proceso de diferenciación del músculo esquelético. También interacciona con el complejo distrofina-glicoproteína, creando una unión entre la matriz extracelular, la membrana y la actina del citoplasma celular; la alteración de este complejo puede dar lugar a la aparición de distrofia muscular [7]. Posteriormente las célu-

las se alinean y elongan y finalmente se fusionan y forman los miotubos multinucleados (Figura 1).

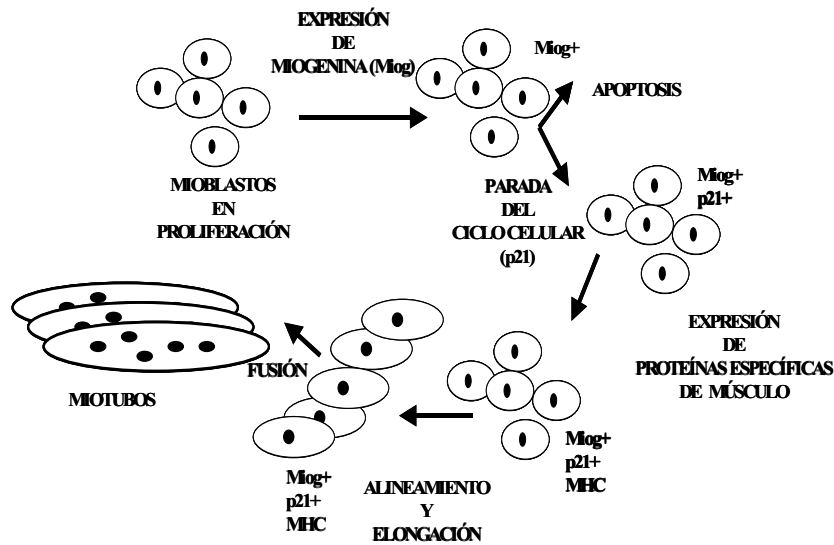


Figura 1.- Etapas del proceso de diferenciación muscular

El citoesqueleto de actina juega un papel importante en la regulación de los efectos proliferativos y de diferenciación muscular, ya que los lamelipodios de membrana podrían facilitar los contactos célula-célula y la localización de proteínas específicas de membrana del músculo esquelético. La formación de lamelipodios en la membrana plasmática celular es debida a una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina. Dicho efecto se ha podido observar tanto en músculo como en tejido adiposo en respuesta a insulina. Una vez formados rápidamente se distribuyen a lo largo de la membrana plasmática formando ondas.

La mayoría de los factores de crecimiento y la expresión de proteínas derivadas de oncogenes virales o celulares estimulan la

proliferación e inhiben la diferenciación muscular. Sin embargo la familia de la insulina y los factores de crecimiento insulínicos de tipo I y II (IGFs) estimulan ambos procesos. Esta familia ha sido involucrada en el control del desarrollo fetal y/o post-natal aunque la acción biológica fundamental de la insulina es el control de la homeostasis glucídica. La insulina y los IGFs realizan esta amplia variedad de funciones a través de la unión a su receptor específico de superficie, que pertenece a la amplia familia de receptores con actividad tirosina quinasa. Tras la unión del ligando se produce una activación de la actividad tirosina quinasa del receptor, que conduce a la autofosforilación en residuos de tirosina de las subunidades β del mismo y a la fosforilación de otros sustratos. Entre los sustratos con los que interacciona el receptor de insulina fosforilado, los sustratos para el receptor de la insulina (IRSs) y Shc son los que mejor se han caracterizado. Dos rutas principales se han identificado, la primera es la ruta de p21-Ras a partir de la unión de los IRSs o Shc con Grb2, que a través de sus dominios SH3, se une a Sos, proteína intercambiadora de nucleótidos capaz de activar Ras por aumentar la velocidad de intercambio de GTP por GDP. La proteína Ras está codificada por una serie de genes (H-, K- y N-ras) y se encuentra anclada por farnesilación a la cara interna de la membrana plasmática. La proteína Ras tiene actividad GTPásica intrínseca para hidrolizar el GTP a GDP inactivándose. Sin embargo, esta actividad GTPásica intrínseca resulta dependiente de una proteína de 120 kDa llamada Ras GAP. La pérdida de la actividad GTPásica intrínseca de Ras por una mutación puntual en el codón 12, 13 ó 61 produce una proteína Ras permanentemente activa y altamente oncogénica, que está implicada en muchos tumores humanos. La cascada de señalización por debajo de Ras implica a una familia de serina/treonina quinasas denominada Raf-1. Una vez activada, Raf-1 quinasa es capaz de fosforilar y activar a MEK (también conocida como MAP quinasa quinasa, MAPKK o MAPKK1/2) que una vez activado es capaz de fosforilar y activar a las p44 y p42 MAP quinasas.

La segunda es la ruta PI3 quinasa que se origina a partir de la unión de los IRSs con la subunidad reguladora, p85, de PI3 quinasa. La PI3 quinasa es una enzima heterodimérica compuesta por una subunidad reguladora, de un peso molecular de 85kDa, y una subunidad catalítica de 110 kDa de peso molecular. La PI3 quinasa cataliza la fosforilación de

lípidos en la posición D3 del anillo del inositol. Otro mecanismo de regulación de PI3 quinasa es a través de la interacción de Ras con la subunidad catalítica de la PI3 quinasa. Por debajo de PI3 quinasa existe unas serina-treonina quinasas denominadas PDK-1 y PDK-2 encargadas de la fosforilación y activación de la PKB, también denominada Akt. PKB (Akt) una vez activada presenta numerosas dianas de acción como la glucógeno sintasa quinasa 3, la fosfodiesterasa 3D, la proteína diana de Rapamicina en mamíferos (mTOR), el IRS-1 y la proteína p70S6 quinasa. La regulación de la actividad de p70S6 quinasa es compleja y en ella interviene tanto PDK-1 como Akt y mTOR [8].

Unas nuevas vías de señalización, reguladas por la familia de las Rho GTPasas (Rho, Rac y Cdc42), han sido identificadas. Las Rho GTPasas regulan la actividad de ciertas serina/treonina quinasas, como la p38 MAP quinasa. Ha sido descrita la regulación de las Rho GTPasas por parte de PI3 quinasa y de Ras [9]. Por debajo de las Rho GTPasas se encuentra una familia de quinasas activadas por p21 (PAKs) que finalmente llevan a la activación de p38 MAP quinasa.

Existe controversia en el conocimiento de las rutas de señalización por las que transcurren los diferentes efectos de la insulina y los IGFs en el músculo esquelético, por ellos nos hemos planteado en esta trabajo caracterizar la señalización implicada en los procesos de proliferación, supervivencia y diferenciación que tienen lugar en la línea de células musculares de ratón C2C12. Otro de los aspectos que nos han interesado ha sido estudiar como afecta transformación por proteínas oncogénicas, como v-ras, el proceso de diferenciación miogénico.

RESULTADOS Y DISCUSION

En primer lugar hemos estudiado los diferentes efectos de la insulina en los mioblastos de la línea celular C2C12. Observamos que la línea celular C2C12 presentaba un alto número de receptores de insulina por célula (89700 ± 11500) con una alta afinidad ($K_d = 15,3 \pm 2,0$ nM). El número de receptores por célula para insulina es mayor que para IGF-I (45700 ± 8200). Además las células tratadas con insulina mostraron un

marcado aumento de la fosforilación en tirosina de la cadena β del receptor de insulina comparando con células no tratadas, y no fosforilaban en tirosina la cadena β del receptor de IGF-I. Estos datos indican que la insulina actúa a través de su propio receptor en esta línea celular. Posteriormente analizamos la funcionalidad de los sustratos del receptor de insulina; Shc, IRS-1 e IRS-2. La insulina no aumenta la fosforilación de Shc. Sin embargo, un leve aumento en la asociación entre Shc e IRS-1 se produjo tras el tratamiento con insulina. Este resultado está en concordancia con lo descrito por otros autores [10]. También, el tratamiento con insulina aumenta la fosforilación, la actividad y la asociación de PI3 quinasa con los IRSs siendo mayor el efecto sobre el IRS-1 frente al IRS-2 (5 veces y 2 veces de aumento, respectivamente). Esto nos demostraba que el IRS-1 es el principal sustrato en la ruta de señalización de la insulina en nuestra línea celular, de acuerdo con los resultados descritos en músculo por otros autores [11]. Estos resultados están en concordancia con los publicados en tejido adiposo blanco y en la línea de fibroblastos 3T3-L1 donde no se observa ninguna fosforilación del IRS-2 en respuesta a insulina [12]. Sin embargo en otros sistemas celulares, como el tejido adiposo marrón, tanto IRS-1, como IRS-2 y Shc intervienen en las diferentes vías de señalización de la insulina [13], mientras que IRS-2 es el principal sustrato en el tejido hepático y en la célula β [11].

Existen dos rutas principales de señalización para el receptor de insulina, la ruta PI3 quinasa y la ruta Ras/MAP quinasa, a través de las cuales la insulina ejecuta una amplia variedad de sus funciones biológicas. Nuestros resultados nos indican que un tratamiento a corto plazo con insulina, de la línea muscular C2C12, activa rápidamente al menos tres rutas de señalización independientes: PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa, p44/p42 MAP quinasa y p38 MAP quinasa [14].

A diferencia del resto de factores de crecimiento, insulina e IGFs han sido implicados en el control del crecimiento y diferenciación del músculo esquelético. En un tratamiento a corto plazo de los mioblastos con insulina o IGF-I, se produce una respuesta proliferativa a la vez que se produce un retardo en el inicio de la diferenciación muscular. Estos efectos tempranos de insulina e IGF-I están asociados con una marcada inhibición de la expresión de la Miogenina y de MRF4, mantenimiento de

la forma fosforilada de Retinoblastoma y la expresión de los componentes del holoenzima responsable de la fosforilación de Retinoblastoma, ciclina D1 y la CDK4 [15] [16], [17]. Nosotros hemos observado que la insulina induce la proliferación de la línea celular C2C12 (mediante el estudio del ciclo celular, la síntesis de DNA y la expresión de las proteínas PCNA y ciclina D1) a través de dos vías independientes, pero que actúan sinérgicamente: PI3 quinasa/p70S6 quinasa y p44/p42 MAP quinasa. A través de los resultados obtenidos hemos dado una gran importancia a la activación de la p70S6 quinasa en la proliferación inducida por insulina, en contra de la ausencia de efecto de la Rapamicina descrita en otras líneas celulares de músculo esquelético [18]. Otros autores señalan que la Rapamicina induce la parada del ciclo celular, así como una disminución en los niveles de la ciclina A y de la actividad de la quinasa asociada a la ciclina A, CDC2, en la línea muscular BC3H1. También hemos observado la importancia de PI3 quinasa en dicho efecto proliferativo de la insulina, tal vez por su activación de p70S6 quinasa. La implicación de la ruta p44/p42 MAP quinasa en el efecto mitogénico de la insulina también ha sido descrito en la línea celular de músculo esquelético L6A1 [19]. Además este efecto mitogénico de la insulina fue muy similar al producido por el IGF-I.

Existe una regulación coordinada de los procesos de proliferación y muerte celular programada durante el desarrollo embrionario. Durante este periodo se produce la apoptosis de células precursoras proliferativas y no de las células ya diferenciadas, limitando así, el depósito de masa muscular durante el desarrollo [20]. El proceso apoptótico tiene lugar *in vitro* en mioblastos cultivados en medio de diferenciación, con un bajo porcentaje de mitógenos. Durante el proceso de diferenciación una amplia fracción de mioblastos es perdida por apoptosis [21] sin embargo, los miotubos multinucleados (células diferenciadas) son resistentes al proceso apoptótico [22]. En la línea celular C2C12, el tratamiento con insulina durante 24 horas disminuye el porcentaje de células hipodiploides y la fragmentación del DNA extranuclear a niveles similares a los obtenidos en los mioblastos cultivados en medio suplementado con un 10% de suero fetal, resultados similares se han obtenido en fibroblastos, en las células PC-12 y en adipocitos [23], [24]. El tratamiento con LY o

con el ML-9 inhibe el efecto antiapoptótico de la insulina. Estos datos nos indican que la insulina utiliza la ruta PI3 quinasa/Akt como ruta de supervivencia [14]. La proteína Akt se ha descrito como una quinasa que fosforila e inactiva a la proteína proapoptótica Bad [25] [26] así como bloquea la activación de la Caspasa-9 [27]. También se ha observado un papel positivo de Akt en la supervivencia de miocitos diferenciados [28].

La organización del citoesqueleto de actina es un importante regulador de los efectos de la insulina, tanto en proliferación celular, metabolismo y diferenciación celular [29]. Es importante el papel que juega el citoesqueleto de actina en la regulación de los efectos proliferativos de la insulina, como son la síntesis de DNA y la expresión de genes tempranos. Nosotros hemos estudiado el efecto de la insulina en la organización del citoesqueleto de actina en la línea celular C2C12 y hemos observado que la insulina induce la ruptura de las fibras de estrés (50% de reducción) y la aparición de lamelipodios en la membrana plasmática de las células (4 veces más frente a las células control). Un efecto similar de la insulina ha sido observado en fibroblastos, adipocitos y mioblastos de la línea celular L6 [30], [31]. En estos sistemas el efecto de la insulina depende de la activación de la ruta PI3 quinasa/Rac [9]. Sin embargo, la insulina induce la formación de lamelipodios de membrana en la línea celular C2C12 a través de la activación de la ruta p38 MAP quinasa [14]. Esta ruta de señalización que modula los cambios en el citoesqueleto no parece que guarde relación con el patrón de proliferación celular descrito anteriormente, sin embargo estos lamelipodios de membrana podrían facilitar los contactos célula-célula y la localización de proteínas específicas de membrana del músculo esquelético como la Caveolina 3, proteína indispensable para la fusión y formación de miotubos multinucleados. En este sentido, la activación de p38 MAP quinasa si está implicada en este proceso como ha sido demostrado por algunos autores [6]. Se ha descrito que la activación por insulina de la ruta MAKAP-quinasa 2/Hsp 27 modula la polimerización de la F-actina [32], también el PDGF induce la formación de lamelipodios de membrana en células endoteliales a través de la activación de la p38 MAP quinasa [33].

El primer signo de desarrollo del músculo en la vida embrionaria es la aparición mioblastos que finalmente dejan de dividirse y se funden

entre sí constituyendo estructuras alargadas denominadas miotubos. Nosotros hemos observado que la insulina induce la diferenciación de la línea celular C2C12 (mediante el estudio de la actividad de la enzima Creatina quinasa, la expresión de la Caveolina 3 y observando la formación de miotubos multinucleados) y que en este proceso esta implicada la estimulación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B y la represión de la actividad del factor AP-1 [34]. La actividad de unión al DNA de NF- κ B ha sido recientemente relacionada con la diferenciación muscular inducida por IGF-II, [35], sin embargo nuestros resultados con AP-1 contrastan con los obtenidos en adipocitos marrones, donde se ha implicado a AP-1 en la diferenciación adipogénica, [36].

Existe mucha controversia en el conocimiento de la ruta de señalización implicada en la miogénesis, nosotros hemos observado que la insulina induce el proceso de diferenciación muscular a través de la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, y la inhibición de la ruta p44/p42 MAP quinasa [34]. También a partir de nuestros resultados nos han hecho pensar en un posible cruce entre las rutas de señalización, que solamente se produce a través de un tratamiento crónico de las células con insulina, y no en un tratamiento agudo. Estos resultados están en concordancia con los descritos en músculo por algunos autores [37]. Este cruce podría ser explicado por la activación de la p38 MAP quinasa a través de la ruta PI3 quinasa/p21Rac[9]. Los resultados obtenidos nos llevan a proponer el siguiente esquema de señalización en la línea celular C2C12 (Figura 2).

En músculo esquelético, la expresión de proteínas codificadas por oncogenes virales y celulares, donde se incluyen ciertas tirosina quinasas (v-src), ciertos factores de transcripción (myc, fos, jun) y formas activas de mediadores de las rutas de señalización acopladas a las proteínas G (H-ras, N-ras), inhiben el proceso de diferenciación muscular [38] [39] [40]. La inhibición del proceso de diferenciación muscular producida por

Ras oncogénico podría estar ligada a una inhibición de la parada del ciclo celular. La ruta de señalización utilizada por Ras para inhibir el proceso de diferenciación muscular está siendo clarificada, aunque sigue habiendo algún punto de controversia. Ras activa al menos tres clases de efectores, Raf (A-Raf, B-Raf y Raf-1), Ral-GEF (Ral-GDS, Rlf y Rgl) y PI3 quinasa [41]. Ha sido descrito que la expresión de un mutante activo de Raf (Raf-CAAX) y de Ral-GDS (Ral-GDS CAAX) inhiben la formación de miotubos multinucleados y la expresión de genes específicos de músculo [42] [43]. En cuanto al tercer efector de Ras, la activación de la ruta PI3 quinasa/Akt ha sido implicada en el proceso de diferenciación muscular [44]. Incluso la expresión de un mutante activo de R-Ras, una proteína de bajo peso molecular y de unión al GTP que comparte un 50 % de homología con las diferentes isoformas de Ras [45], induce el proceso de diferenciación muscular en la línea celular C2C12 a través de la activación de la ruta PI3 quinasa/Akt [46].

Nosotros hemos querido estudiar el efecto de la transformación con Ras oncogénico sobre la diferenciación de la línea de células musculares C2C12. En la línea celular C2C12 transformada con Ras activo no se produce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, necesarias para la activación del factor de transcripción NF- κ B durante el proceso de diferenciación muscular. Además presenta una elevada actividad de p44/p42 MAP quinasa y del factor de transcripción AP-1, lo que impide la parada del ciclo celular. Esto hace que fracase el proceso de diferenciación muscular (no se produce la activación de la Creatina quinasa, la expresión de la Caveolina 3 y la formación de miotubos multinucleados) [47].

El tratamiento de esta línea celular, transformada por v-ras, con el PD098058, inhibidor de MEK-1, produce la parada del ciclo celular necesaria para el proceso de diferenciación muscular, pero provoca un efecto apoptótico que impide que los mioblastos diferencien. La adición de insulina junto con PD098058 impide dicho efecto apoptótico, se produce la parada del ciclo celular, se induce la activación de las rutas PI3 quinasa/Akt/p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa, que llevan a la activación del factor de transcripción NF- κ B y se produce la formación de miotubos multinucleados [47]. Al igual que en el proceso de diferenciación

de la línea celular C2C12, la activación de las rutas de la PI3 quinasa y de p38 MAP quinasa es necesaria para la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras, como hemos observado mediante el uso de inhibidores específicos de ambas rutas. Finalmente, una construcción constitutivamente activa de Akt (siempre en presencia de PD) es capaz de imitar a la insulina induciendo la miogénesis de la línea celular transformada por v-ras. Además en estas condiciones Akt constitutivamente activo induce las rutas p70S6 quinasa y p38 MAP quinasa. Recientemente se ha descrito la regulación de la actividad de NF- κ B por Akt a través de la activación de p38 MAP quinasa [47]. Por lo tanto, estos resultados sugieren una nueva vía de activación de p38 MAP quinasa mediada por Akt y/o p70S6 quinasa, aunque no podemos descartar que la insulina, a través de otras rutas, pueda también activar a p38 MAP quinasa. Estos resultados nos llevan a proponer el siguiente esquema.

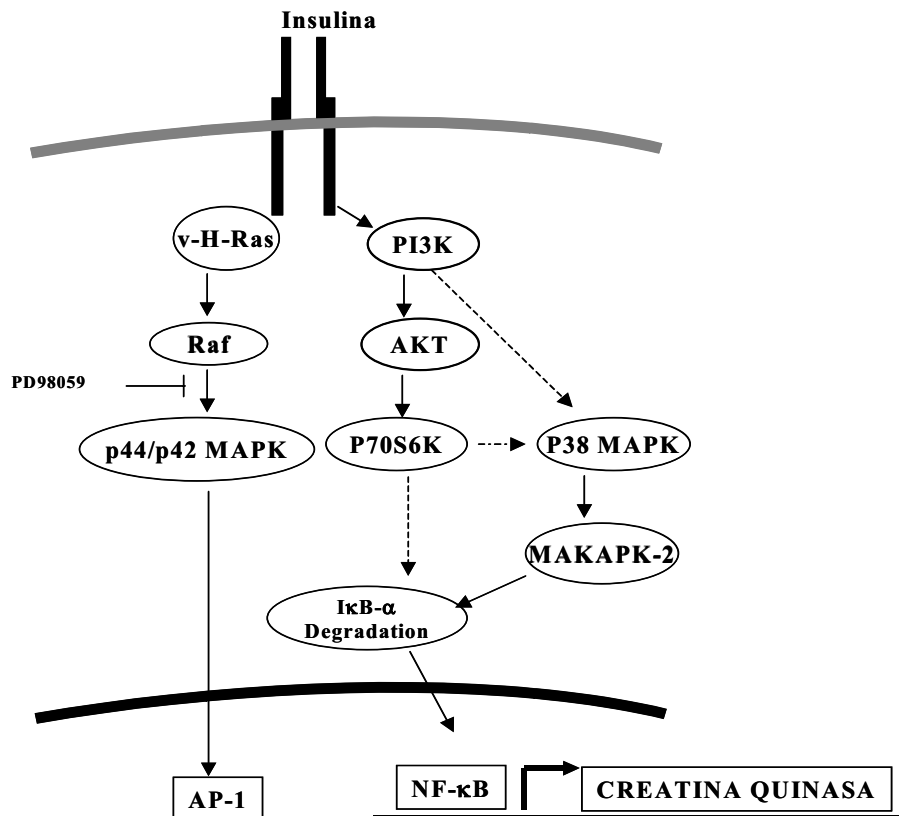


Figura 3.- Rutas que llevan a la miogénesis en la línea celular C2C12 transformada por v-Ras.

En función de estos resultados podemos destacar que tanto la proliferación como la diferenciación muscular no pueden ser considerados como eventos independientes. Al contrario, en este trabajo hemos podido

observar que durante el desarrollo embrionario del músculo esquelético existe una relación coordinada en el tiempo de los procesos de proliferación, movilidad, supervivencia y diferenciación muscular a través de diferentes rutas de señalización. Además hemos encontrado un posible mecanismo para revertir el efecto de la expresión de una forma activa, forma oncogénica, de la proteína Ras sobre el proceso de diferenciación muscular. Se ha descrito que en diversos tumores humanos, como en las células de Rhabdomiosarcoma (tumores de músculo esquelético) son expresadas selectivamente formas mutadas activas de los tres genes ras (H-, K- y N-ras). Para finalizar, muy recientemente se ha descrito que el tratamiento con Cerivastatina, un inhibidor de la síntesis del colesterol, produce Rhabdomiolisis. En este efecto está implicado un proceso apoptótico de las fibras musculares, por eso creemos que es importante el papel que hemos demostrado de la proteína Akt como mecanismo de supervivencia de células musculares.

AGRADECIMIENTOS. Este trabajo se ha realizado con la ayuda de proyectos del Ministerio de Ciencia y Tecnología; PM98/0082 y Comunidad de Madrid; 08.6/0043/2000.1 Rubén Conejo ha disfrutado de una beca de FPU del Ministerio de Educación y Cultura.

BIBLIOGRAFIA

- (1) MOLKENTIN, J.D. AND OLSON, E.N. (1996) Defining the regulatory networks for muscle development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6:445-453.
- (2) ANDRES, V. AND WALSH, K. (1996) Myogenin expression, cell cycle withdrawal, and phenotypic differentiation are temporally separable events that precede cell fusion upon myogenesis. *J. Cell. Biol.* 132:657-666.
- (3) MOLKENTIN, J.D. AND OLSON, E.N. (1996) Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9366-9373.

- (4) MOLKENTIN, J.D., BLACK, B.L., MARTIN, J.F. AND OLSON, E.N. (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 83:1125-1136.
- (5) THANOS, D. AND MANIATIS, T. (1995) NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80:529-532.
- (6) GALBIATI, F., VOLONTE, D., ENGELMAN, J.A., SCHERER, P.E. AND LISANTI, M.P. (1999) Targeted down-regulation of caveolin-3 is sufficient to inhibit myotube formation in differentiating C2C12 myoblasts. Transient activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for induction of caveolin-3 expression and subsequent myotube formation. *J. Biol. Chem.* 274:30315-30321.
- (7) CAMPBELL, K.P. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.
- (8) VIRKAMAKI, A., UEKI, K. AND KAHN, C.R. (1999) Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J.Clin.Invest.* 103:931-943.
- (9) TANG, Y., YU, J. AND FIELD, J. (1999) Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol.Cell Biol.* 19:1881-1891.
- (10) KASUS-JACOBI, A., PERDEREAU, D., TARTARE-DECKERT, S., VAN OBERGHEN, E., GIRARD, J. AND BURNOL, A.F. (1997) Evidence for a direct interaction between insulin receptor substrate-1 and Shc. *J.Biol.Chem.* 272:17166-17170.
- (11) WITHERS, D.J. AND WHITE, M. (2000) Perspective: The insulin signaling system--a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology* 141:1917-1921.
- (12) SUN, X.J., PONS, S., WANG, L.M., ZHANG, Y., YENUSH, L., BURKS, D., MYERS, M.G., GLASHEEN, E., COPELAND, N.G., JENKINS, N.A., PIERCE, J.H. AND WHITE, M.F. (1997) The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol* 11:251-262.
- (13) VALVERDE, A.M., TERUEL, T., NAVARRO, P., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Tumor necrosis factor-alpha causes insulin receptor substrate-2-mediated insulin resistance and inhibits insulin-induced adipogenesis in fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 139:1229-1238.
- (14) CONEJO, R. AND LORENZO, M. (2001) Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. *J. Cell. Physiol.* 187:96-108.

- (15) ROSENTHAL, S.M. AND CHENG, Z.Q. (1995) Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell cycle regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10307-10311.
- (16) D'MELLO, S.R., GALLI, C., CIOTTI, T. AND CALISSANO, P. (1993) Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10989-10993.
- (17) RESNICOFF, M., BURGAUD, J.L., ROTMAN, H.L., ABRAHAM, D. AND BASERGA, R. (1995) Correlation between apoptosis, tumorigenesis, and levels of insulin-like growth factor I receptors. *Cancer Res.* 55:3739-3741.
- (18) CANICIO, J., GALLARDO, E., ILLA, I., TESTAR, X., PALACIN, M., ZORZANO, A. AND KALIMAN, P. (1998) p70 S6 kinase activation is not required for insulin-like growth factor-induced differentiation of rat, mouse, or human skeletal muscle cells. *Endocrinology* 139:5042-5049.
- (19) COOLICAN, S.A., SAMUEL, D.S., EWTON, D.Z., MCWADE, F.J. AND FLORINI, J.R. (1997) The mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 272:6653-6662.
- (20) MCCLEARN, D., MEDVILLE, R. AND NODEN, D. (1995) Muscle cell death during the development of head and neck muscles in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 202:365-377.
- (21) WANG, J. AND WALSH, K. (1996) Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* 273:359-361.
- (22) WANG, J., GUO, K., WILLS, K.N. AND WALSH, K. (1997) Rb functions to inhibit apoptosis during myocyte differentiation. *Cancer Res.* 57:351-354.
- (23) NAVARRO, P., VALVERDE, A.M., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Insulin/IGF-I rescues immortalized brown adipocytes from apoptosis down-regulating Bcl-xS expression, in a PI 3-kinase- and map kinase-dependent manner. *Exp. Cell Res.* 243:213-221.
- (24) PARRIZAS, M., SALTIEL, A.R. AND LEROITH, D. (1997) Insulin-like growth factor I inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 272:154-161.
- (25) DATTA, S.R., DUDEK, H., TAO, X., MASTERS, S., FU, H., GOTOH, Y. AND GREENBERG, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

- (26) DEL PESO, L., GONZALEZ-GARCIA, M., PAGE, C., HERRERA, R. AND NUNEZ, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689.
- (27) KANDEL, E.S. AND HAY, N. (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.
- (28) FUJIO, Y., GUO, K., MANO, T., MITSUUCHI, Y., TESTA, J.R. AND WALSH, K. (1999) Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol. Cell Biol.* 19:5073-5082.
- (29) BOHMER, R.M., SCHARF, E. AND ASSOIAN, R.K. (1996) Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell* 7:101-111.
- (30) CLODI, M., VOLLENWEIDER, P., KLARLUND, J., NAKASHIMA, N., MARTIN, S., CZECH, M.P. AND OLEFSKY, J.M. (1998) Effects of general receptor for phosphoinositides 1 on insulin and insulin-like growth factor I-induced cytoskeletal rearrangement, glucose transporter-4 translocation, and deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 139:4984-4990.
- (31) WANG, Q., SOMWAR, R., BILAN, P.J., LIU, Z., JIN, J., WOODGETT, J.R. AND KLIP, A. (1999) Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell Biol.* 19:4008-4018.
- (32) HUOT, J., HOULE, F., SPITZ, D.R. AND LANDRY, J. (1996) HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res.* 56:273-279.
- (33) MATSUMOTO, T., YOKOTE, K., TAMURA, K., TAKEMOTO, M., UENO, H., SAITO, Y. AND MORI, S. (1999) Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *J.Biol.Chem.* 274:13954-13960.
- (34) CONEJO, R., VALVERDE, A.M., BENITO, M. AND LORENZO, M. (2001) Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and down-regulation of AP-1 activities. *J. Cell. Physiol.* 186: 82-94.
- (35) KALIMAN, P., CANICIO, J., TESTAR, X., PALACIN, M. AND ZORZANO, A. (1999) Insulin-like growth factor-II, phosphatidylinositol 3-kinase, nuclear factor-kappaB and inducible nitric-oxide synthase define a common myogenic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274:17437-17444.
- (36) TERUEL, T., VALVERDE, A.M., NAVARRO, P., BENITO, M. AND LORENZO, M. (1998) Inhibition of PI 3-kinase and RAS blocks IGF-I and insulin-induced uncoupling protein 1 gene expression in brown adipocytes. *J.Cell. Physiol.* 176:99-109.

- (37) CUENDA, A. AND COHEN, P. (1999) Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J. Biol. Chem.* 274:4341-4346.
- (38) FLORINI, J.R., EWTON, D.Z. AND MAGRI, K.A. (1991) Hormones, growth factors, and myogenic differentiation. *Annu. Rev. Physiol.* 53:201-216.
- (39) OLSON, E.N. (1992) Interplay between proliferation and differentiation within the myogenic lineage. *Dev. Biol.* 154:261-272.
- (40) ALEMA, S. AND TATO, F. (1994) Oncogenes and muscle differentiation: multiple mechanisms of interference. *Semin. Cancer Biol.* 5:147-156.
- (41) CAMPBELL, S.L., KHOSRAVI-FAR, R., ROSSMAN, K.L., CLARK, G.J. AND DER, C.J. (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17:1395-1413.
- (42) RAMOCKI, M.B., JOHNSON, S.E., WHITE, M.A., ASHENDEL, C.L., KONIECZNY, S.F. AND TAPAROWSKY, E.J. (1997) Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. *Mol. Cell Biol.* 17:3547-3555.
- (43) RAMOCKI, M.B., WHITE, M.A., KONIECZNY, S.F. AND TAPAROWSKY, E.J. (1998) A role for RalGDS and a novel Ras effector in the Ras-mediated inhibition of skeletal myogenesis. *J. Biol. Chem.* 273:17696-17701.
- (44) JIANG, B.H., AOKI, M., ZHENG, J.Z., LI, J. AND VOGT, P.K. (1999) Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine-threonine kinase Akt/protein kinase B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2077-2081.
- (45) LOWE, D.G., CAPON, D.J., DELWART, E., SAKAGUCHI, A.Y., NAYLOR, S.L. AND GOEDDEL, D.V. (1987) Structure of the human and murine R-ras genes, novel genes closely related to ras proto-oncogenes. *Cell* 48:137-146.
- (46) SUZUKI, J., KAZIRO, Y. AND KOIDE, H. (2000) Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene* 19:1138-1146.
- (47) CONEJO, R., DE ALVARO, C., BENITO, M., CUADRADO, A. AND LORENZO, M. (2002) Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB through an AKT/P70S6K/P38-MAPK pathway. *Oncogene* "in press".
- (48) MADRID, L.V., MAYO, M.W., REUTHER, J.Y. AND BALDWIN, A.S. (2001) Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF- κ B through utilization of the I κ B kinase and activation of the mitogen activated protein kinase p38. *J. Biol. Chem.* 276:18934-18940.

68 (2)

DESARROLLO MUSCULAR