



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUATITLÁN

LOCALIZACIÓN DE UNA NUEVA ISOFORMA DE DELTA-SARCOGLICANO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATÓN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA
ALEXANDRA BERENICE LUNA ÁNGULO

ASESORES: Dr. RAMÓN M. CORAL VÁZQUEZ
Dr. FCO. JAVIER ESTRADA MENA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*El secreto del éxito radica en saber qué mantener cerca de nosotros y de qué
debemos alejarnos.....*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Coral, por su infinita paciencia para enseñarme algo de lo mucho que sabe, por permitirme formar parte de ese gran grupo que coordina y por dejarme ser también su amiga sin nunca dejarle de admirar y respetar. Además también, gracias por la beca, sin ella este trabajo hubiera sido más complicado.

A el Dr. Javier Estrada, por compartir conmigo todos tus conocimientos, todo tu tiempo y paciencia, gracias por hacerme ver mis errores de la forma más real posible. Gracias por compartir conmigo esas noches de trabajo que parecían interminables, gracias no solo por se mi asesor si no también un extraordinario amigo.

DEDICATORIAS

A mis padres por guiarme en este largo camino sin ningún reproche, por nunca perder la fe a pesar de mi tardanza, por tolerar mi mal carácter que empeoró cuando entre ha esta carrera y por todos sus consejos que me han hecho enorme. Gracias, los amo.

A mis hermanos: Ana, Eduardo, Montserrat y Roberto por ser un ejemplo para mi de lucha, de constancia y de éxito. Gracias, espero que mi tardanza no los haya decepcionado mucho. Los quiero.

A Mimis, Neto, Javo, Lalo, Vic y por supuesto mi compadre (Gus), esto también es para ustedes que me enseñaron que a la universidad no solo se va ha estudiar. Gracias por hacerme crecer como persona, por esas fiestas rudas y por su amistad incondicional. Siempre daré gracias por haberlos encontrado en mi camino.

A todos los 25 que sin duda fuimos la mejor generación, pero en particular a Carla, Omar, Gaby, Alejandro, Edgar, David (pale) y David (marino), por andar este camino juntos (aunque sea un ratito), por tolerarme y aceptarme tal cual soy, gracias.

A todos mis compañeros del labo de genética humana, que admiro por ser seres tan tenaces e inteligentes, gracias por compartir todos sus conocimientos conmigo. En verdad, he aprendido mucho de ustedes, pero en particular a Tere y Li que además de ser mis compañeras fueron mis amigas y por supuesto ha gabo, por que además de ser harto inteligente tienes un corazón de lo más grande, gracias por siempre aceptarme, así como soy, sin ningún disfraz y por todo tu apoyo y comprensión siempre que me hizo falta, en verdad gabo vales mil, nunca cambies.

A mis compañeros de Médica Londres: Marco, Tere, Javier, Carmen y Carlos, gracias por hacer que las noches parezcan cortas, y a Boni por enseñarme todavía mucho más de lo que aprendí en la escuela y por hacer más suaves los golpes que me he dado al ejercer esta hermosa carrera.

Ojos, por que los últimos siempre son los primeros en los que pensamos, esto también es para ti, por que nunca he conocido persona más extraña pero al mismo tiempo tan extraordinaria como lo eres tu.

INDICE GENERAL

Índice de figuras y tablas.....	ii
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	iv
1. Generalidades.....	1
1.1. Estructura del Músculo Esquelético.....	1
1.2. Complejo de Glicoproteínas Asociados a la Distrofina.....	5
1.3. El complejo Sarcoglicano-Sarcospan.....	8
1.4. Delta – Sarcoglicano.....	13
1.4.1. Transcrito.....	13
1.4.2. Proteínas.....	14
1.5. Una nueva isoforma de delta-sarcoglicano3.....	16
1.6. Delta - Sarcoglicano en Ratón.....	17
2. Justificación.....	19
3. Objetivos.....	20
4. Estrategia Experimental.....	21
4.1. Biopsias musculares.....	21
4.2. Inmunofluorescencia Sencilla Indirecta.....	23
4.3. Doble Inmunofluorescencia Indirecta.....	25
5. Resultados.....	27
5.1. Homología de las proteínas δ -SG1 y δ -SG3.....	27
5.2. Pérdida de residuos de cisterna y sitios de N-glicosilación.....	29
5.3. Localización de la proteína δ -SG3 en músculo esquelético de ratón.....	31
6. Discusión.....	37
7. Conclusiones.....	42
8. Bibliografía.....	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquemas de la Constitución del Músculo Esquelético.....	4
Figura 2. Esquema de la Organización del Complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina.....	7
Figura 3. Organización del complejo SG-SPN en Diferentes Tejidos.....	12
Figura 4. Esquema de los Transcritos SGCD1 y SGCD2.....	13
Figura 5. Esquema de la estructura de los Transcritos SGCD1 y SGCD3.....	16
Figura 6. Trascrito de Delta-Sarcoglicano en Músculo Esquelético de Ratón.....	17
Figura 7. Esquema de laminillas con criosecciones para su tratamiento.....	22
Figura 8. Alineamiento de las proteínas δ -SG 1 y δ -SG 3.....	28
Figura 9. Esquema comparativo de los dominios de las proteínas δ -SG 1 y δ -SG3.....	30
Figura 10. Inmunofluorescencia sencilla de δ -SG 3 en corte transversal.....	33
Figura 11. Inmunofluorescencia sencilla de δ -SG 3 en corte longitudinal.....	34
Figura 12. Doble Inmunofluorescencia con δ -SG 1 y δ -SG 3 en Corte Longitudinal.....	35
Figura 13 Doble Inmunofluorescencia de δ -SG 1 y δ -SG 3 en Corte Longitudinal 3D.....	36

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxinucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	Ácido Ribonucleico mensajero
DHRP	Receptor de Dihidropiridina
DMD	Distrofia Muscular de Duchenne
DMB	Distrofia Muscular de Becker
DGC	Complejo de proteínas asociadas a la distrofina
SG	Sarcoglicano
SG's	Sarcoglicanos
SG-SSNP	Complejo sarcoglicano-sarcospan
DG	Distroglicano
RS	Retículo Sarcoplásmico
FBS	Suero Fetal Bovino
BSA	Seroalbúmina Bovina
PBS	Buffer de fosfatos salino
NGS	Suero Normal de Cabra
Cy3	Carboximetil Indocyanina
FICT	Isocianato de Fluoresceína
DAPI	4,6-Diamidino-2-Fenilindol
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa

RESUMEN

La distrofina es una de las proteínas más estudiada en las afecciones musculares conocidas como distrofia muscular de Duchenne y Becker, asociadas a esta proteína se encuentran otras que se han denominado en su conjunto, complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DGC), juntas (distrofina-DGC) forma un puente entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de la fibra muscular, sugiriendo con este arreglo un sostén de la fibra durante el proceso de contracción-relajación. Dentro del DGC se encuentra el subcomplejo conocido como complejo sarcoglicano-sarcospan, formado a su vez por diferentes proteínas denominadas α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, y ζ -sarcoglicanos y la proteína sarcospan. Aunque no se conocen por completo las funciones de este subcomplejo se propone que además de contribuir al mantenimiento de la estabilidad de la fibra muscular, sus subunidades pueden participar en procesos de traducción de señales, adhesión y proliferación celular. La ausencia de los sarcoglicanos α -, β -, γ y δ -, también causan distrofias musculares, solo que a estas se les ha nombrado, de cintura (LGMD de sus siglas en inglés) de tipo LGMD2D, LGMD2E, LGMD2C y LGMD2F respectivamente. En modelos murinos solo se había reportado un transcrito de δ -SG en músculo esquelético, que traduce una proteína homóloga a δ -SG1 en humanos. Posteriormente se encontró un transcrito diferente que produce una isoforma que resulta interesante caracterizar para poder contribuir a la comprensión de la función de las proteínas que conforman el complejo sarcoglicano-sarcospan. Considerando que la presencia de transcritos en determinados tejidos no implican la presencia forzosa de la proteína que traduce, este trabajo consistió, en localizar la presencia de esta nueva proteína, en músculo esquelético de ratón que nombramos δ -SG3, y que el análisis por computadora del RNA mensajero, mostró la formación de una proteína más corta debido a la sustitución de los 122 aminoácidos del extremo carboxilo terminal que presenta δ -SG1 por diez nuevos aminoácidos (EGFLNMQLAG). El análisis por inmunofluorescencia indirecta en cortes de músculo esquelético de ratón muestra la presencia de la proteína δ -SG3 en patrones específicos en secciones longitudinales como transversales. Estos primeros resultados nos llevaron a comparar por medio de la inmunotinción las diferencias de localización que pueden presentar dos isoformas de un mismo gen, se observó que δ -SG1 con respecto al δ -SG3 mostraron patrones diferentes. Adicionalmente se realizó el análisis comparativo de ambas proteínas, los resultados obtenidos permiten sugerir que los cambios estructurales de la proteína δ -SG3, pueden alterar su asociación con otras proteínas del complejo sarcoglicano, permitiendo al mismo tiempo la unión de esta proteína con moléculas y proteínas diferentes a las que pueden asociarse a δ -SG1.

1. GENERALIDADES

1.1 ESTRUCTURA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO

El músculo esquelético se desarrolla a partir de precursores uninucleados llamados mioblastos, cuando estos precursores proliferan y se fusionan, formando células multinucleadas que se denominan miotubos, estos sincitios alargados son las unidades de organización del músculo esquelético y se conocen como fibras musculares (Tortora 2003, Fawcett 1995). El músculo esquelético está rodeado por tejido conjuntivo que forma una estructura de sostén continua. Para facilitar su descripción de este, sus diferentes porciones se describen en términos distintos. El tejido conjuntivo denso que rodea a todo el músculo se llama epimisio. Los finos tabiques que se extienden hacia el interior del mismo y que rodean a cada fascículo de fibras se denomina en conjunto perimisio y el delicado retículo que rodea a cada fibra individual es nombrado endomisio (Junqueira 2001, Fawcett 1995). En la Figura 1a se esquematizan las distintas porciones del tejido conjuntivo que rodea al músculo esquelético.

Las fibras musculares muestran una estriación transversal, tienen una longitud de hasta 30cm, son cilíndricas, multinucleadas, su diámetro varía entre 10-100µm y están dispuestas paralelamente entre sí. Las fibras contienen las mismas organelas que cualquier otro tipo de célula, solo que sus componentes han recibido nombres específicos, la membrana se denomina *sarcolema*, el citoplasma *sarcoplasma*, el retículo endoplásmico liso *retículo sarcoplásmico* y las mitocondrias *sarcosomas* (Junqueira 2001).

El citoplasma de la fibra muscular se presenta lleno principalmente de miofibrillas que son las unidades contráctiles de la fibra. Estas estructuras se encuentran estrechamente agrupadas, son cilíndricas, tienen un diámetro de 1-2 μm y presentan bandas alternantes claras y oscuras en toda su longitud. Las bandas claras también llamadas bandas I están formadas por filamentos delgados constituidos por las proteínas, actina principalmente, Tropomiosina y Troponina. Las bandas oscuras o bandas A contienen a los filamentos gruesos constituidos por la proteína miosina. Hay otros detalles adicionales de importancia que son: la línea Z o disco Z de donde parten los filamentos finos, esta línea Z se localiza en la región central de la banda I. La banda H representa una región de superposición de la miosina y esta localizada en la porción central de cada banda A. El área entre las dos líneas Z adyacentes se denomina *Sarcómera* (Junqueira 2001). En la figura 1b se esquematiza el arreglo de estas distintas bandas.

Las miofibrillas están rodeadas de estructuras membranosas en forma de vesículas y túbulos. Estas estructuras forman dos sistemas: uno que consiste en los llamados túbulos T (de transversal) que son en realidad invaginaciones del sarcolema y son los responsables de la contracción uniforme de cada fibra muscular esquelética. Los túbulos T envuelven ambas uniones de la Banda A e I de cada sarcómera. Los otros, el sistema principal, llamado retículo sarcoplásmico (RS), regula específicamente el flujo del ión Ca^{2+} necesario para la contracción/relajación del músculo. El RS está formado por túbulos rodeados por membrana que constituyen una trama continua situada entre los estrechos espacios que quedan entre las miofibrillas, muestran un patrón repetido de diferenciaciones locales relacionadas con regiones específicas de las sarcómeras. La orientación preponderante de los sarcotúbulos es la longitudinal en la zona de unión de la banda A con la banda I. Los sarcotúbulos longitudinales confluyen en un túbulo de mayor calibre y orientación transversal que se denomina cisterna terminal. Los túbulos

longitudinales que abarcan las sucesivas bandas I y las líneas Z interpuestas finalizan también en una cisterna distinta localizada en la unión A-I. De esta forma en cada zona de unión de las bandas A-I se puede observar un par de cisternas terminales. Entre cada par de cisternas terminales se sitúa un delgado túbulo transverso. Las dos cisternas terminales paralelas y el túbulo T forman un complejo que se ha denominado triada, (Figura 2c). En esta última existe una especialización distintiva de las membranas, en la microscopia electrónica se han observado estructuras que parecen llenar el hueco intermembranoso que hay entre las membranas de las cisternas terminales y el túbulo transverso. Según parece, son complejos de proteínas integrales de las membranas en aposición, la presencia de estas sugiere la interrogante de si los impulsos se transmiten eléctricamente de los túbulos T al RS o bien tienen lugar otros medios (Junqueira 2001, Fawcett 1995, Tortora 2003).

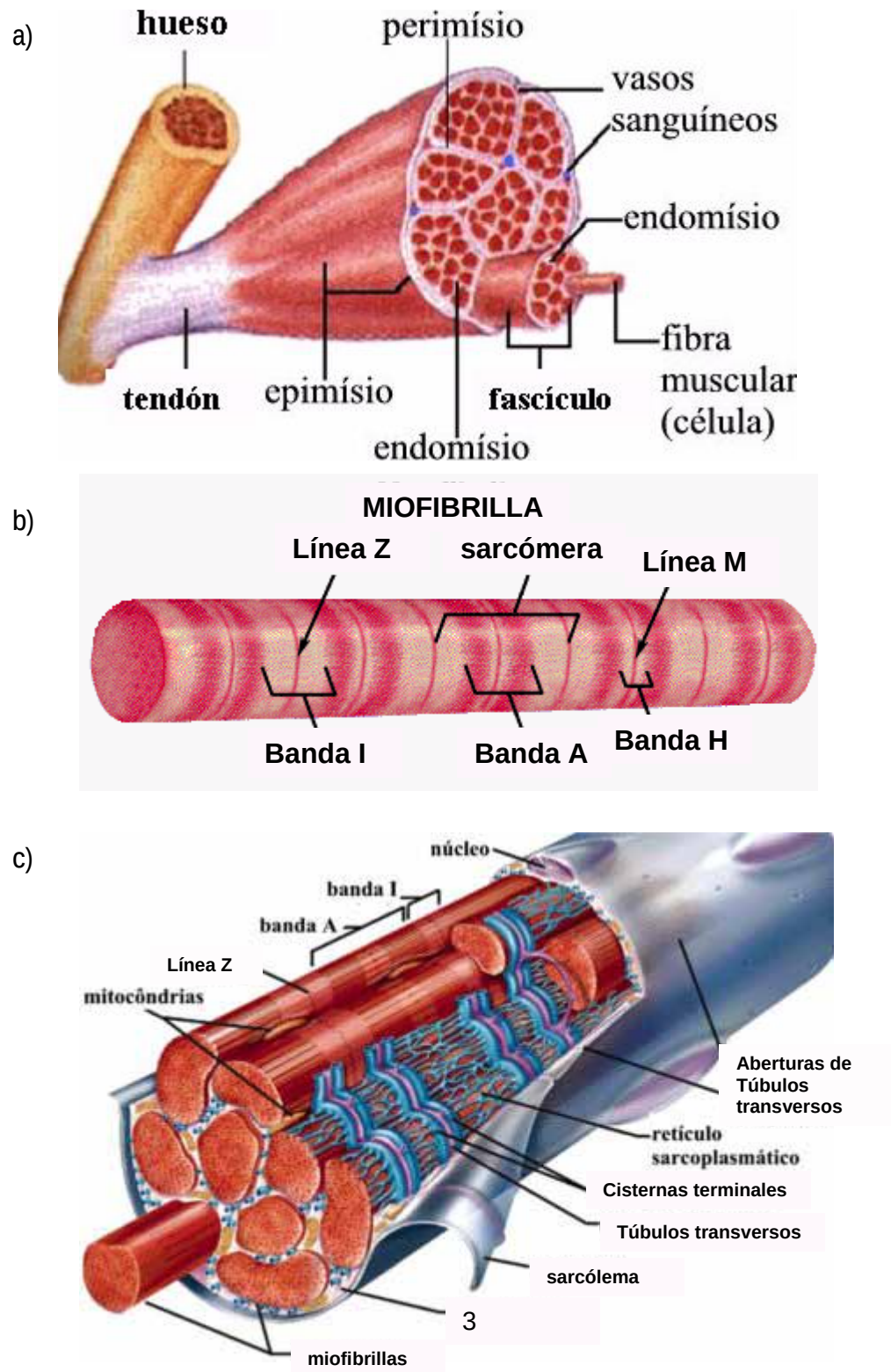


Fig. 1 .Esquemas de la constitución del músculo esquelético. a) muestra que las fibras musculares están organizadas en grupos de haces rodeados por tejido conjuntivo, dividiendo a este en fascículos que contienen varias fibras musculares b) esquema que ilustra las diferentes bandas observadas en las miofibrillas, constituidas por la estructura y posición de los filamentos finos y los filamentos gruesos del sarcómero. c) Esquema de la ultra estructura de la fibra muscular esquelética, el sarcólema y las mifibrillas están parcialmente seccionados para observar los diferentes componentes que constituyen a esta. (en línea, Luisa Miranda 2000, Rodolfo Vasconcelos 2002)

1.2 COMPLEJO DE GLICOPROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA

En las afecciones musculares la distrofina es una de las proteínas más estudiadas, la alteración en esta provoca la distrofia muscular de Duchenne/ Becker (DMD/DMB) (Hoffman 1998). Para conocer mejor la función de esta proteína se realizaron estudios donde se ha demostrado que al separarla bioquímicamente esta copurifica como parte de un complejo macromolecular de glicoproteínas (Hack 2000). Este complejo ha sido nombrado como glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC de sus siglas en ingles). El DGC puede ser definido como un ensamble multimérico de proteínas de la periferia y proteínas integrales de la membrana (Crosbie 2000, Hack 1999). Este complejo puede ser localizado tanto en músculo cardíaco como en músculo esquelético.

El análisis molecular y bioquímico muestra que el DGC esta conformado por tres subcomplejos de acuerdo a sus características bioquímicas (Chan 1998). El primero de ellos, los componentes citoplasmáticos que consisten en las sintrofinas α -, β -1, β -2, γ -1 y γ -2, α - y β -distrobrevina y la distrofina. El segundo subcomplejo, nombrado complejo distroglicano, constituido por las subunidades α y β distroglicanos (DG). El tercer y último subcomplejo nombrado complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SPN) constituido por las subunidades α -, β -, γ -, δ -, ϵ - y ζ -Sarcoglicano (SG), además de la proteína sarcospan (Campbell 1995, Chan 1998, Blake 2002, Crosbie 2000).

La interacción entre los distintos subcomplejos del DGC es importante y se lleva acabo de la siguiente manera: El amino terminal de la distrofina interactúa directamente con F-actina, la distrofina se une con otros subcomplejos del DGC por su dominio carboxilo terminal, la unión es directamente con β -DG que es una proteína transmembranal que a su vez se une con α -DG que es

una proteína de la superficie celular, esta última sirve como receptor para la proteína laminina- α 2 que pertenece a la matriz extracelular (Crosbie 2000). El complejo SG-SPN se une directamente con β -DG por la interacción con la subunidad δ -SG. Las sintrofinas y distrobrevinas se unen directamente con la proteína distrofina en su dominio carboxilo terminal. Los componentes y la interacción entre ellos pueden observarse en la figura 2.

Este arreglo del complejo DGC junto con otros estudios, llevan a proponer que este une a la actina con la matriz extracelular manteniendo la estabilidad mecánica del sarcolema durante la contracción de la fibra muscular. Datos más recientes sugieren que el DGC puede también tener un papel en la señalización celular debido a la asociación de este complejo con moléculas como Grb2, calmodulina, sintetasa de óxido nítrico neuronal, filamina entre otras (Crosbie 2000, Chan 1999, Ling 1999, Rondon 2001).

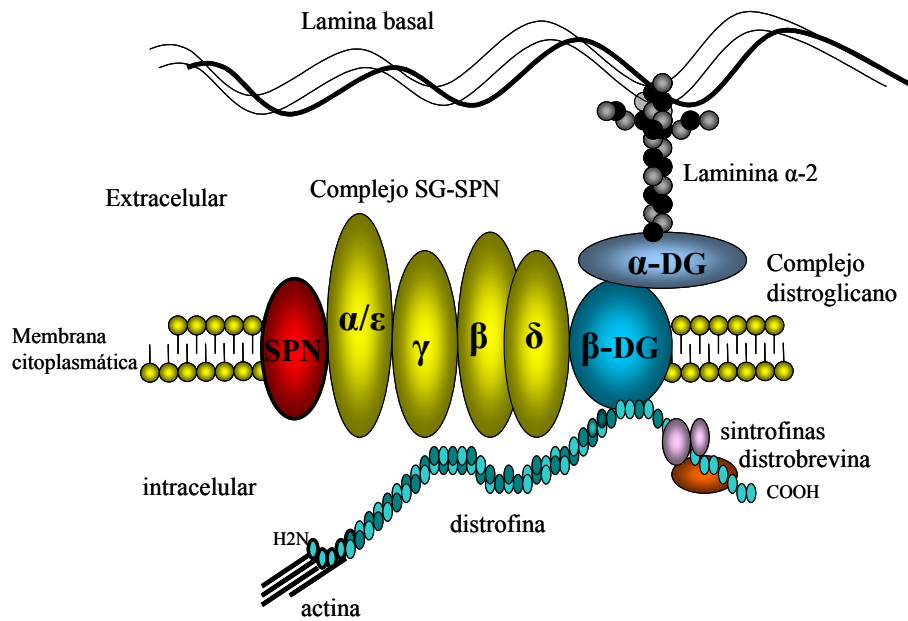


Fig 2. Esquema de la organización del complejo sarcoglicano-sarcospan. El DGC une al citoesqueleto de la fibra muscular con la matriz extracelular por la organización de las distintas proteínas integrales de membranas así como las proteínas intracelulares y extracelulares.

1.3 EL COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPAN

El complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SPN) es un subcomplejo dentro del DGC, constituido por diferentes proteínas transmembranales denominadas sarcoglicanos, a las cuales se les asocia la proteína sarcospan. Los sarcoglicanos son proteínas glicosiladas cuya estructura primaria consiste en un dominio corto intracelular, una región transmembranal única y un dominio extracelular grande (Chan 1998). Las primeras proteínas caracterizadas de este complejo se les denominó como α -, β -, γ -, y δ -sarcoglicanos cuyos pesos moleculares son de 50, 43, 35 y 35KD respectivamente, en 1997 se descubrió un homólogo de α -SG, el cual fue nombrado ϵ -SG de un peso molecular de 45KD. Posteriormente un sexto sarcoglicano fue descrito en el 2002 el cual se denominó ζ -SG de aproximadamente 40KD (Hack 2002, Ettinger 1997, McNally 1998, Wheeler 2002). En los dominios extracelulares de estas glicoproteínas se han encontrado sitios de N-glicosilación así como sitios potenciales de fosforilación en los dominios citoplasmáticos (Yoshida 1998, Matsumura 1999). Los sarcoglicanos β , γ y δ tiene un grupo de residuos de cisteínas en la región carboxilo, cuya función se desconoce (McNally 1996), aunque esta estructura se ha reportado frecuentemente en moléculas receptoras. Sarcospan forma parte de la familia de proteínas tetraspaninas, esta presenta cuatro dominios transmembranales, sus extremos amino y carboxilo se ubican en la región citoplasmática y tiene un peso de 25KD (Hack 2000, Wheeler 2002).

La secuencia de estas glicoproteínas revela que α y ϵ -SG son proteínas tipo I (el dominio amino terminal esta localizado en la región extracelular) además de que ambas proteínas presentan una homología de 62% a nivel de aminoácidos. Con lo que respecta a las subunidades

β -, γ -, δ - y ζ -SG se ha determinado que son proteínas tipo II (el extremo amino terminal se encuentra en la región intracelular), en cuanto a su homología, γ - y δ -SG se relacionan a nivel de aminoácidos en un 69%, ζ -SG está altamente relacionada con γ - y δ -SG, mientras que β -SG guarda una baja homología con todas estas proteínas (Shi 2004, Ozawa 1997, Hack 2000).

El ensamblaje de los sarcoglicanos se caracteriza por tener un proceso específico, se sabe que β -SG tiene un papel especial en este, actuando como promotor de la formación del complejo. La glicosilación de β -SG sirve para la asociación con δ -SG, que es esencial para la localización apropiada en la membrana, la unidad β - δ sarcoglicanos se denomina nucleador. Mientras que γ -SG, se propone que sirve como el puente de unión entre el nucleador y α -SG (Hack 2000). Con lo que respecta a ζ -SG se determinó que esta subunidad forma parte importante del complejo pero se desconoce como se ensambla en él. De tal forma que la ausencia de uno de los sarcoglicanos genera la disminución o pérdida del complejo en la membrana muscular, provocando al mismo tiempo alteraciones en el complejo distrofina-glicoproteínas. Las causas descritas por las que un sarcoglicano puede estar ausente son las mutaciones en los genes que codifican específicamente a las glicoproteínas α -, β -, γ - y δ -SG. La ausencia de estos sarcoglicanos provoca los distintos tipos de Distrofias Musculares de cintura LGMD (por sus siglas en inglés) de tipo LGMD2D, LGMD2E, LGMD2C y LGMD2F respectivamente, conocidas también como sarcoglicanopatías. Además los modelos animales deficientes de estos sarcoglicanos, presentan cardiomiopatía dilatada, la cual también se presenta en pacientes con distrofia muscular con alteraciones en estas mismas proteínas (Coral-Vázquez 1999, Straub 1998, Hack 1998, Varged 2001) Las Mutaciones en ϵ -SG se han asociado con el síndrome de distonía mioclónica y anormalidades psiquiátricas asociadas (Chan 1998, Marechal 2003, Foncke 2003). Para ζ -SG Wheeler y colaboradores

demonstraron que existe una disminución de este en la distrofia muscular, pero no se ha relacionado ninguna mutación en este gen directamente con algún tipo de distrofia u otra patología. Con lo que respecta a Sarcospan tampoco se ha relacionado algún tipo de distrofia con mutaciones en su gen.

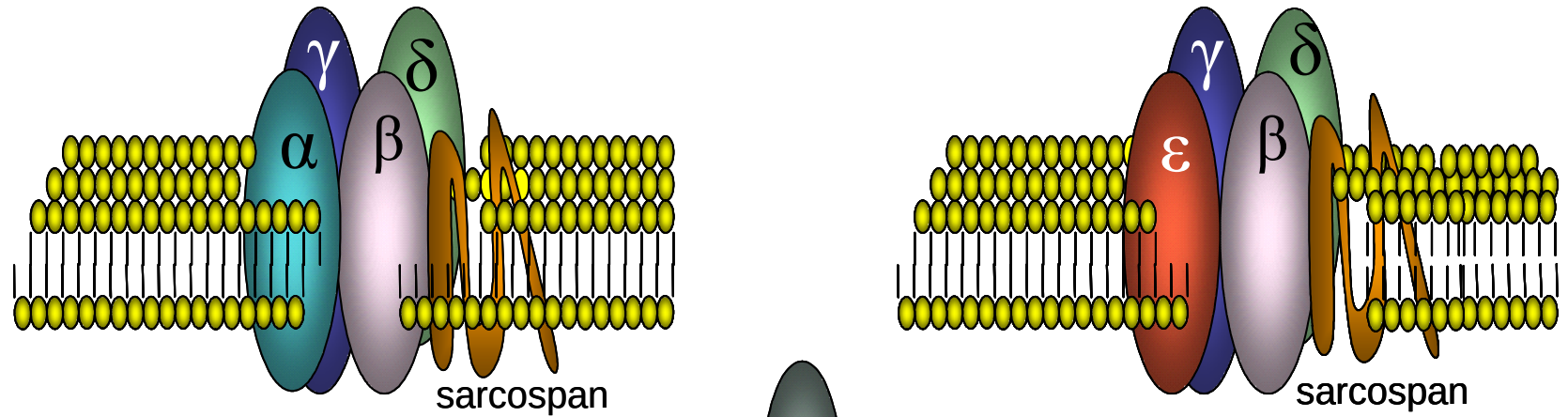
Con esto, la principal función que se le adjudica al complejo SG-SPN es que interviene en la estabilización de la membrana, aunque estudios recientes proveen evidencia de que también juega un papel no mecánico, ya que el complejo SG-SPN puede funcionar como receptor para algún ligando extracelular a través de los sarcoglicanos β , γ y δ , mientras que el sarcoglicano α podría actuar como un efector secundario en la posible participación del complejo SG-SPN en algún proceso de transducción de señales (Shi 2004, Chan 1998, Hack 1999).

Para los sarcoglicanos se han descrito dos complejos distintos que coexisten en el músculo esquelético, el primero de ellos constituidos por las subunidades α -, β -, γ - y δ -SG, el segundo formado por α -, β -, γ - y δ -SG (Straub 1999). En el músculo liso se ha reportado un complejo conformado por las subunidades α -, β -, γ - y δ -SG asociado con distrofina, como se muestra en la figura 3. Un segundo complejo recientemente reportado en músculo liso vascular y en células endoteliales del cordón umbilical, muestra la presencia ϵ - y SPN asociado con utrofina. Las subunidades β -, ϵ - y δ -SG's también se han encontrado en tejidos no musculares (Nigro 1996, Ettinger 1997, Chan 2005). ϵ -SG es el componente reportado más ubicuo, ya que se expresa en células tanto musculares como no musculares (McNally 1998, Ettinger 1997). En cuanto ζ -SG se ha detectado su expresión a nivel de proteína en músculo esquelético cardíaco y liso vascular (Wheeler 2002).

Los sarcoglicanos además de presentar la formación de distintos complejos, como se puede ver en el esquema de la página 12, también presentan una gran variedad de transcritos para cada una de las subunidades, lo que sugiere la existencia de distintas isoformas. El análisis de ellas puede aportar información debido a los cambios que estas presentan en sus dominios relacionados tanto con la localización tisular como con las proteínas asociadas.

Las isoformas del complejo SG-SSPN, no se han caracterizado a profundidad, de lo que se conoce, α -SG tiene un transcrito alternativo carente de los exones 6 y 7, otro transcrito carente de el exón 3 (con o sin los exones 6-7) y otro con los exones 6- 7- 8 y uno más con un exón 5 alternativo. Para β -SG además del transcrito principal de 4.3Kb se han detectado transcritos de 3.0 y 1.35Kb. En γ -SG se han encontrado dos transcritos que varían en el exón 1. Para ϵ -SG se ha reportado la inclusión de un exón 10 y la existencia de una familia de transcritos con procesamientos alternativos, que codifican diferentes secuencias en el extremo carboxilo terminal. En ζ -SG se reporta un procesamiento alternativo con transcritos sin exón 3, exón 4 o ambos. Para sarcospan se han encontrado dos transcritos uno de 605.0kb presente exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco y otro de 4.5kb detectado en músculo esquelético, cardíaco, colon, ovario, próstata, intestino delgado, bazo, testículo y timo. Para δ -SG se han reportado dos transcritos alternativos, estos presentan diferencias en la parte carboxilo terminal, ambos transcritos se detallan en la siguiente sección (Center for Human and Clinical Genetics [en línea]).

A) MUSCULO ESQUELETICO



B) MUSCULO LISO

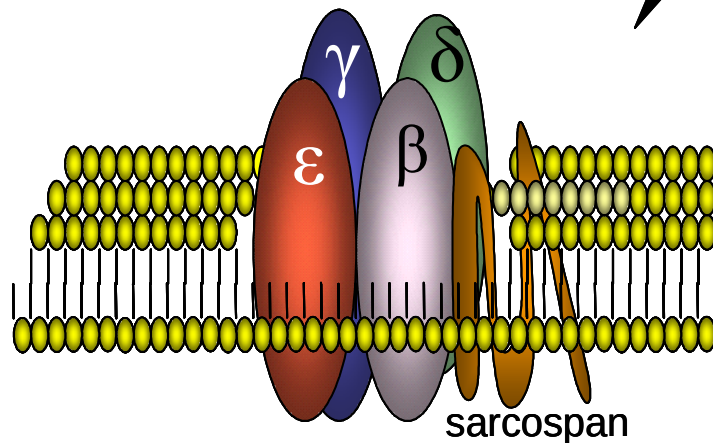


Figura 3. Organización del Complejo SG-SSPN en diferentes tejidos. Muestra los diferentes complejos formados por los sarcoglicanos. En A se observa los dos diferentes complejos que se pueden formar en músculo esquelético, uno que contiene a la subunidad α y otro que contiene a la subunidad ϵ , nunca se encuentran ambas glicoproteínas en un mismo complejo. En B se observa el único complejo que se conoce el cual que contiene a ϵ -SG.

1.4 DELTA SARCOGLICANO

1.4.1 Transcritos

El delta sarcoglicano se localiza en humanos en el 5q31.3-q33.2, abarca 433Kb del DNA genómico. Produce un RNA mensajero (mRNA) de mayor abundancia de 8.0Kb y otro menos abundante de 3.6Kb. En rata se ha determinado la existencia de otros transcritos para delta sarcoglicano lo que sugiere la existencia de empalmes y/o formas alternativas de poliadenilación del RNA mensajero (Center for Human and Clinical Genetics [en línea], Jung 1996).

El empalme alternativo del RNA produce dos proteínas diferentes en la porción carboxilo terminal, las cuales han recibido los nombres de delta-sarcoglicano 1 (δ -SG1) y delta-sarcoglicano 2 (δ -SG2). El mRNA del transcrito SGCD1 esta constituido por 9 exones, al comparar este con SGCD2, se observa un exón diferente en la porción 3' terminal y diferentes sitios de poliadenilación. El mRNA del SGCD2 no contiene el exón 9, en su lugar contiene un fragmento del intrón 8 (Center for human and clinical genetics [en línea]). Ambos transcritos se esquematizan en la figura 4

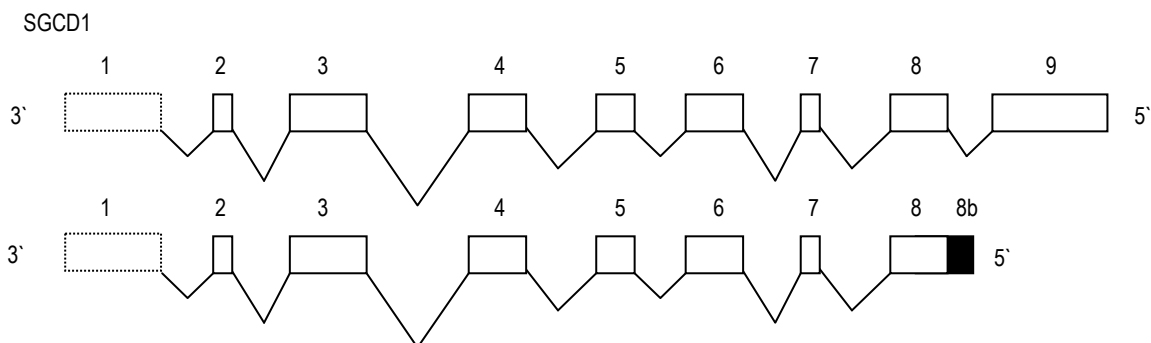


Fig. 4. Esquema de transcritos SGCD1 y SGCD2. Esquema que muestra los dos diferentes transcritos conocidos para el gen de delta-sarcoglicano en humanos SGCD1 y SGCD2. Las cajas blancas, representan los exones que se traducen, la caja de línea discontinua representa el exón no traducible (UTR), la caja negra representa al exón alternativo. Las líneas que separan a cada caja están representando a los intrones.

1.4.2 Proteína

El transcrito SGCD1 produce una proteína constituida por 289 aminoácidos, la masa molecular aparente es de 35Kd. El SGCD2 codifica una secuencia carboxilo terminal diferente, sustituyendo los últimos 54 aminoácidos que traduce SGCD1 por 23 aminoácidos diferentes (Center for Human and Clinical Genetics [en línea]).

La proteína que produce SGCD1 contiene en su extremo amino-terminal 36 aminoácidos hidrofóbicos, esta región se encuentra en el dominio citoplasmático, seguido por 21 aminoácidos de la región transmembranal mientras que los 232 aminoácidos restantes se localizan en el dominio extracelular (Center for Human and Clinical Genetics [en línea]). El dominio carboxilo terminal contiene tres sitios potenciales para N-glicosilación y son: Asn51, Asn109 y Asn285 los dos primeros motivos son conservados. Además de presentar cuatro residuos de cisteínas Cys264, Cys266, Cys282 y Cys289 (Center for Human and Clinical Genetics [en línea], Jun 1996, Hack 2000).

Anteriormente se consideraba que los sarcoglicanos α , β , γ y δ se localizaban exclusivamente en el sarcolema de la fibra muscular, siendo esta consideración, una de las herramientas más importantes para el diagnóstico diferencial de las distrofias musculares, pero en 2001 se demostró que solo α - y β -SG conservan esta localización exclusiva del sarcolema, en tanto que γ - y δ -SG muestran un patrón estriado en cortes longitudinales de músculo esquelético de rata (Ueda 2001). Este patrón estriado de δ -SG se debe a su localización en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico. Mientras que γ -SG se encontró en la cisterna terminal y en el

retículo sarcoplásmico longitudinal. La expresión de δ - y γ -SG no se ve alterada por la ausencia de la distrofina (Ueda 2001).

1.5 UNA ISOFORMA NUEVA DE DELTA-SARCOGLICANO

En una genoteca de cDNA de músculo esquelético de ratón, se separaron clonas del cDNA del gen de delta sarcoglicano. El análisis de la secuencia de DNA de una de estas clonas, muestra una secuencia de cDNA diferente en su extremo 3' del transcrito del mRNA. Para determinar el origen de esta nueva secuencia, se alineo con el gen completo de delta sarcoglicano de ratón. El análisis mostró un nuevo transcrito idéntico para SGCD1 (GenBank accession no. [NM011891](#)) desde el exón 1 hasta el exón 5, la diferencia de este, es que incluye una porción del intrón 5 en su extremo 3' terminal, como se esquematiza en la figura 5. El análisis por computadora (DNA MAN Lynnon BioSoft) de este cDNA, predice una proteína corta, donde los 122 aminoácidos de la parte carboxilo terminal que constituyen δ -SG1 son remplazados por 10 aminoácidos que son: Ácido glutámico, Glicina, Fenilalanina, Leucina, Asparagina, Metionina, Glutamina, Leucina, Alanina y Glicina (EGFLNMQLAG). El codón de paro para esta proteína se encuentra en la posición 532 de la secuencia del intrón 5. A esta nueva isoforma se le nombró delta sarcoglicano 3 (δ -SG3). Se predice que δ -SG3, esta constituida por 177 aminoácidos (Estrada-Mena 2006).

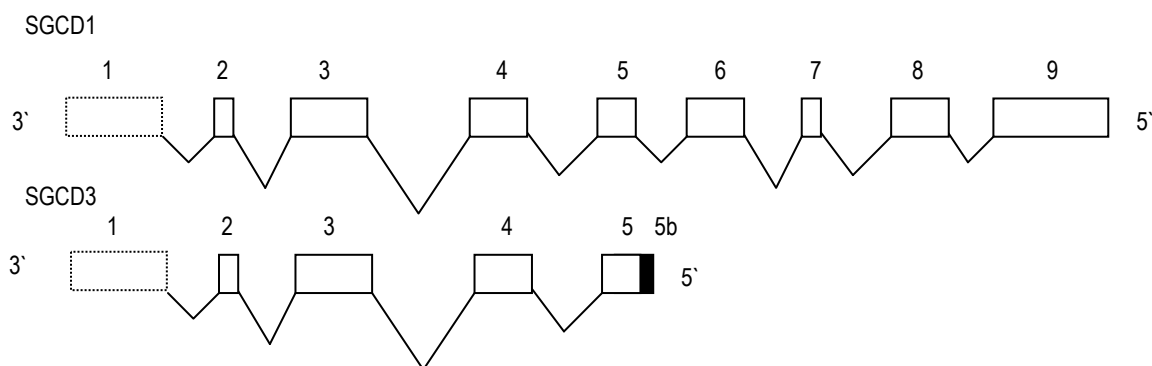


Fig. 5. Esquema de la estructura del transcrito SGCD1 y SGCD3. Las cajas blancas muestran los exones, la cajas de líneas discontinuas en cada esquema representa un UTR, la caja negra, representa el exón alternativo, que es parte de un intrón. Las líneas entre las cajas representan a los intrones.

1.6 DELTA-SARCOGLICANO DE RATÓN

El gen del delta sarcoglicano de ratón se localiza en el cromosoma 11 de esta especie. El transcrito de esta proteína esta constituido por 8 exones y se muestra un esquema de este en la figura 6, cuya longitud es de 1,399pb. El uso de ratones como modelo animal en este trabajo, es debido a la alta homología que presenta la proteína producida en esta especie con δ -SG1 en humanos, así como la accesibilidad de sus tejidos. La proteína producida sin madurar, en ratón tiene un peso molecular 32,133.34 daltons y 289 residuos (European Bioinformatics Institute, [en línea]).

Para el ratón se han reportado en las bases de datos dos isoformas, el transcrito constituido por 8 exones, caracterizado en músculo esquelético y el segundo de ellos caracterizado en cerebelo de ratones de 10 días de nacidos, sin que existan reportes de la presencia de este último en músculo esquelético, constituido por 4 exones, la longitud de este es de 474pb (ENSMUST00000020613). Produciendo una proteína que tiene un peso molecular de 17,778.82 daltons y un numero de residuos de 187 aminoácidos. (ENSMUSP00000020613) (European Bioinformatics Institute, [en línea]).

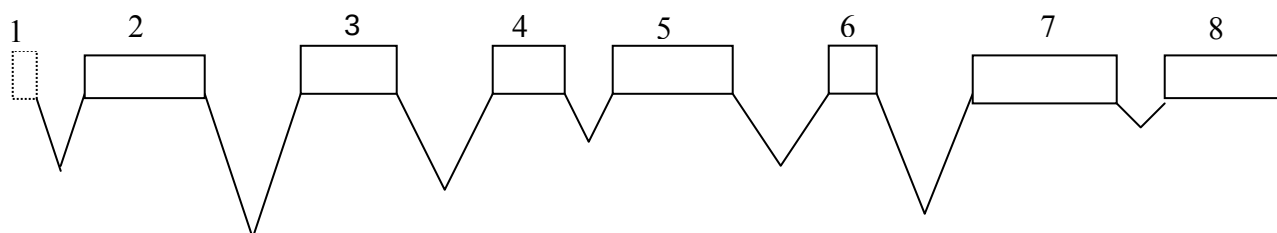


Fig. 6. Transcrito de delta-sarcoglicano en músculo esquelético de Ratón. El esquema que representa la única isoforma de delta sarcoglicano encontrada en músculo esquelético de ratón que muestra la isoforma que produce una proteína homologa en humanos, constituido de 8 exones. Las cajas blancas son exones traducibles, la caja discontinua representa el UTR. Las líneas entre las cajas representan el tamaño de los intrones. Los números indican el numero de exón.

Aunque los transcritos encontrados en músculo esquelético de estas dos especies resultan distintos en la forma de empalme, la homología en estas proteínas es del 94.5%. Para dejar más claro esto se alinearon ambas secuencias marcando como *del R* la secuencia de aminoácidos para la proteína encontrada en ratón y *del H* para la proteína encontrada en humanos. El alineamiento se muestra a continuación.

delR 289 aa vs.
delH 289 aa
94.5% identity;

	10	20	30	40	50	60
delR	MPQEQYSHHRSTMPSSSEPHIYKVGIYGWRKRCLYFFVLLLMIILVNLAMTIWILKVMN					
	. . .					
delH	MPQEQYTHHRSTMPGSVGPQVYKVGIYGWRKRCLYFFVLLLMIILVNLAMTIWILKVMN					
	10	20	30	40	50	60
delR	70	80	90	100	110	120
	FTIDGMGNLRITEKGLKLEGDSEFLQPLYAKEIKSRPGNALYFKSARNVTVNILNDQTKV					
	.					
delH	FTIDGMGNLRITEKGLKLEGDSEFLQPLYAKEIQSRPGNALYFKSARNVTVNILNDQTKV					
	70	80	90	100	110	120
delR	130	140	150	160	170	180
	LTQLVTGPKAVEAYGKRFEVKT VSGKLLFSADDSEVVVGAERLRVLGAEGTVFPKSIETP					
	. . .					
delH	LTQLITGPKAVEAYGKKFEVKT VSGKLLFSADNNEVVVGAERLRVLGAEGTVFPKSIETP					
	130	140	150	160	170	180
delR	190	200	210	220	230	240
	NVRADPFKELRLESPTSLVMEAPKGVEINAEAGNMEAICRSELRLSKDGEIKLDAAKI					
	.					
delH	NVRADPFKELRLESPTSLVMEAPKGVEINAEAGNMEATCRTELRLSKDGEIKLDAAKI					
	190	200	210	220	230	240
delR	250	260	270	280		
	KLPRLPGRSYTPTGTRQKVFEVCVANGRLFLSQAGTGSTCQINTSVCL					
						
delH	RLPRLPHGSYTPTGTRQKVFEICVANGRLFLSQAGAGSTCQINTSVCL					
	250	260	270	280		

1. JUSTIFICACIÓN

El complejo sarcoglicano-sarcospan es un conjunto de proteínas involucradas en patologías severas, ocasionadas por la ausencia de uno o más subunidades de este complejo, estas patologías son las distrofias musculares de cintura, pero además otros estudios han demostrado la intervención de alguna de estas proteínas en otras enfermedades como lo es la cardiomiopatía dilatada y la distonia mioclónica. De entre los diversos enfoques que existen para comprender la función y los fenotipos patológicos de este complejo está el estudio de las isoformas cuya expresión tejido-especifica así como su localización subcelular aportan información importante. El complejo sarcoglicano se ha encontrado en diferentes tipos de músculos formando complejos alternos y para cada una de las subunidades que lo conforman se ha determinado la presencia de transcritos alternativos, aunque sus isoformas no han sido caracterizadas a profundidad se tiene evidencia de su existencia. Es por ello que resulta importante identificar y estudiar estas nuevas proteínas, para acercarnos a la comprensión de su función y su participación en la generación de afecciones musculares y de otros tejidos.

3. OBJETIVOS

Analizar los cambios estructurales que presenta el sarcoglicano delta 3 a nivel de proteína, y compararlos con la proteína delta 1.

Determinar la localización de la isoforma 3 por medio de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en cortes longitudinales y transversales de músculo esquelético de ratón.

Comparar la ubicación en músculo esquelético de la isoforma 3 del sarcoglicano delta, con respecto a la ubicación de la isoforma 1 de la misma proteína, por medio de técnica de inmunofluorescencia indirecta, en cortes longitudinales de músculo esquelético de ratón.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

4.1 BIOPSIAS MUSCULARES

Se sacrificaron 10 ratones adultos jóvenes de sexo indistinto de la cepa Balb-c por dislocación cervical y se obtuvieron biopsias de los músculos gastrocnemio y femoral. Los músculos obtenidos se montaron sobre distintos corchos con la ayuda de goma de tragacanto o Tissue Teck, procurando obtener muestras por separado en orientación transversal y longitudinal. Una vez que estuvieron correctamente orientadas las muestras se fijaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido con la finalidad de evitar el deterioro del tejido, se almacenaron a menos 70°C hasta su uso. Posteriormente se hicieron criosecciones de 7µm por triplicado que fueron colocadas en portaobjetos debidamente rotulados, cubiertos con poli-L-lisina al 1%, en cada porta objetos se colocaron 6 criosecciones de la misma orientación, procurando que estas mantuvieran una distancia suficiente para no sobreponerse entre ellas mismas, como se muestra en la Figura 7. Antes del montaje en portaobjetos con poli-L-lisina se verificó la calidad de los tejidos y la orientación de las fibras musculares con azul de toluidina.

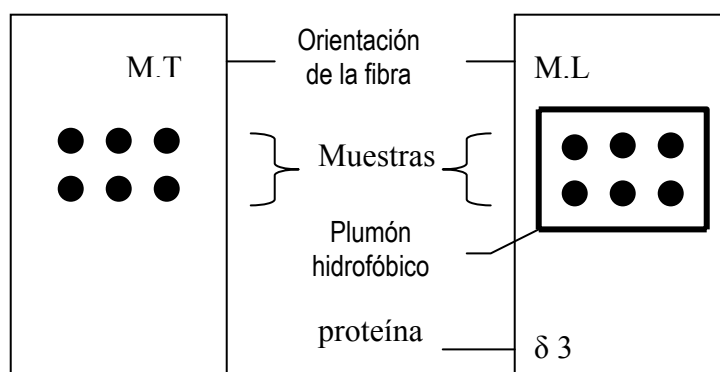


Fig 7. Esquema de laminillas con criosecciones, para su tratamiento. Esquema que muestra las características necesarias para la identificación de las muestras. La marca en la parte superior de la laminilla nos indicaba si la fibra estaba en orientación transversal (MT) o longitudinal (ML). Las muestras se colocaron por triplicado en dos líneas diferentes. Se rotulo la proteína a identificar, que al mismo tiempo nos indico el anticuerpo primario a utilizar y sin tocar las muestras se delineaba un área con plumón hidrofóbico.

4.2 INMUNOFLUORESCENCIA SENCILLAS INDIRECTAS

La proteína δ -SG3 se buscó por inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo primario policlonal, producido en colaboración con el Dr. Dominique Mornet del Institut de Biologie en Montpellier, Francia, por inmunización a conejos, utilizando un péptido sintético que contiene la secuencia de aminoácidos:EGFLNMQLAG, secuencia que se localiza en la porción carboxilo terminal de dicha proteína y hace específico al anticuerpo para dicha variante. Una vez descongeladas las laminillas y debidamente rotuladas, se colocó plumón hidrofóbico tratando de no cubrir los tejidos con éste. Con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos y hacer permeable al tejido se utilizó suero fetal bovino (FBS) al 5%, BSA al 5%, gelatina al 0.5% y Triton X-100 al 0.5%, diluidos en Buffer de fosfatos (PBS) 1X, ocupando 500 μ l de ésta solución para cubrir cada laminilla. La solución anterior se colocó durante una hora a temperatura ambiente, terminado este tiempo se retiró esta y se agregó el anticuerpo que reconoce la parte carboxilo terminal de δ -SG, diluido en FBS al 2.5%, BSA al 2.5%, gelatina al 0.25% y Tween-20 al 0.5% usando como medio de disolución PBS 1X, en una relación 1:500, cubriendo cada laminilla con 250 μ l. Se llevo acabo una incubación durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda oscura. Terminado este tiempo de incubación y con la finalidad de retirar todo el exceso de anticuerpo primario, las secciones fueron lavadas tres veces en tiempos de 5 minutos con la solución de lavado constituida por PBS 1X y Tween-20 al 0.5%. Se preparó una dilución de anticuerpo secundario en una proporción 1:250, anti-conejo unido a carboximetil indocyanina-3 (Cy3, Jackson) en una solución de PBS 1X, NGS al 3%, BSA al 1% y Tween-20 al 0.5%. Este se dejó incubar durante una hora a temperatura ambiente, en la cámara húmeda oscura. Terminado este tiempo se llevaron acabo los tres lavados de 5 minutos con la

misma solución de lavado mencionada anteriormente. Una vez retirado el exceso de anticuerpo secundario se colocaron 15µl de un medio de montaje antidesvanescente para tejidos con DAPI (Vectashield, vector lab) con el propósito de hacer más duradera la fluorescencia y marcar los núcleos de las fibras. Finalmente se les colocó un cubreobjetos, teniendo cuidado de no moverlo una vez colocado y se sellaron con barniz.

Las criosecciones fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia (axioplan 2 Imaging, Zeiss) con objetivos de 40X y 100X (zeiss).

4.3 DOBLES INMUNOFLUORESCENCIAS INDIRECTAS

Una vez preparadas las laminillas para su correcta identificación, como se indicó anteriormente, se bloquearon los sitios no específicos utilizando una solución bloqueadora de PBS 1X, 0.5M pH 7.3, 5% de FBS, 5% BSA, 0.5% de gelatina y 0.5% de Triton X-100. Para este proceso se delimitaron los cortes con plumón hidrofóbico y se cubrieron los tejidos con 500µl de esta solución, durante una hora a temperatura ambiente dentro de una caja húmeda oscura. Posteriormente se retiró la solución bloqueadora y se colocaron 250µl de una mezcla de anticuerpos primarios, el primero de ellos, hecho en conejo, se utilizó en una relación 1:500 este reconoció los últimos 10 aminoácidos de la parte carboxilo terminal de la variante 3 de delta sarcoglicano. El segundo anticuerpo primario utilizado, es un anticuerpo policlonal comercial, hecho en cabra (Santa Cruz), se utilizó en una dilución 1:50, este reconoció a la variante 1 de delta sarcoglicano en los últimos 15 aminoácidos de la parte carboxilo terminal, que no se encuentran en la variante 3. Ambos anticuerpos se diluyeron y mezclaron en una misma solución de PBS 1X, 2.5% FBS, 0.25% gelatina y 0.5% Tween 20, dejándose incubar esta toda la noche a 4°C en una cámara húmeda oscura. Terminado el tiempo de incubación, se eliminó el anticuerpo primario que no se fijó a su proteína blanco con la solución de lavado constituida por PBS 1X y 0.5% Tween-20, en tres tiempos de cinco minutos. Al mismo tiempo se realizó una mezcla de anticuerpos secundarios que nos sirvieron para detectar a los anticuerpos primarios. El primero de ellos, diluido en una proporción de 1:250 unido a isocianato de Fluoresceína (FITC, Jackson) hecho en cabra, reconoció al anticuerpo unido a la isoforma 1 del sarcoglicano delta. El segundo anticuerpo secundario dirigido contra conejo unido a Carboxymetil- idocyanina-3 (Cy3, Jackson), reconoció al anticuerpo unido a la isoforma 3, ambos se diluyeron en una misma solución de PBS 1X, 3% de NGS, 1% BSA y 0.5%

Tween 20 con una proporción de 1:250. Para cubrir los tejidos fue necesario agregar 250µl de esta mezcla. Se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se realizaron nuevamente tres lavados de 5 minutos para retirar el exceso de anticuerpo secundario, con la solución de lavado mencionada anteriormente. Todo este trabajo también se desarrolló en una cámara húmeda oscura. Retirando el último lavado se agregaron a cada portaobjetos 15µl de un medio de montaje antidesvanescente para tejidos con DAPI (Vectashield vector lab). Finalmente se les colocó un cubreobjetos y se sellaron con barniz.

Las criosecciones fueron examinadas en un microscopio de fluorescencia (axioplan 2 Imaging Zeiss, Germany) con objetivos de 40X y 100X (zeiss). Bajo condiciones convencionales y adquiriendo cortes ópticos para reconstruir imágenes 3D. (Apotome Zeiss, Germany)

5. RESULTADOS

5.1 HOMOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS δ -SG1 Y δ -SG3

Con la finalidad de analizar la homología a nivel de proteína de δ -SG3 con la δ -SG1, se alinearon ambas secuencias. En este alineamiento, Figura 8, se observan a todos aquellos aminoácidos que son iguales en ambas secuencias unidos por una línea vertical. En éste se observa que ambas proteínas están constituidas por los mismos aminoácidos hasta el 167, después de éste, δ -SG3, presenta 10 aminoácidos diferentes careciendo del resto de los aminoácidos que presenta δ -SG1, esta pérdida se indica con la línea discontinua en el alineamiento. El análisis muestra una homología en ambas proteínas del 59.9%. Aunque toda la secuencia de δ -SG3 es igual a la que presenta δ -SG1 hasta el aminoácido 167, la pérdida de porción de la parte carboxilo terminal da como consecuencia esta baja homología.

delR 289 aa vs.
del3 177 aa
59.9% identity, Global alignment score: 634

	10	20	30	40	50	60
del-R	MPQEYSHHRSTMP	SSSEGP	HIYKVGIY	GWRKRC	LYFFVLL	MILILVNLAMTIWILKVMN
del-3	MPQEYSHHRSTMP	SSSEGP	HIYKVGIY	GWRKRC	LYFFVLL	MILILVNLAMTIWILKVMN
	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
del-R	FTIDGMGNLR	ITEKGLK	LEGDSEFL	QPLYAKEI	KSRPGNAL	YFKSARNVTVNILNDQTKV
del-3	FTIDGMGNLR	ITEKGLK	LEGDSEFL	QPLYAKEI	KSRPGNAL	YFKSARNVTVNILNDQTKV
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
del-R	LTQLVTGPKAVE	AYGKRFEV	KTVSGKLL	FSADDSEVV	VGAERLRV	LGAEGTVFPKSIETP
del-3	LTQLVTGPKAVE	AYGKRFEV	KTVSGKLL	FSADDSEVV	VGAERLRV	LG-EG-----
	130	140	150	160		
	190	200	210	220	230	240
del-R	NVRADPFKELR	LESPTRSL	VMEAPKGVE	INAEAGN	MEAICRSEL	RLESKDGEIKLDAKI
		...				
del-3	-----FLNMQ	-----	-----	AG-----	-----	-----
	170					
	250	260	270	280		
del-R	KLPRLP	RGSYTPTG	TRQKVFEV	CVCAN	GRFLSQAGT	GSTCQINTSVCL
del-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----

FIG.8. Alineamiento de las proteínas δ -SG1 y δ -SG3. Muestra la homología entre ambas proteínas, donde los aminoácidos que son iguales en ambas se unen por una línea vertical, donde los aminoácidos que no se conservan se señalan con puntos y donde δ -SG3 carece del resto de los aminoácidos que presenta δ -SG1 se señalan con una línea discontinua.

5.2 PÉRDIDA DE RESIDUOS DE CISTEÍNA Y SITIOS DE N- GLICOSILACIÓN

Debido a que δ -SG3 esta perdiendo una gran porción de su parte carboxilo terminal, lo que conlleva a la pérdida importante de aminoácidos con respecto a δ -SG1 en el dominio extracelular, resulta importante analizar si esta nueva proteína esta conservando todos o solo algunos de estos sitios. Para ello se realizó un esquema que nos permite llevar acabo este análisis y que se muestra en la figura 9. Este se realizó con información reportada en la base de datos LAIDEN (NP-000328) y ENSEMBL (ENMUSP000000764559). En la figura 9A, se observa el esquema de la proteína δ -SG1 que presenta un dominio intracelular constituido por 36 aminoácidos hidrofóbicos (rojo), un dominio intracelular corto de 21 aminoácidos desde Phe37-Leu57 (en amarillo) y un dominio extracelular largo de 289 aminoácidos (en azul). En este último dominio se han reportado tres motivos de N-glicosilación en los aminoácidos 60,108 y 284, indicados con las flechas verdes, de éstos se sabe que 60 y 108 son sitios conservados. Contrastando esta información con δ -SG3, se observa en la figura 9B que conserva el mismo dominio intracelular e intermembranal, perdiendo 112 aminoácidos del dominio extracelular y sustituyendo a éstos por los aminoácidos, ácido glutámico, glicina, fenilalanina, leucina, asparagina, metionina, glutamina, leucina, alanina y glicina. δ -SG3 conserva dos motivos de glicosilación, el 60 y 108, indicados también con flechas verdes, perdiendo el motivo 284.

Siguiendo con el análisis de la figura 9A, δ -SG1 presenta cuatro sitios conservados de residuos de cisteínas, en los aminoácidos 264, 266, 282 y 289 y están indicados con flechas grises. Comparando a δ -SG3, este pierde por completo todo el fragmento que los contiene.

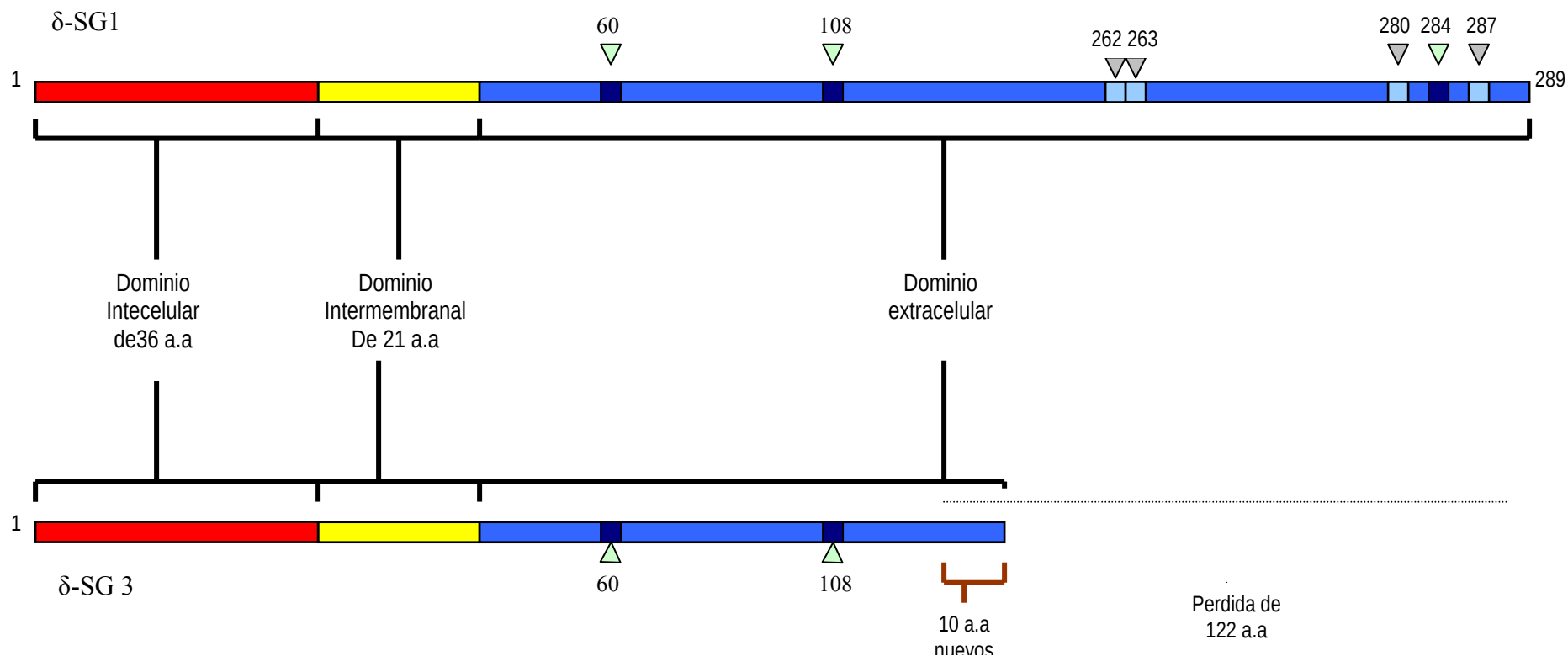


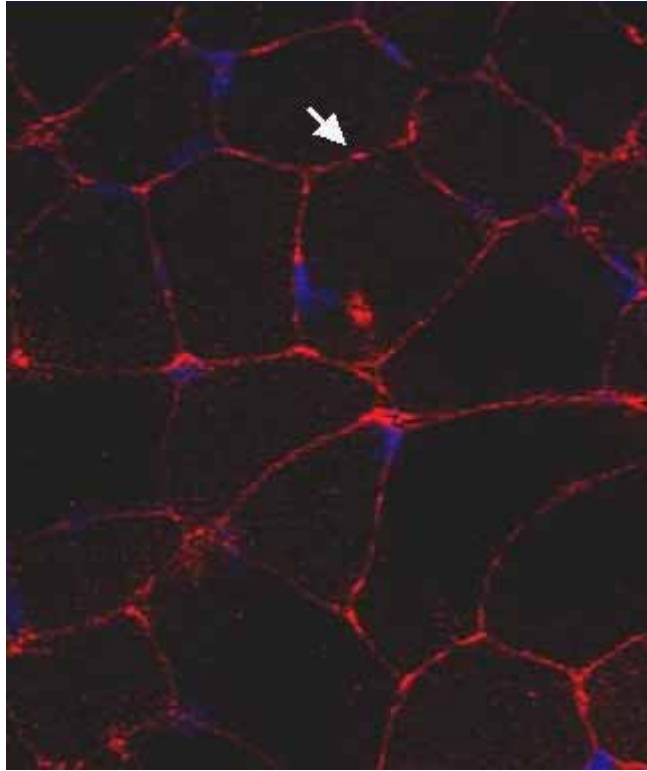
Fig 9. Esquema Comparativo de los Dominios de las Proteínas δ -SG 1 Y δ -SG3. Esquema que muestra los dominios de las proteínas delta-sarcoglicano 1 (δ -SG) y delta-sarcoglicano 3 (δ -SG 3). δ -SG es una proteína constituida de 289 a.a., que presenta un dominio extracelular de 232. a.a., en este dominio presenta tres sitios de glicosilación indicados con las flechas verdes y cuatro residuos de cisteína parecidos a los encontrados en el factor de crecimiento epidermal (EGF), indicados con las flechas grises. δ -SG 3, constituido por 117 a.a., conserva los mismos dominios: intracelular, intermembranal y parte de dominio extracelular de δ -SG, en este último dominio se sustituyen 112 a.a. por 10 a.a. nuevos, perdiendo de esta forma los cuatro residuos de cisteína y un sitio de glicosilación, δ -SG 3 conserva dos sitios de glicosilación indicados por las flechas verdes.

5.3 LOCALIZACIÓN DE δ -SG3 EN CORTES LONGITUDINALES Y TRANSVERSALES DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATÓN

Con la finalidad de localizar a la isoforma δ -SG 3 en cortes longitudinales y trasversales de músculo esquelético de ratón, se generó un anticuerpo policlonal específico hecho en conejo en el laboratorio del Dr. Dominique Mornet en el Instiut de Biologie, Montpellier, Francia. Con este se llevó acabo la inmunofluorescencia sencilla en crio secciones de gastrocnemios de ratón orientadas longitudinal y transversalmente. En los cortes transversales, donde se observan los haces de fibras, se observó un patrón discontinuo en el sarcolema de éstas (Figura 9).

Al llevar acabo la inmunofluorescencia sencilla para la detección de δ -SG3 en cortes transversales de músculo esquelético de ratón, donde se ve la longitud de la fibras, se observó un patrón continuo a lo largo de estas (Figura 10), similar a un reporte previo que muestra la presencia de δ -SG en retículo sarcoplásmico. Sin embargo en ese trabajo el anticuerpo utilizado para localizar a δ -SG reconoce la porción amino terminal de todas las isoformas descritas. Por lo que resultó imposible poder diferenciar a la proteína δ -SG1 de δ -SG3. Para evaluar esta situación se llevo acabo una doble inmunofluorescencia en crio secciones longitudinales con el anticuerpo de δ -SG3 y un anticuerpo que reconoce la porción carboxilo terminal de δ -SG1 (figura 11). La tinción de δ -SG3 muestra una distribución escasa e irregular en el sarcolema mientras que la tinción de δ -SG1 en esta organela tiene una distribución regular e intensa. Las secciones adicionalmente muestran que tanto δ -SG3 como δ -SG1 presentan un patrón estriado similar, sugiriendo con esto que las dos isoformas se localizan en retículo sarcoplásmico sin colocalizar (figura 11).

Con la finalidad de confirmar este patrón, se realizó una imagen en tercera dimensión (Axion Vision, Carl Zeiss, Germany) (Figura 12). En esta imagen además de confirma que ambas isoformas no colocalizan, se marca de manera interesante que la isoforma δ -SG3 parece ser más abundante en RS que δ -SG1.



- Figura 10. Inmunofluorescencia Sencilla de δ -SG 3 en Corte Transversal. Muestra la localización de la isoforma 3 del sarcoglicano delta en corte transversal de músculo esquelético de ratón, utilizando Cy3 como fluorocromo (color rojo). Los núcleos se observan en color azul. Se puede observar un patrón discontinuo en el sarcolemma de las fibras musculares para la isoforma 3. La flecha blanca muestra claramente, una zona muy intensa y a lado de esta no hay fluorescencia, quedando en el sarcolemma de la fibra zonas que fluorescencia y otras zonas que no.

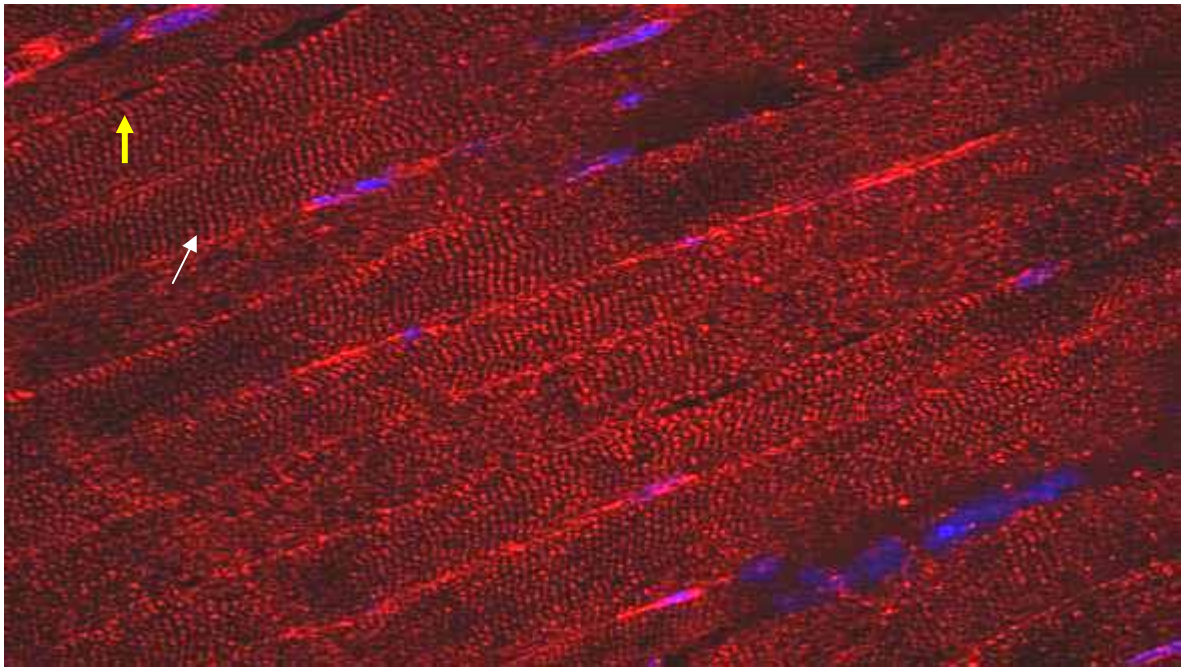


Figura 11. Inmunofluorescencia Sencilla de δ -SG 3 en Corte Longitudinal. Se muestra el patrón estriado a lo largo de la fibra muscular para el sarcoglicano delta 3 en un corte longitudinal de músculo esquelético de ratón, este patrón está indicado con las flechas blancas. Los núcleos se observan en color azul y se encuentran en la periferia de la fibra. Utilizando Cy3 como fluorocromo para identificar a esta isoforma. Adicionalmente esta figura confirma el patrón discontinuo de esta nueva proteína en el sarcolema, este patrón lo indican las flechas amarillas

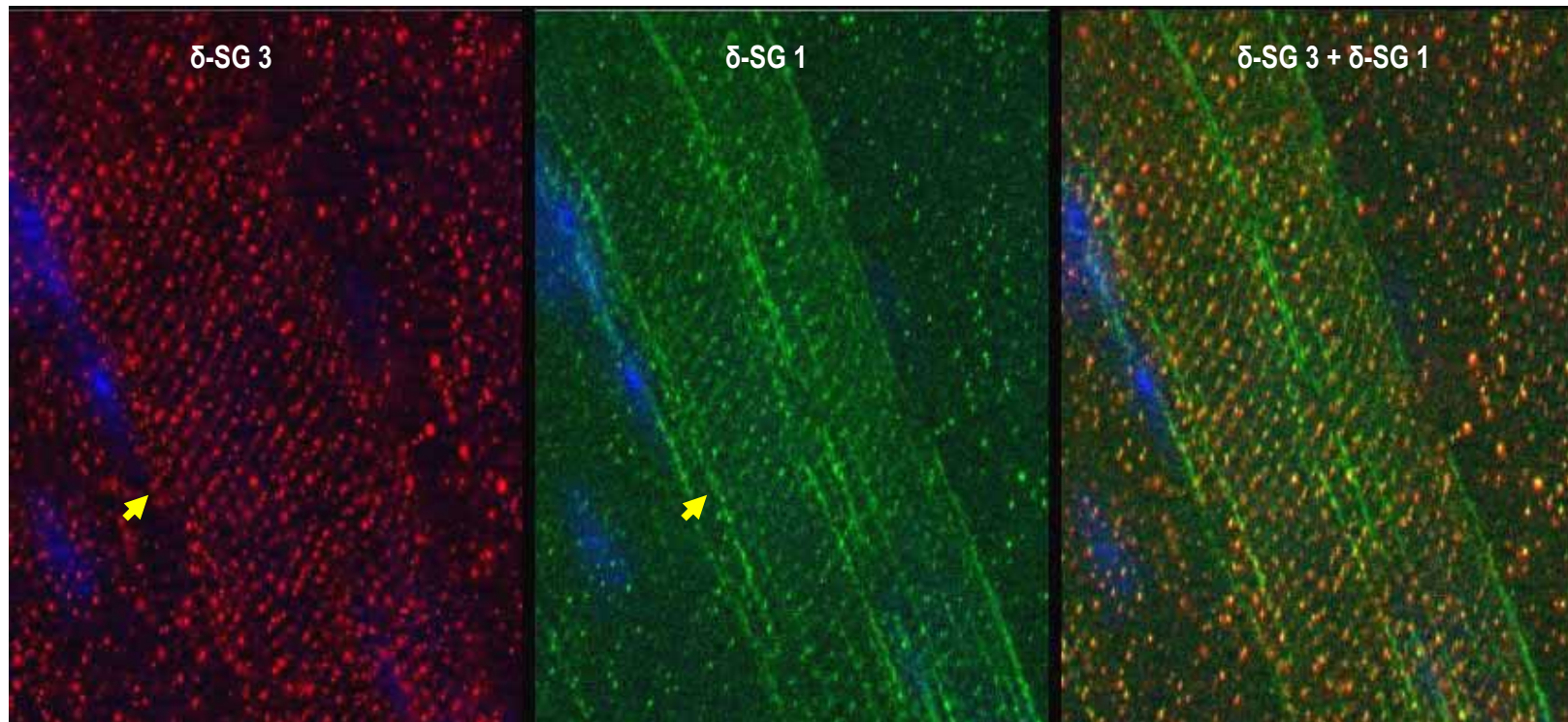


Figura 12. Doble Inmunofluorescencia con δ -SG1 y δ -SG3 en Corte Longitudinal. Muestra el análisis por doble inmunofluorescencia para localizar a δ -SG1 y δ -SG3 en cortes longitudinales de músculo esquelético de ratón. Los núcleos se observan en la periferia de la membrana en color azul. El anticuerpo usado para detectar δ -SG 3 esta unido a Cy3 (rojo). Para detectar a δ -SG 1 se utilizó un anticuerpo unido a FICT (verde). Los cortes se observaron a 45 X. En la fotografía de la derecha (delta 3) se repite el mismo patrón estriado observado en las inmunofluorescencias sencillas, un dato importante que aporta esta imagen, es la ausencia de δ -SG 3 en el sarcolema de la fibra. En la fotografía central se observa la localización de δ -SG 1 que muestra el mismo patrón observado para la isoforma 3. δ -SG1 presenta una localización continua en todo el sarcolema de la fibra muscular. La fotografía de la izquierda muestra a ambas isoformas, en esta sobre posición se observa que no existe colocalización de δ -SG 1 con δ -SG 3. Adicionalmente se puede comparar la ubicación de ambas proteínas en el sarcolema de la fibra, donde con flechas amarillas se muestra que para δ -SG 3 la presencia es nula en esta Organela, mientras que para δ -SG 1 se puede observar en un patrón continuo.

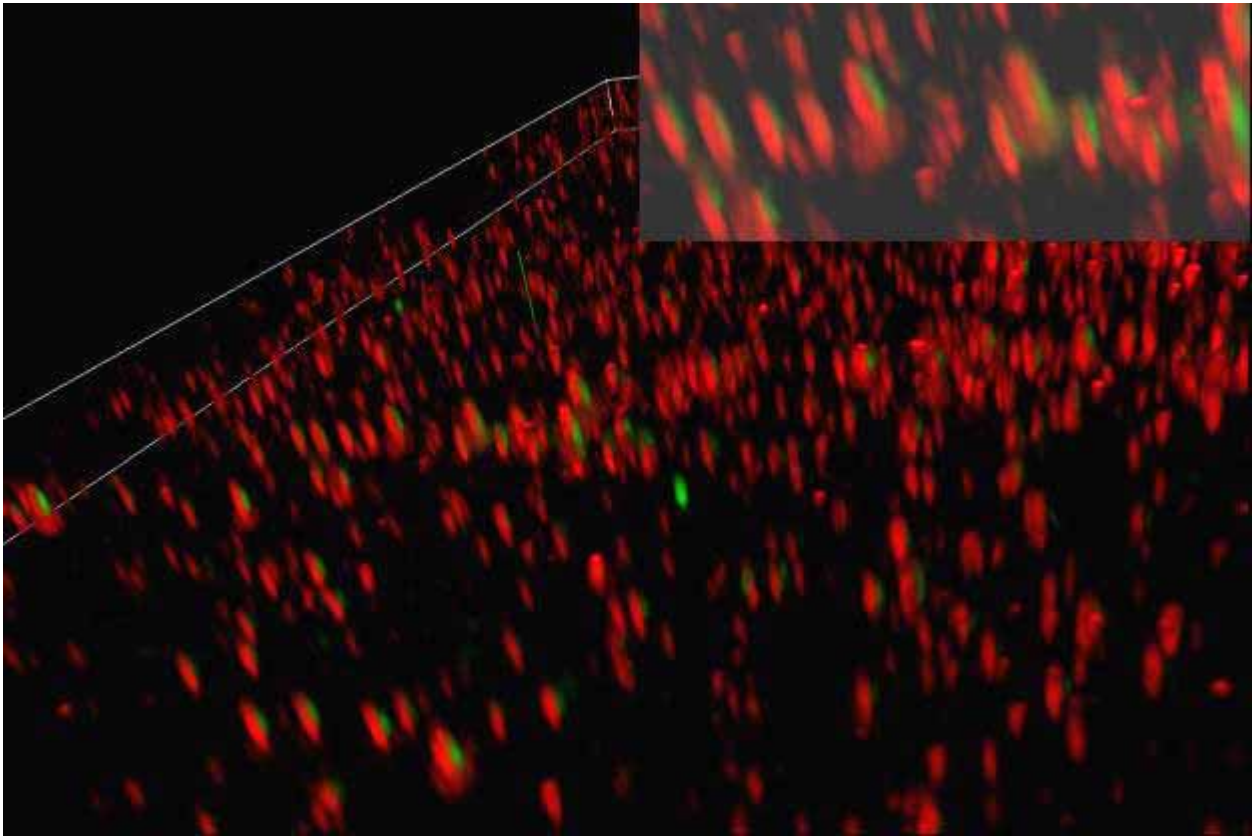


Figura 13. Doble inmunofluorescencia con δ -SG 1 y δ -SG 3 en corte longitudinal 3D. Se muestra una imagen en tercera dimensión de la doble inmunofluorescencia de las isoformas 1 y 3 del sarcoglicano delta, en cortes longitudinales de músculo esquelético de ratón, en 100x. En esta imagen se puede confirmar que δ -SG3 no colocaliza con δ -SG1, aunque ambas estén aparentemente cerca. Al parecer δ -SG 3 es más abundante que la δ -SG 1. El recuadro de la parte superior derecha muestra un aumento de la misma imagen, para observar mejor la localización de ambas isoformas.

6. DISCUSIÓN

δ -SG es una proteína involucrada en patologías como son la distrofia muscular de cintura 2F y la cardiomiopatía dilatada, de esta proteína se conocen dos transcritos diferentes en humano, que producen las isoformas conocidas como δ -SG1 y δ -SG2. Tratando de estudiar mejor estas proteínas se encontró en una genoteca un transcrito de δ -SG que al ser analizado in silico predijo una proteína más corta que las que se encuentran reportadas para este gen, a esta nueva proteína se le denominó δ -SG3. Con ayuda de las secuencias se demostró que las proteínas δ -SG1 y δ -SG3 son homologas hasta el aminoácido 167, después de este, δ -SG3 carece del resto de los aminoácidos que presenta δ -SG1, sustituyendo ha estos, por 10 nuevos aminoácidos. Con estas características que presenta δ -SG3 al llevar acabo el alineamiento se determinó con las que esta proteína presenta una homología con respecto a δ -SG1 del 59.9%. Esta baja homología es debida a que δ -SG3 está perdiendo gran parte del dominio extracelular que presenta δ -SG1.

Haciendo uso de la secuencia de los aminoácidos que constituyen a δ -SG3, se determinó un peso molecular de 20 KD, este peso puede modificarse debido a procesos postraduccionales como es, por ejemplo, la glicosilación. Ejemplo de esta modificación en el peso molecular debido a este proceso de maduración de las proteínas se puede observar en α -DG, la cual presenta un peso de 97.552 daltons, que aumenta hasta un peso de 156 KD en este proceso.

En lo que se refiere a la comparación mediante alineamientos entre δ -SG1 y δ -SG3, destaca el hecho de que compartan la región citoplasmática y transmembranal pero en la región extracelular δ -SG3 no presenta gran parte de la región carboxilo terminal, en cambio solo presenta

diez aminoácidos que no son encontrados en δ -SG1. Entonces ambas proteínas comparten el dominio intracelular, el dominio intermembranal y dos sitios de N-glicosilación. Sin embargo, δ -SG3 no presenta un tercer sitio de N-glicosilación, ni los residuos de cisteínas, ni un gran número de aminoácidos que sí están presentes en la región carboxilo de δ -SG1. En cuanto a las posibles implicaciones de estos cambios señalamos que estas glicosilaciones son modificaciones postraduccionales que pueden ser llevadas a cabo en diferentes compartimentos de la célula; la presencia de carbohidratos en las proteínas se les ha adjudicado diferentes funciones, como el de promover el plegamiento correcto de éstas, conferir estabilidad y hasta de permitir la adhesión de otras moléculas (Lodish 2002). En particular para el complejo de los sarcoglicanos se ha demostrado que las glicosilaciones son necesarias para que algunas subunidades de este complejo puedan unirse, tal es el caso de β y δ -SG's.

Una posibilidad es que la pérdida del sitio de N-glicosilación puede cambiar el plegamiento de esta nueva proteína, lo cual puede afectar la interacción de δ -SG3 con el resto de las subunidades del complejo sarcoglicano. Este cambio también puede sugerirnos la existencia de una asociación con proteínas distintas a las del complejo SG-SSPN. Esta unión de subunidades de dicho complejo con proteínas diferentes a las del complejo sarcoglicano ya se ha evidenciado anteriormente en cordón umbilical de humano (Ramírez-Sánchez). La conservación de estos dos sitios de glicosilación también podría estar funcionando como lugares de unión para diferentes moléculas, lo que haría posible un cambio total de la función de δ -SG3.

Con lo que respecta a los residuos de cisteína la función biológica que se les ha asignado en las proteínas es la formación de enlaces disulfuro (S-S), estos pueden ser intermoleculares o

intramoleculares y contribuyen a estabilizar la estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas. El apareamiento adecuado de los residuos de cisteína es indispensable para la estructura y actividad normal de éstas (Harvey 2002). Se ha observado para los sarcoglicanos, que las mutaciones en estos sitios se asocian con la severidad del fenotipo en la distrofia muscular, lo que sugiere que pueden funcionar como receptores para algunos ligandos desconocidos importantes para el correcto funcionamiento de estas proteínas. Comparando a δ -SG3 que pierde por completo todo el fragmento que contiene estos residuos y considerando que los 10 aminoácidos que remplazan a este fragmento perdido, no contienen ningún residuo de cisteína, podemos sugerir que esta nueva proteína puede estar interactuando con otras proteínas o moléculas con las cuales δ -SG1 no tiene relación, por lo cual la capacidad de estar formando complejos alternativos con otras proteínas diferentes a los sarcoglicanos es posible.

Considerando estas diferencias estructurales importantes que presenta δ -SG3 con respecto a δ -SG1 y tomando en cuenta los antecedentes experimentales que demuestran, por medio de la técnica de RT-PCR no cuantitativa que el transcrito de esta proteína se localizaba tanto en tejidos musculares como no musculares, presentando una expresión abundante en músculo esquelético y corazón (J. Estrada-Mena 2006). Este trabajo también consistió en la búsqueda de la expresión a nivel de proteína, exclusivamente en músculo esquelético, de δ -SG3 para determinar la presencia y localización en este tejido así como para poder comparar su localización con respecto δ -SG1.

Para poder llevar a cabo este análisis, se produjo un anticuerpo específico para δ -SG3, en colaboración con el Dr. Dominique Mornet del Institut de Biologie en Montpellier, Francia, que reconoce a los 10 aminoácidos diferentes de la parte carboxilo terminal de δ -SG3 (EGFLNMQLAG).

Con este anticuerpo lo primero que se realizó fue determinar la presencia y localización de la proteína delta 3 en las criosecciones de músculo esquelético de ratones controles, estos cortes fueron tanto longitudinales como transversales. El resultado obtenido mostró que el RNAm se está traduciendo a proteína y esta se localiza en un patrón discontinuo. Esto nos permite establecer que la proteína δ -SG 3 no se localiza en toda la membrana de la fibra, si no solo en ciertas regiones, al contrastar este patrón con el que presenta δ -SG1, que en este caso es continuo en todo el sarcolema (figura 12), podemos ver que δ -SG1 tiene una mayor distribución en esta organela en contraste con δ -SG 3.

La inmunofluorescencia realizada en cortes longitudinales de músculo esquelético de ratón, donde se localizó exclusivamente la proteína δ -SG3 muestra un patrón estriado en toda la longitud de la fibra, reportes anteriores mostraron la presencia de este mismo patrón para el sarcoglicano delta, estudios más específicos demostraron que este patrón era debido a que la proteína se encontraba en retículo sarcoplásmico, en concreto en cisternas terminales, pero en este estudio realizado por Ueda, et.al, se utilizó un anticuerpo, que reconocía la parte amino terminal (N-Terminal), de la proteína en δ -SG y como ya se mostró anteriormente, ambas proteínas, tanto δ -SG1 como δ -SG3, son iguales en esta porción, por lo tanto resulta imposible distinguir en ese estudio si este patrón está dado por δ -SG1 o δ -SG3. Nosotros mostramos que la presencia de este patrón es característico de la isoforma 3, debido a la especificidad de nuestro anticuerpo, pero con estos resultados, no podríamos afirmar que δ -SG1 no presenta también este mismo patrón, por lo cual nos dimos a la tarea de hacer dobles inmunofluorescencias donde se utilizó el mismo anticuerpo primario específico para δ -SG3 y para diferenciar a δ -SG1 se utilizó un anticuerpo primario policlonal que reconoce el extremo Carboxilo Terminal de esta proteína. Esta

inmunofluorescencia mostró nuevamente el patrón estriado a lo largo de toda la fibra, pero al hacer evidente a δ -SG1 en estos cortes longitudinales, con el fluorocromo FICT (verde) se puede observar el mismo patrón que muestra δ -SG3. Esto nos permite establecer que ambas proteínas se encuentran en retículo sarcoplásmico. Un resultado adicional que confirma su localización en la fibra muscular es la doble inmunofluorescencia con DHRP (Estada-Mena 2006), molécula característica del RS. Un resultado importante que confirma lo obtenido en las inmunofluorescencias dobles, es la escasa presencia de δ -SG3 en el sarcolema de la fibra muscular en contraste con δ -SG1 que es abundante en esta organela celular. Como se señala en la figura 12 con las flechas amarillas.

Al llevar a cabo una sobreposición de δ -SG1 y δ -SG3, que nos permite hacer este tipo de fluorescencia, se observa un color naranja en algunas de las regiones del corte, lo cual podría hacernos pensar en una colocalización de estas proteínas, por lo tanto llevamos a sugerir una posible unión de estas proteínas en un mismo complejo. Aunque en general, también se pueden distinguir ambos fluorocromos independientes lo que nos podría indicar que δ -SG3 y δ -SG1 se encuentran en complejos distintos. Para aclarar este punto, se obtuvo una imagen tridimensional, en estos mismos cortes. En los resultados se observó que estas dos proteínas forman parejas, sin juntarse nunca, es decir, sin colocalizar. El hecho de encontrarse separadas nos puede llevar a sugerir que ambas proteínas se encuentran en complejos diferentes. También es evidente la presencia más abundante de la δ -SG3 en este tipo de corte, en comparación de la δ -SG1, lo cual nos puede sugerir que δ -SG3 tiene una función de mayor relevancia en el retículo sarcoplásmico.

7. CONCLUSIONES

El RNAm del transcrito de SGDC3 se traduce en proteína, el análisis de la estructura de esta (δ -SG3) muestra que la pérdida de la parte carboxilo terminal que contiene el sitio de glicosilación 284 y los cuatro residuos de cisteína 264, 266, 282 y 289 le puede conferir a esta nueva proteína un plegamiento distinto al observado para δ -SG1 y por lo tanto la capacidad de conformar complejos alternativos con proteínas diferentes a las del complejo sarcoglicano-sarcospan, sugiriendo también con esto, un cambio en las funciones que llevan acabo ambas proteínas.

La proteína δ -SG3, se localiza en el sarcolema de las fibras musculares del músculo esquelético, en un patrón discontinuo. Un patrón estriado en cortes transversales sugiere la presencia de esta nueva proteína en el retículo sarcoplásmico al igual que δ -SG1.

Las proteínas δ -SG3 y δ -SG1 no colocan en retículo sarcoplásmico, la isoforma 3 de esta proteína es aparentemente más abundante en esta organela lo que sugiere una importante función en el retículo sarcoplásmico de δ -SG3.

8. BIBLIOGRAFÍA

Blake D. Weir, A. Newey S y Davies K. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol rev.* 82:291-329.

Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center (2006), The Sarcoglycans, [En línea] 11 March 1996, <<http://www.dmd.nl/>>[consulta 03 septiembre 2005]

Center for Human and Clinical Genetics, Leiden University Medical Center (2006), delta-Sarcoglycan(SGCD),(GMD-2F/CMD-1L), [En línea] 11 March 1996, <<http://www.dmd.nl/>>[consulta 03 septiembre 2005]

Chan Yiu-mo, Carsten G. Bšnnemann, Hart G.W. Lidov and Louis M. Kunkel, 1998, Molecular Organization of Sarcoglycan Complex in Mouse Myotubes in Culture, *The Journal of Cell Biology*, 143, pp. 2033-2044.

Cohn Ronald D. and Kevin P. Campbell, 2000 , *Molecular Basis of Muscular Dystrophies*, Muscle Nerve, 23, pp.1456–1471.

Coral-Vazquez Ramon, Ronald D. Cohn, Steven A. Moore, Joseph A. Hill, Robert M. Weiss, Robin L. Davisson, Volker Straub, Rita Barresi, Dimple Bansal, Ron F. Hrstka, Roger Williamson and Kevin P. Campbell, 1999, Disruption of the Sarcoglycan–Sarcospan Complex in Vascular Smooth Muscle: A Novel Mechanism for Cardiomyopathy and Muscular Dystrophy, *Cell*, 98, pp.465–474.

Crosbie Rachelle H., Leland. E. Lim., Steven A. Moore., Michio. Hirano., Arthur. P. Hays., Simon. W. Maybaun, Huguette Colin, Sherry A. Dovico, Catherine A. Stolle, Michelle Fardeau, Fernando M.S. and Kevin P. Campbell, 2000, Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions, *Human Molecular Genetics*, 9(13), pp.2019-2027.

D.W. Fawcett, 1995, *Tratado de Histología*, 12ª ed., España, McGraw-Hill Interamericana, 954p.

Duclos Franck, Volker Straub, Steven A. Moore, David P. Venzke, Ron F. Hrstka, Rachelle H. Crosbie, Madeleine Durbeej, Connie S. Lebakken, Audrey J. Ettinger, Jack van der Meulen, Kathleen H. Holt, Leland E. Lim, Joshua R. Sanes, Beverly L. Davidson, John A. Faulkner, Roger Williamson,

and Kevin P. Campbell. 1998, Progressive Muscular Dystrophy In α -Sarcoglycan-deficient Mice. The Journal of Cell Biology, 142(6), pp.1461–1471

Estrada-Mena Francisco J., Dominique Mornet, Haydeé Rosas-Vargas, Alexandra Angulo, Manuel Hernández, Viola Becker, Alvaro Rendón, Manuel Ramos-Kuri, Ramón M. Coral-Vázquez, 2006, A novel isoform of δ -sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle, Biochemical and Biophysical Research Communications, 340, pp. 865–871.

European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory and Sanger Institute (2005),[Enlínea],<http://www.Ensembl.org/Mus_musculus/transview?db=core;transcript=ENSMUST0000077221> [consulta 11 Sep. 2005]

Foncke E. M.J, Klein C, Koelman JHTM, Kramer P L, Schilling K, Müller B, garrels J, de Carvalho Aguiar P, Liu L, de Froe A, Speelman J D, Ozelius L J and Tijssen MAJ, 2003, Hereditary myoclonus-dystonia associated whit epilepsy, Neurology 60(12), pp.520-530.

Gerard J.Tortora et.al., 2003, Principios de anatomía y fisiología, 9.ed., México, Oxford University press, 789p.

Hack Andrew A, Man-Yee J. Lam, Laurence Cordier, Daria I. Shoturma, Chantal T. Ly, Melissa A. Hadhazy, Michele R. Hadhazy, H. Lee Sweeney and Elizabeth M. McNally, 2000, Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex, Journal of Cell Science, 113, pp.2535-2544.

Hack A., L. Cordier, D.I.Shoturma, M.Y.Lam, H.L.Sweeney and E. M. McNally, 1999, Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency, Cell Biology, 96, pp.10723–10728.

Hack Andrew A., Margaret E. Groh, Elizabeth M. McNally, 2000, Sarcoglycans in Muscular Dystrophy, Microscopy Research and Technique, 48, pp.167–180.

Hack Andrew A., Chantal T. Ly, Fang Jiang, Cynthia J. Clendenin, Kirsten S. Sigrist, Robert L. Wollmann and Elizabeth M. McNally, 1998, γ -Sarcoglycan Deficiency Leads to Muscle Membrane Defects and Apoptosis Independent of Dystrophin, The Journal of Cell Biology, 142 (5), pp.1279–1287.

Harvey Lodish, et.al., 2002, Biología Celular y Molecular, 4.ed., España, Interamericana, 745 p.

I.Ramírez-Sánchez, H.Rosasa-Vargas, G.Cebollos-Reyes, F.Salamanca, R. M. Coral-Vázquez, 2004, Expresión Análisis of the SG-SSPN Complex in Smooth Muscle and Endothelial Cells of Human Umbilical Cord Vessels, Journal of Vascular Research,

Jung Daniel, Franck Duclos, Barbara Apostol, Volker Straub, Jane C. Lee, Valérie Allamand, David P. Venzke, Yoshihide Sunada, Carolyn R. Moomawi, Cynthia J. Leveille, Clive A. Slaughteri, Thomas O. Crawford, John D. McPherson and Kevin P. Campbell, 1996, Characterization of δ -Sarcoglycan: a Novel Component of the Oligomeric Sarcoglycan Complex Involved in Limb-Girdle Muscular Dystrophy, The Journal of Biological Chemistry, 271(50), pp. 32321–32329.

Junqueira y Carneiro, 2001, Histología básica, texto y atlas., 5. ed, España, MASSON, 420 p.

Lapidos Karen A., Rahul Kakkar, Elizabeth M. MacNally, 2004, The Dystrophin Glycoprotein Complex, Signaling Strength and Integrity for the sarcolemma, Circulation Research, 274, pp. 1023-1030

Ling A. Liu and Eva Engvall, 1999, Sarcoglycan Isoforms in Skeletal Muscle, The Journal of Biological Chemistry, 274 (53), pp. 38171–38176.

Luisa Miranda Vilela (2005), Anatomia & Fisiologia Humana, [En línea] 2 agosto.2000, <<http://www.afh.bio.br/sustenta/sustenta4.asp>> [consulta 7 noviembre 2005]

Matsamura k, Saito f, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T, 1999, Sarcoglycan Complex: A muscular supporter of Dystroglycan-dystrophin interplay?, Cell Mol Biol, 45, pp. 751-752

MacNally Elizabeth M, Chantal T. Lya, Louis M. Kunkelb, 1997, Human ϵ -sarcoglycan is highly related to α -sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene, Federation of European Biochemical Societies, 422, pp. 27-32.

Noguchia Satoru, Eriko Wakabayashi-Takaia, Toshikuni Sasaokaa, Eijiro Ozawaa, 2001, Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of γ -sarcoglycan gene using a transgenic mouse, Federation of European Biochemical Societies, 495, pp. 77-81.

Ozawa Eijiro, Satoru Noguchi, Yuji Mizuno, Yasuko Hagiwara and Mikiharu Yoshida, 1997, Dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: Evolution of a concept of muscular dystrophy, *Muscle & Nerve*, 21, pp. 421–438.

Rodolfo Vasconcelos (2005), Diferenças Funcionais entre os Músculos Esquelético e liso, [En línea], Brasil, 14 sept. 2002, <<http://molbr.vilbol.vol.com.br/fisio/diflesq.htm>> [consulta 7 noviembre 2005]

Shi Weixing, Zaili Chen, Jodi Schottenfeld, Richard C. Stahl, Louis M. Kunkel and Yiu-mo Chan, 2004, Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan, *muscle nerve*, 29, pp. 409-419.

Straub Volker, Audrey J. Ettinger, Madeleine Durbeej, David P. Venzke, Susan Cutshall, Joshua R. Sanes and Kevin P. Campbell, 199, ϵ -Sarcoglycan Replaces α -Sarcoglycan in Smooth Muscle to Form a Unique Dystrophin-Glycoprotein Complex, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(39), pp. 27989–27996.

Straub Volker, Franck Duclos, David P. Venzke, Jane C. Lee, Susan Cutshall, Cynthia J. Leveille and Kevin P. Campbell, 1998, Molecular Pathogenesis of Muscle Degeneration in the δ -Sarcoglycan-Deficient Hamster, *American Journal of Pathology*, 153 (5), pp. 1623-1630.

Ueda Hideho, Kei Ueda, Takeshi Baba and Shinichi Ohno, 2001, δ - and γ -Sarcoglycan Localization in the Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40(4), pp. 529-537.

Vorgerd Matthias, Martin Gencik, Johannes Mortier, Jorg T. Epplen, Jean-Pierre Malin and Wilhelm Mortier, 2001, Isolated loss of γ -sarcoglycan: diagnostic implications in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies, *Muscle Nerve*, 24, pp. 421–424.

Wheeler Mattheew T., Sara Zarnegar and Elizabeth McNally, 2002, ζ -Sarcoglycan a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy, *Human Molecular Genetics*, 11(18), pp. 2147-2152.

Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M, 1998, Bidirectional signaling between sarcoglycan and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes mutations, *J. Biol Chem*, 273, pp. 1583-1590.



A novel isoform of δ -sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle [☆]

Francisco J. Estrada ^{a,b}, Dominique Mornet ^c, Haydeé Rosas-Vargas ^a, Alexandra Angulo ^a,
Manuel Hernández ^a, Viola Becker ^a, Alvaro Rendón ^d, Manuel Ramos-Kuri ^b,
Ramón M. Coral-Vázquez ^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, C.P. 06725 México, D.F., Mexico

^b Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, México y Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN, Mexico

^c Département de Physiologie des Interactions (EA701), Institut de Biologie, Bd Henry IV, 34060 Montpellier, France

^d INSERM U-592, Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, Hôpital Saint Antoine, Bat Kourilsky 184 rue du Fbg St Antoine, F-75571 Paris Cedex, France

Received 6 December 2005

Abstract

The sarcoglycan–sarcolemma complex (α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, and ζ -SG–SSPN), a component of the dystrophin-associated glycoprotein complex (DAGC), is located at the sarcolemma of muscle fibers where it contributes to maintain cell integrity during contraction–relaxation cycles; γ - and δ -SG are also expressed in the sarcoplasmic reticulum (SR). In this study, we report the identification of a novel isoform of murine δ -SG produced by alternative splicing that we named δ -SG3. This isoform is present at transcript level in several tissues, with its highest expression in skeletal and cardiac muscle. The δ -SG3 protein lacks the last 122 amino acids at the C-terminal, which are replaced by 10 new amino acids (EGFLNMLAG). Interestingly, double immunofluorescence analysis for δ -SG3 and the dihydropyridine receptor (DHPR) shows a close localization of these two proteins. We propose the subcellular distribution of this novel δ -SG3 isoform at the SR and its involvement in intracellular calcium concentration regulation.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Sarcoglycan–sarcolemma complex; δ -Sarcoglycan isoform; Sarcoplasmic reticulum; Skeletal muscle

The dystrophin-associated glycoprotein complex (DAGC) is a multimeric array composed of membrane and cytoskeletal proteins that links the extracellular matrix with the cytoskeleton [1]. In skeletal muscle, the DAGC is composed of dystrophin, the syntrophins, the dystroglycans, the sarcoglycans, and sarcospan [2–4]. The importance of the DAGC in normal muscle physiology is clearly demonstrated since the deficiency of almost any of

its components constitutes the primary cause of muscular dystrophy [5]. The sarcoglycan–sarcolemma complex (SG–SSPN) is a subcomplex of the DAGC composed by the transmembranal proteins α -, β -, γ -, and δ -sarcoglycans (SG), as well as by sarcospan (SSPN). Mutations in α -, β -, γ -, and δ -SGs cause autosomal recessive limb girdle muscular dystrophies (LGMD 2D–2F) [6], that have been collectively called sarcoglycanopathies. A fifth member of the sarcoglycan family, ϵ -SG, is closely related to α -SG, and both are coexpressed in striated muscle as part of different complexes [7–9]. Contrasting with the rest of the sarcoglycans, mutations in the ϵ -SG gene are not associated with muscular dystrophy but to the myoclonus-dystonia syndrome of neurological origin [10]. The most recently described component of the SG–SSPN complex is ζ -SG,

[☆] Abbreviations: SG, sarcoglycan; DAGC, dystrophin-associated glycoprotein complex; SSPN, sarcospan; SR, sarcoplasmic reticulum; DHPR, dihydropyridine receptor; LGMD, limb girdle muscular dystrophy; RyR, ryanodine receptor.

* Corresponding author. Fax: +5255 55885174.

E-mail address: rmcoralv@prodigy.net.mx (R.M. Coral-Vázquez).

which is expressed in skeletal and smooth muscle associated with both α - and ϵ -SGs [11,12]. To date, ζ -SG has not been associated to any muscular disease.

In striated muscle two different complexes have been recognized on the sarcolemma, both containing β -, γ -, and δ -SGs, and the mutually exclusive components α - and ϵ -SG [9]. Most of the previous reports focused on the presence of the SG–SSPN complex on the muscle plasma membrane [13]. Nevertheless, a non-sarcolemmal localization of some members of the SG–SSPN complex was first described by Ueda et al. [14], who reported the expression of γ - and δ -SG in the sarcoplasmic reticulum (SR).

To date, two human delta sarcoglycan isoforms, δ -SG1 and δ -SG2, have been identified. The δ -SG1 transcript contains 9 exons encompassing 8 kb which are translated in a basic transmembranal 35 kDa protein of 290 amino acids [15,16]; while the δ -SG2 transcript lacks exon 9, terminates at intron 8, and encodes for a protein with a different C-terminal sequence, exchanging the last 57 amino acids of δ -SG1 by 23 different amino acids [17]. In Syrian hamster, three alternative promoters have been found, that produce transcripts with a unique exon 1 which contains 5'-untranslated sequences [18]. Herein we describe a new shorter murine δ -SG isoform mainly present in the SR, coexisting with the larger previously reported murine δ -SG isoform. This new isoform, that we named δ -SG3, is originated from alternative splicing of the δ -SG transcript and has 10 new amino acids at its C-terminal that substitute the last 122 amino acids of the reported isoform. The specific localization of this δ -SG isoform in the SR close to the dihydropyridine receptor suggests a possible role in calcium regulation.

Materials and methods

Animals. Experiments were carried out in male adult Balb C mice. All procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources of the United States as approved in México by the National Academy of Medicine (<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>).

Antibodies. The peptide corresponding to the specific δ -SG3 C-terminal end, residues 168–177 (EGFLNMQLAG), was synthesized in solution. It was purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column and its structure was ascertained by fast atom bombardment mass spectroscopy. The N terminus of the δ -SG3 C-terminal sequence was linked to a molecule of aminohexanoic acid ($\text{Ahx} = \text{NH}_2-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$), functioning as spacer arm, and the amine was substituted by a cysteine. Then, this synthetic peptide was conjugated by the N-terminal cysteine residue to the keyhole limpet hemocyanin (using Kit 77600 inject maleimide KLH, Pierce) using the protocol recommended by the manufacturer, then mixed with Freund's adjuvant (Sigma) and injected into rabbit. Polyclonal antibodies against the peptide present in the sera were characterized by Western blot using the KLH-conjugated δ -SG3 peptide as described previously [19]. The other antibodies used in this work were: C-terminal δ -SG (C15, polyclonal goat, Santa Cruz Biotechnology), dihydropyridine receptor (polyclonal goat, Santa Cruz Biotechnology). As secondary antibodies, we used Cy3-mouse anti-rabbit (Jackson), Cy3-goat anti-rabbit (Jackson), Cy3-donkey anti-goat (Jackson), and FITC-goat anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology).

Reverse transcription-polymerase chain reaction. Non-quantitative expression analysis of δ -SG1 and δ -SG3 transcripts was carried out by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from mice tissues. Total RNA from male adult mice tissues (brain, heart, skeletal muscle, lung, liver, retina, kidney, uterus, small intestine, and testis) as well as from C2C12 cells was extracted with TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's specifications. Reverse transcription reactions were performed with 2 μg of the total RNA using random primers. The obtained cDNA was used for the PCR amplification using a common forward primer and a specific reverse primer for each δ -SG isoform. GAPDH was amplified as positive control: δ -SG1 and δ -SG3, forward 5'-GAACAGTATTCCCACACAGGAG-3', δ -SG1 reverse 5'-TCTGCAGATGGCTTCCATATTGC-3'; δ -SG3 reverse 5'-ATGGTGTGTCACCCAGCCCAATTG-3'; GAPDH forward 5'-ATCCCATCACCACTCTCCAG-3'; GAPDH reverse 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. The conditions for PCR were: initial denaturation for 5 min at 94 °C followed by 32 cycles, each cycle consisting of denaturation 30 sec at 94 °C, alignment 30 sec at 60 °C, and extension 1 min at 72 °C; and a final extension during 7 min at 72 °C. PCR products were sequenced with Big Dye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) and ABI 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions.

Immunofluorescence. Gastrocnemius and femoral muscles from adult mice were dissected, frozen in liquid nitrogen-isopentane, and cut into 7 μm cryostat sections. Sections were blocked and permeabilized with 5% fetal bovine serum (FBS), 5% bovine serum albumin (BSA), 0.5% gelatin, and 0.5% Triton X-100 diluted in PBS for 1 h. Primary antibodies were diluted in 2.5% FBS, 2.5% BSA, 0.25% gelatin, and 0.5% Tween 20 in PBS, and tissues were incubated for 120 min. After incubation with primary antibody, sections were washed three times with 0.5% Tween 20 in PBS. Secondary antibody coupled to either carboxymethyl indocyanine-3 (Cy3) or fluorescein-isothiocyanate (FITC) was used diluted 1:250 in PBS, 3% NGS, 1% BSA, and 0.5% Tween 20. Then the sections were rinsed three times with PBS, 0.5% Tween 20 and finally they were mounted and cell nuclei were stained using Vectashield-DAPI (Vector Lab). The sections were examined with a fluorescence microscope (Axioplan 2 Imaging Zeiss) under conventional parameters and stacking optical sections to reconstruct 3D images (Apotome Zeiss System).

Cell culture. C2C12 cells were cultured in growing conditions in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO_2 . Once cell confluence was reached, differentiation was induced by substituting growing medium by differentiation DMEM supplemented with 1% horse serum.

Results

Structure of the novel isoform of delta-sarcoglycan

By screening of a mouse skeletal muscle cDNA library, we isolated cDNA clones of the δ -SG gene. The DNA sequence analysis of one of this clones showed a cDNA sequence with a different 3'-end than the reported one for δ -SG mRNA. To determine the origin of this new sequence, we aligned it with the complete mouse δ -SG gene sequence. The analysis showed us a new δ -SG transcript identical to the reported transcript (δ -SG1) (GenBank Accession No. [NM011891](#)) from exon 1 to exon 5, but with a portion of intron 5 added to the 3'-end sequence of exon 5 (Figs. 1A and C). The analysis of this new δ -SG cDNA sequence by a computer program (DNA MAN Lynnon BioSoft) predicted the translation of a shorter protein, in which the 122 amino acids at the carboxy end of the δ -SG1 isoform were replaced by 10 new amino acids (EGFLNMQLAG) and a stop codon at position 532 of

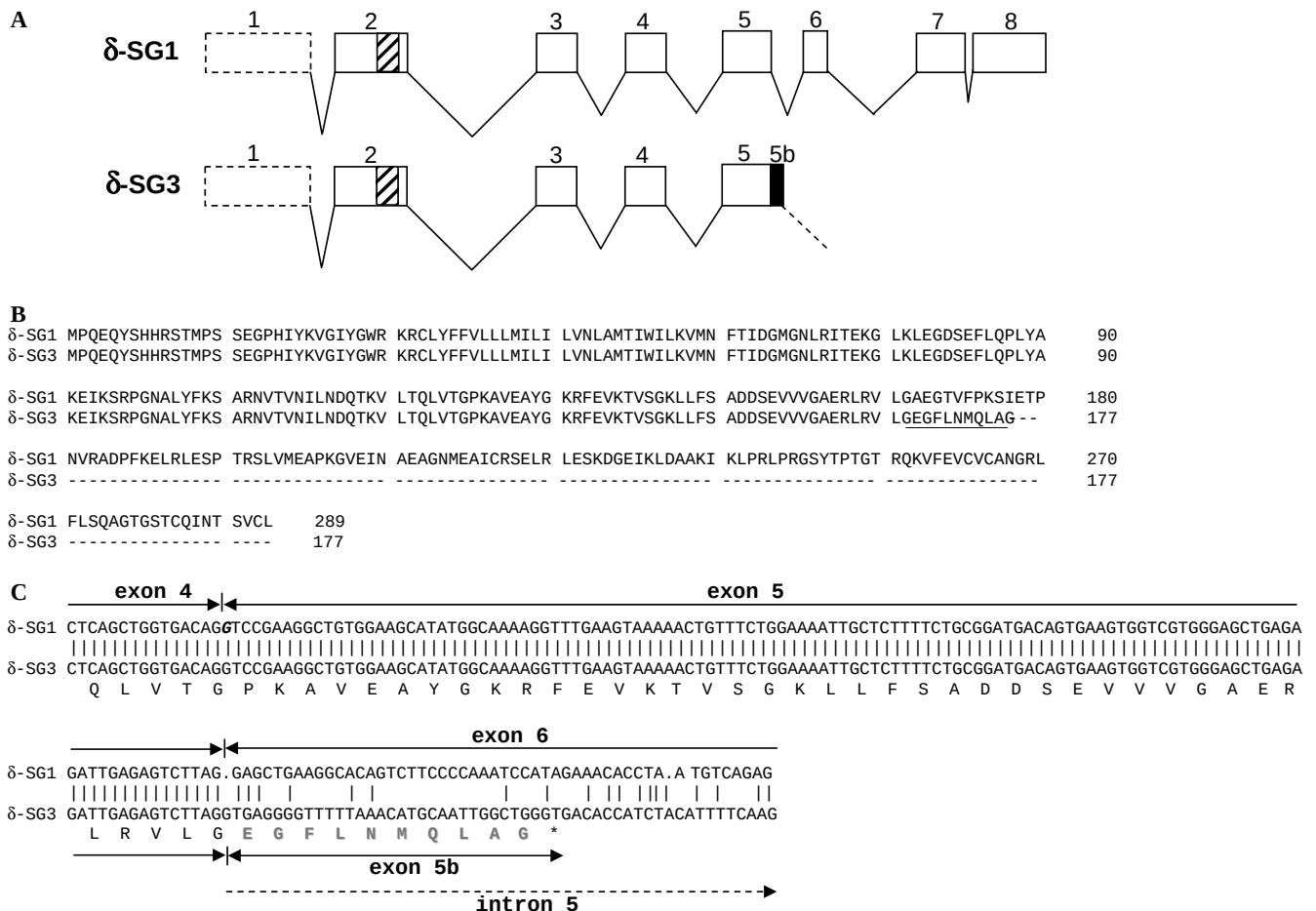


Fig. 1. Gene structure of mouse SGCD gene and comparison of δ -SG1 and δ -SG3 transcript and protein sequences. (A) Structure of the mouse SGCD gene. The different exons (boxes) of δ -SG1 and δ -SG3 are represented. The black box indicates alternative splicing for exon 5 (exon 5b) in δ -SG3 isoform. Striped box in exon 2 indicates the region encoding the transmembrane domain. Untranslated exon 1 is indicated with dotted box. (B) Alignment of amino acid sequences of δ -SG1 and δ -SG3. The open-reading frame of δ -SG1 encodes a polypeptide of 258 amino acids while δ -SG3 encodes a polypeptide of 177 amino acids. The new 10 amino acids at the carboxy end terminal of δ -SG3 are underlined. (C) Alignment of partial transcript sequence of δ -SG1 and δ -SG3 isoforms and predicted peptide sequence. Both isoforms share the same DNA sequence from exon 4 to exon 5, but in δ -SG3 this exon part of intron 5 is added by alternative splicing, exon 5b. The new 10 amino acids codified by this addition are shaded.

the coding sequence, codified by a portion of intron 5 (Fig. 1B). We named this new isoform δ -SG3. The δ -SD3 isoform inferred is composed of 177 amino acids, compared to the 289 amino acids of the full-length δ -SG1. It conserves the first two motifs of the three asparagine-linked N-glycosylation sites and lacks a portion of the C-terminal, that contains four cysteine residues that are a common feature of Cy3-mouse anti-rabbit (Jackson) of the sarcoglycans.

Expression profile of the δ -SG1 and δ -SG3 isoforms in different mouse tissues and cell lines

RT-PCRs were performed with total RNA from different mouse tissues to determine the mRNA expression of δ -SG3 (Fig. 2). As shown in Fig. 2A, both isoforms were detected in all tissues examined. The mRNA expression of both isoforms was most abundant in skeletal and cardiac muscle, where δ -SG1 and δ -SG3 show a similar expression level. In most other tissues, the δ -SG1 isoform is predomi-

nant, and in liver, small intestine, and brain, δ -SG3 is barely detectable. A middle expression was detected for both isoforms at lung and retina. To evaluate the differentiation-dependent expression of δ -SG3, we performed RT-PCR using total RNA from myoblasts and myotubes of the C2C12 cell line (data not shown). The expression of δ -SG3 was only evident in myotubes, suggesting a development-dependent regulation.

Localization of the δ -SG3 isoform in mouse skeletal muscle

To investigate the localization of the δ -SG3 isoform in mouse skeletal muscle, a specific rabbit polyclonal antibody was generated. The immunolabeling of mouse gastrocnemius cryostat longitudinal sections with this antiserum showed a striated pattern, resembling the sarcoplasmic reticulum structure (Figs. 3A, C and E). Furthermore, in skeletal muscle cross-sections a patched staining pattern was observed on the sarcolemma (Fig. 3F). Specific labeling was eliminated when the δ -SG3 isoform antiserum

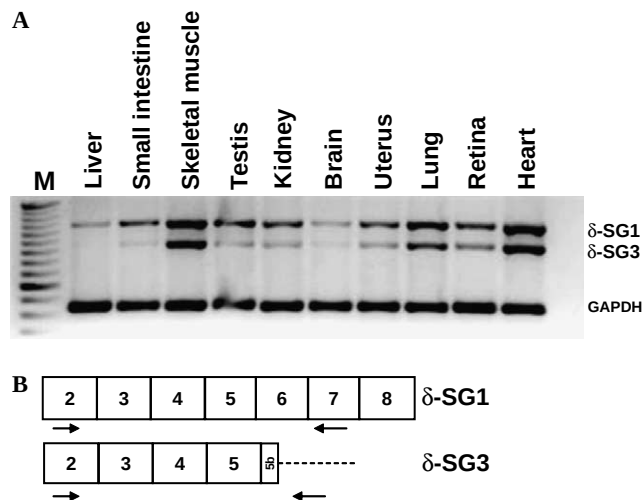


Fig. 2. Transcript expression of δ -SG isoforms 1 and 3 in different mouse tissues. (A) RT-PCR results separately using δ -SG1- and δ -SG3 specific primer pair. Note that all tissues show more expression of δ -SG1 than δ -SG3, except for skeletal muscle and heart where both isoforms showed similar expression level. RT-PCR for δ -SG1 and δ -SG3 produced products of 654 and 530 bp, respectively. GAPDH was amplified as positive control and produced a PCR product of 275 bp. Lane M, 50 bp ladder; (–), negative control. (B) Schematic representation of the exon (boxes) primer localization used for the specific RT-PCR of δ -SG1- and δ -SG3 transcripts. Forward primer was the same for both isoforms, reverse primer for δ -SG1 was located in exon 7, and reverse primer for δ -SG3 was located in a portion of exon 5b.

was preabsorbed with the 10-fold excess immunogenic peptide (Figs. 3B and D).

A previous report showed the presence of δ -SG in SR [14] similar to that observed by us in the case of δ -SG3. However, those authors used an anti- δ -SG antibody that recognizes the N-terminal of both isoforms. This fact makes it impossible to distinguish between δ -SG1 and δ -SG3. To assess this situation, we performed double-labeling with δ -SG3 antiserum and an antibody that recognizes the C-terminal of δ -SG1. While staining of δ -SG3 showed a scarce and irregular distribution along the sarcolemma (Figs. 4A and D), the δ -SG1 signal was more intense and with a regular distribution (Figs. 4B and E). In longitudinal sections, it was observed that the δ -SG isoforms are distributed in a similar striated pattern (Figs. 4D–F), suggesting that both δ -SG isoforms are localized in SR. Merge image revealed a close positioning, but no colocalization of δ -SG1 and δ -SG3 in pairs (Fig. 4F). This pattern was confirmed through the acquisition of 3D images (AxioVision, Carl Zeiss) (Figs. 4G and H). Interestingly, the δ -SG3 isoform seems to be more abundant in SR than δ -SG1 (Fig. 4H).

To explore the striated pattern of δ -SG3 in skeletal muscle more in detail, double-labeling experiments were carried out with antibodies against δ -SG3 and the DHPR (a transverse tubule marker). As observed in Figs. 5A–D, δ -SG3 and DHPR presented a similar distribution. A merged image shows that they do not colocalize (Fig. 5C). Nevertheless, 3D images of the same region, acquired with a

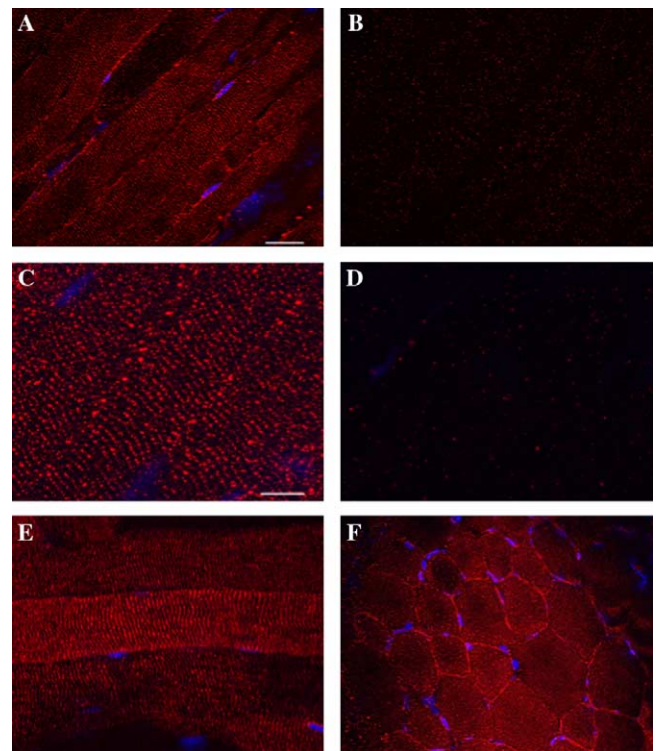


Fig. 3. Immunolocalization of δ -SG3 protein in mouse skeletal and cardiac muscle. Longitudinal (A–C, and E) and cross-sections (F) from mouse skeletal muscle; and were immunolabeled with rabbit serum anti- δ -SG3. The longitudinal sections staining (A–C) shows a striated pattern. Note there is also a faint staining at the sarcolemma (A,C). The sarcolemma staining shows a punctate pattern in cross-sections (C). Immunolabeling of longitudinal sections with the antiserum preabsorbed with the synthetic peptide used to immunize the rabbit did not show staining (B,C).

higher magnification (AxioVision, Carl Zeiss), showed that δ -SG3 is located in SR, next to the DHPR (Fig. 5D).

Discussion

In the present study, we identified a novel isoform of δ -SG (δ -SG3) expressed in mouse skeletal and cardiac muscle. The δ -SG3 isoform is produced by an alternative splicing that unprocessed part of intron 5 in the 3'-end sequence of exon 5. The predicted peptide sequence of the new isoform conserves the N-terminal, the transmembranal domain, misses the last 122 amino acids of the C-terminal, and has instead 10 new amino acids. The loss of the amino acids at the C-terminal causes the elimination of one N-glycosylation site and the four cysteine residues. Holt and Campbell [20] have shown that glycosylation and a proper folding of the sarcoglycans is important for the assembly of the sarcoglycan complex. Therefore, the absence of one N-glycosylation site in the δ -SG3 isoform could modify its folding properties and its capabilities to interact with other members of the SG-SSPN complex. On the other hand, it has been suggested that the cysteine residues at the carboxy end of β -, γ -, and δ -SG may function as receptors for some

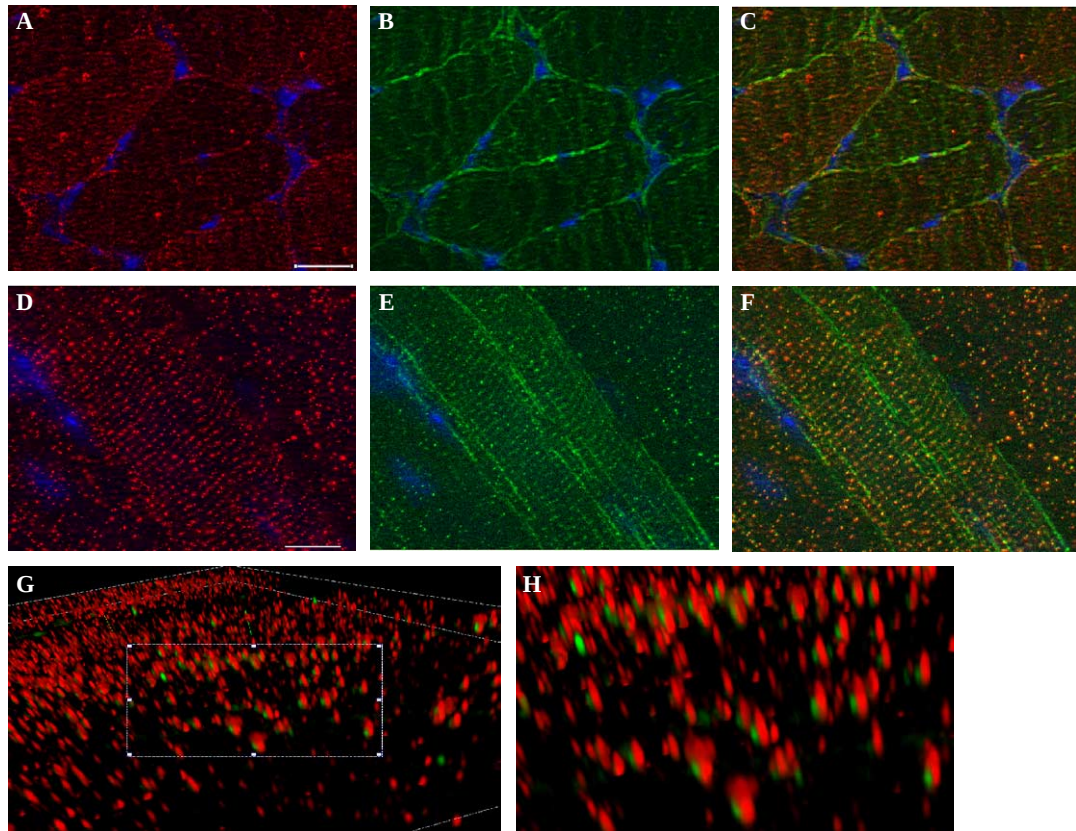


Fig. 4. Double immunofluorescence analysis for δ -SG3 and δ -SG1. Transversal (A–C) and longitudinal (D–G) cryosections of mouse skeletal muscle were double labeled with antibodies against δ -SG3 and δ -SG1. Panels show images obtained for δ -SG3 (A,D), δ -SG1 (B,E), and merge δ -SG3/ δ -SG1 (C,F). 3D images in two magnifications of the merge longitudinal section staining (G,H) show the nearness of both isoforms, and that δ -SG1 is always accompanied by δ -SG3.

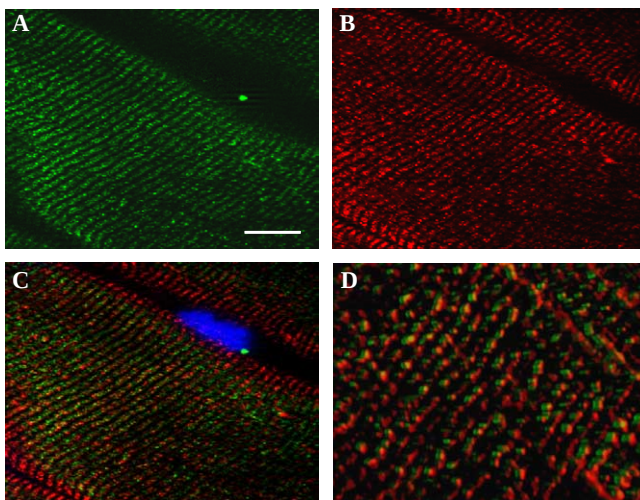


Fig. 5. Double immunofluorescence analysis for δ -SG3 and DHPR. Longitudinal cryosections of mouse skeletal muscle were double labeled with antibodies against δ -SG3 and DHPR. Panels show images obtained for DHPR (A), δ -SG3 (B), and merge DHPR/ δ -SG3 (C). A higher magnification of the merge image (D) shows that δ -SG3 is always accompanied by DHPR.

unknown ligands [13,21]. Consequently, the elimination of these residues in the δ -SG3 isoform could modify its capacity of interaction with other proteins.

Previously, Ueda et al. [14] demonstrated that the expression of δ - and γ -SGs in the SR of skeletal muscle is independent of dystrophin and the rest of the sarcoglycans. In concert with our results, this suggests that the lack of the δ -SG1-C-terminal in δ -SG3 could confer to the protein the capacity to form an alternative complex, at least in skeletal muscle. We also suggest that in this tissue the association of the δ -SG isoforms with β -SG is not required for the maturation of the complex with γ -SG. This is opposite to what Shi et al. [22] reported. They demonstrated that the assembly pathway of the sarcoglycans depends on β - and δ -SG. Thus, it will be interesting to explore the biochemical interactions of δ -SG3 with the other components of the DAGC and to compare the complexes formed with those formed by δ -SG1.

Immunofluorescence images of longitudinal mouse skeletal muscle cryosections revealed that δ -SG3 is mostly expressed in a striated pattern excluded from the sarcolemma, in clear contrast with δ -SG1 that is detected along the muscle membrane. A similar localization of δ -SG has been observed by Ueda et al. [14] using a pan-specific antibody. By confocal and electronic microscopy they demonstrated that δ -SG is located at the central portion of the I bands, in the terminal cisternae of the SR. Our double immunofluorescence assays with an

antiserum against δ -SG3 and a polyclonal antibody against the carboxy terminus of δ -SG1 suggest that both, δ -SG3 and δ -SG1, are located at the SR. Besides, double immunofluorescence with anti- δ -SG3 and anti-DHPR antibodies showed that δ -SG3 localizes very close to the DHPR. As is well known, contraction is initiated by the depolarization of the T-tubular membrane, where the DHPR act as voltage sensors. This in turn causes Ca^{2+} to be released by the ryanodine receptor (RyR) Ca^{2+} channels of the SR [23–25]. Recently, Iwata et al. [26] demonstrated that the damage to skeletal muscle in BIO14.6 hamsters that lack δ -SG is due mainly to the deregulation of the intracellular Ca^{2+} homeostasis that can be significantly prevented by Ca^{2+} handling drugs. Besides, Ueyama et al. [27] reported that the BIO14.6 hamster has an abnormal RyR expression in the cardiac muscle, suggesting abnormal calcium regulation caused by δ -sarcoglycan deficiency. Taking in account all this results, we consider a possible role of δ -SG3 in muscle contraction and/or in Ca^{2+} regulation mechanisms. Our hypothesis points towards a structural role related to the correct localization and maintenance of the proteins that participate in the regulation of the calcium concentration during the contraction–relaxation cycles at the terminal cisternae of the SR and very likely through an interaction with the Ca^{2+} channels. Further studies will be necessary to clarify this issue, localizing δ -SG3 more accurately, specifically at the triad junction, where it seems to form a complex with a different composition than in sarcolemma.

Acknowledgment

F. J. Estrada was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) Register Number 165401.

References

- [1] C. Angelini, Advances and perspectives in muscular dystrophies, *Basic. Appl. Myol.* 12 (2002) 17–25.
- [2] R.M. Coral-Vazquez, R.D. Cohn, S.A. Moore, J.A. Hill, R.M. Weiss, R.L. Davisson, V. Straub, R. Barresi, D. Bansal, R.F. Hrstka, R. Williamson, K.P. Campbell, Disruption of the sarcoglycan–sarcolemma complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy, *Cell* 98 (1999) 465–474.
- [3] R.H. Crosbie, J. Heighway, D.P. Venzke, J.C. Lee, K.P. Campbell, Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin–glycoprotein complex, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31221–31224.
- [4] V. Straub, K.P. Campbell, Muscular dystrophies and the dystrophin–glycoprotein complex, *Curr. Opin. Neurol.* 2 (1997) 168–175.
- [5] F. Sciandra, M. Bozzi, M. Bianchi, E. Pavoni, B. Giardina, A. Brancaccio, Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin–glycoprotein complex, *Ann. Ist. Super. Sanita* 39 (2003) 173–181.
- [6] A.A. Hack, M.E. Groh, E.M. McNally, Sarcoglycans in muscular dystrophy, *Microsc. Res. Tech.* 48 (2000) 167–180.
- [7] A.J. Ettinger, G. Feng, J.R. Sanes, Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32534–32538.
- [8] E.M. McNally, C.T. Ly, L.M. Kunkel, Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene, *FEBS Lett.* 422 (1998) 27–32.
- [9] V. Straub, A.J. Ettinger, M. Durbeej, D.P. Venzke, S. Cutshall, J.R. Sanes, K.P. Campbell, ϵ -Sarcoglycan replaces α -sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin–glycoprotein complex, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27989–27996.
- [10] A. Zimprich, M. Grabowski, F. Asmus, M. Naumann, D. Berg, M. Bertram, K. Scheidtmann, P. Kern, J. Winkelmann, B. Muller-Myhsok, et al., Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome, *Nat. Genet.* 29 (2001) 66–69.
- [11] M.T. Wheeler, S. Zarnegar, E.M. McNally, ζ -Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2147–2154.
- [12] G. Anastasi, G. Cutroneo, A. Sidoti, G. Santoro, R. D’Angelo, G. Rizzo, C. Rinaldi, O. Giacobbe, P. Bramanti, G. Navarra, A. Amato, A. Favalaro, Sarcoglycan subcomplex in normal human smooth muscle: an immunohistochemical and molecular study, *Int. J. Mol. Med.* 16 (2005) 367–374.
- [13] Y.M. Chan, C.G. Bonnemann, H.G.W. Lidov, L.M. Kunkel, Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 2033–2044.
- [14] H. Ueda, K. Ueda, T. Baba, S. Ohno, δ - and γ -Sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 529–537.
- [15] V. Nigro, G. Piluso, A. Belsito, L. Politano, A.A. Puca, S. Papparella, E. Rossi, G. Viglietto, M.G. Esposito, C. Abbondanza, N. Medici, A.M. Molinari, G. Nigro, G.A. Puca, Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1179–1186.
- [16] D. Jung, F. Duclos, B. Apostol, V. Straub, J.C. Lee, V. Allamand, D.P. Venzke, Y. Sunada, C.R. Moomaw, C.J. Leveille, C.A. Slaughter, T.O. Crawford, J.D. McPherson, K.P. Campbell, Characterization of δ -sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 32321–32329.
- [17] Leiden Muscular Dystrophy pages. Available from: <<http://www.dmd.nl/>>.
- [18] A. Sakamoto, M. Abe, T. Masaka, Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster, *FEBS Lett.* 447 (1999) 124–128.
- [19] F. Rivier, A. Robert, M. Royuela, G. Hugon, A. Bonet-Kerrache, D. Mornet, Utrophin and dystrophin-associated glycoproteins in normal and dystrophin deficient cardiac muscle, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 20 (1999) 305–314.
- [20] K.H. Holt, K.P. Campbell, Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 34667–34670.
- [21] E.M. McNally, D. Duggan, J.R. Gorospe, C.G. Bonnemann, M. Fanin, E. Pegorato, H.G. Lidov, S. Noguchi, E. Ozawa, R.S. Finkel, R.P. Cruse, C. Angelini, L.M. Kunkel, E.P. Hoffman, Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1841–1847.
- [22] W. Shi, Z. Chen, J. Schottenfeld, R.C. Stahl, L.M. Kunkel, Y.-M. Chan, Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan, *Muscle Nerve* 29 (2004) 409–419.
- [23] S. Mänttärä, M. Järvillehto, Comparative analysis of mouse skeletal muscle fibre type composition and contractile responses to calcium channel blocker, *BMC Physiol.* 5 (2005) 4.
- [24] K.G. Beam, T. Tanabe, S. Numa, Structure, function and regulation of skeletal muscle dihydropyridine receptor, *Ann. NY Acad. Sci.* 560 (1989) 127–137.
- [25] S. Mänttärä, Dihydropyridine receptors in skeletal muscle with comparative reference to muscle development and exercise in mouse and salmon, Oulu University Press (2005) PDF at <<http://herkules.oulu.fi/isbn9514277201/>>.

- [26] Y. Iwata, Y. Katanosaka, Z. Shijun, Y. Kobayashi, H. Hanada, M. Shigekawa, S. Wakabayashi, Protective effect of Ca^{2+} handling drugs against abnormal Ca^{2+} homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 740–751.
- [27] T. Ueyama, T. Ohkusa, Y. Hisamatsu, Y. Nakamura, T. Yamamoto, M. Yano, M. Maatsuzaki, Alterations in cardiac SR Ca^{2+} -release channels during development of heart-failure in cardiomyopathic hamsters, *Am. J. Physiol.* 274 (1998) 1–7.