

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

***“EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A
UTROFINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES SOMETIDAS A ESTIRAMIENTO:
ACTIVACIÓN Y LIBERACIÓN DE eNOS”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. ISRAEL RAMÍREZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAMÓN CORAL VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2008



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.

“Quien es autentico, asume la responsabilidad de ser lo que es y se reconoce libre. El hombre nace libre, responsable y sin excusas. El hombre se presenta como una elección por realizar y al querer la libertad descubrimos que depende enteramente de la libertad de otros y la libertad de los otros depende de la nuestra. El hombre no es otra cosa que su proyecto y sólo existe en a medida en que se realiza. El hombre no puede hacer nada, mientras no se pueda comprender debidamente a sí mismo. El hombre sueña y soñar, en teoría, es vivir un poco, pero vivir soñando es no existir”
Jean Paul Sastre.

“El individuo ha luchado siempre para no ser absorbido por la tribu. Si lo intentas a menudo estarás solo y a veces asustado pero ningún precio es demasiado alto por el privilegio de ser uno mismo”
Friedrich Wilhem Nietzsche.

“La desvalorización del mundo humano crece en razón directa de la valorización del mundo de las cosas”
“La manera como se presentan las cosas no es la manera como son; y si las cosas fueran como se presentan la ciencia entera sobraría”
Karl Marx.

“Cualquiera puede enfadarse eso es algo muy sencillo. Pero enfadarse con la persona adecuada en el grado exacto, en el momento oportuno, con el propósito justo y del modo correcto, eso ciertamente no resulta tan sencillo”
Aristóteles.

“Es mas frecuente que la confianza sea generada por la ignorancia que por el conocimiento: son los que conocen poco y no los que conocen mucho, los que afirman positivamente que este o aquel problema nunca será solucionado por la ciencia”
Charles Darwin.

“No podemos resolver problemas pensando de la misma manera que cuando los creamos”
Albert Einstein

“A toda acción corresponde una reacción, del mismo valor y de sentido contrario. A toda causa corresponde un efecto y a todo efecto una causa”
Isaac Newton.

APOYOS

Este proyecto fue apoyado por el Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social con el numero de proyecto IMSS-FOFOI-FP-2002-024, así como por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el numero proyecto 46187/A-1 y el 39542, por la Asociación Francesa Contra las Miopatías con el numero MNM12005, así como también por la Secretaria de Investigación y Posgrado del Instituto Politécnico Nacional con el numero de proyecto SIP-IPN 2007 0820.

Durante el desarrollo de este trabajo el estudiante fue becario de tiempo completo del CONACYT con el numero de registro 144593, así como del Instituto Mexicano del Seguro Social con el numero de matricula 99090450.

Así mismo, el estudiante fue becario parcial de Investigador Nivel III del Sistema Nacional de Investigadores y de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (ENCB-IPN) por medio del proyecto ENCB-IPN-Comunidad Europea IC4-CT-2001-10087.

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio Multidisciplinario de Bioquímica de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio de Genética Molecular de la unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, bajo la tutoría principal del Dr. Ramón Coral Vázquez y la co-tutoría del Dr. Guillermo Ceballos Reyes y del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Coral Vázquez por dirigir de este trabajo, cuando a mi me parecía sin rumbo. Por todo su apoyo y estímulo para la buena culminación del mismo, así como por todas las enseñanzas, que sin duda contribuyeron de manera importante en mi desarrollo académico y personal desde que llegué a su laboratorio como un estudiante de licenciatura

Al Dr. Guillermo Ceballos Reyes por la co-dirección de esta tesis, por abrirme las puertas de su laboratorio que con el transcurso del tiempo se convertiría en mi “casa” y por brindarme todas las bondades del Instituto Politécnico Nacional.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por todas las aportaciones para llevar a buen término este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio, que con el transcurrir de los interminables días de trabajo se convirtieron en entrañables amigos y que como yo han dejado parte de su vida *embarrada* en la mesa del laboratorio y que comprendieron la importancia de la labor de hacer investigación. Lamento no nombrarlos a todos y cada uno de ustedes, la lista sería interminable.

No busco ningún reconocimiento, solo pretendo un cambio en mi entorno.

A todo aquel que crea que se lo merece.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	9
TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	12
RELACIÓN DE FIGURAS	13
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
CAPITULO 1	
INTRODUCCIÓN	
1.1 EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA/UTROFNA	16
1.2 CARACTERÍSTICAS Y DISTRIBUCIÓN CELULAR Y TISULAR DEL DAPC/UAPC	19
1.2.1 PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS Y PERIFÉRICAS A LA MEMBRANA	19
1.2.2 EL COMPLEJO DISTROGLICANO	22
1.2.3 COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPÁN	24
CAPITULO 2	
2.1 PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON EL DAPC/UAPC	25
2.1.1 DISTROFINA	25

2.1.2 SINTASAS DE OXIDO NÍTRICO	27
2.1.3 COMPLEJO DISTROGLICANO	29
2.1.4 COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPÁN	30
CAPITULO 3.	
3.1 ESTUDIO DEL DAPC/UAPC EN ENDOTELIO VASCULAR	35
CAPITULO 4.	
4.1 EL ENDOTELIO VASCULAR Y SUS FUNCIONES	36
4.2 EL ENDOTELIO Y SUS ESTÍMULOS MECÁNICOS	37
CAPITULO 5	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
CAPITULO 6	
HIPÓTESIS	40
CAPITULO 7	
OBJETIVOS	41
CAPITULO 8	
METODOLOGÍA	
8.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS	42
8.2 MATERIAL BIOLÓGICO	42

8.3 CULTIVOS CELULARES	43
8.4 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	44
8.5 CITOMETRÍA DE FLUJO	45
8.6 APLICACIÓN DE LA FUERZA MECÁNICA A LAS CÉLULAS EN CULTIVO	46
8.7 EVALUACIÓN DE LOS TRANSCRITOS POR RT-PCR	49
8.8 ENSAYOS DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	51
8.9 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN	52
8.10 CUANTIFICACIÓN DE OXIDO NÍTRICO	53
CAPITULO 9	
RESULTADOS	
9.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS HUVEC	55
9.2 UTROFINA SG- ϵ , DG- β , CAV-1 Y eNOS COMPONEN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A UTROFINA DE HUVEC	59
9.3 EXPRESION DE ALGUNOS TRANSCRITOS DEL UAPC EN HUVEC	62
9.4 EL ESTIRAMIENTO SOBRE LAS HUVEC INDUCE UN INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL UAPC	65
9.5 COMPOSICIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEINAS ASOCIADAS A UTROFINA EN HUVEC SOMETIDAS A ESTIMULO MECÁNICO	67
9.6 ACTIVACIÓN Y LIBERACIÓN DE eNOS DEL UAPC DE HUVEC SOMETIDAS A ESTIRAMIENTO	69

CAPITULO 10	
DISCUSIÓN	73
CAPITULO 11	
CONCLUSIONES	78
CAPITULO 12	
PERSPECTIVAS	80
CAPITULO 13	
REFERENCIAS	83
CAPITULO 14	
ANEXO	96

ABREVIATURAS.

BD	bradicinina
BSA	albúmina serica de bovino
CAV-1	caveolina-1
CAV-3	caveolina-3
CD	cluster of differentiation
CDG	complejo distroglicano
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
CMD	cardiomiopatía dilatada
CMDLX	cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X
Co-IP	co-inmunoprecipitación
CSG-SSPN	complejo sarcoglicano-sarcospán
DAB	diamino bencidina
DAPC	complejo de proteínas asociadas a distrofina
DG- β	distroglicano beta
DMB	distrofia muscular de Becker
DMD	distrofia muscular de Duchenne
dNTPs	dinucleótidos trifosfato
E	extractos de proteína total
eNOS	sintasa de óxido nítrico endotelial
eNOS ^p	sintasa de óxido nítrico endotelial fosforilada
FAK	cinasa de adhesión focal

FITC	isotiocianato de fluoresceína
FKRP	proteína relacionada a fukutina
GAPDH	gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
hr	horas
HUVEC	células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
IP	inmunoprecipitación
kDa	kilodaltones
LGMD	distrofia muscular de cintura
MDC	distrofia muscular congénita
μg	microgramos
min	minutos
ml	mililitros
μl	microlitros
N/cm ²	Newtons/centímetro cuadrado
nNOS	sintasa de óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NS	no estiradas
pb	pares de bases
PBS	amortiguador de sales de fosfatos
PIN	proteína inhibidora de la sintasa de óxido nítrico
pmol	picomol
RNA	ácido ribonucleico
r.p.m.	revoluciones por minuto

RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
S	estiradas
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SG	sarcoglicano
SG-ε	sarcoglicano epsilon
Sn	sobrenadante
SSPN	sarcospán
UAPC	complejo de proteínas asociadas a utrofina
x.g.	gravedad

TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

GEN	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO	TAMAÑO ESPERADO
SG-β	sentido 5'-ATGCGTGAGAGAGCTGTTGA-3' antisentido 5'-TTTGGTCCAATGCGAATCAC-3'	203 pb
SG-δ	sentido 5'-ACACCTAATGTCAGGGCAGAC-3' antisentido 5'-TCTGTCCTTCTCATCCCTCA C-3'	221 pb
SG-ε	sentido 5'-TCCACCTTACCCAAAACCTG-3' antisentido 5'-AACGGGAAGTCTTCTGCAGA-3'	261 pb
SSPN	sentido 5'-CTAGTCAGGGACACTCCATT-3' antisentido 5'-GGCACTCAGCAGAAAGTATAA-3'	147 pb
Enos	sentido 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3' antisentido 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'	175 pb
GAPDH	Sentido 5'-ATCCCATCCCATCTTCCAG-3' antisentido 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'	317 pb

RELACIÓN DE FIGURAS.

Figura 1. Complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina (DAPC/UAPC).

Figura 2. Organización molecular de las proteínas distrofina y utrofina.

Figura 3. Organización molecular de los distroglicanos.

Figura 4. Cardiopatía dilatada y vasoconstricciones coronarias en el ratón carente de SG- δ

Figura 5. Sistema de estiramiento equibiaxial.

Figura 6. Calculo de la fuerza aplicada en el sistema de estiramiento equibiaxial.

Figura 7. Cultivos celulares primarios.

Figura 8. Caracterización de los cultivos celulares primarios.

Figura 9. Caracterización de los cultivos celulares primarios.

Figura 10. Composición del UAPC endotelial.

Figura 11. Expresión de los transcritos del CSG-SSPN en HUVEC.

Figura 12. Expresión del transcrito de eNOS en HUVEC.

Figura 13. Expresión de las proteínas del UAPC en HUVEC sometidas a estímulo mecánico.

Figura 14. Composición del UAPC en HUVEC sometidas a estímulo mecánico.

Figura 15. Activación y liberación de la eNOS del UAPC de HUVEC sometidas a estímulo mecánico.

Figura 16. Producción de óxido nítrico en HUVEC bajo diferentes estímulos.

Figura 17. Conclusiones.

Figura 18. Perspectivas.

RESUMEN.

En un estudio previo propusimos la presencia, en el endotelio de los vasos del cordón umbilical humano, de un complejo de proteínas asociadas a utrofina (UAPC) análogo al complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) que se encuentra en músculo estriado y liso. En vista de la importancia que este grupo de proteínas tiene en el funcionamiento vascular y en el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada en algunos tipos de distrofia muscular. Por lo mismo, en el presente estudio nos enfocamos a caracterizar más detalladamente estos complejos. Con los resultados obtenidos demostramos, por ensayos de co-inmunoprecipitación, que la utrofina (UTR) se asocia con beta distroglicano (β -DG), epsilon sarcoglicano (ϵ -SG), caveolina-1 (cav-1) y la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) en las células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano (HUVEC). Asimismo, los análisis de Western blot semi-cuantitativo demostraron un incremento en los niveles de las proteínas ϵ -SG, β -DG, UTR y CAV-1 después de la aplicación del estímulo de estiramiento mecánico a las HUVEC. Este estímulo también propició el aumento de la eNOS, así como su activación y liberación del UAPC conduciendo a un incremento significativo en la producción de óxido nítrico (NO). A partir de estos datos se propone que el UAPC endotelial podría tener una función relevante en la regulación del tono vascular.

ABSTRACT

Previously we postulated the presence of an utrophin associated protein complex (UAPC) in endothelium from human umbilical cord vessels, like the dystrophin-associated protein complex (DAPC) found in striated and smooth muscle. Several studies have emphasized the relevance of DAPC to maintain the vascular function. In the present work, we demonstrate that utrophin (UTR) indeed forms a complex, with beta-dystroglycan (DG), epsilon-sarcoglycan (SG), caveolin-1 (cav-1), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by co-immunoprecipitation analysis.

Additionally, we observed an increment in the protein levels of epsilon-SG, beta-DG, UTR and cav-1 after mechanical stretching. Interestingly, this stimulus also induced eNOS up-regulation, activation and release from the UAPC, and led to a significant increase in nitric oxide (NO) production. Finally, we propose that UAPC in HUVECs may play an important role in the regulation of vascular tone.

CAPITULO 1.

INTRODUCCIÓN

1.1 EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA/UTROFINA

El complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) esta conformado por la interacción de múltiples proteínas que se asocian estrechamente con la distrofina, que es la proteína central y de donde el complejo adquiere su nombre. El complejo sarcoglicano-sarcospán (CSG-SSPN) y el complejo distroglicano (CDG) son componentes esenciales del DAPC; adicionalmente se asocian otras proteínas como las sintrofinas, las distrobrevinas; y eventualmente se asocian en el músculo estriado un diverso grupo de moléculas de señalización como la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), la calmodulina y la caveolina-3 (Cav-3) (1) (Figura 1).

El DAPC fue originalmente descrito en el músculo estriado; sin embargo recientemente se ha puesto de manifiesto su presencia en otros tipos celulares como músculos lisos vasculares y no vasculares, y tejidos no musculares (2).

El DAPC se encuentra unido por la parte externa de la célula a diversas proteínas de la matriz extracelular como laminina, agrina y perlecano entre otras, mientras que por su parte intracelular se une a los filamentos de actina del citoesqueleto (3).

Es así que, a través de su interacción con la matriz extracelular y el citoesqueleto, se ha propuesto que el DAPC proporciona una unión mecanosensitiva entre el medio extracelular y el intracelular, proporcionando así estabilidad a la célula durante procesos de estrés mecánico (4).

La proteína utrofina que es homólogo autosómico de la distrofina, se asocia con la mayoría de las proteínas que conforman el DAPC excepto con la propia distrofina,

formando de esta manera un complejo independiente de distrofina conocido como complejo de proteínas asociadas a utrofina (UAPC) (5).

Adicionalmente, la interacción del DAPC/UAPC con el medio intra y extracelular, es importante para el establecimiento de la transducción bioquímica de señales al interior celular.

Gran parte de la importancia de este grupo de proteínas radica en que la disrupción del DAPC, como resultado de la deficiencia en alguno de sus componentes, desestabiliza el puente de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, promoviendo de esta forma la degeneración muscular. Esto es lo que ocurre en las diversas distrofias musculares que frecuentemente se relacionan con la aparición de cardiomiopatía (CDM) (6).

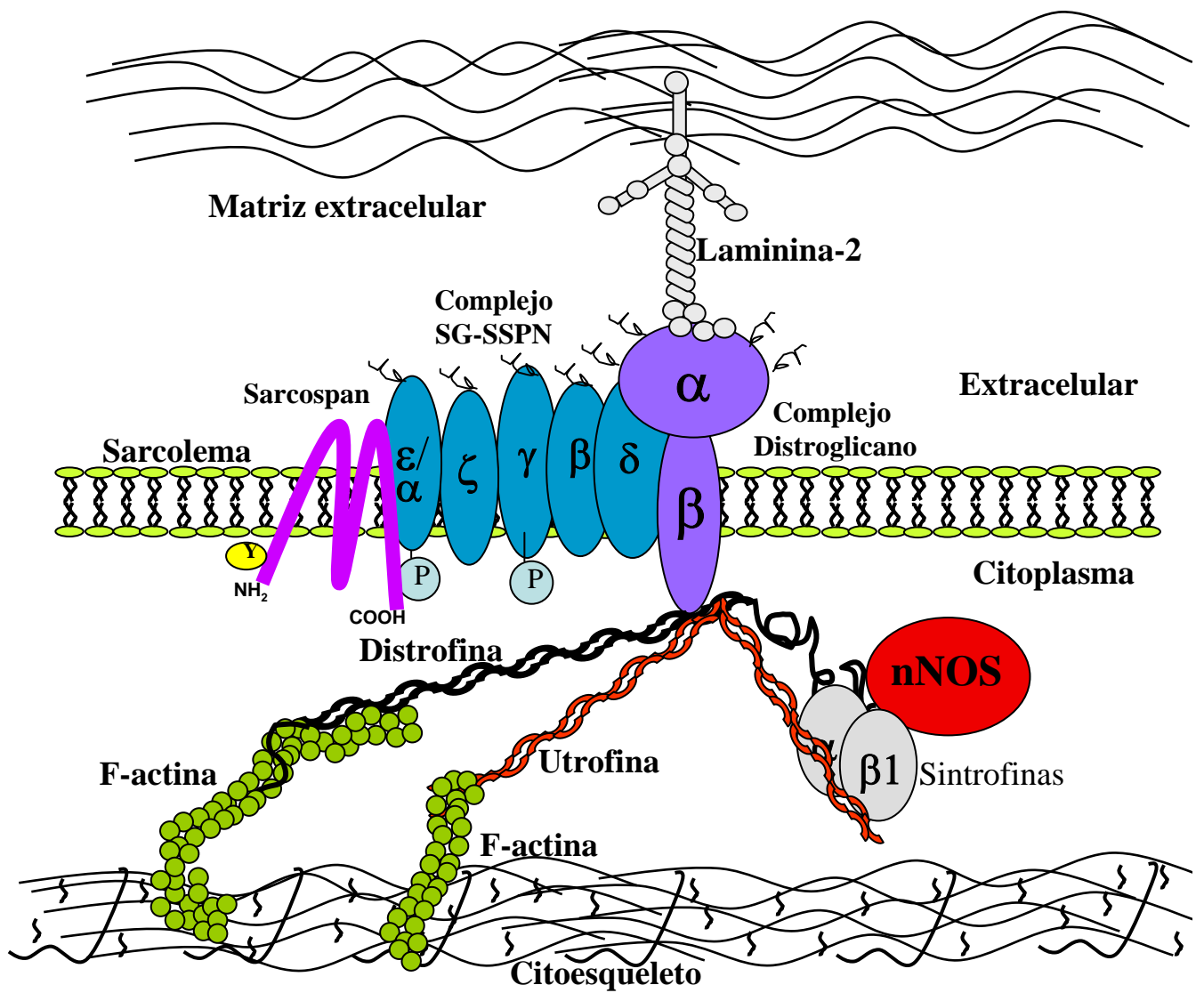


Figura 1. Complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina (DAPC/UAPC). Organización del DAPC/UAPC en el cual se pueden identificar algunos subcomplejos como el complejo distroglicano y el complejo sarcoglicano-sarcospán, así mismo se localizan algunas moléculas de señalización como las sintrofinas y la nNOS.

1.2 CARACTERÍSTICAS Y DISTRIBUCIÓN CELULAR Y TISULAR DEL DAPC/UAPC

El DAPC/UAPC puede dividirse de manera general en al menos tres subgrupos de proteínas de acuerdo a su ubicación celular.

1.2.1 PROTEÍNAS CITOPLASMÁTICAS Y PERIFÉRICAS A LA MEMBRANA

El primero de estos subgrupos es un componente citoplasmático que consiste de una serie de proteínas periféricas a la membrana celular.

La distrofina y la utrofina, con un peso molecular de 427 y 397 kDa respectivamente, son proteínas muy similares, ambas poseen cuatro diferentes regiones: la región amino terminal con homología a alfa actinina, la cual se encuentra unida a los filamentos de actina del citoesqueleto (Figura 2). Una de las diferencias existentes entre la distrofina y la utrofina radica en que la región amino terminal de la utrofina es más corta con respecto a la de la distrofina y sin embargo a pesar de este pequeño acortamiento, la utrofina puede unirse a los filamentos de actina del citoesqueleto. Adicionalmente, ambas cuentan con una región central en forma de varilla que se compone de repetidos similares a espectrina; una región adyacente rica en cisteínas y finalmente la región carboxilo terminal (7).

La región carboxilo terminal y la región rica en cisteínas contienen varios sitios de unión a proteínas. El carboxilo terminal incluye un dominio altamente conservado de residuos de triptofano conocido como dominio WW, un dominio putativo de unión a calcio y un pequeño dominio rico en cisteínas conocido como hand-EF, además de un dominio similar a un dedo de zinc (8).

La distrofina tiene un patrón de expresión que no se restringe a músculo estriado, ya que recientemente se le ha detectado en músculos lisos y tejidos no musculares como sistema nervioso.

La utrofina tiene una distribución más ubicua, de tal manera que además de encontrarse en músculo estriado, predominantemente en la unión neuromuscular, también se encuentra en músculo liso y en tejidos no musculares como el endotelio y sistema nervioso (9).

Proteínas adicionales que también se encuentran en la región citoplasmática de las células musculares son las sintrofinas alfa 1, beta 1 y beta 2, las tres con un peso molecular de 58 kDa. Las sintrofinas se expresan en el músculo estriado, encontrándose la sintrofina alfa 1 mayoritariamente concentrada en las uniones neuromusculares, similar a lo que se observa con la distribución de utrofina. Adicionalmente, las tres sintrofinas se expresan en músculo liso así como en una gran variedad de tejidos no musculares (10).

Localizada también en la región citoplasmática de las células musculares se encuentra la enzima sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) la cual se encarga de modular vías de señalización a partir de la producción del segundo mensajero óxido nítrico (1). Se piensa que esta proteína se une al DAPC/UAPC mediante la interacción de su dominio homodimérico PDZ y el dominio PDZ de la proteína alfa 1 sintrofina (11).

Por otro lado, se piensa que la interacción entre la nNOS y el DAPC/UAPC en el músculo estriado puede estar dada por la proteína caveolina-3 que se ha observado que puede formar parte de DAPC/UAPC alternativos (12).

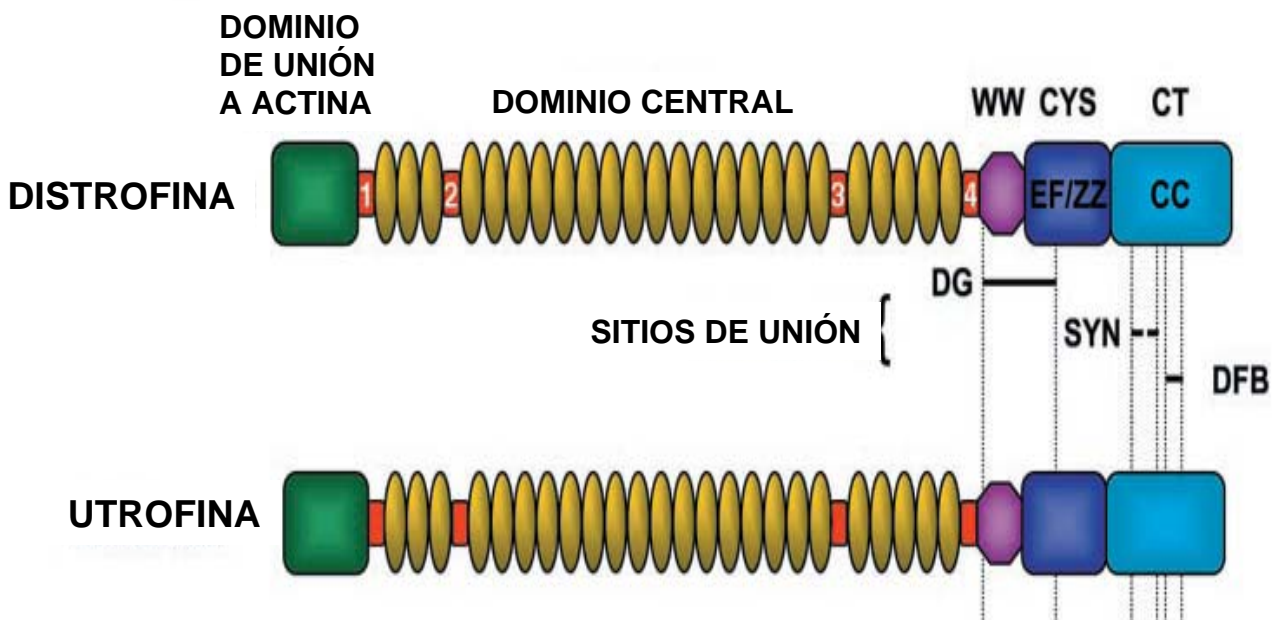


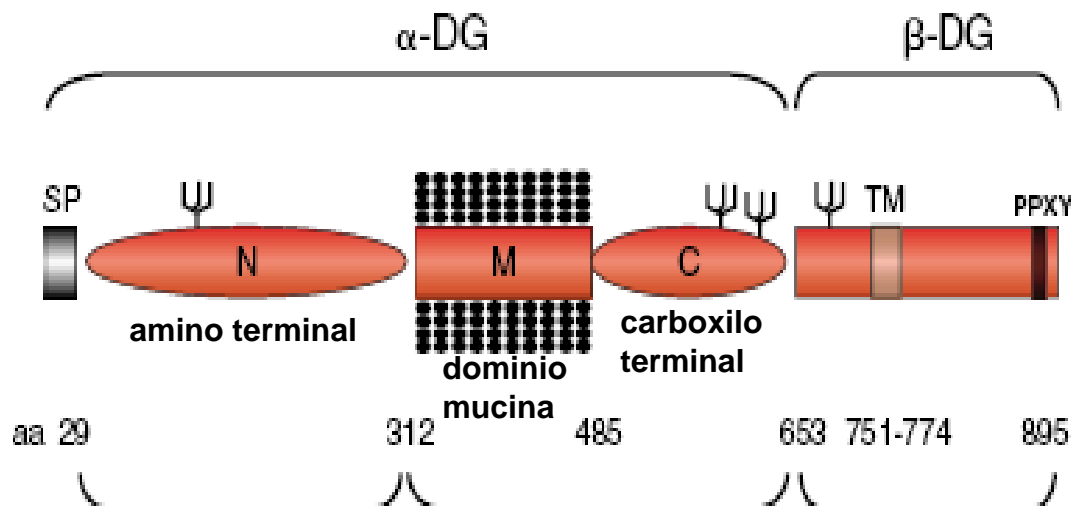
Figura 2. El esquema representa la organización molecular de las proteínas distrofina y utrofina, se muestran algunos de sus dominios mas relevantes.

1.2.2 EL COMPLEJO DISTROGLICANO (CDG).

El complejo distroglicano esta codificado por un solo gen, el cual genera una proteína precursora de aproximadamente 115 KDa, que es posteriormente procesada por un corte proteolítico el cual genera dos péptidos, uno de 72 KDa y otro de 43 KDa (Figura 3). El producto de 72 KDa corresponde al distroglicano- α el cual se modifica de manera postraduccional incorporándose en él una gran cantidad de carbohidratos hasta alcanzar un peso de 156 KDa para el caso del músculo esquelético y 140 KDa para el caso del músculo cardíaco (13). El péptido resultante de 43 KDa corresponde al distroglicano- β que es una proteína transmembranal que se une en su porción citoplasmática a la distrofina/utrofina y en su porción extracelular al distroglicano- α (14). El distroglicano- α es una proteína extracelular que se une a una gran cantidad de proteínas que forman parte integral de la matriz extracelular, entre las que destacan la laminina $\alpha 2$, la agrina y el perlecano (15, 16).

Existen numerosas evidencias que sugieren que el complejo distroglicano participa en transducción de señales, como lo indica la presencia de dominios de unión SH2 y SH3, en el dominio citoplasmático del distroglicano- β , estructuras que comúnmente encontradas en proteínas cinasas de tirosina,. De hecho se ha demostrado que la fosforilación de la tirosina 892 del distroglicano- β es requerida para reclutar proteínas que contienen dominios SH2 (17, 18).

La expresión del complejo distroglicano se ha descrito en todos los tipos musculares; sin embargo, existen algunos datos que sugieren que estas proteínas se encuentran en tejidos no musculares como el endotelio (19).



SP: peptido se\u00f1al

TM: dominio transmembranal

PPXY: dominio de uni\u00f3n a distrofina/utrofina

Figura 3. Organizaci\u00f3n molecular de los dominios presentes en los distroglicanos.

1.2.3 COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPÁN

El subcomplejo sarcoglicano-sarcospán (CSG-SSPN) es un complejo de glicoproteínas transmembranales que forman parte del DAPC/UAPC, este subcomplejo está constituido de proteínas transmembranales llamadas SG's α , β , γ , δ , ϵ y ζ , además del SSPN. Los SG's α y ϵ son proteínas transmembranales tipo 1 y presentan sitios putativos de fosforilación en la porción citoplasmática, con lo cual se sugiere que participan en transducción de señales (20).

Por su parte los SG's β , γ , δ y ζ son proteínas transmembranales tipo 2 (20) con dominios ricos en cisteínas en la porción extracelular, por lo que se piensa que pueden funcionar como moléculas receptoras (21).

El CSG-SSPN originalmente fue descrito en músculo esquelético, sin embargo posteriormente se descubrió su presencia en músculo cardiaco y muy recientemente en músculo liso, aunque su composición varía dependiendo del tipo muscular. Adicionalmente, se ha reportado su presencia en otros tipos de tejidos no musculares como el endotelio, el sistema nervioso, el hígado y el riñón (22).

Los componentes del CSG-SSPN se expresan diferencialmente en un patrón espacio temporal definido para cada uno de ellos. El SG alfa se expresa exclusivamente en músculo estriado (23) mientras que la expresión del SG gama ocurre en músculo estriado y en músculo liso (24). Por su parte los SGs beta y delta además de observarse en todos los tipos musculares, se han observado aunque en bajos niveles, en tejidos no musculares tales como la retina y el cerebro (25, 2). La expresión del SG epsilon se ha observado en todos los tejidos en los que se ha estudiado por lo que se considera de expresión ubicua (26).

CAPITULO 2.

2.1 PATOLOGÍAS RELACIONADAS CON EL DAPC/UAPC

2.1.1 DISTROFINA

El gen de la distrofina se encuentra ubicado en el cromosoma Xp21.2. Se han reportado mutaciones en este gen que causan enfermedades neuromusculares recesivos ligadas al cromosoma X. Tales patologías son la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) que afecta a 1 de cada 3500 hombres nacidos vivos, y la Distrofia Muscular de Becker (DMB) (1 de cada 30,000 hombres nacidos vivos) que es una forma alélica menos grave de la DMD. Ambos tipos de distrofia están continuamente acompañadas de cardiomiopatía dilatada, aunque la gravedad de la CMD no se relaciona con la severidad del tipo de distrofia (27, 28).

Por otra parte, se han descrito mutaciones en el gen de la distrofina que también dan origen a CMD ligada al cromosoma X (CMDLX) sin evidencias de distrofia muscular. Los varones afectados por la CMDLX presentan falla congestiva cardiaca en la adolescencia, la cual progresa rápidamente y conlleva de manera común a la muerte temprana.

Las mujeres portadoras usualmente desarrollan CMD alrededor de la quinta década de vida, pero en estos casos la enfermedad generalmente es leve y progresa muy lentamente (29). La diferencia que se ha observado entre los pacientes con DMD y DMB que presentan CMD con respecto a pacientes con CMDLX, es que estos últimos desarrollan patologías de músculo esquelético muy leves, sin mostrar disminución marcada de distrofina en este tipo muscular, al parecer por la activación de promotores alternos encontrados en músculo esquelético y no activos en músculo cardiaco (30).

Los defectos en el gen de la distrofina asociados con la CMDLX se han agrupado principalmente en la región del extremo amino terminal de la proteína, lo cual afecta su asociación con la actina del citoesqueleto, lo que ocasiona una ruptura del enlace citoesqueleto-matriz extracelular (31).

Existen modelos murinos deficientes en distrofina que muestran anormalidades en la fisiología muscular, causadas por alteraciones en el soporte estructural del sarcolema. Adicionalmente, las mutaciones en distrofina afectan de manera secundaria la estabilidad de las proteínas que interactúan con esta proteína como el caso de los filamentos de actina del citoesqueleto, de los sarcoglicanos en la membrana, e incluso de proteínas extracelulares como el distroglicano α lo que a su vez desestabiliza la interacción con la matriz extracelular (32). De manera similar a lo que ocurre en humanos, estos modelos animales desarrollan distrofia muscular con o sin la aparición de CMD, apoyando la idea de que este grupo de proteínas son de importancia fundamental para la función normal de los miocitos esqueléticos y cardíacos. En ambos casos, el estrés mecánico parece ser significativamente importante en la edad de inicio, que depende directamente de la disfunción de estos músculos (30, 33).

En los ratones genéticamente modificados, que carecen de distrofina, conocidos como ratones *mdx*, se observa distrofia muscular de gravedad media y en tejido el cardíaco se observan áreas de degeneración y fibrosis que aparecen a partir de la semana 20 de vida. De manera general se piensa que este tipo de cardiomiopatía es leve (34). Por su parte, los ratones que carecen de distrofina y utrofina, que es un homólogo autosómico de la distrofina, desarrollan cardiomiopatía que los lleva a una muerte súbita, lo que sugiere que la utrofina puede tener un papel

compensatorio en los ratones, aunque no se ha observado este fenómeno en humanos (35).

2.1.2 SINTASAS DE OXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico es un segundo mensajero con un gran número de funciones biológicas, el cual es sintetizado por la enzima sintasa de óxido nítrico, de la cual existen tres isoformas conocidas; la neuronal, la inducible y la endotelial (36).

En el músculo estriado y en el músculo liso el óxido nítrico modula una amplia gama de procesos que incluyen el acople excitación-contracción, entrada de glucosa, homeostasis de calcio y de manera muy importante vasodilatación (36, 37).

En el músculo estriado la enzima sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) se asocia con el DGC por medio de la sintrofina $\alpha 1$ (38, 39).

Se ha observado que la ausencia del DAPC en DMD y en ratones deficientes de distrofina conlleva a una rápida degradación y desaparición de la enzima nNOS. (39, 40).

En músculo esquelético deficiente de distrofina, la nNOS es desplazada de la membrana plasmática y esta disociación es causante de vasoconstricciones anormales por pérdida de la síntesis de óxido nítrico (41).

Adicionalmente, se ha observado que en músculo estriado con expresión deficiente de sintrofina $\alpha 1$, la localización de la nNOS se pierde provocando una marcada y más severa vasoconstricción, confirmándose con esto que la asociación de la nNOS con el DAPC es crítica para la aparición del vasoespasmo (42).

Por otro lado, se ha observado que la nNOS reminescente en músculo estriado de DMD permanece inactiva debido a que en esta condición patológica existe una sobre-expresión de la proteína inhibidora de la nNOS (PIN) (36).

La función potencial de la nNOS en DMD y CMD es fundamental para la culminación de las rutas de señalización en las que participa el óxido nítrico, principalmente en la regulación del tono vascular.

Cuando la actividad de la nNOS está reducida, como ocurre en DMD y CMD la vasoconstricción no puede ser regulada o revertida por la vasodilatación generada por el óxido nítrico, lo que conduce a la aparición de isquemia en músculo esquelético y cardiaco (43).

Una evidencia clara de la importancia del óxido nítrico en la fisiología vascular es el ratón deficiente en nNOS. Este modelo animal no desarrolla distrofia muscular y el DAPC permanece intacto, pero el ratón si desarrolla graves problemas cardiovasculares (44).

Existen hipótesis que tratan de aclarar la aparición de la isquemia derivada de la disociación del DAPC. Por un lado, debido a que la aparición de la isquemia, se relaciona directamente con la deficiencia del DAPC y de la nNOS, esta deficiencia puede llevar a la muerte celular solo si la deficiencia del DAPC también incrementa la susceptibilidad del músculo al daño por estrés oxidativo (45). Por otro lado, debido a que el óxido nítrico es un regulador potencial de la apoptosis y de la muerte celular por necrosis, se sugiere una segunda ruta en la cual las alteraciones en la nNOS generan un desajuste en la modulación de estas dos vías de muerte tisular que de por si ya es susceptible por la carencia del DAPC (46).

2.1.3 COMPLEJO DISTROGLICANO

A la fecha no se han descrito mutaciones que ocurran de manera natural en el gen distroglicano que lo puedan relacionar con la aparición de alguna patología. Modelos murinos deficientes en el gen distroglicano no son viables por lo cual se considera que mutaciones en este gen son letales (47).

Existen patologías relacionadas con el complejo distroglicano, en particular un grupo de distrofias musculares en las que se observan alteraciones en las modificaciones postraduccionales responsables del patrón de glicosilación del distroglicano- α (48, 49). La glicosilación alterada del distroglicano- α se ha implicado con el desarrollo de la distrofia muscular congénita tipo 1C (MDC1C) la cual es causada por mutaciones en la proteína relacionada a fukutina (FKRP) (50), la cual se encarga de la glicosilación del distroglicano- α (51). La MDC1C esta caracterizada por la degeneración muscular grave y cardiomiopatía (51). Mutaciones alélicas en el gen FKRP también causan una más común y menos grave forma de distrofia muscular llamada LGMD2I (distrofia muscular de cintura 2I) la cual se encuentra frecuentemente asociada con cardiomiopatía dilatada que aparece generalmente en la adolescencia (52). Es importante señalar que la localización del CDG no se restringe al músculo esquelético; recientemente se le ha detectado en músculo liso y otros tejidos como el hígado y el riñón (2).

2.1.4 COMPLEJO SARCOGLICANO-SARCOSPÁN

Las mutaciones en los genes que codifican para los SG's α , β , γ y δ provocan un tipo de distrofia muscular conocida como distrofia muscular de cintura con un patrón de herencia autosómico recesiva (LGMD2C-F respectivamente). En el caso de las mutaciones en los SG's β y δ , además de desencadenar las LGMD2D y 2F respectivamente, en algunos casos se ve acompañada de CMD, la cual cursa con gravedad provocando la muerte por falla cardíaca a edad temprana (53). Mientras que para el caso de pacientes con LGMD2C y 2E debida a mutaciones en los SG's α y γ , respectivamente, la aparición de CMD es mucho menos frecuente (54). Existen casos en los que mutaciones en el SG δ son la causa de cardiomiopatía dilatada familiar o esporádica que no está relacionada a alguna enfermedad muscular (55).

En el caso del SG δ una de las primeras mutaciones descritas fue en el hámster Sirio BIO 14.6 (56). Se trata de una mutación espontánea que corresponde a una eliminación del primer exón del gen, dando como resultado la pérdida total de la proteína (57). En estos animales se observan características histológicas de distrofia muscular acompañadas con necrosis progresiva del miocardio, hipertrofia, dilatación ventricular y muerte prematura debida a falla cardíaca (58). El hamster BIO 14.6 es un excelente modelo para estudiar CMD asociadas con SG's, pues en estos animales carentes del SG- δ la incidencia de la cardiomiopatía es del 100% (59).

Para entender más los aspectos moleculares de las CMD se han generado varias sublíneas a partir del hamster BIO 14.6 tales como la UMX7.1 y la TO-2, las cuales

tienen una eliminación genómica en el extremo 5' del gen para el SG- δ que impide la síntesis del transcrito y por lo tanto de la proteína (60).

Para tratar de aclarar los mecanismos responsables de la fisiopatología de la CMD originada por deficiencia en alguno de los miembros del CSG-SSPN y para establecer posibles estrategias de tratamientos, se han desarrollado ratones genéticamente modificados, los cuales son deficientes en los SG's α , β , γ y δ .

Una de las principales características de estos ratones es que desarrollan una patología de músculo esquelético que se puede homologar a la LGMD en los humanos (61, 62). Adicionalmente, se ha observado tanto en pacientes como en los modelos animales, que la deficiencia primaria de un sarcoglicano conduce a una disminución secundaria o pérdida total del resto de los miembros del CSG-SSPN, lo cual concuerda con la demostración de que la biosíntesis y el anclaje en la membrana de estas proteínas está estrechamente relacionado entre si (63, 64).

Estos modelos animales han sido usados, entre otros aspectos, para determinar los efectos de estas mutaciones en el músculo liso vascular (61). El CSG-SSPN de músculo liso vascular se encuentra constituido de las subunidades β , δ , ε y SSPN y existe controversia en cuanto a la presencia del SG- γ en este tejido. Recientemente se ha propuesto que el cuarto miembro del CSG-SSPN en músculo liso vascular es SG- ζ en sustitución de SG- γ (65, 66)

Se ha observado que el ratón deficiente en el SG- α muestra desintegración del CSG-SSPN en músculo esquelético, sin embargo, el complejo se mantiene intacto en músculo liso vascular y no presenta CMD. La falta de patología cardiovascular en este ratón mutante puede deberse a que la falta de SG- α se ve compensada por su homólogo, el SG- ε en músculo cardiaco y músculo liso vascular (61, 62).

Los ratones deficientes en los SG's β y δ pierden la expresión del CSG-SSPN de músculo liso vascular lo cual se piensa que conlleva a la generación de vasoespasmos en las arterias coronarias, generándose de esta forma lesiones isquémicas que desarrollan una forma grave de CMD (Figura 4) (61, 62). Lo anterior podría apoyar la hipótesis de que la pérdida de la expresión del CSG-SSPN de músculo liso es directamente responsable de la aparición de la CMD (61, 62).

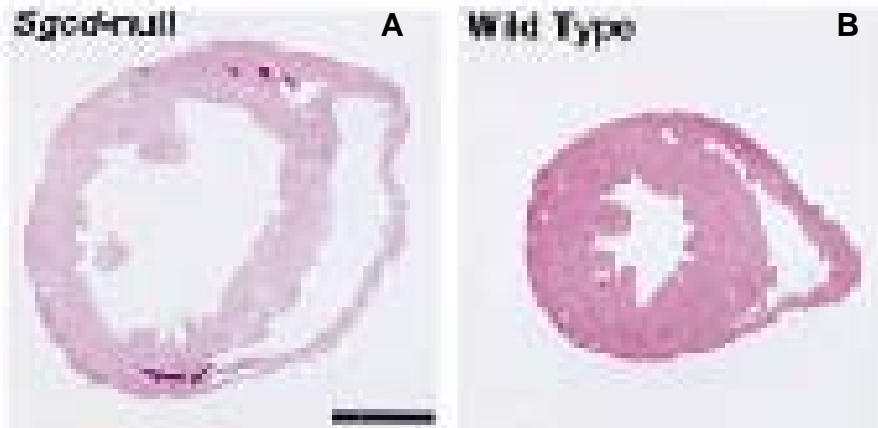
En algunos casos, en el ratón deficiente en SG- γ , se ha observado que desarrolla CMD de manera secundaria, con áreas degenerativas cardíacas puntuales, con pérdida de expresión del CSG-SSPN en el cardiomiocito, pero sin que se vea alterada la expresión del CSG-SSPN en músculo liso vascular, por lo cual se postula que la aparición de la CMD no depende de la pérdida del CSG-SSPN en músculo liso vascular coronario (63).

Recientemente Wheeler y colaboradores (2004) han propuesto que la aparición de vasoespasmos en el ratón deficiente del SG- δ no se relaciona con la pérdida del CSG-SSPN en músculo liso vascular, ya que la recuperación de la expresión del SG- δ específicamente en cardiomiocitos de este ratón, fue suficiente para corregir la degeneración cardíaca y de manera sorprendente también se logró eliminar las lesiones vasoespásmicas (65, 66)

Tales evidencias sugieren que las lesiones vasoespásmicas son generadas por un evento extrínseco al músculo liso vascular y se propone que la generación de citocinas y radicales libres formados en el cardiomiocito degenerado, son los responsables de las lesiones vasoespásmicas (65, 66)

Por otra parte, las lesiones vasoespásticas observadas en las arterias coronarias de los ratones deficientes en los SG's β , γ y δ han logrado revertirse con tratamiento con el bloqueador de canales de calcio verapamil, que funciona como un potente anti-vasoespástico. Este tratamiento disminuye la patología y mejora la función cardiaca, indicando con esto que independientemente de que se trate de un efecto extrínseco o intrínseco, el vasoespasmo contribuye de manera importante con la aparición de la CMD (63, 67).

CARDIOMIOPATÍA DILATADA EN RATÓN SG- δ NULO



ISQUEMIA EN ARTERÍAS CORONARIAS DE RATÓN SG- δ NULO

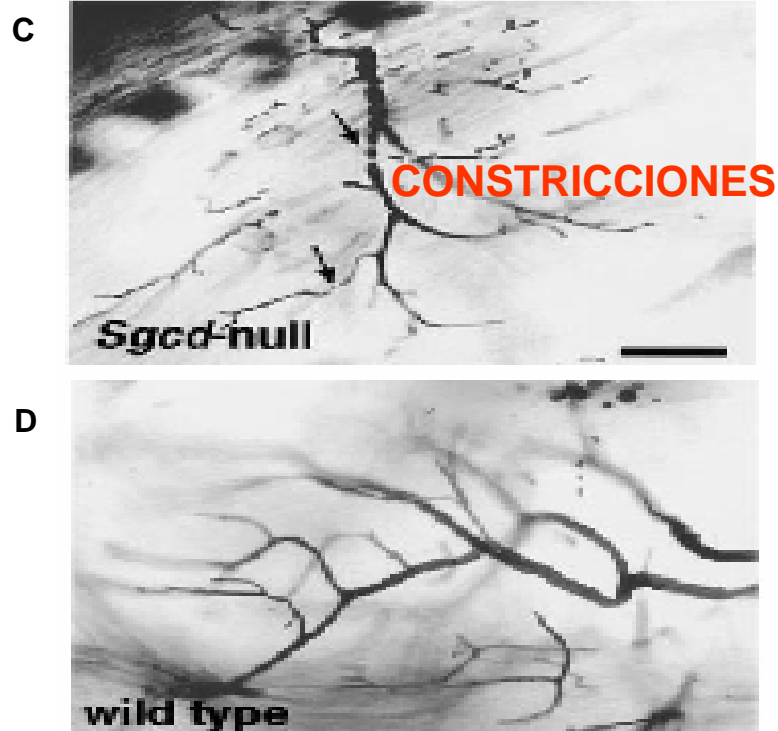


Figura 4. La imagen muestra la cardiopatía dilatada en el ratón carente de SG- δ (A) en comparación con el corazón del ratón silvestre (B). También se muestra la presencia de constricciones en las arterias coronarias del ratón carente de SG- δ (C) en comparación con las coronarias de un ratón silvestre (D). Imagen tomada de Coral-Vázquez et al, 1999 Cell, 98, 465-474.

CAPITULO 3.

3.1 ESTUDIO DEL DAPC/UAPC EN ENDOTELIO VASCULAR

Todos los antecedentes del capítulo anterior ponen de manifiesto la importancia del DAPC en el tejido vascular. Es así que el estudio del DAPC/UAPC en sistema vascular se ha enfocado al análisis de miocardiocitos y de músculo liso vascular (68) y muy poco se sabe en lo concerniente a la expresión y función de estas proteínas en células endoteliales, las cuales son fundamentales en el funcionamiento vascular.

Estudios recientes realizados por nuestro grupo de trabajo (69), teniendo como modelo los vasos de cordón umbilical humano, han demostrado en el músculo liso la presencia de las proteínas distrofina, utrofina, distroglicano- β y de los SG- ϵ , δ , β y SSPN mientras que para el endotelio se evidenció la presencia de las proteínas utrofina, distroglicano- β y SG- ϵ .

Así mismo, se sugirió que éstas podrían estar formando complejos localizados en los dominios caveolares de la membrana plasmática, dada su colocalización con la proteína caveolina-1 (Cav-1). Adicionalmente, de acuerdo a las características bioquímicas de los SGs y del resto de las proteínas del UAPC, y la posible asociación con caveolina-1, propusimos la posibilidad de que este complejo de proteínas pueda participar en el endotelio como proteínas sensoras de fuerzas mecánicas y a su vez en la transmisión de esta señal mecánica al interior celular. Tal es el caso de algunos mecanorreceptores endoteliales que se asocian con la cav-1 como las integrinas (70) y de sus efectores río abajo como la propia cav-1 y

diversas cinasas entre ellas la cinasa de adhesión focal (FAK) que se sabe que responden de manera directa a los estímulos mecánicos (71).

CAPITULO 4.

4.1 EL ENDOTELIO VASCULAR Y SUS FUNCIONES

Las células endoteliales son uno de los principales componentes celulares de los vasos sanguíneos. Esta monocapa celular se encuentra entre la pared vascular y el torrente sanguíneo, presentando un área vasta de superficie para el intercambio de materiales entre la sangre y los tejidos, por lo que interactúa con diversos mediadores celulares, químicos, mecánicos y hormonales provenientes de estos compartimientos. Es también una barrera selectivamente permeable a diversas macromoléculas y proporciona una superficie no adhesiva y no trombogénica que mantiene continua la fluidez de la sangre. Las células endoteliales desempeñan un papel fundamental en la homeostasis vascular, mediante la síntesis y liberación de diversas sustancias que actúan en forma autócrina, parácrina e inclusive intrácrina (72). Además participa en la adhesión leucocitaria, la inflamación, la regulación de la coagulación y del tono vascular, la angiogénesis y el crecimiento vascular y actúa además como una barrera para solutos y líquidos del flujo transvascular. El endotelio, lejos de ser un participante pasivo es un tejido dinámico, que secreta y modifica una amplia variedad de mediadores biológicamente activos que influyen a su vez el comportamiento de otros tipos celulares, tales como, músculo liso vascular, monocitos, macrófagos, fibroblastos y diversas células específicas de cada órgano, al mismo tiempo regula la producción y la composición de la matriz extracelular circundante o adyacente (73).

El endotelio está expuesto a una gran variedad de estímulos dentro de los que destacan los hemodinámicos y se sabe que estas fuerzas mecánicas influyen de manera importante en la función endotelial. Sin embargo, los mecanismos que regulan las respuestas endoteliales al estímulo por fuerzas mecánicas no han sido bien descritos.

El que el endotelio pueda responder al estrés mecánico por la activación de rutas de señalización bien definidas, indica que estas células poseen sensores capaces de transmitir eventos mecánicos y convertirlos en señales biológicas que desencadenan las respuestas efectoras. La identidad de los mecanosensores que llevan a cabo estas respuestas está siendo investigada (74).

4.2 EL ENDOTELIO Y SUS ESTIMULOS MECÁNICOS

El endotelio es un tejido multifuncional que responde a una gran variedad de estímulos, dentro de los estímulos a los que es sometido el endotelio destacan los mecánicos (75). Este tejido está sujeto a dos tipos de fuerzas mecánicas principalmente, el flujo laminar o “shear stress” y el estiramiento. El flujo laminar o “shear stress” ocurre debido a que el tejido se encuentra en contacto directo con el flujo sanguíneo por el lado del lumen vascular, lo cual implica la aplicación de una fuerza de roce unidireccional o turbulenta en la zona apical de la célula (76). Por su parte el estiramiento ocurre de manera circunferencial a lo largo de todo el vaso sanguíneo y es generado tanto por la presión ejercida por la pared del vaso como por la presión sanguínea y se da en todos los vasos aunque predominantemente en vasos pulsantes como los pulmonares y cardíacos (76).

El estiramiento mecánico circunferencial de un vaso puede ser cuantificado por medio de la Ley de Laplace: $T = (P_t) (R) / \mu$ donde T corresponde al estiramiento del vaso, P_t es la presión transmural, R el radio del vaso y μ el grosor de la pared del vaso y usualmente se expresa como dinas/cm².

El flujo laminar, es generado por el roce del flujo sanguíneo sobre la superficie luminal endotelial cuando circula la sangre. El flujo laminar es tangencial a la superficie luminal y puede ser expresado por la siguiente ecuación:

$t = 4\eta Q / \pi r^3$ donde t representa el roce del flujo laminar en dinas/cm², η es la viscosidad, Q el flujo y r el radio del vaso (77).

Estas fuerzas mecánicas sobre el endotelio estimulan la secreción de moléculas confinadas a regular el tono vascular, tales como la prostaciclina y el óxido nítrico (NO), encargadas de dilatar los vasos y la endotelina-1 que se encarga de contraer el vaso (77).

Las fuerzas mecánicas ejercidas sobre el endotelio también aumentan la expresión de genes, algunos codifican para proteínas encargadas de reestructurar y dar soporte mecánico, como moléculas de adhesión y proteínas del citoesqueleto. Otros codifican para factores de crecimiento y citocinas. Algunas de estas moléculas son importantes en la fisiología vascular normal, ya que su disminución o incremento puede contribuir al desarrollo de la patología relacionada con el sistema vascular (78).

Estas evidencias ponen de manifiesto que el estrés mecánico puede modificar la expresión de distintos genes, los cuales incluso son fundamentales para la viabilidad de la estirpe celular.

CAPITULO 5

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Todas las evidencias anteriores proponen que la importancia del DAPC/UAPC no se remite únicamente a su función estructural en músculo estriado, sino que es sumamente importante su presencia e integridad en el tejido vascular. Sin embargo y a pesar de la importancia que se ha demostrado que tiene el DAPC en el desarrollo de la cardiomiopatía, el estudio de este grupo de proteínas se ha enfocado principalmente a los cardiomiocitos y al músculo liso vascular. A la fecha hay escaso conocimiento sobre la expresión y función de estas proteínas en células endoteliales, las cuales son de fundamental importancia para la función vascular. En un estudio reciente realizado por nuestro grupo de trabajo en los vasos del cordón umbilical humano, postulamos la presencia de un UAPC de células endoteliales conformado por CAV-1, ϵ -SG, β -DG y UTR. También postulamos que este complejo puede estar localizado en las caveolas, que funcionan como microdominios de señalización en las células endoteliales, debido a su probable asociación con la caveolina-1. Estos resultados nos impulsaron a estudiar a mayor profundidad la probable existencia del UAPC endotelial y explorar su relevancia fisiológica en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Debido a la importancia de las células endoteliales en la función cardiovascular, nosotros consideramos de gran relevancia analizar el UAPC en cuanto a su composición y el posible cambio de ésta en respuesta al estiramiento mecánico en este tipo celular.

CAPITULO 6.

HIPÓTESIS

En las células endoteliales existe un complejo de proteínas asociadas a utrofina constituido por utrofina, sarcoglicano- ϵ , distroglicano- β , caveolina-1 y eNOS. Este complejo a su vez cambia su composición después de que las células endoteliales son sometidas a estímulo mecánico.

CAPITULO 7

OBJETIVOS.

-Evaluar por inmunoprecipitación las formas de UAPC presentes en las células endoteliales cultivadas y su posible interacción con otras proteínas, además de conocer si bajo el estrés mecánico hay cambios en las posibles asociaciones.

-Evaluar por Western-blot semicuantitativo los niveles de proteínas del UAPC así como de proteínas probablemente relacionadas con él, en endotelio en cultivo sometido a estrés mecánico.

-Evaluar la posible participación del UAPC en alguna ruta de señalización en el endotelio sometido a estímulo mecánico.

CAPITULO 8

METODOLOGÍA

8.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El manejo de las muestras biológicas para el desarrollo de este estudio se aprobó por el comité de ética e investigación del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS.

8.2 MATERIAL BIOLÓGICO.

Los cordones umbilicales se proporcionaron por el servicio de ginecobstetricia y labor y expulsión de la clínica 4 del IMSS (Hospital Luis Castelazo Ayala). Los cordones umbilicales fueron de nacimientos normales a término colectados inmediatamente después del parto. Se recuperaron fragmentos de cordón umbilical de 10 a 15 cm y se colocaron en NaCl 0.9% (SIGMA Chemical Co. San Luis Missouri USA) adicionado con 1% de mezcla de antibióticos (penicilina 1000 U/ml, estreptomina 1g/ml y anfotericina B 25 mg/ml GIBCO-BRL Rockville Maryland USA) a temperatura de 4°C y se transportaron al laboratorio para que a partir de ellos se obtuviera el endotelio para los cultivos celulares primarios.

8.3 CULTIVOS CELULARES.

Las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) se aislaron de varios segmentos de cordón umbilical. Las HUVEC fueron desprendidas del músculo liso de la vena umbilical por medio de digestión enzimática de la matriz extracelular (79). La vena umbilical se canuló y perfundió con tripsina a una concentración de 0.125% disuelta en solución de Hank adicionado con 1 % de mezcla de antibióticos hasta alcanzar turgencia, el tejido se incubó durante 15 min a 37°C, el volumen total de la solución de tripsina dentro de la vena umbilical fue recuperado en un tubo cónico graduado (CORNING Inc. Nueva York USA) y se le adicionó 0.1 volúmenes de suero de bovino fetal (SFB). El endotelio se separó de la solución por centrifugación a 2700 rpm/15 min, (1000 x g) y la pastilla se resuspendió con medio M199 suplementado con SFB al 10%, 2 mM de L-glutamina, 1% de la mezcla de antibióticos (todos los reactivos utilizados en este apartado fueron de GIBCO-BRL) y mitógeno endotelial de cerebro de bovino 5mg/ml (80). Las células endoteliales se sembraron en cajas de cultivo celular de 75 cm³ (CORNING) y se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO₂. El endotelio se caracterizó posteriormente por la detección del factor de von Willebrand por medio de inmunofluorescencia y adicionalmente se realizaron ensayos de citometría de flujo para el marcador endotelial CD31 así como para marcadores de células mesenquimales de cordón umbilical para determinar la predominancia de la población de células endoteliales en nuestros cultivos celulares.

8.4 INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.

Se detectó por inmunofluorescencia en los cultivos de células endoteliales después de tres pasajes proliferativos, la presencia del factor de von Willebrand, proteína específica de células endoteliales. Las células se sembraron a una densidad de 150,000 por 0.1 ml sobre un cubreobjetos de cristal de 1 cm de diámetro cubiertos con colágena al 0.1% (SIGMA). Las células sembradas sobre el cubreobjetos se dejaron en reposo toda la noche en incubadora para permitir su adhesión sobre el cristal. Una vez que las células se adhirieron al cubre-objetos se lavaron con amortiguador de sales de fosfatos constituido de la siguiente manera: 136 mM de NaCl, 2.6 mM de KCl, 4.2 mM de Na₂HPO₄·7H₂O y 1.4 mM de KH₂PO₄ (PBS) durante 2 min y se fijaron con metanol absoluto durante 10 min a -20°C. Posteriormente, se lavaron suavemente con PBS 3 veces durante 5 min cada vez. Se bloquearon los sitios inespecíficos con albúmina sérica bovina (BSA de SIGMA) al 5% en PBS y posteriormente se incubaron durante 3 hrs a temperatura ambiente con 25 µl del anticuerpo primario específico contra el factor de von Willebrand (Rabbit anti factor VIII related antigen 08-0018 ZYMED San Francisco California USA). Transcurrido el tiempo establecido, se lavaron con PBS 3 veces durante 5 min y se incubaron con el anticuerpo secundario especie-especifico acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (goat anti-rabbit IgG-FITC) a una dilución de 1:200 durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se hicieron 3 lavados con PBS de 5 min cada uno y se montaron los cubreobjetos en un portaobjetos con 5 µl de medio de montaje para fluorescencia vecta-shield (VECTOR Laboratorios, Inc. Burlingame, California USA) y se analizaron las

muestras con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600 y se capturaron las imágenes con la cámara Nikon DN100.

8.5 CITOMETRÍA DE FLUJO

Con la finalidad de conocer que en nuestros cultivos celulares primarios existía predominantemente una población de células endoteliales se realizaron en ellos ensayos de citometría de flujo para el marcador endotelial CD31 así como para diversos marcadores de células mesenquimales de cordón umbilical, tales marcadores son: CD58, CD90, CD62, CD44, CD54, CD13, CD166 y CD49. Los ensayos fueron realizados comparativamente en células endoteliales así como en las células mesenquimales del cordón umbilical. Los cultivos de células endoteliales confluentes en tercer pase proliferativo, así como las células mesenquimales se lavaron con PBS adicionado con 10% de SFB (PBS-SFB) y se desprendieron de la caja de cultivo mediante raspado con gendarme. Se recuperaron las células y se centrifugaron a 1000 x g durante 5 min, posteriormente se resuspendió la pastilla con PBS-SFB y se repitió el procedimiento dos veces más a partir de la centrifugación. Posteriormente se hicieron diluciones 3×10^5 células en 300 μ l PBS-SFB y se incubaron durante 1 hr a 4°C y en oscuridad con los anticuerpos primarios específicos para los marcadores antes mencionados. Cabe mencionar que los anticuerpos primarios están acoplados a fluorocromos. Después del tiempo de incubación se lavaron las células con PBS-SFB dos veces y posteriormente se analizaron en el citómetro de flujo.

8.6 APLICACIÓN DE LA FUERZA MECÁNICA A LAS CÉLULAS EN CULTIVO.

Los cultivos primarios confluentes de células endoteliales sembrados en las cajas de cultivo de 75 cm³ fueron resembrados en un aparato que proporciona estiramiento equibiaxial radial estático (Figura 5) (81). Este sistema de estiramiento contiene insertada una membrana elástica de silicón (Dow Corning CO. San Diego California USA) recubierta de colágena (SIGMA) al 0.01% sobre la cual se adhieren las células endoteliales. Una vez cultivadas dentro del sistema de estiramiento las células se dejaron estabilizar durante 24 hrs en incubadora con 5% de CO₂ y a 37°C. La membrana elástica de silicón se encuentra sujeta a una serie de tornillos dentro del sistema los cuales al ser rotados estiran la membrana de silicón de manera equibiaxial, por lo tanto estirando a su vez a las células endoteliales adheridas sobre ella. Posterior al tiempo de estabilización de las células dentro del sistema se aplicó la fuerza mecánica que de acuerdo a los parámetros que se muestran en la figura 6 que es de aproximadamente 1.4N/cm². Las membranas elásticas con los cultivos confluentes de células endoteliales, fueron estiradas por periodos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14hrs.

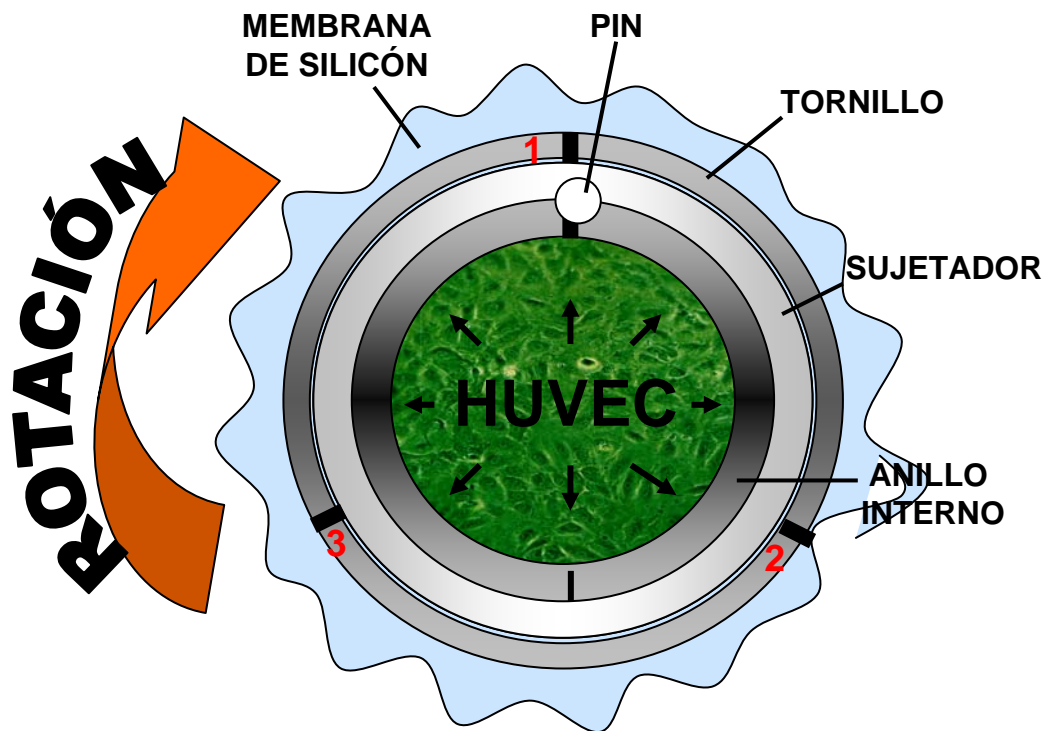
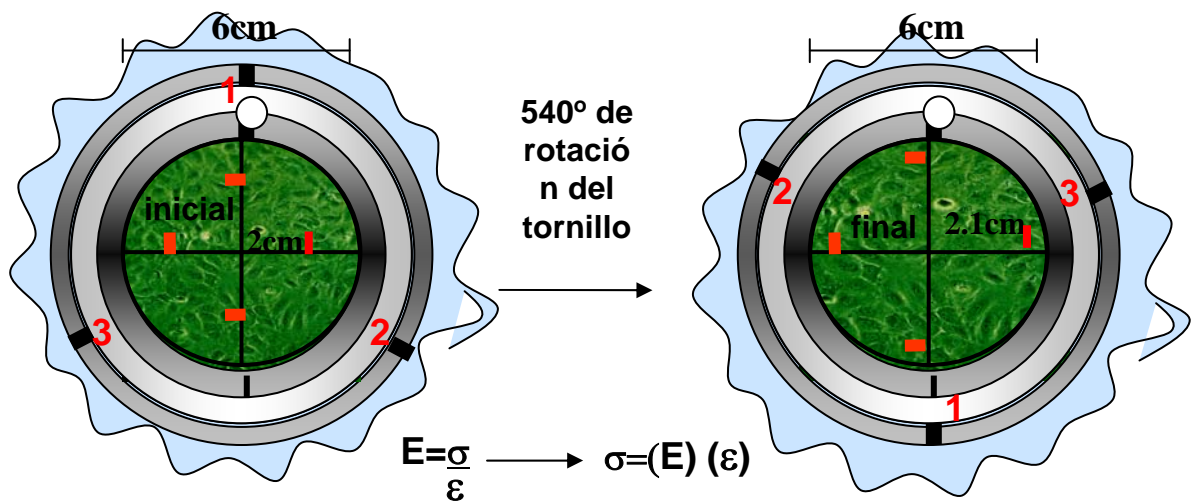


Figura 5. Sistema de estiramiento equibiaxial para células en cultivo. Lee A. et al, 1996, Am. J. Physiol. 271, 40:C1400-C1408



$$\epsilon = \frac{0.1 \text{ cm}}{6 \text{ cm}} = 0.016 \text{ cm} \longrightarrow 1.6 \times 10^{-4} \text{ m}$$

$$\sigma = (0.88 \text{ MN/m}^2)(1.6 \times 10^{-4}) = 1.4 \times 10^{-4} \text{ MN/m}^2 = 140 \text{ N/m}^2 = 1.4 \text{ N/cm}^2$$

Rangos fisiológicos 120mmHg=1.6N/cm² 80mmHg=1.06N/cm²

E= fuerza de elasticidad de biomateriales (valor de Young). Valor de Young para la membrana de silicón es 0.88 MN/m² (Corning).

σ = estrés en unidades de fuerza/área

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (\epsilon = \text{estiramiento, incremento en longitud})$$

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L_0} \quad \begin{array}{l} \Delta L = \text{diferencia en longitudes} \\ L_0 = \text{longitud inicial} \end{array}$$

Figura 6. Calculo de la fuerza aplicada en el sistema de estiramiento equibiaxial..

8.7 EVALUACIÓN DE LOS TRANSCRITOS POR RT-PCR.

Para conocer el patrón de expresión de los transcritos de algunos de los miembros del UAPC (CSG-SSPN y eNOS) se realizaron ensayos de RT-PCR en células de endotelio sometidas a diferentes tiempos de estiramiento (2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 hrs.) con 1.4 N/cm^2 de fuerza de estiramiento. Estos tiempos se utilizaron con la finalidad de conocer en cual de ellos se podía observar el nivel de expresión menos o más elevado con respecto a las células no estiradas. para de esta forma trabajar en los posteriores ensayos con el tiempo que mostró un cambio más representativo en cuanto a nivel de expresión. La fuerza de 1.4 N/cm^2 corresponde a un nivel de estiramiento que representa rangos fisiológicos en los que una célula se estira y se encuentran indicados en reportes bibliográficos (76). Para realizar los ensayos de RT-PCR se realizó extracción de RNA total de las células endoteliales en cultivo en estado basal y sometidas a estiramiento en los diferentes tiempos utilizando TRIZOL con las recomendaciones del proveedor. Cada lote de RNA fue sometido a síntesis de cDNA con el uso de la técnica de hexámeros al azar y con MMLV transcriptasa reversa utilizando $2\mu\text{g}$ de RNA total (todos los reactivos mencionados con anterioridad fueron adquiridos de GIBCO-BRL). El cDNA resultante se sometió a ensayos de PCR para realizar coamplificaciones con oligonucleótidos específicos para cada gen del CSG-SSPN, para el gen de eNOS así como para el gen de la GAPDH que se utilizó como control endógeno para la posterior cuantificación y normalización de los valores de expresión relativa. Como control del experimento se utilizaron RNAs totales

extraídos de células endoteliales cultivadas en la cámara de estiramiento que no fueron sometidas al estímulo mecánico.

Los oligonucleotidos utilizados para las amplificaciones inciden sobre secuencias codificantes y sus secuencias se muestran a continuación: β - SG sentido 5'-ATGCGTGAGAGAGCTGTTGA -3', antisentido 5'-TTTGGTCCAATGCGAATC AC-3', δ -SG sentido 5'-ACACCTAATGTCAGGGCAGAC-3', antisentido 5' -TC TGTCCCTTCTCATCCCTCAC-3', ϵ -SG sentido 5'-TCCACCTTACCCAAAACCT G-3', antisentido 5' -AACGGGAAGTCTTCTGCAGA-3' , SSPN, sentido 5'-CTAGTCAGGGACACTCCATT-3', antisentido 5'-GGCACTCAGCAGAAAGTA TAA-3', eNOS sentido 5'-CATGAGGCTCAGCCCCAGAAC-3', antisentido 5'-AGTCAATCCCTTTGGTGCTCAC-3'. Como control interno se amplificó de manera simultánea con cada componente del CSG-SSPN y eNOS el transcrito de la GAPDH de humano usando los siguientes oligonucleotidos: sentido 5'-ATCCCATCCCATCTTCCAG-3' antisentido 5'-TGTGGTCATGAGTCC TTCCA-3'. La mezcla de reacción de PCR consistió en 2.5 μ l de cDNA, 10 pmol de cada oligonucleotido, 200 μ M de cada dNTP, 1.5 mM de $MgCl_2$, 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl ph 8.4 y dos unidades de Taq polimerasa (todos los reactivos mencionados con antelación fueron adquiridos de Invitrogen) en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de amplificación fueron un paso de desnaturalización a 95°C por 5 min seguido de 32 ciclos compuestos de 30 seg de desnaturalización a 95°C; 30 seg de alineamiento a 62°C para β y δ SG, 59°C para SG- ϵ y SSPN; 30 seg de elongación a 72°C. Finalmente se aplicó un paso de elongación a 72°C por 7 min. Los productos de PCR se sometieron a corrimiento electroforético en gel de

agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. La intensidad de las bandas fue cuantificada directamente del gel de agarosa teñido usando el software para densitometría y análisis de imágenes Alphaimager 2200 5.0.

8.8 ENSAYOS DE INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Para determinar las posibles variaciones en el nivel de expresión de las proteínas utrofina, cav-1, β -DG, ϵ -SG y eNOS en HUVECs sometidas a estiramiento, comparadas con las mismas proteínas de HUVEC que no fueron estiradas, se homogenizaron 10^7 HUVEC estiradas y por otro lado 10^7 HUVEC no estiradas con 50 μ l de solución de lisis RIPA compuesto de 1% de Tritón X-100, 0.5% de desoxicolato de sodio, disueltos en PBS 1X con inhibidores de proteasas "Mini Compleat" (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania). Los extractos proteicos totales fueron cuantificados por espectrofotometría utilizando el método de cuantificación DC de BIO-RAD. Posteriormente, 40 μ g de proteína total fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en gradiente de 3-12.5% con 180 Voltios por 75 min en el sistema "Mini Protean" de BIO-RAD. Las proteínas totales separadas en el gel se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD) con el uso del sistema de electrotransferencia semi-seco de BIO-RAD durante 47 minutos a 12 voltios. Posteriormente, las membranas de nitrocelulosa fueron teñidas con rojo de Ponceu (SIGMA) para corroborar la presencia de las proteínas. Posteriormente las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés y se incubaron con el anticuerpo

secundario especie-específico acoplado a peroxidasa. La hibridación fue revelada por el método colorimétrico de diamino benzidina (DAB de BIO-RAD).

8.9 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.

Resultados preliminares de nuestro grupo (69) han sugerido la potencial asociación de algunos de los miembros del UAPC y otras proteínas relacionadas a él, como caveolina-1 en células endoteliales. El interés de esta metodología es confirmar dichas asociaciones, además de conocer si las células sometidas a estrés mecánico presentan cambios en las posibles interacciones de éstas proteínas. Para ello se realizaron extractos proteicos de las células en cultivo con solución de extracción no desnaturalizante constituido por 0.15 mM de NaCl, 0.5 mM de EDTA y 0.5% de Tritón X-100. Los extractos proteicos fueron sometidos a ensayos de inmunoprecipitación (82) con un anticuerpo específico para la región carboxilo de la proteína caveolina-1. De la misma forma se realizaron los ensayos con el anticuerpo específico para la región carboxilo de la utrofina. La proteína inmunoprecipitada se sometió a un SDS-PAGE, el cual posteriormente fue transferido a papel de nitrocelulosa y ensayado por Western-blot con anticuerpos específicos para el SG- ϵ , DG- β , sintrofina- α 1 y para la porción carboxilo de la utrofina y la oxido nítrico sintasa endotelial. Como control de los experimentos, se realizaron extractos de cultivos celulares que no fueron sometidos a estrés mecánico.

8.10 CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.

Los niveles de óxido nítrico (NO) producidos por las HUVEC, en condiciones normales y de estrés, se midieron de manera indirecta por el método de Greiss (83, 84). Usando como fuente de nitrato reductasa la *E. coli* transgénica ATCC 1775 (ATCC Co. Rockville MD, USA), se pueden convertir los nitratos (que son resultado de la oxidación del óxido nítrico) presentes en el medio a nitritos y con el uso del reactivo de Greiss, los nitritos son desionizados estequiometricamente dando como resultado una tonalidad púrpura en la reacción, la cual puede ser cuantificada espectrofotométricamente. Las HUVEC fueron cultivadas en el sistema de estiramiento, con DMEM (Dulbecos Modified Eagles Médium) sin rojo de fenol (GIBCO-BRL, Rockville MD, USA) en sustitución del M199. Las HUVEC cultivadas en el sistema de estiramiento bajo esta condición fueron estabilizadas durante toda la noche a 37°C con 5% de CO₂ en la incubadora, posteriormente las células fueron estiradas durante 8 horas. Después del tiempo de estímulo se recolectaron 250 µl de medio de cultivo de las células estimuladas y por otra parte se recolectó el mismo volumen de medio de las HUVEC cultivadas en el sistema de estiramiento pero que no fueron estimuladas. Cada uno de los medios de cultivo recolectados fue incubado con 200 unidades ópticas de *E. coli* ATCC 1775 y puestos en agitación a 100 rpm durante una hora a 37°C. Las bacterias se separaron de la fase líquida por centrifugación a 3000 rpm por 5 min. Subsecuentemente el sobrenadante se recuperó e incubó durante un minuto con 250 µl de sulfanilamida al 1% y 250 µl de N-1-naftil etilendiamina al 0.1%. Como control positivo de la síntesis de óxido nítrico en los experimentos utilizamos

HUVEC estimuladas por 30 min con bradicinina (todos los reactivos utilizados para esta técnica fueron de SIGMA). Finalmente los nitritos fueron cuantificados en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 554 nm y los resultados fueron interpolados en una curva estándar.

CAPITULO 9

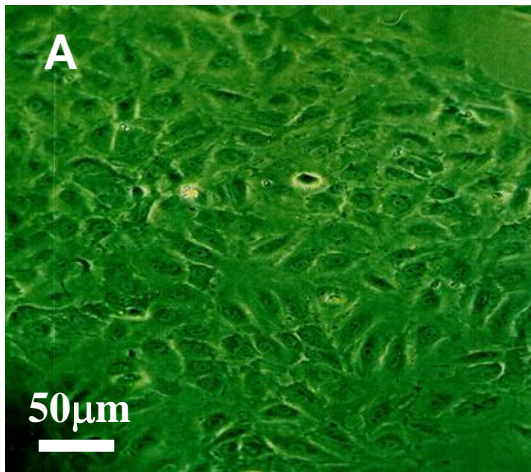
RESULTADOS

9.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS HUVEC

Una vez que las células endoteliales fueron obtenidas y mantenidas estables en cultivo (Figura 7A), se caracterizaron por medio de inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo para el factor de von Willebrand, proteína específica de las células endoteliales. Las células endoteliales observadas en un campo óptico del microscopio demuestran que aproximadamente el 99% de las células en la preparación presenta tinción inmunofluorescente positiva para el factor de von Willebrand, lo cual nos indica que nuestros cultivos se encuentran constituidos predominantemente de células endoteliales (Figura 7B).

Una prueba adicional para la caracterización del cultivo endotelial primario fue la citometría de flujo. En este ensayo se utilizaron anticuerpos dirigidos contra marcadores específicos de células mesenquimales de cordón umbilical tales como CD44, CD58, CD90, CD62, CD13, CD69 y CD166 así como para el marcador de las HUVEC, CD31. Todos los marcadores mencionados se aplicaron sobre ambas estirpes celulares, con la finalidad de evidenciar que en nuestros cultivos primarios predomina la presencia de HUVEC, lo cual quedó demostrado en las gráficas de citometría obtenidas (Figura 8 y 9).

ENDOTELIO



VON WILLEBRAND

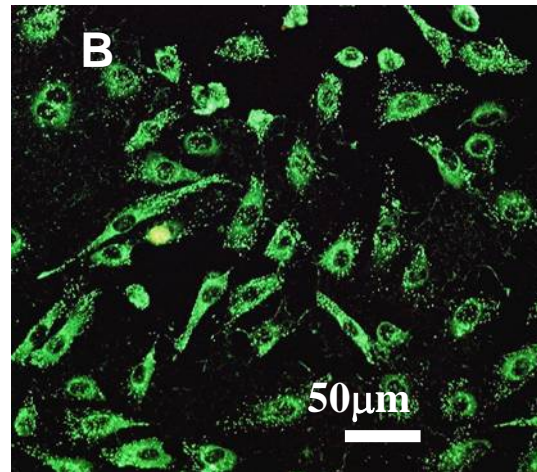


Figura 7. Caracterización de los cultivos celulares primarios. Cultivos celulares primarios de endotelio derivado de la vena del cordón umbilical (HUVEC). Fotografía del microscopio de luz blanca (A). Inmunofluorescencias para el factor de Von Willebrand en las HUVEC, fotografía del microscopio de fluorescencia (B).

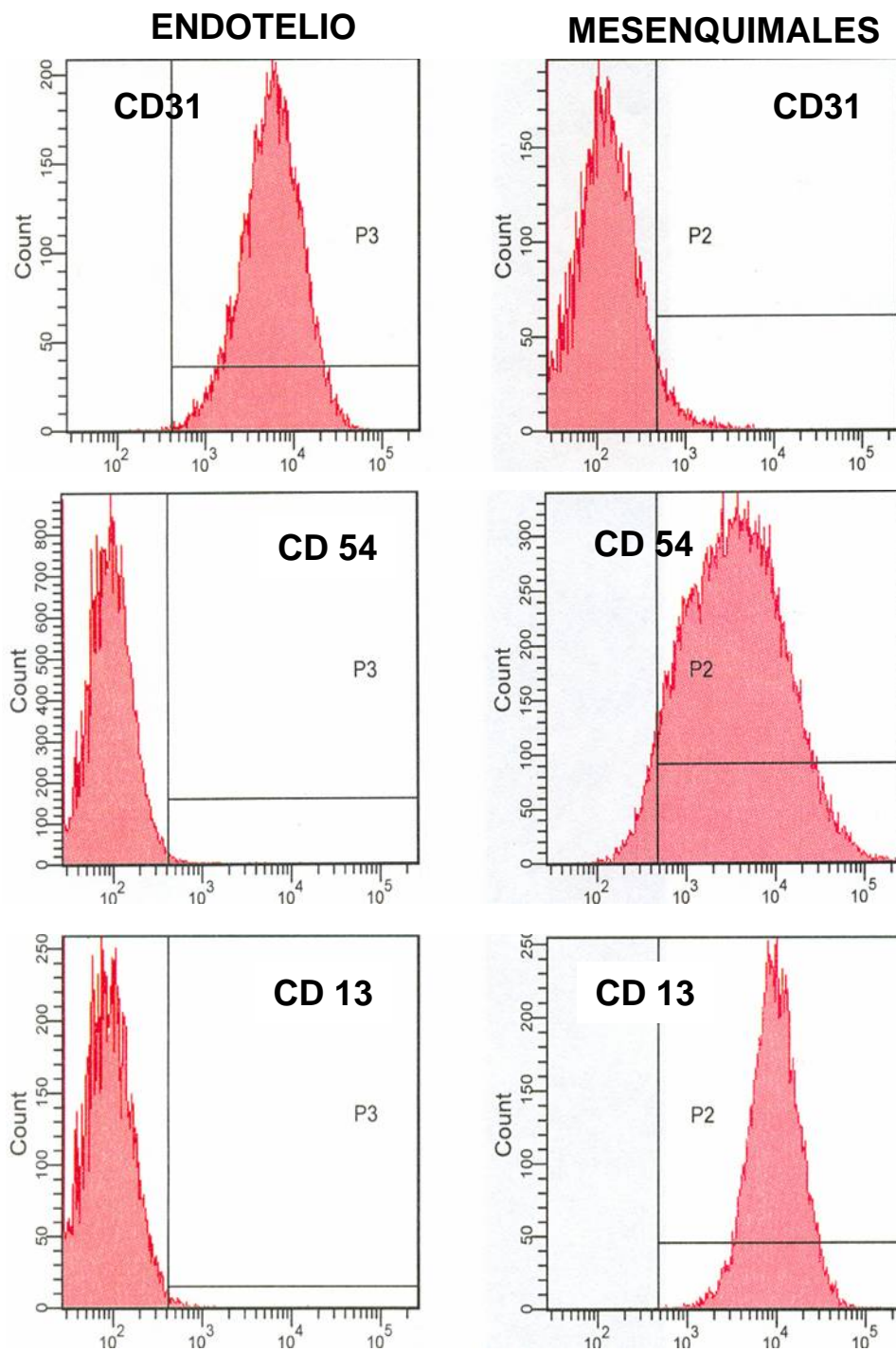


Figura 8. Caracterización de los cultivos celulares primarios. Representación gráfica de la citometría de flujo en las poblaciones celulares (HUVEC columna izquierda y mesenquimales de cordón umbilical columna derecha) marcadas con diferentes anticuerpos (específicos para endotelio CD31 y para células mesenquimales CD54, CD13). Los picos hacia la izquierda del recuadro indican tinción negativa y los picos hacia la derecha representan tinción positiva.

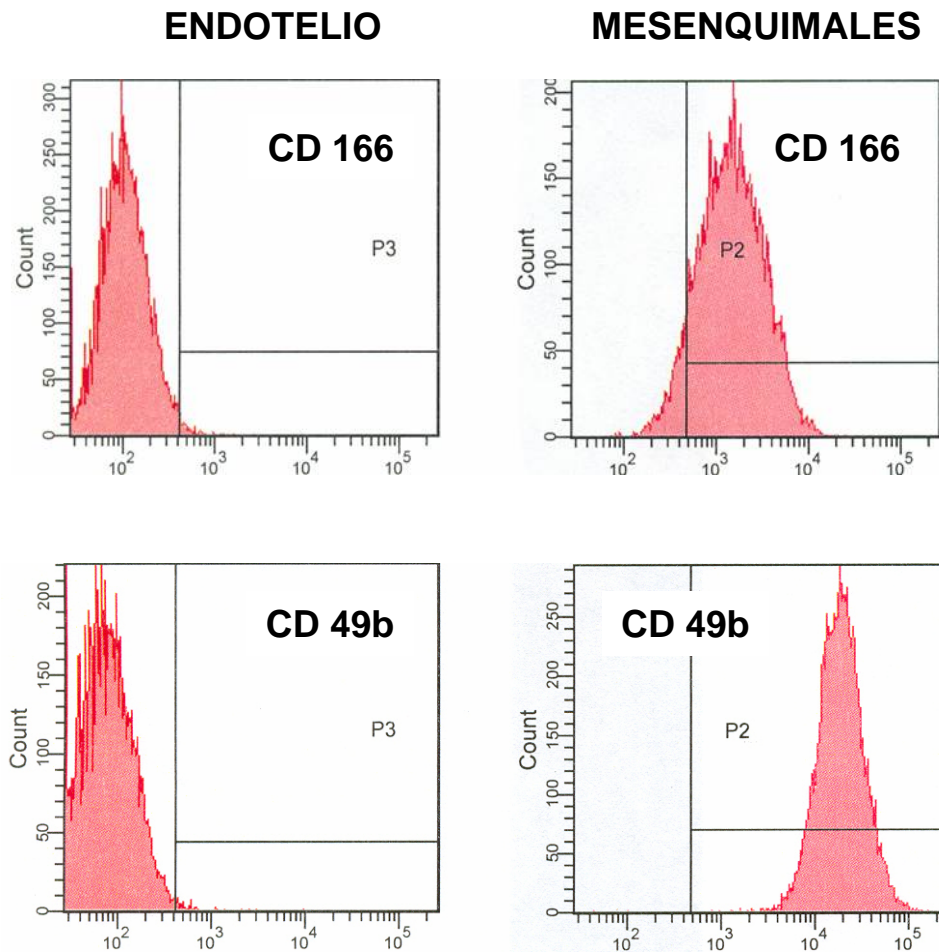


Figura 9. Caracterización de los cultivos celulares primarios. Representación gráfica de la citometría de flujo en las poblaciones celulares (HUVEC columna izquierda y mesenquimales de cordón umbilical columna derecha) marcadas con diferentes anticuerpos (específicos para las células mesenquimales de cordón umbilical CD166, CD49b). Los picos hacia la izquierda del recuadro indican tinción negativa y los picos hacia la derecha representan tinción positiva.

9.2 UTROFINA SG- ϵ , DG- β , CAV-1 Y eNOS COMPONEN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A UTROFINA DE HUVEC.

En un estudio previo propusimos que en el endotelio de vasos del cordón umbilical existe un complejo de proteínas asociadas a utrofina que se puede constituir por utrofina, SG- ϵ , DG- β y caveolina-1 (69). Para establecer si estas proteínas en realidad forman un complejo en las HUVEC, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación en extractos de proteína total de HUVEC en cultivo (Figura 10). Los extractos de proteína total (E) y las proteínas coimmunoprecipitadas (IP) con los anticuerpos anti-caveolina-1 o anti-utrofina fueron analizados por medio de ensayos de Western blot usando anticuerpos específicos contra las proteínas utrofina, eNOS, SG- ϵ , DG- β y caveolina-1. Estos resultados confirman que en las HUVEC existe un UAPC conformado por lo menos de utrofina, eNOS, SG- ϵ , DG- β y cav-1 (Figura 10).

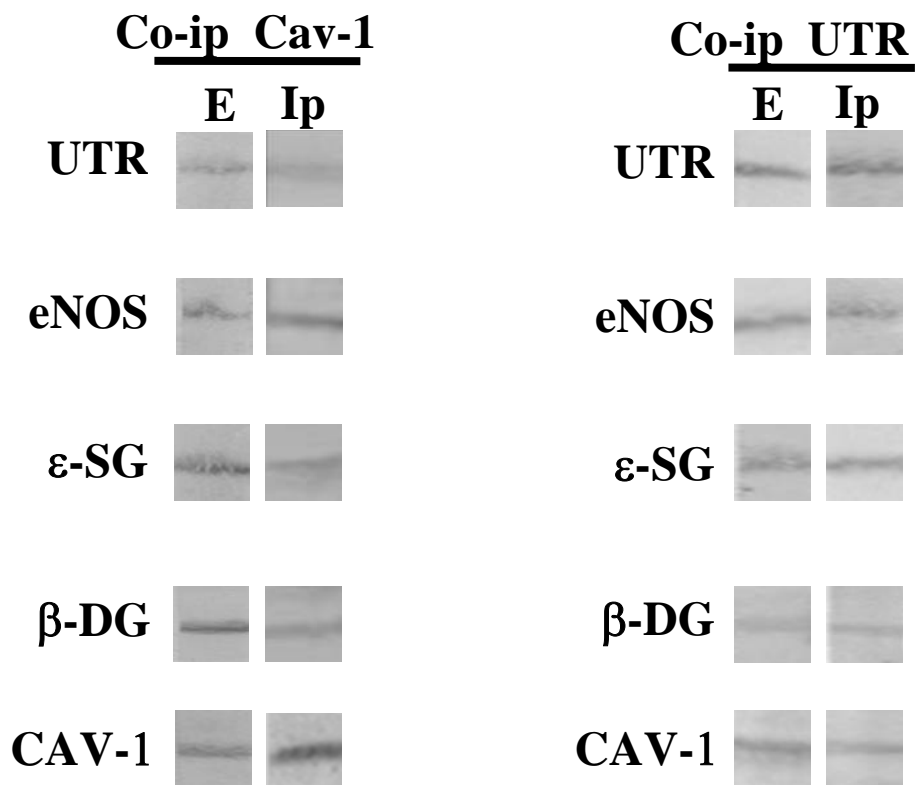


Figura 10. Composición del complejo de proteínas asociadas a utrofina en HUVEC. Ensayos de Western blot en extractos de proteínas totales (E), así como de proteínas co-inmunoprecipitadas (Ip) con anticuerpos anti caveolina-1 (cav-1) o anti-utrofina (UTR). Estos experimentos se repitieron 5 veces, obteniéndose resultados semejantes a los mostrados.

9.3 EXPRESION DE ALGUNOS DE LOS TRANSCRITOS DEL UAPC EN HUVEC.

Debido a que las células endoteliales se encuentran constantemente sometidas a fuerzas hemodinámicas, en el presente estudio decidimos imitar este estímulo fisiológico de los vasos sanguíneos con un sistema de estiramiento equibiaxial (81) donde las HUVEC fueron cultivadas. Esta herramienta mecánica ejerce una fuerza de estiramiento simultánea en todas direcciones sobre las células cultivadas dentro de él.

Las células endoteliales se cultivaron en el sistema de estiramiento y se les dejó estabilizar dentro del mismo durante 24 hrs. Posteriormente se procedió a realizar RT-PCR a partir de mRNAs obtenidos de las HUVEC estimuladas mecánicamente durante diferentes tiempos 0 (estado basal), 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 hrs, aplicando una fuerza de aproximadamente 1.4 N/cm^2 . Los niveles de estiramiento fueron elegidos por estar dentro de los intervalos fisiológicos vasculares (76). Dichas cinéticas temporales se realizaron con la finalidad de conocer en cual de los diferentes tiempos de estiramiento se obtiene un cambio más significativo en el nivel de expresión de algunos de los miembros del UAPC, comparándolas con las células no estiradas.

El tiempo de estiramiento que mostró un cambio más drástico en el nivel de expresión de los transcritos de los SG's (Figuras 11A y 11B) y eNOS (Figura 12A y 12B) fue de 8 hrs, mostrándose incrementos importantes en los niveles de expresión de los SG's β , δ y ϵ con aumentos de 1.4, 0.6, 0.8 veces respectivamente, mientras que el transcrito de SSPN no evidenció cambio en su

nivel de expresión en ninguno de los tiempos (Figuras 11A y 11B). Por su parte el transcrito de eNOS mostró un importante incremento en su nivel de expresión siendo este de 1.7 veces más con respecto al estado basal (Figuras 12A y 12B).

Algo importante de mencionar es que se detectaron los transcritos de los SG's β , δ y sarcospan; sin embargo, las proteínas de estos genes no se detectaron en los ensayos de Western blot (dato no mostrado).

Tomando en cuenta el mayor incremento en el nivel de expresión de algunos de los transcritos del UAPC a las 8 horas de estímulo mecánico, decidimos realizar todos los ensayos posteriores con este tiempo de estiramiento.

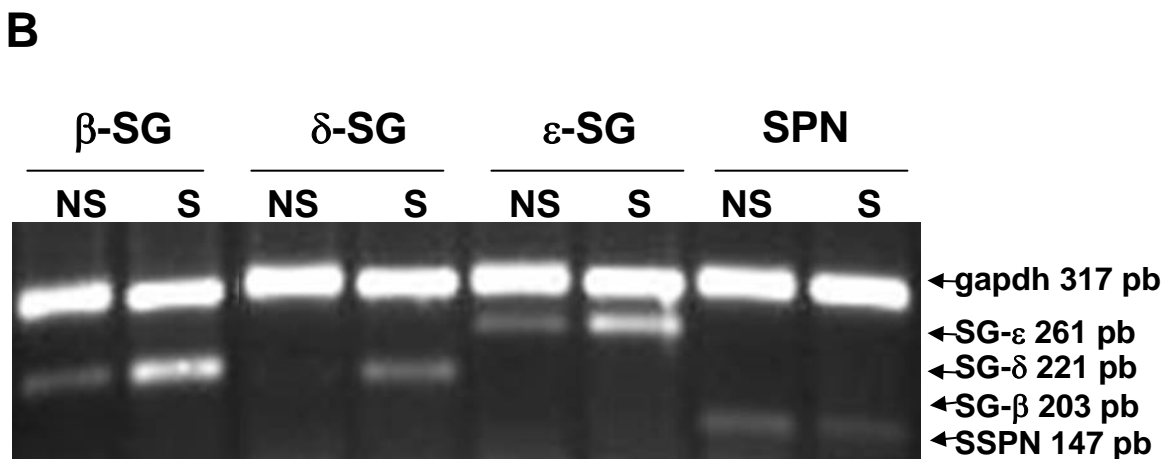
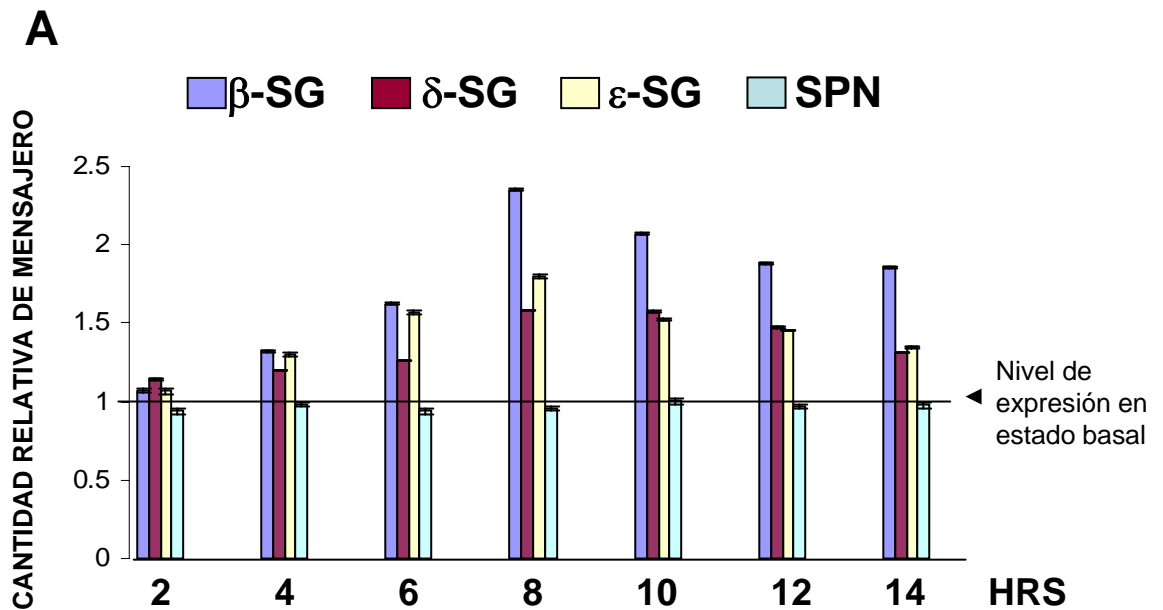


Figura 11 Expresión de los transcritos del CSG-SSPN en HUVEC sometidas y no sometidas a estiramiento. Análisis de la expresión por RT-PCR de algunos miembros del UAPC en HUVEC estimuladas mecánicamente. Representación gráfica de los niveles de expresión relativa de los transcritos de los SG's en diferentes tiempos, con 1.4 N/cm² de fuerza de estiramiento (A) y corrimiento electroforético en gel de agarosa de los transcritos de los SG's y GAPDH (317 pb) a 8 hrs con 1.4 N/cm² de fuerza de estiramiento (S) y en estado basal (NS) (B). Estos experimentos fueron repetidos 8 veces, obteniéndose resultados semejantes.

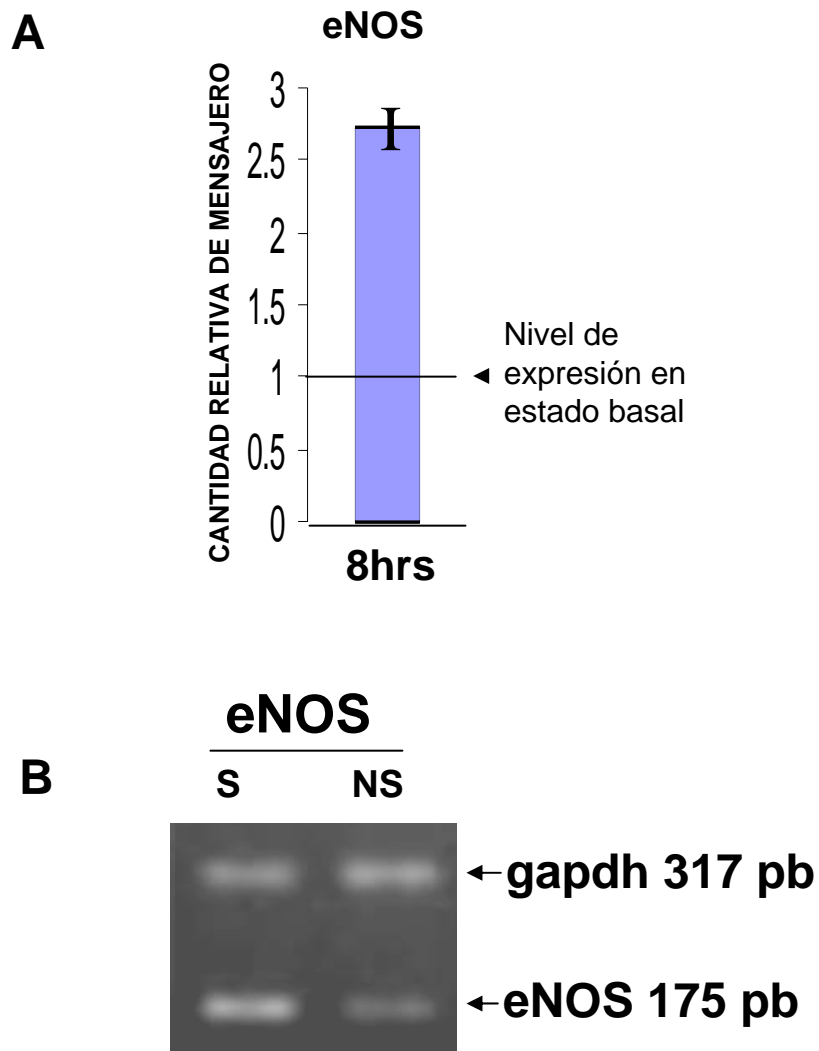


Figura 12. Análisis de la expresión por RT-PCR de eNOS en HUVEC estimuladas mecánicamente. Representación gráfica del nivel de expresión relativa del transcrito de eNOS durante 8 hrs de estiramiento con 1.4 N/cm² de fuerza (A) y corrimiento electroforético en gel de agarosa del transcrito de eNOS 175 pb y GAPDH como control endógeno 317 pb, bajo las mismas condiciones de estímulo mecánico (8 hrs con 1.4 N/cm² de fuerza de estiramiento (S) y en estado basal (NS)) (B). Los experimentos fueron realizados tres veces.

9.4 EL ESTIRAMIENTO SOBRE LAS HUVEC INDUCE UN INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL UAPC.

Debido a la evidente sobre-expresión del transcrito de eNOS y de SG- ϵ en respuesta al estímulo mecánico sobre las HUVEC, decidimos evaluar un posible incremento en sus productos proteicos, así como el posible incremento en el nivel de expresión de algunas otras proteínas pertenecientes al UAPC de HUVEC sometidas a estiramiento. De tal forma que se analizaron por medio de Western blot semicuantitativo las proteínas utrofina, eNOS, SG- ϵ , DG- β y caveolina-1, tanto en HUVEC estiradas como en no estiradas (Figura 13 A).

Nuestros resultados demuestran que todas las proteínas pertenecientes al UAPC analizadas presentan incremento en su nivel de expresión en las HUVEC estiradas con respecto al estado basal. Es así que la utrofina presenta un incremento de 0.3 veces, DG- β 0.39 veces, caveolina-1 0.8 veces y SG- ϵ 0.8 veces (Figura 13 B).

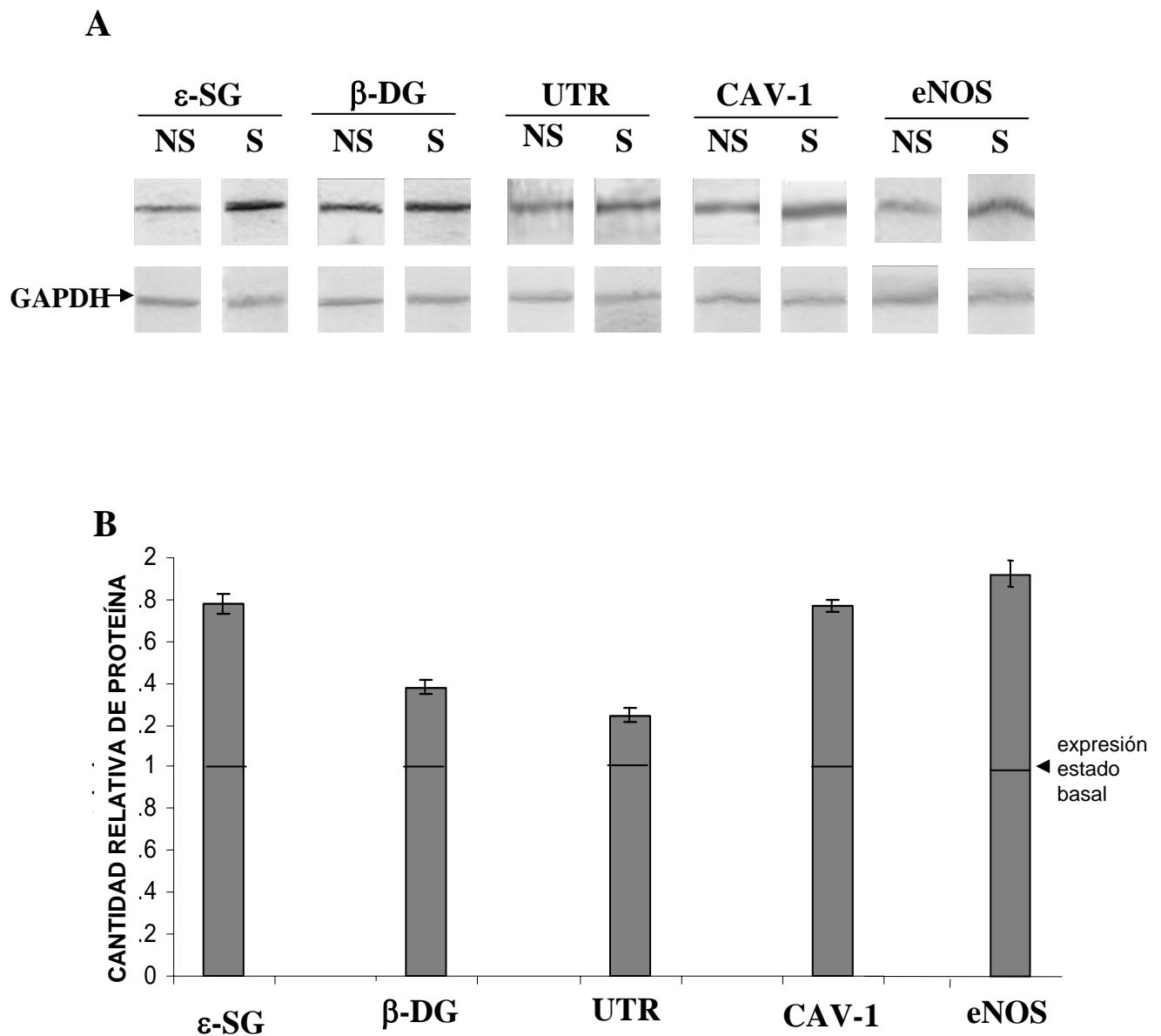


Figura 13. El estiramiento sobre las HUVEC induce la sobreexpresión de las proteínas del UAPC. Western Blot semicuantitativo de ϵ -SG, β -DG, UTR, cav-1, eNOS y GAPDH en proteínas totales de HUVEC no estiradas (NS) y estiradas 8-h (S) con 1.4 N/cm² de fuerza de estiramiento (A). Valores densitometricos del Western blot semicuantitativo en HUVEC estiradas (S) y no estiradas (NS) [(proteína/GAPDH S)/(proteína/GAPDH NS)] (B). Los experimentos fueron repetidos 5 veces.

9.5 COMPOSICIÓN DEL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A UTROFINA EN HUVEC SOMETIDAS A ESTIMULO MECÁNICO

Extractos de proteína total de HUVEC estiradas y no estiradas fueron co-inmunoprecipitados con anticuerpos contra caveolina-1 o contra utrofina (Figura 14). Una vez realizadas las co-inmunoprecipitaciones, las proteínas precipitadas así como también las proteínas totales se analizaron por medio de Western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra las proteínas utrofina, eNOS, SG- ϵ , DG- β y caveolina-1. Por medio de estos experimentos se determinó que la composición del UAPC fue la misma entre HUVEC estiradas y no estiradas (Figura 14 paneles NS y S, carril Ip). Sin embargo, observamos una aparente reducción en la cantidad de eNOS inmunoprecipitada de las HUVEC sometidas a estímulo mecánico (Figura 14 panel S, carril Ip), en comparación con la cantidad de eNOS detectada en la fracción inmunoprecipitada de las HUVEC no estiradas (Figura 14 panel NS, carril Ip). En el Western blot realizado para la detección de eNOS, se utilizó un anticuerpo que reconoce de manera indistinta la forma fosforilada y no fosforilada de la enzima y tomando como base el antecedente de que la activación (fosforilación) de la proteína, se relaciona con la liberación de su anclaje se valoró esta posibilidad.

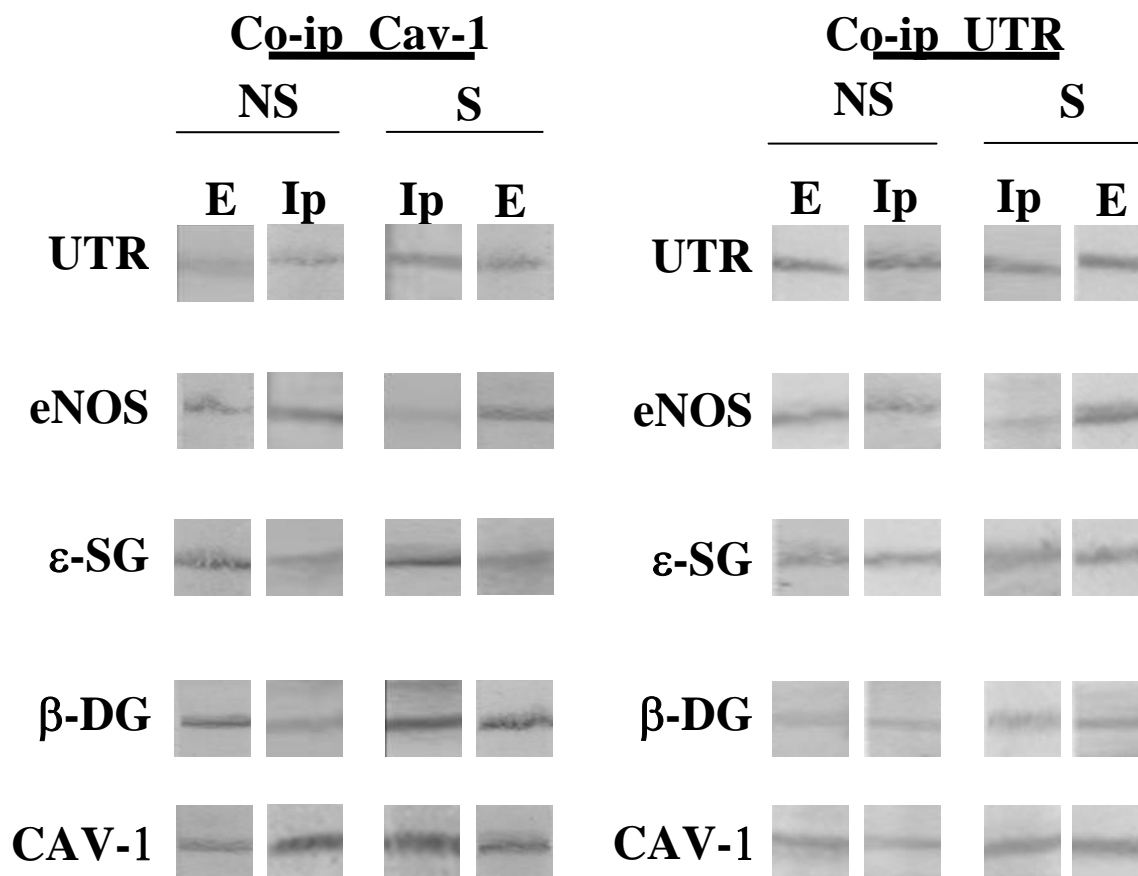


Figura 14. Composición del complejo de proteínas asociadas a utrofina en HUVEC no estiradas y estiradas. Western blot para UTR, eNOS, ϵ -SG, β -DG y caveolina-1 en proteínas totales (E) y co-inmunoprecipitadas (Ip) con anticuerpos anti cav-1 o anti-utrofina (UTR), de HUVEC no estiradas (NS) y estiradas 8 hrs (S) con 1.4 N/cm² de fuerza . Los experimentos se realizaron 5 veces.

9.6 ACTIVACIÓN Y LIBERACIÓN DE eNOS DEL UAPC DE HUVEC SOMETIDAS A ESTIRAMIENTO.

Como se mencionó en el apartado anterior, los ensayos de co-inmunoprecipitación que demuestran la asociación de eNOS con el UAPC endotelial fueron realizados con un anticuerpo que detecta indistintamente la forma fosforilada y no fosforilada de la proteína; en un estudio posterior, además del anticuerpo mencionado, realizamos el Western blot para la eNOS empleando un anticuerpo que discrimina entre la forma fosforilada y no fosforilada de la enzima (eNOS^P) (Figura 15 A y 15 B).

Observamos que en los Western blot realizados con ambos anticuerpos, obtuvimos un incremento en la eNOS de la fracción del sobrenadante derivada de las co-inmunoprecipitaciones de las HUVEC sometidas a estímulo mecánico (15 A y 15 B panel S, carril SN). De manera paralela, los ensayos de co-inmunoprecipitación con el anti cav-1 o con el anti UTR, revelaron que la cantidad de eNOS asociada al complejo disminuyó después del estiramiento sobre las HUVEC, aunque esta diferencia es más evidente cuando se co-inmunoprecipita con anti cav-1 (comparativamente carriles Ip de la Figura 15 A y 15 B). Estos resultados en su conjunto sugieren que el estímulo mecánico aplicado sobre las HUVEC induce la liberación de eNOS del UAPC. Adicionalmente la forma fosforilada de eNOS (eNOS^P) se vió incrementada en el sobrenadante (Sn) de las HUVEC estiradas (S) (Figura 15 A y 15 B panel S carril Sn) con respecto a las HUVEC no estiradas (Figura 15 A y 15 B panel NS carril Sn). Estos resultados sugieren que el estímulo mecánico libera y activa la sintasa de óxido nítrico.

De manera adicional, fue de interés para nosotros determinar si el incremento en la fosforilación de eNOS conduce a su vez a un incremento en la producción de óxido nítrico (ON), segundo mensajero producido por la sintasa, de tal forma que se midió de forma indirecta, por medio del método de Greiss, la concentración de esta molécula en el sobrenadante de las HUVEC en cultivo, antes y después del estímulo mecánico. Con esta medición se observó un incremento por arriba de 6 veces en la producción de ON en las HUVEC sometidas a estímulo mecánico, en comparación con los niveles basales determinados en HUVEC que no fueron sometidas a estiramiento (Figura 16). Como control positivo de estos ensayos se utilizaron sobrenadantes de HUVEC que fueron estimuladas de manera química con bradicinina; bajo esta condición se observaron incrementos en los niveles de ON de 3 veces con respecto a la basal (Figura 16). Estos resultados en su conjunto demuestran que el estímulo mecánico no solo libera la eNOS del UAPC sino que también conduce a su activación.

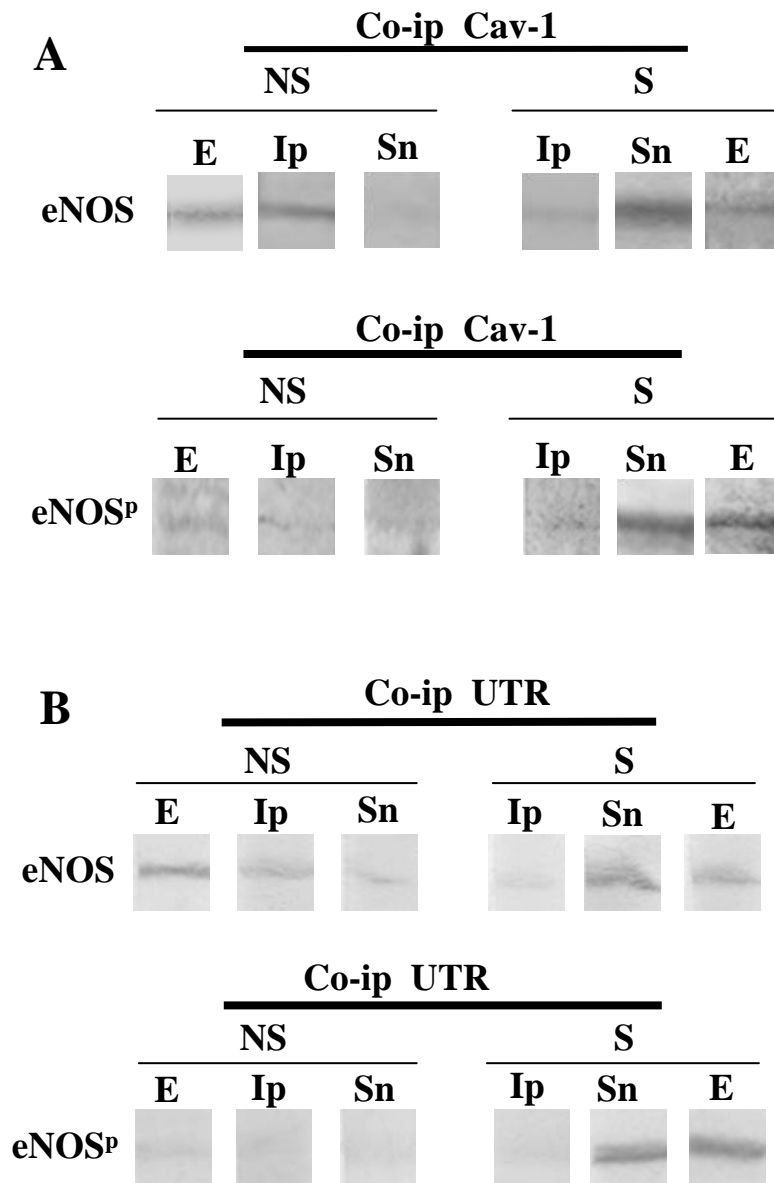


Figura 15. Activación y liberación de eNOS del UAPC de HUVEC estiradas. Western blot para eNOS con anticuerpos para la forma fosforilada y no fosforilada de la enzima y solo para la forma fosforilada de la misma (eNOS^p). Proteínas totales (E), co-inmunoprecipitadas (Ip) con anti cav-1 (A) o con anti UTR (B) y sobrenadantes (Sn) de HUVEC no estiradas (NS) y estiradas (S).

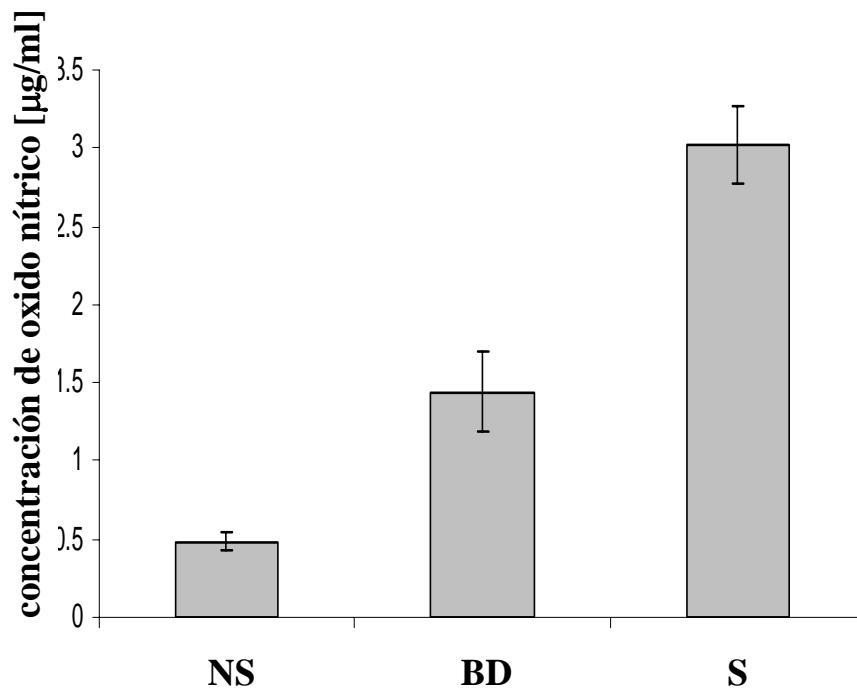


Figura 16. Producción de óxido nítrico en HUVEC bajo diferentes condiciones. Concentración de óxido nítrico en HUVEC no estiradas (NS), estimuladas con bradicinina (BD) y sometidas a estímulo mecánico (S). Los experimentos se repitieron 5 veces.

CAPITULO 10.

DISCUSIÓN

El DAPC/UAPC es un grupo de proteínas de membrana y de citoesqueleto que une a la matriz extracelular con el medio intracelular. Este complejo de proteínas fue descrito originalmente en músculo esquelético, donde se constituye por las proteínas distrofina o utrofina además de sintrofinas, distrobrevinas y los subcomplejos distroglicano y sarcoglicano-sarcospan (85).

Recientemente, varios estudios han demostrado la importancia del DAPC/UAPC en la aparición de la cardiopatía dilatada y en el funcionamiento del tejido vascular (85, 86, 67); sin embargo, existe un conocimiento muy restringido sobre el DAPC/UAPC en células endoteliales. Algunos reportes han demostrado la presencia individual de algunos miembros del complejo como β -DG en células endoteliales de aorta de bovino (87, 88) y se ha reportado la presencia de utrofina en células endoteliales de diversos vasos de ratones (4, 5). En un estudio previo en células endoteliales de vasos de cordón umbilical *in situ*, propusimos la presencia de un complejo de proteínas asociadas a utrofina conformado por β -DG, ϵ -SG y caveolina-1 (69). Para contribuir con el desarrollo del conocimiento de la función del UAPC en tejido vascular humano, en el trabajo aquí presentado se analizó, mediante co-inmunoprecipitaciones en extractos de proteína total derivadas de HUVEC, la composición de dicho complejo.

A partir del estudio se observó que hay una asociación de utrofina con β -DG, ϵ -SG y caveolina-1. También demostramos la interacción, en esta co-inmunoprecipitación, de la eNOS en su forma no fosforilada. Este hallazgo es

importante puesto que es la primera vez que se describe un complejo de proteínas asociadas a utrofina que a su vez se asocia a caveolina-1 y por lo tanto, a caveolas. En las células endoteliales, la caveolina-1 es la principal proteína de las caveolas (1, 89) y funciona como un regulador importante de la actividad de una gran diversidad de moléculas de señalización que incluyen a la eNOS (90).

Diversos estudios han hecho evidente, en el músculo estriado, que la sintasa de óxido neuronal (nNOS) se encuentra expresada de manera abundante. En este tejido la nNOS se encuentra asociada con el DAPC/UAPC por medio de su unión con el dominio PDZ de la proteína α -sintrofina. Se ha propuesto que el óxido nítrico producido por la nNOS de músculo esquelético sometido a estrés mecánico regula el flujo sanguíneo por medio de su difusión, desde las fibras de músculo esquelético hasta los microvasos más próximos donde es responsable de disminuir la vasoconstricción (42, 91).

La evidencia anterior respalda de manera importante los resultados de este trabajo, ya que deja claro la importancia que tiene el DAPC/UAPC en la regulación de la actividad de una molécula de señalización tan relevante en la fisiología vascular como lo es la eNOS.

Las células endoteliales se encuentran sujetas a deformaciones físicas por dos principales tipos de fuerzas mecánicas: "shear stress" o roce laminar y estiramiento multidireccional (92). Estos estímulos biomecánicos pueden ser percibidos por la caveola (93). Por lo tanto, para nosotros fue importante determinar si el UAPC responde a estímulos mecánicos. Para evaluar esta hipótesis, cultivamos HUVEC bajo condiciones de estiramiento equibiaxial en un

sistema que imita el proceso de estiramiento hemodinámico multidireccional en los vasos dilatados.

Observamos que este estímulo induce la sobre expresión y la activación de eNOS, lo cual se relaciona directamente con la fosforilación de la serina 1177 y con su liberación del UAPC. Estos resultados concuerdan con la información de que eNOS es anclada e inhibida por el dominio de anclaje de la caveolina-1 bajo condiciones basales (94), regulando de esta manera su actividad enzimática (95). Otros reportes indican que cuando las células endoteliales son estimuladas por medio de flujo laminar, la eNOS se activa por medio de fosforilación en la serina 1177 y liberada de la caveola (96).

De igual forma, varios reportes recientes han determinado que la sobre expresión de eNOS después del estímulo mecánico, incrementa la producción de ON y mejora la función endotelial (97). En este sentido y basado en nuestros resultados, nosotros postulamos que el UAPC puede poseer la función de sensor de estímulos mecánicos en el endotelio.

Adicionalmente, nosotros creemos que el incremento en la concentración de óxido nítrico en nuestro sistema va de la mano con el incremento en la síntesis de eNOS a nivel de proteína y con su fosforilación en el residuo serina1177, contribuyendo de esta forma a un incremento en la actividad enzimática de eNOS inducida por el estímulo mecánico.

También observamos que en respuesta al estímulo mecánico existe un incremento en relación uno a uno entre eNOS y cav-1. Esto lo interpretamos como un incremento en este complejo dual de proteínas y consecuentemente, como la

presencia de más complejo mecanosensor sobre la membrana endotelial lo cual conlleva a su vez, a un incremento en la síntesis de óxido nítrico (Figura 17).

Por mucho tiempo se ha sabido que los cambios agudos en la presión o en el flujo laminar sobre el endotelio inducen una rápida liberación de óxido nítrico que da como resultado la vasodilatación (98). Adicionalmente, se ha reportado que el incremento en el flujo laminar y la presión *in situ* activan rápidamente la eNOS caveolar con la aparente disociación de la eNOS de la cav-1 y su asociación con calmodulina (99). Esto correlaciona con los resultados del presente trabajo donde se encuentra un considerable incremento de óxido nítrico en respuesta al estiramiento mecánico.

Además de la sobre-expresión de eNOS, el estímulo mecánico también induce el incremento en la síntesis de las proteínas utrofina, β -DG, ϵ -SG y caveolina-1.

Aunque varios reportes indican que la sobre-expresión de caveolina-1 disminuye marcadamente la actividad enzimática de eNOS (94, 100), en este estudio nosotros observamos que la sobre expresión de eNOS y cav-1 se encuentra acompañada por el aumento en la actividad enzimática de eNOS.

El incremento en la cantidad de cav-1 en las HUVEC estimuladas mecánicamente puede estar relacionado al incremento en la densidad de caveolas en la membrana (93) y con la participación de la caveolina-1 en el reclutamiento de diversas moléculas de señalización involucradas en respuestas celulares, tales como integración de adhesiones focales desencadenadas por el estrés mecánico (101).

En el caso del β -DG y el ε -SG nosotros sugerimos que su incremento puede estar relacionado con la participación de estas proteínas en diferentes procesos celulares y/o diferentes complejos de proteínas. Esto lo sugerimos debido a que previamente observamos una colocación parcial de estas proteínas con caveolina-1 (69, Ramírez-Sánchez I datos no publicados).

Algo interesante de mencionar es que se ha reportado en el endotelio que el nivel de transcripción de algunos genes se incrementa como consecuencia del aumento en la concentración de óxido nítrico (102) o de Ca^{2+} (103), ambos inducidos por el estrés mecánico. También observamos que el estrés mecánico promueve un incremento moderado en el nivel de expresión de los transcritos del β -SG, δ -SG y ε -SG. Este tipo de activaciones comúnmente ocurren en genes cuyos promotores presentan sitios de unión a factores de transcripción que son activados por el calcio o por el óxido nítrico, segundos mensajeros que tienden a incrementar su concentración en el interior de la célula endotelial durante procesos de estrés mecánico (104). Sin embargo, en este contexto no detectamos a nivel de proteína β -SG y δ -SG, esto sugiere la existencia de un proceso de regulación postranscripcional para estos genes. Nuestros resultados confirman las observaciones previas que indican que los β -SG y δ -SG a nivel de proteína no se encuentran en células endoteliales (69).

Estos datos en su conjunto indican que el UAPC tiene un papel fundamental en la mecanopercepción y en el desencadenamiento de la respuesta intracelular endotelial mediada por eNOS.

CAPITULO 11

CONCLUSIONES.

Los resultados de este trabajo proporcionan evidencia de la presencia de un UAPC en HUVEC, conformado por utrofina, β -DG, ϵ -SG eNOS y caveolina-1.

Debido a la asociación que presenta el UAPC con caveolina-1, nosotros proponemos que este complejo de proteínas se localiza en los dominios membranales de señalización conocidos como caveolas.

También proponemos que el complejo puede funcionar como un mecanosensor que contribuye al proceso de regulación del tono vascular a través de la liberación y activación de la enzima eNOS (Figura 17).

El entendimiento del control en la producción de óxido nítrico y algunas de las funciones reguladas por esta molécula transductora de señales en el sistema vascular por medio de los mecanosensores caveolares, podría dirigir la implementación de estrategias terapéuticas farmacológicas y genéticas, para prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

A

NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL UAPC EN HUVEC SOMETIDAS A ESTIRAMIENTO					
	CAV-1	ϵ -SG	β -DG	UTR	eNOS
BASAL	+	+	+	+	+
ESTIRADAS	+++	+++	++	++	+++

B

INCREMENTO EN LAS CAVEOLAS ENDOTELIALES DESPUES DEL ESTIMULO MECÁNICO, ACTIVACIÓN Y LIBERACIÓN DE eNOS

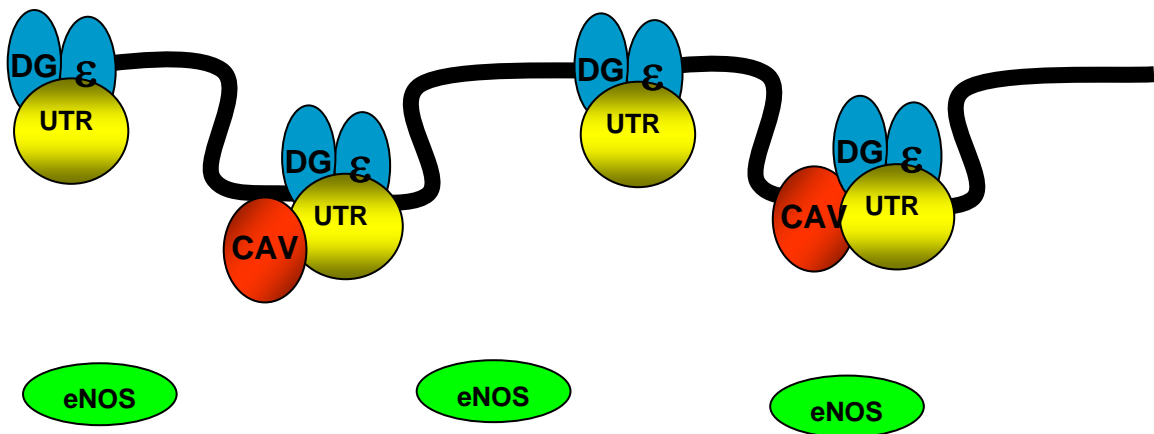


Figura 17. Conclusiones. A. Incremento relativo en las proteínas del UAPC. B. Representación gráfica del incremento en el número de caveolas endoteliales posterior al estímulo mecánico.

CAPITULO 12

PERSPECTIVAS

El análisis de los resultados de las co-inmunoprecipitaciones en HUVEC no estimuladas demuestra que, cuando el ensayo se realiza utilizando el anticuerpo contra la caveolina-1, en el Western blot del inmunoprecipitado se logra apreciar una cantidad disminuida de las proteínas utrofina, ϵ -SG y β -DG en comparación con lo que se observa en el Western blot del inmunoprecipitado con el anticuerpo contra utrofina. En este último ensayo se puede observar una cantidad más elevada de las proteínas utrofina, ϵ -SG y β -DG y una disminución en la cantidad de caveolina-1.

Los contrastes observados en las cantidades de proteínas utrofina, ϵ -SG y β -DG en las diferentes co-inmunoprecipitaciones nos indican que estas proteínas no precipitan en su totalidad con la caveolina-1, por lo cual esta evidencia nos sugiere que utrofina, ϵ -SG y β -DG podrían localizarse en porciones membranales diferentes a la caveola.

Nosotros hemos comenzado a explorar esta posibilidad, por un lado analizando de manera independiente el contenido de UAPC en las caveolas y las balsas lipídicas que forman parte de los dominios de señalización conocidos como DRM's (dominios de membrana resistentes a detergentes), y por otro lado analizando el contenido de UAPC en fracciones membranales que carecen de DMR's (Figura 18).

Esta posibilidad nos daría evidencia importante de la participación del UAPC en la señalización por su presencia en dominios especializados, así como su parte en la

organización estructural por asociación en matriz-citoesqueleto, en la célula endotelial.

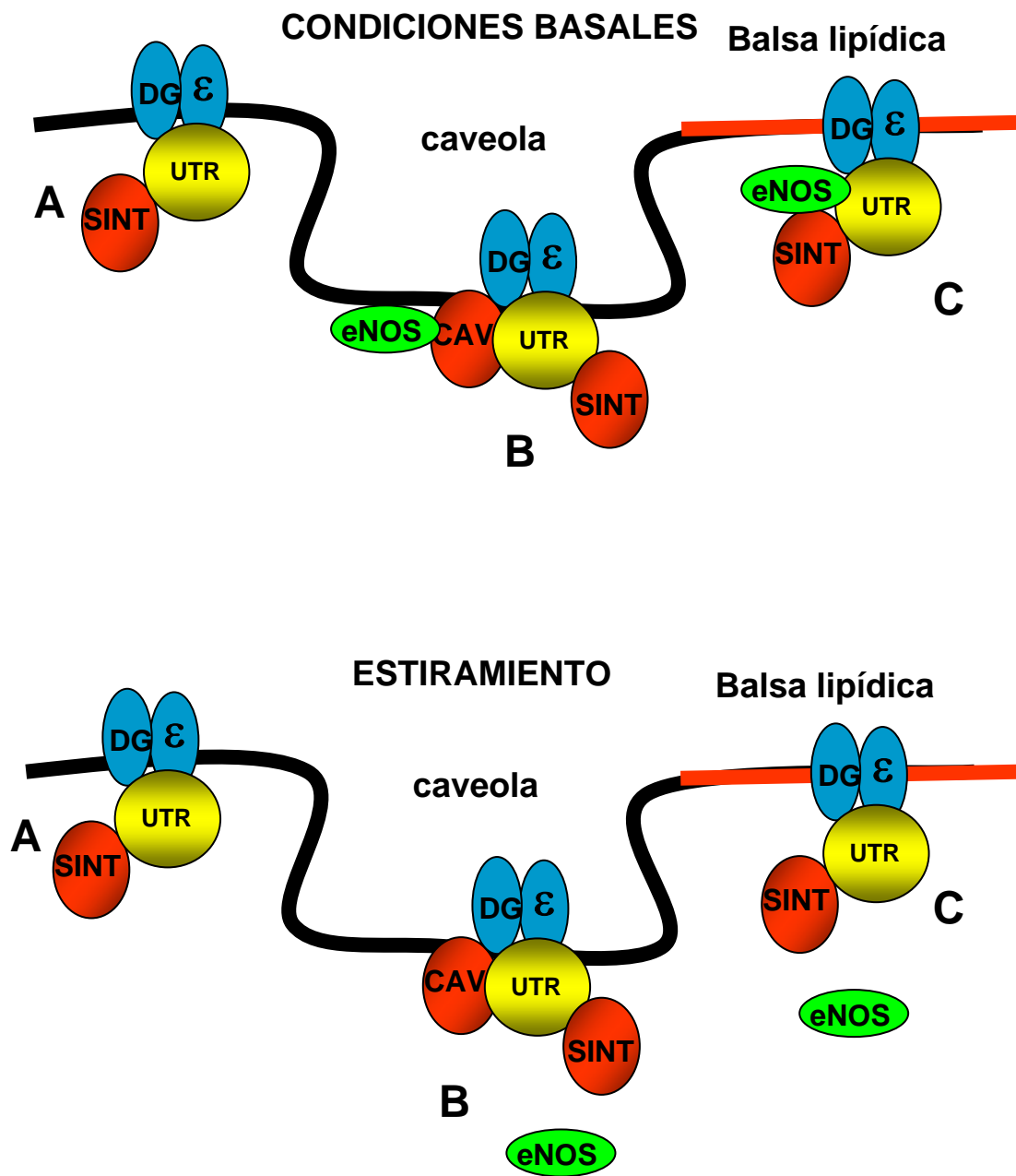


Figura 18. Perspectivas. Representación esquemática de los diversos UAPC endoteliales A, membranal, B, membrana de caveola, C, membrana de balsa lipídica, en condiciones basales y de estiramiento.

CAPITULO 13

REFERENCIAS.

- 1.- Rando, TA (2001) The dystrophin glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* 24:1575-1594.
- 2.- Estrada FJ, Mornet D, Rosas-Vargas H, Angulo A, Hernandez M, Becker V, Rendon A, Ramos-Kuri M, and Coral-Vazquez RM. (2006) A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 17;340:865-871
- 3.- Campbell KP. (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679
- 4.- Blake DJ, Weir A, Newey SE, and Davies KE. (2002) Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82:291-329
- 5.- Khurana TS, Davies KE (2003) Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov* 5:379-390
- 6.- Towbin, JA (1998) The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10:131-139
- 7.- 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.* 45:751-762.
- 8.- Rentschler S, Linn H, Deininger K, Bedford MT, Espanel X, Sudol M (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with β -dystroglycan. *Biol Chem.* 380:431-442.

- 9.- Davies KE, Nowak KJ (2006) Molecular mechanism of muscular dystrophies: old and new players. *Nat, Rev. Mol. Cell Biol.* 10:762-773.
- 10.- Albrecht DE, Froehner SC (2002) Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals* 3:123-129.
- 11.- Ahmed Abdelmoity, Roanna C. Padre, Kimberley E. Burzynski, James T. Stull, Kim S. Lau (2000) Neuronal nitric oxide synthase localizes through multiple structural motifs to the sarcolemma in mouse myotubes. *FEBS Letters* 482: 65-70.
- 12.- Segal SS, Brett SE, Sessa WC (1999) Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters. *Am J Physiol.* 277:H1167-H1177.
- 13.- Muntoni, F, Brockington, M; Torelli, S; Brown, SC (2004) Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies *Curr Opin Neurol.* 17:205-209.
- 14.- Sciandra, F, Bozzi, M, Bianchi, M, Pavini, E, Giardina, B, Brancaccio, A (2003) Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita,* 39,2:173-181.
- 15.- Chiba, A, Matsumura, K, Yamada, H, Inazu, T, Shimizu, T, Kusunoki, S, Kanazawa, I, Kobata, A, Endo, T. (1997) Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J. Biol. Chem.* 272:2156-2162.
- 16.- Winder, S. (2001) The complexities of dystroglycan. *Trends. Biochem. Sci.* 26 2: 118-124.

- 17.- James, M, Nuttall, A, Ilesley, JL, Ottersbach, K, Tinsley, JM, Sudol, M, Winder, SJ. (2000) Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J. Cell. Sci.* 113:1717-1726.
- 18.- Sotgia, F, Lee, H, Bedford, MT, Petrucci, T, Sudol, M, Lisanti, MP (2001) Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry.* 40:14585-14592.
- 19.- Liu LA, Engvall E (1999) Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 274: 38171–38176.
- 20.- Lavidor KA, Kakkar R, McNally EM. (2004) The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 30;94:1023-1031.
- 21.- 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.* 45:751-762.
- 22.- Ohlendieck, R (1996) Towards an understanding of the dystrophin-glycoprotein complex: linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibres *Eur. J. Cell. Biol.* 69:1-10.
- 23.- Ettinger, AJ, Feng, G, Sanes, JR (1997) Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.* 272:32534-32538.
- 24.- Barresi R, Moore SA, Stolle A, Mendell R, Campbell KP (2000) Expression of γ -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J. Biol. Chem.* 275:38554-38560.

- 25.- Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Ozawa E (2000) A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum Mol Genet.* 2000 Dec 12;9:3091-3100.
- 26.- Hack, AA, Groh, M, McNally, EM (2000) Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Micros. Res. and Tech.* 48:167-180.
- 27.- Hart, KA, Hodgson, S, Walker, A, Cole, CG, Johnson, L, Dubowitz, V, Borrow, M (1987) DNA deletions in mild and severe Becker Muscular Dystrophy. *Hum. Genet.* 75:281-285.
- 28.- Hoffman, EP, Brown, RH, Kunkel, LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928.
- 29.- Berko, BA, Swift, M (1987) X-linked dilated cardiomyopathy. *N. Eng. J. Med.* 316:1186-1191.
- 30.- Towbin, JA, Bowles, NE (2002) The failing heart. *Nature* 415; 10:227-233.
- 31.- Towbin, JA, Hejtmancik, JF, Brink, P, Gelb, B, Zhu, XM, Chamberlain, JS, McCabe, ER (1993) X-linked dilated cardiomyopathy (XLCM): molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation.* 87:1854-1865.
- 32.- Ervasti JM, Campbell, KP (1993) A role of dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminina and actin. *J. Cell. Biol.* 122:809-823.
- 33.- Towbin, JA (1993) Molecular genetic Aspects of Cardiomyopathy. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 2492:285-320.
- 34.- Heydemann, A, Wheeler, MT, McNally, E. (2001) Cardiomyopathy in animal models of muscular dystrophy. *Curr. Opin. Cardiol.* 16:211-217.

- 35.- Ikeda, Y, Ross, J (2000) Models of dilated cardiomyopathy in the mouse and the hamster. *Curr. Opin. Cardiol.* 15:197:201.
- 36.- Guo, Y, Petrof, B, Hussain, S (2001) Expresión and localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle and Nerve* 24:1468-1475.
- 37.- Moll J, Barzaghi P, Lin, S, Bezakova, G, Lochmuller H, Engvall, E, Muller, U, Ruegg, MA. (2001) An agrin minigene rescues dystrophic symptoms in a mouse model for congenital muscular dystrophy. *Nature*;413:302-307.
- 38.- Brenman, JE, Chao, DS, Gee, SH, McGee AW, Craven, SE, Santillano, DR, Wu, Z, Huang, F, Xia, H, Peters, MF, Froehner, SC, Brent, DS (1996) Interaction of oxide nitric synthase with thwe postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell.* 84:757-767.
- 39.- Brenman, JE, Chao, DS, Xia, H, Aldape, K, Brent, DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscle dystrophy. *Cell.* 82:743-752.
- 40.- Chao, DS, Gorospe, JR, Brenman, JE, Rafael, JA, Peters, MF, Froehner, SC, Hoffman, EP, Chamberlain, JS, Bredt, DS. (1996) Selective loss of sarcolemmal nitric oxide syntase in Becker muscular dystrophy. *J. Exp. Med.* 184:609-618.
- 41.- Grozdanovic Z, Baumgarten HG (1999) Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex. *Histol Histopathol.* 14:243-256.
- 42.- Thomas GD, Shaul PW, Yuhanna IS, Froehner SC, Adams ME. (2003) Vasomodulation by skeletal muscle-derived nitric oxide requires syntrophin–

mediated sarcolemmal localization of neuronal nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 92:554–560

43.- Sander, M, Chavoshan, B, Harris, SA, Iannaccone, ST, Stull, JT, Thomas, GD, Victor RG. (2000) Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13818–13823.

44.- Thomas GD, Sander M, Lau KS, Huang PL, Stull JT, Victor RG. (1998) Impaired metabolic modulation of α -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15090–15095.

45.- Rando TA. (2001) The role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Techn. Microsc Res Tech.* 2001 Nov 15:223-235.

46.- Brune B, von Knethen A, Sandau KB. (1999) Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 6:969–975.

47.- Sciandra F, Gawlik KI, Brancaccio A, Durbeej M. (2007) Dystroglycan: a possible mediator for reducing congenital muscular dystrophy? *Trends. Biotechnol.* 25:262-268.

48.- Durbeej, M, Henry, MD, Campbell, KP. (1998) Dystroglycan in development and disease. *Curr.Opin. Cell. Biol.* 110:594-601.

49.- Muntoni, F, Brockington, M, Blake, DJ, Torelli, S, Brown, SC. (2002) Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet.* 360:1419-1421

50.- Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown, SC, Torelli, S, Benson, MA, Ponting, CP, Estournet, B, Romero, NB, Mercuri, E, Voit, T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni, F (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a

form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.* 69:1198—1209.

51.- Endo, T, Toda, T (2003) Glycosilation in Congenital Muscular Dystrophies. *Biol. Pharm. Bull.* 26:1641-1647.

52.- Brockington, M, Yuva, Y, Prandini, P, Brown, SC, Torelli, S, Benson, MA, Herrmann R., Anderson L. V., Bashir R., Burgunder J. M., Fallet, S, Romero, N, Fardeau, M, Straub V, Storey, G, Pollitt, C, Richard, I, Sewry, CA, Bushby, K, Voit, T, Blake, DJ, Muntoni, F. (2001) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum. Mol. Genet.* 10:2851-2859.

53.- Laval, SH, Bushby, MD (2004) Limb-Girdle muscular dystrophies – from genetics to molecular pathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 30:91-105.

54.- Wheeler, MT, Zarnegar, S, McNally, EM (2002) ζ -sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Gen.* 18:2147-2154.

55.- Tsubata, S, Bowles, KR, Vatta, M, Zintz, C, Titus, J, Muhonen, L, Bowles, NE, Towbin, JA (2000) Mutations in the human delta sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 106:655-662.

56.- Homburger, F, Baker, JR, Nixon, CW, Whitney, R (1962) Primary generalized polymyopathy and cardiac necrosis in a inbred line of Syrian hamsters. *Med. Exp.* 6:339-345.

57.- Nigro, V, Okazaki, Y, Belsito, A, Piluso, G, Matsuda, Y, Politano, I, Nigro, G, Ventura, C, Abbondanza, C, Molinari, AM, Acampora, D, Nishimura, M,

Hayashizaki, Y, Puca, GA. (1997) Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum. Mol. Genet.* 6:601–607.

58.- Fatkin, D, Graham, RM (2002) Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies. *Physiol. Rev.* 82:945-980.

59.- Sakamoto, A, Abe, M, Masaki, T (1999) Delineation of genomic deletion in cardiomyopathic hamster. *FEBS Lett.* 447:124-128.

60.- Li, GR, Ferrier, GR, Howlett, SE (1995) Calcium currents in ventricular myocytes of prehypertrophic hamsters. *Am. J. Physiol.* 268 part 2:H999-H1005.

61.- Coral-Vazquez, R, Cohn, RD, Moore; SA, Hill, JA, Weiss, RM, Davidson, RL, Straub, V, Barresi, R, Bansal; D, Hrstka, R, Williamson, R, Campbell, KP (1999) Disruption of sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 99: 465-474.

62.- Durbeej, JM, Cohn, RD, Hrstka, F, Moore, SA, Allamand; V, Davidson, BL, Williamson, RA, Campbell, KP (2000) Disruption of beta-sarcoglycan gene reveals pathogenic complexity of limb-girdles muscular dystrophy type 2E. *Mol. Cell. Biol.* 5:141-151.

63.- Hack, AA, Ly, CT, Jiang, F, Clendenin, CJ, Sigrist, KS, Wollmann, RL, McNally, EM (1998) Gamma sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J. Cell. Biol.* 142:1279-1287.

64.- Hack, AA, Lam, MY, Cordier, L, Shoturma, DI, Ly, CT, Hadhazy, MA, Hadhazy, MR, Sweeny HL, McNally, EM (2000) Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Cell. Sci.* 113:2535-2544.

- 65.- Wheeler, MT, Korcarz, CE, Collins, KA, Lapidos, KA, Hack, AA, Lyons, MR, Zarnegar, S, Earley, JU, Lang, RM, McNally, ME (2004) Secondary Coronary Artery Vasospasm Promotes Cardiomyopathy Progression. *Am. J. Pathol.* 164:1063-1071.
- 66.- Wheeler, MT, Allikian, MJ, Heydemann, A, Hadhazy, M, Zarnegar, S, McNally, EM (2004) Smooth muscle cell-extrinsic vascular spasm arises from cardiomyocyte degeneration in sarcoglycan-deficient cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 113:668-675.
- 67.- Cohn, RD, Durbeej, M, Moore, SA, Coral-Vazquez, R, Prouty, S, Campbell, KP (2001) Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J. Clin. Invest.* 107:R1-R7
- 68.- Wheeler MT, McNally EM (2003) Sarcoglycans in vascular smooth and striated muscle. *Trends Cardiovasc. Med.* 13:238-43.
- 69.- Ramírez-Sánchez I, Rosas-Vargas H, Ceballos G, Salamanca F, and Coral-Vázquez RM. (2005) Expression analysis of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels. *J Vasc Res* 42:1-7
- 70.- Martinez-Lemus LA, Sun Z, Trache A, Trzciakowski JP, Meininger GA (2005) Integrins and regulation of the microcirculation: from arterioles to molecular studies using atomic force microscopy. *Microcirculation.*12:99-112.
- 71.- Takahashi M, Ishida T, Traub O, Corson MA, Berk BC (1997) Mechanotransduction in endothelial cells: temporal signaling events in response to shear stress. *J. Vasc. Res.* 34:212-219.
- 72.- Rehman H.U. Vascular endothelium as an endocrine organ. *Proc R Coll Phys Edim .* 31:149-154,2001

- 73.- Levy N M, Pappano A J (2007) Cardiovascular Physiology. Mosby Elsevier Publishers, Philadelphia PA, USA. p 107-122.
- 74.- Davies P.F., Zilberberg J. y Helmke B.P. (2003) Spatial microstimuli in endothelial mechanosignaling. *Circ Res* 92:359-370
- 75.- Esper R J, Vilariño J O (2002) La placa arterosclerotica de alto riesgo. De la disfunción endotelial al síndrome isquémico agudo. Proas Science Publishers, España. p. 1-43
- 76.- Smith J J, Kampine J P (1999) Circulatory Physiology, the essentials. Williams and Wilkins Publishers. New York, NY, USA p 16-30
- 77.- Busse R. y Fleming I. (2003) Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends in Pharmacol Sciences* 24: 24-29.
- 78.- Ali MH, Schumacker PT (2002) Endothelial responses to mechanical stress: where is the mechanosensor? *Crit Care Med.* 30:S198-206.
- 79.- Jaffe EA, Nachmen RL, Becker GC, and Minick CR. (1973) Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J Clin Invest* 52: 2745-2756
- 80.- Jones GE. (1996) Methods in molecular medicine. Human cell culture protocols. Totowa, NJ Humana Press Inc. p 100-110
- 81.- Lee A, Delhaas T, Walkman K, McKenna A, Villareal J, and McCulloch D. (1996) An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 271:C1400- C1408
- 82.- Cerecedo D, Martinez-Rojas D, Chavez O, Martinez- Perez F, Garcia-Sierra F, Rendon A, Mornet D, and Mondragon R. (2005) Platelet adhesion: structural and functional diversity of short dystrophin and utrophins in the formation of dystrophin-

associated-protein complexes related to actin dynamics. *Thromb Haemost* 94:1203-1212

83.- Titheradge MA. Nitric Oxide Protocols, *Methods in molecular biology* 14, Totowa, NJ Humana Press Inc. (1998)

84.- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnock JS, and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138 (1982)

85.- Durbeej M, and Campbell KP. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 12:349-361

86.- Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawaa R, Toyo-oka T, and Takeoa S. (2003) Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 59 419–427

87.- Matsumura K, Shasby DM, and Campbell KP. (1993) Purification of dystrophin-related protein (utrophin) from lung and its identification in pulmonary artery endothelial cells. *FEBS Lett* 326: 289-293

88.- Hosokawa H, Ninomiya Haruaki, Kitamura Y, Fujiguara K, and Masaki T. (2002) Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci* 115:1487-1496

89.- Nowak KJ, Davies KE (2004) Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep* 9:872-876

90.- Shin J, Jo H, and Park H. (2006) Caveolin-1 is transiently dephosphorylated by shear stress activated protein tyrosine phosphatase mu. *Biochem Biophys Res Comm* 339:737-741.

- 91.- Shiao T, Fond A, Deng B, Wehling-Henricks M, Adams ME, Froehner SC, Tidball JG (2004) Defects in neuromuscular junction structure in dystrophic muscle are corrected by expression of a NOS transgene in dystrophin-deficient muscles, but not in muscles lacking alpha- and beta1-syntrophins. *Hum Mol Genet.* 1;13:1873-1884.
- 92.- Howard AB, Alexander RW, Nerem RM, Griendling KK, and Taylor WR. (1997) Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol* 272 (2Pt 1):C421- C427
- 93.- Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, and Davies PF. (2003) Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1720–H1729
- 94.- Michel JB, Feron O, Sacks D, and Michel T. (1997) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272:15583-15586
- 95.- Garcia-Cardena G, Liu P, Schnitzer JE, and Sessa WC. (1996) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveola via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6448-6453
- 96.- Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, and Chen J. (2002) Relationships between caveola and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1-F10
- 97.- Helmke BP. (2005) Molecular control of cytoskeletal mechanics by hemodynamic forces. *Physiology* 20:43-53
- 98.- Polar J.M. (1998) Modern visualisation of the endothelium. Harwood Academic Publishers, pp3-151

- 99.- Bittar EE, Frank PG, Lisanti MP. (2005) Advances in molecular and cell biology. Caveolae and lipid rafts: Roles in signal transduction and the pathogenesis of human disease. Elsevier Academic Press USA pp 91-104.
- 100.- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, and Sessa WC. (1997) Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin. Functional Significance of the NOS Caveolin binding domain in vivo. J Biol Chem 272:25437-25440
- 101.- Radel C, and Rizzo V. (2005) Integrin mechanotransduction stimulates caveolins-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. Am J Physiol Heart Circ Physiol 288:H936-H945
- 102.- Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. Trends in Cell Biol 11:66-74
- 103.- Shiu YT, Li S, Yuan S, Wang Y, Nguyen P, and Chien S. (2003) Shear stress-induced c-fos activation is mediated by Rho in a calcium-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun 303:548-555
- 104.- Harrison DG, Widder J, Grumbach I, Chen W, Weber M, Searles C. (2006) Endothelial mechanotransduction, nitric oxide and vascular inflammation J Intern Med 259:351-63.

CAPITULO 14

ANEXO

Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS

Israel Ramirez-Sanchez^{1,2}, Guillermo Ceballos-Reyes², Haydee Rosas-Vargas¹, Doris Cerecedo-Mercado³, Alejandro Zentella-Dehesa⁴, Fabio Salamanca¹, Ramon M Coral-Vazquez¹

¹Unidad de Investigacion Medica en Genetica Humana, Hospital de Pediatria, Centro Medico Nacional Siglo XXI-IMSS, Mexico City, Mexico, ²Seccion de Posgrado e Investigacion, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politecnico Nacional, Mexico City, Mexico, ³Departamento de Morfologia, Escuela Nacional de Ciencias Biologicas, Instituto Politecnico Nacional, Mexico City, Mexico, ⁴Departamento de Bioquimica Instituto Nacional de Nutricion Salvador Zubiran and Departamento de Medicina Genomica y Toxicologia Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico City, Mexico

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Materials and Methods
 - 3.1. Tissues
 - 3.2. Cell Cultures
 - 3.3. Mechanical Stress on HUVEC
 - 3.4. Immunoblot Assays
 - 3.5. Co-immunoprecipitation Assays
 - 3.6. Nitric Oxide Quantification
4. Results
 - 4.1. Composition of the HUVEC utrophin associated proteins complex
 - 4.2. HUVEC-eNOS becomes activated under mechanical stimulus
 - 4.3. Over-expression of HUVEC eNOS during mechanical stimulus
 - 4.4. Mechanical stress induces overexpression of UAPC members
5. Discussion
6. Acknowledgment
7. References

1. ABSTRACT

Several studies have emphasized the relevance of dystrophin-associated protein complex (DAPC) to maintain the vascular function. Previously we postulated the presence of an utrophin associated protein complex (UAPC) in endothelium from umbilical cord vessels. In the present work, we demonstrate that utrophin (UTR) indeed forms a complex, with beta-dystroglycan (DG), epsilon-sarcoglycan (SG), caveolin-1 (cav-1), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by co-immunoprecipitation analysis. Additionally, we observed an increment in the protein levels of epsilon-SG, beta-DG, UTR and cav-1 after mechanical stretching. Interestingly, this stimulus also induced eNOS up-regulation, activation and release from the UAPC, and led to a significant increase in nitric oxide (NO) production. Finally, we propose that UAPC in HUVECs may play an important role in the regulation of vascular tone.

2. INTRODUCTION

Cardiomyopathy is a multifactorial disease. Recent evidence shows that hereditary and acquired forms of cardiomyopathy can be caused by alterations within the dystrophin-associated protein complex (DAPC) (1, 2, 3, 4). Dystrophin gene mutations cause Duchenne- or Becker-type muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy (DCM) (5, 6). Additionally, it is frequent that patients with mutations in α -, β -, γ - or δ -SG, which cause limb girdle muscular dystrophy (LGMD 2C-F, respectively), also present cardiomyopathy. In the case of δ -SG, there are documented cases of mutations in the sporadic and hereditary cardiomyopathy-gene related (7).

The DAPC is a multimeric array comprising membrane and cytoskeletal proteins that link the extracellular matrix with the cytoskeleton (8). This complex is composed of dystrophin, the syntrophins, the DG, the α , β , γ , δ , ϵ and ζ SG, and sarcospan (SSPN) (2, 6,

8). Under certain conditions, dystrophin is substituted in the protein complex by utrophin, the autosomal homologue protein of dystrophin (4); in this case the protein complex may be denominated the utrophin-associated protein complex (UAPC). Utrophin presents an ubiquitous distribution and is expressed in striated and smooth muscles, as well as in non-muscular tissues such as nervous system and endothelial cells (4).

Null mice models for β - and δ -SG develop muscular dystrophy accompanied by dilated cardiomyopathy, and it has been observed that these mice have coronary microvasculature constrictions, apparently caused by the SG-SSPN loss in coronary vascular smooth muscle (9, 10).

Despite of the importance of the DAPC in cardiomyopathy development, the study of this complex has been mainly focused on cardiomyocytes and vascular smooth muscle. There is a modest knowledge on the expression and function of these proteins in endothelial cells, which play a fundamental role in the vascular function. In a recent study performed by our research group in human umbilical cord vessels, we postulated the presence in endothelial cells of an UAPC, constituted by ϵ -SG, β -DG and UTR (11). We also postulated that this complex could be localized in endothelial caveolar transduction domains because of its probable association with cav-1 (11). These results prompted us to study the putative endothelial UAPC in greater detail and to explore its physiological relevance in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Due to the importance of endothelial cells in cardiovascular function, we consider of high significance to analyze the composition and possible change in response to stretching of this protein complex in this tissue type.

Our results confirmed the association of utrophin with ϵ -SG, β -DG and cav-1, as well as its association with eNOS.

Additionally, we observed that under the equibiaxial stretching stimulus that resembles physiologic mechanical forces, UAPC components modified their expression pattern in HUVECs. Interestingly, the mechanical stimulus also induced the activation and release of eNOS from the complex, suggesting an active role of the UAPC in endothelial mechanoreception.

3. MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the Institutional Research and Ethics Committees of the Hospital de Pediatria, Centro Medico Nacional Siglo XXI-IMSS.

3.1. Tissues

Umbilical cords of mature newborns from normal full-term pregnancies were obtained immediately after birth, and 10-15 cm of tissue were placed in 0.9% NaCl plus 2% antibiotic-antimycotic mixture (Gibco-BRL Rockville MD, USA).

3.2. Cell Culture

HUVECs were isolated from several umbilical cord segments. Endothelial cells were separated from the umbilical vein by enzymatic digestion of the extracellular matrix (12). Briefly, the umbilical vein was cannulated and perfused until turgent with 0.125% trypsin in Hank's solution (Gibco-BRL Rockville MD, USA). The tissue was incubated 15 min at 37°C; the total volume of the trypsin solution inside the umbilical vein was recovered, and a 0.1 volumes fetal bovine serum (FBS) was added. Cells were harvested and centrifuged at 2700 rpm/15 min (1000 x g), and the pellet was resuspended in M199 supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine, 1% antibiotic-antimycotic mixture (all reagents were obtained from Gibco-BRL Rockville MD, USA), 1% heparin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) and 5 mg/ml brain bovine endothelial mitogen (13). Endothelial cells were incubated at 37°C and 5% CO₂, the latter characterized by von Willebrand factor expression (anti-Von Willebrand factor from Sta. Cruz Biotechnologies, Sta Cruz CA, USA), >99% of cells being positive for this endothelial marker.

3.3. Mechanical Stress on HUVECs

An equibiaxial strain device was used to stretch HUVECs as described by Lee et al. (14). Cells were first cultured onto collagen-coated silicon membranes (Dow Corning Co. SD CA, USA), previously treated with 0.01% rat tail-collagen type 1 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). After a 24-h stabilization period in culture, HUVECs were subjected to a mechanical stimulus of approximately 1.4 N/cm², which was obtained after turning the nut of the device 540°. This force represents an increase of 9% in the cellular size from basal conditions. HUVECs were stretched for 0 (basal), and 8 h.

3.4. Immunoblot Assays

To determine variations of the protein expression levels of utrophin, cav-1, β -DG, ϵ -SG, and eNOS in stretched HUVECs compared to control non-stretched HUVECs, 10⁷ non-stretched and stretched cells, were homogenized in 50 μ l RIPA buffer (1% triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, all in PBS 1X with mini complete protease inhibitors (Roche Diagnostics, Mannheim Germany), supplemented with 1mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, and 1mM NaF. Homogenates were centrifuged for 10 min at 10,000 x g to pellet debris. Total protein content was measured in the supernatant with the DC assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). A total of 40-60 μ g of proteins were applied to a 3-12.5% SDS-PAGE gradient, electrotransferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA), incubated 1 h at 37°C in blocking buffer (5% nonfat dry milk in PBS plus 0.1% Tween 20 [PBS-T]) and then incubated 3 h at room temperature with the following different primary antibodies: ϵ -SG (C-17), Cav-1 (C-97), Utrophin (H300), β -DG (C-20), endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (NOS3 N -20), and eNOS pSer¹¹⁷⁷ (eNOS^p ALX-804-396). Membranes were simultaneously incubated with anti-GAPDH (V-19) as the internal control used to normalize the densitometric analysis. All the primary antibodies were purchase from Santa Cruz Biotechnologies (Sta. Cruz, CA, USA), except eNOS^p ALX-804-396 which was obtained

from Alexis Biochemicals (Carlsbad CA, USA). All primary antibodies were diluted 1:100 in PBS-T. Membranes were washed three times during 5 min in PBS-T and incubated 1 h at room temperature in the presence of horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted 1:1000 in PBS-T. Membranes were washed three times in PBS-T and then the immunoblots were developed with a diamine benzidine (DAB) colorimetric method (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Band intensity was directly quantified from nitrocellulose membrane using Labworks software and the EpiChem Darkroom image analyzer (UVP Bioimaging Systems, Upland CA, USA).

3.5. Coimmunoprecipitation Assays

10^7 stretched and non-stretched control HUVECs, respectively, were lysated with 50 μ l of non-denaturing extraction buffer composed of 0.15 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.1%, 1 mM PMSF, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF (all these reagents were obtained from Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA.) and mini-complete protease inhibitor (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) all diluted in PBS 1X (15). The homogenate was incubated 3 min on ice, and passed 5 times through an insulin syringe. Then, the homogenate was incubated on ice for additional 10 min, and the protein concentration was measured by the DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). A total of 0.5-1 mg protein was incubated for 3 h at 4°C, under mild orbital agitation with 3 μ g of immunoprecipitating antibody (anti Cav-1 H-97 or anti utrophin H-300 Santa Cruz Biotechnologies, Sta. Cruz CA, USA). Next, 20 μ l of protein G-sepharose (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA.) were added and the mixture was incubated overnight at 4°C. The immunoprecipitation reaction was centrifuged for 15 min at 12000 x g, and the supernatant was recovered and stored at 4°C. The pellet, containing the immunoprecipitated proteins, was washed three times with extraction buffer 15 min at 12000 x g. Finally, the proteins immunoprecipitated in the pellet and those remaining in the supernatant were applied to a 3-12.5% SDS-PAGE gradient. Co-immunoprecipitation was performed at least three times with each immunoprecipitating antibody for confirmation of results. Western blots were performed according to the previously described procedure (15).

3.6. Nitric Oxide Quantification

Evaluation of the nitric oxide (NO) levels produced by HUVECs, under non-stretched and stretched conditions, was measured indirectly by the Greiss method (16, 17) using transgenic *E. coli* ATCC 1775 (ATCC Co. Rockville MD, USA) as nitrate reductase source. Briefly, HUVECs were cultured in the stretch device, changing M199 by DMEM without phenol red (Gibco BRL, Rockville MD, USA), then HUVECs in culture were stabilized overnight at 37°C with 5% CO_2 and subsequently stretched as described previously. After the stimulus, 250 μ l of cell culture medium from basal and stretched HUVECs were recovered and incubated for 1 h at 37°C with 200 optic units of *E. coli* ATCC 1775 (ATCC Co. Rockville MD, USA) under shaking conditions at 100 rpm. The bacteria were separated from the liquid by centrifugation at 3000 rpm for 5 min, subsequently the

supernatant was recovered and incubated 1 min with 250 μ l of 1% sulfanilamide and 250 μ l of 0.1% N-(1-naftil) ethylenediamine. We utilized HUVECs stimulated for 30 min with 6 μ M bradykinin (Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA.), as positive control of oxide nitric synthesis. Finally, nitrites were measured in a spectrophotometer at 554 nm optical density (O.D.) interpolating with a standard curve.

4. RESULTS

4.1. Composition of the HUVEC utrophin associated proteins complex and

In a previous work, we postulated the presence, in endothelium derived from umbilical cord vessels, an utrophin associated protein complex that may be constituted by utrophin, ϵ -SG, Cav-1 and β -DG (11). To establish whether these proteins do in reality form a complex in HUVEC, we carried out immunoprecipitation assays with total protein extracts obtained from cultured cells (Figure 1). Total extracts (E) and the co-immunoprecipitated (Ip) proteins with anti-cav-1 or anti-utrophin antibodies were analyzed by Western blot assays using antibodies against β -DG, ϵ -SG, utrophin, eNOS, and cav-1 proteins. These results confirmed that there is a UAPC conformed at least by β -DG, ϵ -SG, utrophin, eNOS, and Cav-1 (Figure 1, panels NS, lane Ip) in HUVEC.

4.2. HUVEC-eNOS Becomes Activated Under Mechanical Stimulus

Because endothelial cells are usually subjected to hemodynamic forces, we decided to mimic the physiologic mechanical stimulus of blood vessels on HUVECs with an equibiaxial stretching device (14). This tool exerts a simultaneous equivalent stretching force in cells in all directions. Total protein extracts of non-stretched (NS) and stretched (S) HUVECs were co-immunoprecipitated with anti-cav-1 or anti-utrophin, while total extracts and precipitated proteins were analyzed by Western blot (Figure 1). By means of these studies, we observed that UAPC composition was the same between NS and S cells (Figure 1, lane Ip). Nonetheless, we observed an apparent reduction in the amount of eNOS immunoprecipitated from the cells submitted to the mechanical stimulus (Figure 1 panels S, lane Ip), as compared with eNOS detected in the immunoprecipitated fraction from NS cells (Figure 1 panels NS lane Ip). Since these experiments were conducted using an antibody that recognized both the phosphorylated and non-phosphorylated form of the protein, and with the knowledge that phosphorylation and release of eNOS from the membrane is associated with enzyme activation (18), we further analyzed eNOS employing the previously mentioned antibody and one that discriminates the phosphorylated form of the protein (Figure 2A and 2B).

Interestingly, with both antibodies we observed an eNOS increase in the supernatant fraction derived from the immunoprecipitated proteins of stretched HUVECs carried on with anti-cav-1 or anti-UTR (Figure 2A and 2B, panels S, lanes Sn). In parallel, immunoprecipitation assays both with anti-cav-1 or anti-UTR revealed that the amount of eNOS associated to the complex is decreased after

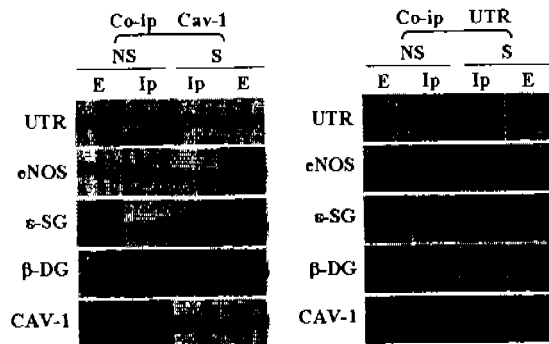


Figure 1. Composition of UAPC in stretched and control untreated HUVECs. Immunoprecipitation (Ip) and total protein extracts (E) analysis derived from non-stretched (NS) and 8-h equibiaxially stretched (S) HUVECs. Total proteins were immunoprecipitated with anti-CAV-1 or anti-utrophin (UTR) antibodies. Total extracts (E), and co-immunoprecipitated proteins (Ip) were analyzed by Western blot using antibodies against utrophin (UTR), epsilon sarcoglycan and beta dystroglycan (ϵ -SG, β -DG), caveolin-1 (cav-1), or endothelial nitric oxide synthase (eNOS) that recognized the phosphorylated and no phosphorylated forms of the protein.

stretching, although this difference is more evident when immunoprecipitating cav-1 (compare IP lanes in Figure 2A and 2B). All this information suggested that the mechanical stimulus induced eNOS release from the UAPC. Additionally, the phosphorylated form of eNOS (eNOS^P) was higher in the supernatant (Sn) of stretched (S) HUVECs (Figure 2A and 2B, panels S, lane Sn), as compared with the result obtained with the NS cells (Figure 2A and 2B, panels NS, lanes Sn). These results suggest that the stimulus liberates and activates the synthase. To determine whether the increase in eNOS^P drives to an increment in NO production, we indirectly measured its concentration in the supernatant of the culture cells, by Greiss method before and after mechanical stimulus. An increase of up to six-fold was observed in NO production in stretched HUVECs in comparison with basal levels determined in NS cells (Figure 2C). Bradykinin-positive control of eNOS activation only increased NO levels up to three fold over basal levels (Figure 2C). Taken together these results suggested that mechanical stimulus not only liberates eNOS from utrophin complexes but also leads to its activation.

4.3. Over-Expression of HUEVEC eNOS During Mechanical Stimulus

Western blot analysis of eNOS in total extracts in Figure 2 A suggest a possible increase in the total endothelial content of this enzyme following stretching. To verify whether there was an increment in the amount of eNOS, we performed relative quantitation of the enzyme band obtained in protein immunoblotting of proteins from non-stretched (NS), stretched (S), and bradykinin (BD) stimulated cells (Figure 3A). Band intensity analysis showed that the mechanical stimulus induced a two-fold increase of the enzyme, as compared with the basal level

obtained with the NS and bradykinin-treated cells (Figure 3B). GAPDH was used as internal control for densitometric value normalization.

4.4. Mechanical Stress Induces Overexpression of UAPC Members

Due to the overexpression of eNOS in response to stretching, a component of the evidenced UAPC present in HUVECs, it was relevant to evaluate a possible increment in the expression of the remaining components of this complex. Expression of β -DG, utrophin, cav-1 and ϵ -SG proteins was analyzed by semiquantitative Western blot in non-stretched and stretched HUVECs (Figure 4A). Our results demonstrate that in contrast with the increase in eNOS, mechanical stress induces a more modest up-regulation in β -DG, utrophin, cav-1, and ϵ -SG to 0.39-, 0.3-, 0.8 and 0.79-fold respectively (Figure 4B). This result correlated with the ϵ -SG mRNA level increase (0.8 fold) exhibited by semiquantitative RT-PCR assays performed in total RNA from stretched HUVECs (unpublished data).

5. DISCUSSION

In skeletal muscle, utrophin and dystrophin serve as anchors for the DAPC, which is composed of isoforms of syntrophin, dystrobrevin, and dystroglycan, and sarcoglycan-sarcospan sub-complex (19). On the other hand, genetic defects of SGs and/or dystrophin may result in the development of cardiomyopathy and/or muscular dystrophies (20). Recently, several studies have shown the importance of the SG complex in the vascular smooth muscle function; notwithstanding this, there is a very restricted knowledge on DAPC in endothelial cells. Some reports have shown the presence of individual members of the complex such as utrophin and β -DG in endothelial cells from different sources (21, 22). In a previous study in endothelial cells from umbilical cord vessels *in situ*, we postulated the presence of an utrophin-associated protein complex conformed by β -DG, ϵ -SG, and cav-1 (12). To demonstrate the presence of this complex in endothelial cells, we analyzed total protein extracts from HUVECs by immunoprecipitation; this analysis confirmed the association of utrophin with β -DG, ϵ -SG, and cav-1. Interestingly, we also found the interaction of the unphosphorylated form of eNOS with the UAPC. To the best of our knowledge, this is the first time that an utrophin-associated protein complex in endothelial associated to caveolae has been described.

In endothelial cells, caveolin-1 is a principal protein of caveolae (1, 2, 23), and serves as an important regulator of the activity of many signaling molecules, including eNOS. Furthermore, endothelial cells are subject to physical deformations by two major types of mechanical forces: shear stress and mechanical strain (24), biomechanical stimuli that can be sense through caveolae (25). Therefore, it was interesting to determine whether the UAPC could respond to a mechanical stimulus. To evaluate this hypothesis, we cultured HUVECs under equibiaxial stretching conditions utilizing a device (14) that mimics multidirectional hemodynamic stretching process in dilated vessels. Interestingly, this stimulus induced eNOS

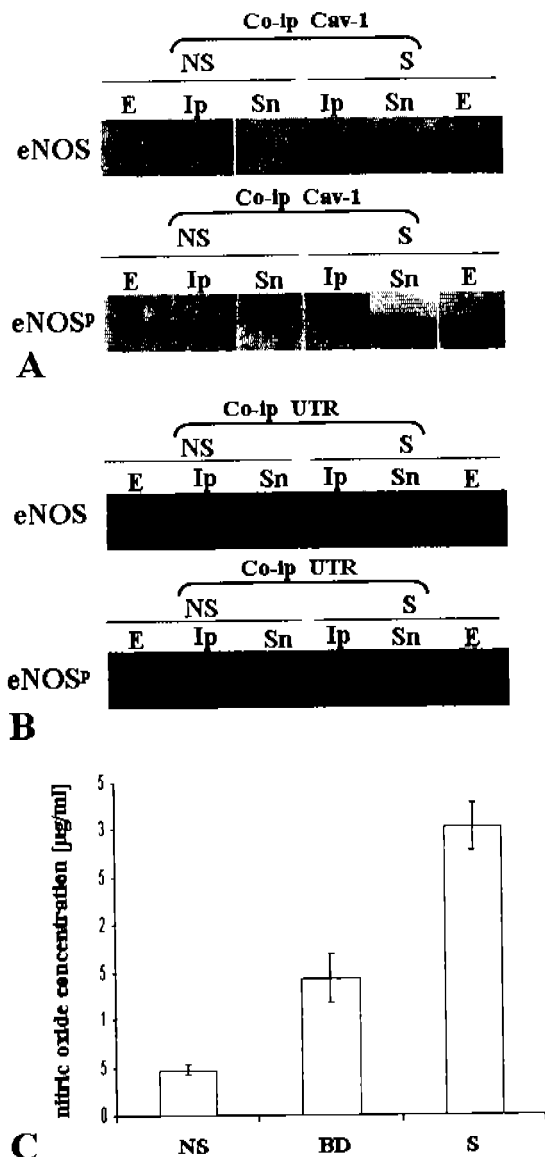


Figure 2. Release and activation of eNOS from UAPC in stretched HUVECs. Immunoprecipitation analysis of total protein extracts derived from non-stretched (NS) and 8-h equibiaxially stretched (S) HUVEC. Total extracts proteins were immunoprecipitated with anti-cav-1 (A) or anti-UTR (B) antibodies. Total extracts (E), co-immunoprecipitated proteins (Ip) and the supernatants (Sn) were analyzed by Western blot using antibodies against eNOS that discriminate between the phosphorylated (eNOS^p) and non-phosphorylated (eNOS) forms of the enzyme. (C) NO amount in basal conditions (NS) or after 30 min stimulation with 6 μM bradykinin (BD) or after 8 h of equibiaxially stretched (S) HUVECs.

overexpression and activation of the enzyme, which was directly related with Ser1177 phosphorylation of and release from the UAPC. These results are in agreement with the information that eNOS is anchored and inhibited

by cav-1's scaffolding domain in endothelial cells under basal conditions (26), thus regulating its enzymatic activity (27). Other reports have shown that during flow shear stress, eNOS is activated by Ser1177 phosphorylation and released from the caveolae (28). Likewise in the recent past, several reports have determined that up-regulation of eNOS gene expression after mechanical stimulus, enhanced NO production and improved endothelial function (29). In this sense and based on our results, we postulate that the UAPC might possess a function as a mechanical stimulus sensor in endothelial cells.

Additionally, we believe that NO concentration increase goes hand in hand with the increase in eNOS protein synthesis and the phosphorylation of residue Ser1177, contributing in a collaborative way to an enhanced enzymatic activity induced by the mechanical stimulus. Since in response to stretching we observe a one to one increase both in eNOS and cav-1, we interpret this as more of the protein complex, and consequently, more mechanosensor complex on the endothelial membrane which leads to a higher increase in eNOS enzymatic activity.

In addition to eNOS overexpression, the mechanical stimulus also induced the increase of β -DG, ϵ -SG, and cav-1 and UTR proteins. Although several reports indicate that cav-1 overexpression, markedly attenuates eNOS enzymatic activity (26, 30), in this study we observed that eNOS and cav-1 overexpression is accompanied by enhancement of eNOS enzyme activity. The increase of cav-1 in stretched HUVECs may be closer related to the increment of the caveolae density (25) and with the protein participation in the recruitment of several signaling molecules involved in cellular responses, such as the integration of focal adhesions triggered by mechanical stress (31).

In the case of β -DG and ϵ -SG, we suggested that their increase may be related with the participation of these proteins in a different cellular process and/or protein complex, since we had previously observed incomplete colocalization of these proteins with cav-1 in endothelial cells (11; Ramírez-Sánchez I, unpublished observations). On the other hand, the transcription-level of some genes has been reported to increase as consequence of augmented NO (32) or intracellular Ca^{2+} (33), induced by the mechanical stress. In this regard, it was also observed that the mechanical stress promoted a moderate increment in the expression level of β -, δ - and ϵ -SG mRNA (Ramírez-Sánchez I, unpublished observation). Nonetheless, in this context we have not been able to detect the β -, δ -SG proteins. These results confirm our previous observation that these two sarcoglycans are not present in endothelial cells (11), and suggest the existence of a post-transcriptional regulation process of their genes.

In summary, our results provide evidence for the presence of an UAP complex in HUVECs, comprising utrophin, β -DG, ϵ -SG, eNOS and cav-1. Furthermore, we propose that this complex may function as a mechanosensor that can contribute to the vasodilation

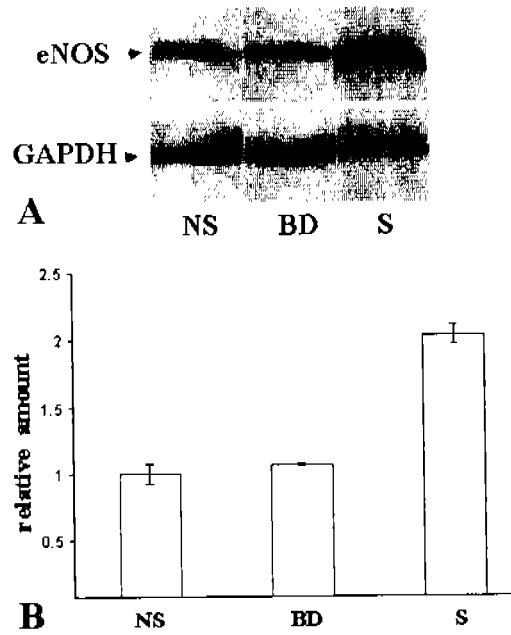


Figure 3. Mechanical stretch induces overexpression of eNOS in HUVECs. Effect of the mechanical strain on eNOS protein content in stretched HUVECs. (A) eNOS analyzed by Western blot of protein extracts obtained from HUVECs treated as follows: under basal conditions (NS); after 30 min stimulation with 6 μ M bradykinin (BD), and after 8 h of equibiaxially stretched (S) HUVECs. eNOS relative protein amount was calculated by the ratio of eNOS densitometric units/GAPDH densitometric units. Densitometric analysis was performed using bands obtained in the Western blot assay (A).

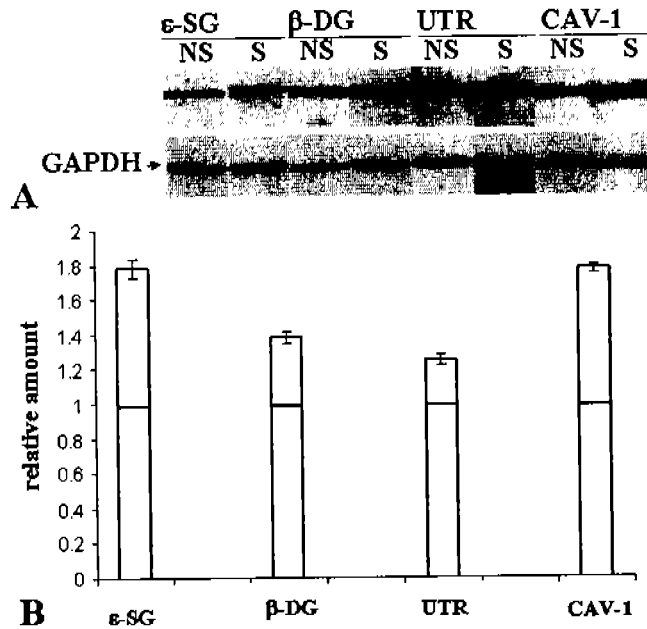


Figure 4. Equibiaxial strain induces overexpression of UAPC proteins. (A) UAPC was analyzed by Western blot using total protein cell lysates from non-stretched (NS) and 8 h equibiaxially stretched (S) HUVECs, and antibodies against ϵ -SG, β -DG, UTR, cav-1 and GAPDH. Immunodetection of GAPDH (35 kDa) was employed as internal control to evaluate amounts of the other proteins. (B) Effect of HUVEC equibiaxial stretching (9% form basal condition) on protein expression level of the members of UAPC. The graph shows densitometric values [(protein/GAPDH stretched cells)/(protein/GAPDH control cells)] from semi quantitative Western blot assays 1 represents basal values.

process through release and activation of the enzyme eNOS. Understanding these mechanosensors responses could address the implementation of potential genetic and pharmacologic therapeutic strategies, to prevent the development of cardiovascular diseases.

6. ACKNOWLEDGMENTS

Ramírez-Sánchez I is a doctoral candidate supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) grant 144593 and by the IMSS Fellowship Award (México). This work was partially supported by CONACyT, México (grants 39542-Q and SEP 46187/A-1) and the IPN. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D. Sc. degree for I.R.S. at Universidad Nacional Autónoma de México. We are grateful to personnel at the Gyneco-Obstetric Service of the IMSS Mexico City-based Luis Castelazo Ayala Hospital.

7. REFERENCES

1. Rando TA. The dystrophin glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle and Nerve* 24:1575-1594 (2001)
2. Blake DJ, Weir A, Newey SE, and Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82:291-329 (2002)
3. Holt KH, and Campbell KP. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 273:34667-34670 (1998)
4. Khurana TS, and Davies KE. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. *Nat Rev Drug Discov* 2:379-390 (2003)
5. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679 (1995)
6. Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, Gorecki DC, and Davies KE. β -dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Nat Acad Sci USA* 95:241-246 (1998)
7. Cohn RD, Durbeej M, Moore SA, Coral-Vazquez R, Prouty S, and Campbell KP. Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Clin Invest* 107:R1-R7 (2001)
8. Estrada FJ, Mornet D, Rosas-Vargas H, Angulo A, Hernandez M, Becker V, Rendon A, Ramos-Kuri M, and Coral-Vazquez RM. A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 17;340(3):865-871 (2006)
9. Durbeej M, Cohn RD, Hrstka F, Moore S, Allamand V, Davidson BL, Williamson RA, and Campbell KP. Disruption of β -sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell Biol* 5:141-151 (2000)
10. Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davidson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, and Campbell KP. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 99:465-474 (1999)
11. Ramírez-Sánchez I, Rosas-Vargas H, Ceballos G, Salamanca F, and Coral-Vázquez RM. Expression analysis of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels. *J Vasc Res* 42:1-7 (2005)
12. Jaffe EA, Nachmen RL, Becker GC, and Minick CR. Culture of human endothelial cells from umbilical veins. *J Clin Invest* 52: 2745-2756 (1973)
13. Jones GE. Human cell culture protocols. -Methods in molecular medicine. Totowa, NJ Humana Press Inc. (1996)
14. Lee A, Delhaas T, Walkman K, McKenna A, Villareal J, and McCulloch D. An equibiaxial strain system for cultured cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 271:C1400-C1408 (1996)
15. Cerecedo D, Martinez-Rojas D, Chavez O, Martinez-Perez F, Garcia-Sierra F, Rendon A, Mornet D, and Mondragon R. Platelet adhesion: structural and functional diversity of short dystrophin and utrophins in the formation of dystrophin-associated-protein complexes related to actin dynamics. *Thromb Haemost* 94(6):1203-1212 (2005)
16. Titheradge MA. Nitric Oxide Protocols, Methods in molecular biology, Totowa, NJ Humana Press Inc. (1998)
17. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnock JS, and Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138 (1982)
18. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, and Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 52, 25:34724-34729 (1998)
19. Durbeej M, and Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 12:349-361 (2002)
20. Yoshida H, Takahashi M, Koshimizu M, Tanonaka K, Oikawa R, Toyo-oka T, and Takeo S. Decrease in sarcoglycans and dystrophin in failing heart following acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 59 419-427 (2003)
21. Matsumura K, Shasby DM, and Campbell KP. Purification of dystrophin-related protein (utrophin) from lung and its identification in pulmonary artery endothelial cells. *FEBS Lett* 326: 289-293 (1993)
22. Hosokawa H, Ninomiya Haruaki, Kitamura Y, Fujiguara K, and Masaki T. Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci* 115(7), 1487-1496 (2002)
23. Shin J, Jo H, and Park H. Caveolin-1 is transiently dephosphorylated by shear stress activated protein tyrosine phosphatase mu. *Biochem Biophys Res Comm* 339 737-741 (2006)
24. Howard AB, Alexander RW, Nerem RM, Griendling KK, and Taylor WR. Cyclic strain induces an oxidative stress in endothelial cells. *Am J Physiol* 272 (2Pt 1):C421-C427 (1997)
25. Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE, and Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in

vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1720-H1729 (2003)

26.- Michel JB, Feron O, Sacks D, and Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca^{2+} -calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272:15583-15586 (1997)

27.- Garcia-Cardena G, Liu P, Schnitzer JE, and Sessa WC. Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveola via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6448-6453 (1996)

28.- Goligorsky MS, Li H, Brodsky S, and Chen J. Relationships between caveola and eNOS: everything in proximity and the proximity of everything. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1-F10 (2002)

29.- Helmke BP. Molecular control of cytoskeletal mechanics by hemodynamic forces. *Physiology* 20:43-53 (2005)

30.- Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, and Sessa WC. Dissecting the Interaction between Nitric Oxide Synthase (NOS) and Caveolin. Functional Significance of the NOS Caveolin binding domain *in vivo*. *J Biol Chem* 272, 25437-25440 (1997)

31.- Radel C, and Rizzo V. Integrin mechanotransduction stimulates caveolin-1 phosphorylation and recruitment of Csk to mediate actin reorganization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H936-H945 (2005)

32.- Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biol* 11(2), 66-74 (2001)

33.- Shiu YT, Li S, Yuan S, Wang Y, Nguyen P, and Chien S. Shear stress-induced c-fos activation is mediated by Rho in a calcium-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 303(2), 548-555 (2003)

Key Words: Utrophin, Cardiomyopathy, Muscular Dystrophy, Endothelium, Mechanical Stimulus

Sent correspondence to: Dr Ramón Mauricio Coral-Vázquez Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS. Av. Cuauhtémoc No 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06725 México, D.F., México, Tel: 52-55-5627-6941, Fax: 52-55-5588-5174, E-mail: rncoralv@prodigy.net.mx

<http://www.bioscience.org/current/vol12.htm>

Expression Analysis of the SG-SSPN Complex in Smooth Muscle and Endothelial Cells of Human Umbilical Cord Vessels

I. Ramírez-Sánchez^{a, b} H. Rosas-Vargas^a G. Ceballos-Reyes^b F. Salamanca^a
R.M. Coral-Vázquez^a

^aUnidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, y ^bSección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México

Key Words

Endothelium · Expression analysis · Sarcoglycan-sarcospan complex · Sarcospan · Smooth muscle

Abstract

Recently, participation of the sarcoglycan (SG)-sarcospan (SSPN) complex in the development of cardiomyopathy in patients with limb-girdle muscular dystrophy has been shown, and presence of the complex in smooth muscle may be important for the contraction/dilation process of vessels. However, there are few studies determining the SG-SSPN complex in vascular smooth muscle and endothelial cells of vessels. In this study, we analyzed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunofluorescence the expression of different components of the complex in vein/artery smooth muscle and endothelial cells of the human umbilical cord. By RNA analysis, we observed expression of α -, β -, γ -, δ -, ϵ -SG, and SSPN in smooth muscle cells. In endothelial cells, RNA expression was restricted to β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN. At protein level, we observed in smooth muscle the presence of β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN. In endothelial cells, immunostaining only evidenced the presence of ϵ -SG and SSPN. However, colocalization of SGs and SSPN with dystrophin and utrophin was noted. These results, interestingly, suggest that the SG-SSPN complex may either

form with dystrophin or utrophin in smooth muscle cells, and with utrophin in endothelial cells. Additionally, we also observed in some smooth muscle regions the colocalization of the SG-SSPN complex with caveolin, with colocalization being more pronounced between ϵ -SG-SSPN and caveolin in endothelial cells.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

Introduction

The dystrophin-associated glycoprotein complex (DAGC) is a multimeric array of membrane and cytoskeletal proteins that links extracellular matrix to the cytoskeleton [1]. DAGC components include dystroglycans, dystrophin, syntrophins, dystrobrevin, sarcoglycans (SGs), and sarcospan (SP). Disruption of the complex as a result of the deficiency in one of its components promotes muscle degeneration, as is the case in diverse muscular dystrophies [2]. The SG-SSPN complex is recognized as a subcomplex of DAGC and is composed of the subunits α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, and ζ -SGs as well as SSPN [3, 4]. SGs are glycoproteins with a transmembrane domain, that have high homology between their sequences and structure, and SSPN is a tetraspan protein that associates biochemically with SGs [5]. Mutations in α -, β -, γ -, and δ -SGs genes lead to limb-girdle muscular dystrophy

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
1018-1172/05/0421-0001\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/jvr

Ramón Mauricio Coral-Vázquez

Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc No 330 Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06725 México, D.F. (Mexico)
Tel. +52 55 5627 6941, Fax +52 55 5388 5174, E-Mail rmcoralv@prodigy.net.mx

type 2 [6–10]. First described in skeletal muscle, the SG-SSPN complex is also present in smooth and cardiac muscles, although its composition varies according to the muscle type. In striated muscle (skeletal and cardiac muscle), there exist at least two types of complexes, both containing β -, γ -, and δ -SGs; mutually exclusive components are α - and ϵ -SGs [11, 12]. In smooth muscles, the SG-SSPN complex is similar to that described in skeletal muscles in the presence of ϵ -SG. In a recent study, ζ -SG was described as part of the SG-SSPN complex [4]; however, its association with α - and ϵ -SGs remains to be elucidated. β -, δ -, and ϵ -SGs have broad expression, e.g. in the brain, lung, kidney, liver, and other organs, but α - and γ -SGs are mainly expressed in striated muscle.

In addition to the role of the SG-SSPN complex in limb-girdle muscular dystrophies, the complex plays an important role in smooth and cardiac muscles. SG-SSPN complex disruption leads to dilated cardiomyopathy in limb-girdle muscular dystrophy type 2 patients [13–17] as well as in SG-deficient models [18–20]. In either case, the primary deficiency in any SG results in the secondary loss of the SG-SSPN complex [19, 21, 22]. The δ -SG null mouse model presented muscular dystrophy characterized by the complete loss of the SG-SSPN complex in skeletal and cardiac membranes [19]. Closer analysis of the dilated myopathic heart of this mouse showed irregularities in the coronary vasculature, confirming the importance of the SG-SSPN complex in blood vessels. Few studies on DAGC in vascular endothelial cells and smooth muscles have shed more light on its composition and possible functions of its components in these tissues. Most of these studies were performed in animal models and in human coronary arteries. Due to the difficulty to obtain vascular human tissues and since results obtained in animal models are not always transferable to humans, we decided to evaluate the transcriptional expression and protein distribution of the SG-SSPN complex as well as its coexpression with other DAGC components in veins and arteries of the human umbilical cord, a tissue that can easily be obtained without further stressful consequences for the patients.

Materials and Methods

The study was approved by the Hospital Ethics Research Committee.

Tissues

Umbilical cords of mature newborns from full-term pregnancies were obtained within 15 min after birth, and 10 cm of tissue was

placed in 0.9% NaCl. Then, the vein and arteries were dissected and cut to expose the vascular lumen. Vessels were incubated separately in 0.9% NaCl containing a mixture of collagenase types I and IV (0.75 mg/ml each; Invitrogen™) for 30 min at 4°C. Endothelial cells were scraped off from the vascular lumen using a syringe plunger and centrifuged at 3,500 rpm for 10 min at 4°C. Cells were resuspended in 0.9% NaCl and centrifuged once more. The pellet was recovered and processed for RNA extraction. The endothelium-free vein and artery were also processed for RNA extraction.

RNA Isolation and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To analyze mRNA expression of SG-SSPN complex components, total RNA from the endothelium and endothelium-free artery and vein smooth muscles was assayed by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). cDNA synthesis was performed from 2 μ g total RNA by reverse transcription with MMLV (Invitrogen) and random primers. cDNAs were PCR amplified with specific primers for each SG: α -SG, sense 5'-GCAATTGGTGAGCAGAGCAGCAGAT-3', antisense 5'-GGTGCAATTGACCCTGGTGGATAA-3'; β -SG sense 5'-ATGCGTGAGAGAGCTGTTGA-3', antisense 5'-TTTGGTCCAATGCGAATCAC-3'; γ -SG sense 5'-TACTCATCCTCGTTGTG-3', antisense 5'-TACAGTCACATTCTGGGTTG-3'; δ -SG sense 5'-ACACCTAATGTCAGGGCAGAC-3', antisense 5'-TCTGTCCTTCTCATCCCTCAC-3'; ϵ -SG sense 5'-TCCACCTTACCCAAAACCTG-3', antisense 5'-AACGGGAAGTCTTCTGCAGA-3', and SSPN, sense 5'-CTAGTCAGGGACAC'CCATT-3', antisense 5'-GGCACTCAGCAGAAAGTATAA-3'. As internal control, human GAPDH cDNA was simultaneously coamplified with each component of the SG-SSPN complex using the following primers: sense 5'-ATCCCATCCCATCTTCAG-3' and antisense 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. The PCR reaction mixture consisted of 2.5 μ l of cDNA, 10 pmol of each primer, 200 μ M of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, and two units of Taq polymerase (Invitrogen) in a final volume of 25 μ l. Amplification conditions were one denaturing step at 95°C for 5 min followed by 32 cycles with denaturing for 30 s at 95°C; annealing for 30 s at 59°C for β - and δ -SG at 62°C for ϵ -, γ -SG, and SSPN, and 30 s at 72°C for α -SG; elongation for 30 s at 72°C, and a final elongation step at 72°C for 7 min. PCR products were electrophoretically separated on 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Band intensities were quantified directly from stained agarose gel using video imaging and a densitometry software system (AlphaMager 2200 5.0 software).

Immunofluorescence

Vein and artery from fresh umbilical cords were dissected and cut into fragments of 1 cm in length. Each vessel fragment was re-filled with Jung tissue freezing medium (Leica Instruments, Germany) and frozen in liquid nitrogen-isopentane. Cryosections (7 μ m in thickness) from each vessel were permeabilized for 3 min with 0.3% Triton X-100. After incubation with blocking solution (5% bovine serum albumin in phosphate-buffered solution, PBS) for 1 h at room temperature, cryosections were incubated for 3 h with one primary antibody (single staining) or two primary antibodies (double staining) at room temperature. After several washes

with PBS, sections were incubated with the adequate secondary antibody for 1 h at room temperature. After rinsing with PBS, sections were mounted on Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA) [23] and observed under an Olympus BX60 fluorescence microscope.

Antibodies

Mouse primary monoclonal antibodies were used against α -SG (1:200; NCL-a-SARC, Novocastra), β -SG (1:200; NCL-b-SARC, Novocastra), γ -SG (1:200; NCL-g-SARC, Novocastra), δ -SG (1:200; NCL-d-SARC, Novocastra), and N-terminal (1:200; NCL-DYS3, Novocastra) and C-terminal dystrophin (1:200; NCL-DYS2, Novocastra). Goat primary polyclonal antibodies were used against ϵ -SG (1:100; C-17 Santa Cruz), N-terminal utrophin (1:100; N-19, Santa Cruz), and β -dystroglycan (1:100; C-20, Santa Cruz); rabbit primary polyclonal antibodies were used against caveolin-1 (1:100; H-97, Santa Cruz) and C-terminal utrophin (1:100; H-300, Santa Cruz). Rabbit polyclonal antibody was used against SSPN (1:100; C-20, Santa Cruz). As secondary antibodies, we used Cy3-goat anti-mouse (Jackson), FITC-goat anti-rabbit (Santa Cruz), FITC-mouse anti-goat (Jackson), and FITC-rabbit anti-goat (Santa Cruz).

Results

RNA expression of the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelial cells of human umbilical cord vessels was evaluated by semiquantitative RT-PCR. For this purpose, total RNA was purified from different portions of artery and vein (proximal to the placenta, in the middle portion of the umbilical cord and near the abdominal wall) obtained from female and male newborns. Since the expression level of each gene was the same independently of the gender of the newborn and the umbilical cord portion, only results obtained in endothelial and smooth muscle cells from one portion of the vein and artery are shown in figure 1. In smooth muscles of both vessels, we detected mRNA expression of all components of the SG-SSPN complex, although γ -SG was expressed at a very low level. Besides, in endothelial cells there was only evident expression of β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN.

To explore the expression of the SG-SSPN complex at protein level, human umbilical cord vein and artery cryosections were analyzed by indirect immunofluorescence. Because the staining pattern was the same for artery and vein sections, we only show results obtained in artery sections (fig. 2, 3). In contrast to the mRNA expression observed, in smooth muscles only evident protein expression of β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN, but not of α -, and γ -SG proteins, was evident (fig. 2). In endothelial cells, immunostaining for ϵ -SG and SSPN was exclusively apparent. To assess colocalization of SGs and SSPN in tissue, double immunofluorescence staining was assayed using dif-

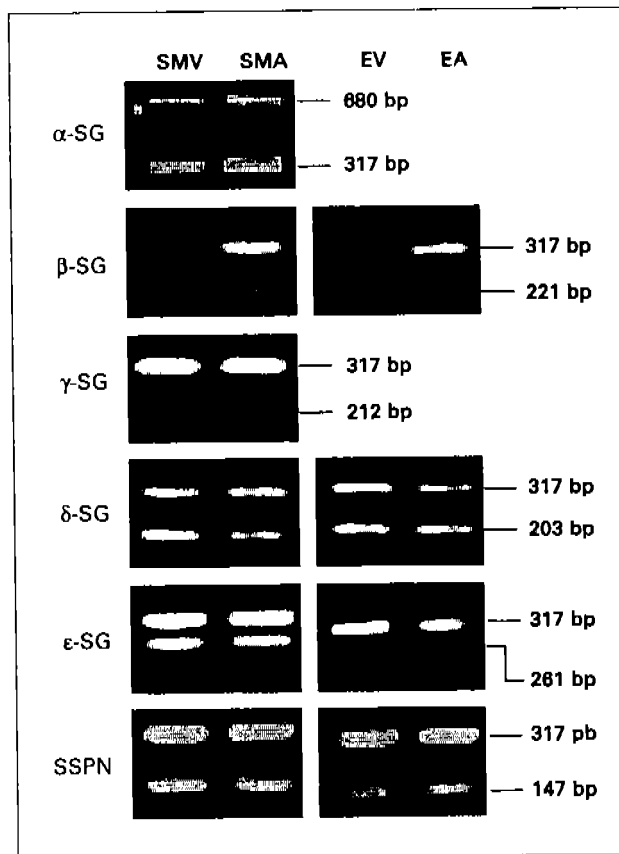


Fig. 1. RT-PCR analysis of the SG-SSPN complex in umbilical cord vessels. Total RNAs obtained from smooth muscle (SM) and endothelial (E) cells of umbilical cord vein (V) and artery (A) were RT-PCR amplified using specific primers for α -SG (fragment 680 bp), β -SG (fragment 221 bp), γ -SG (fragment 212 bp), δ -SG (fragment 203 bp), ϵ -SG (fragment 261 bp), and SSPN (fragment 147 bp). All reactions were analyzed in the exponential phase of amplification. The RNA amplification of GAPDH (fragment of 317 bp) was used as an internal control.

ferent antibody combinations (fig. 2). Results showed that β -SG and δ -SG colocalize exclusively in smooth muscles (fig. 2a-c). β - and δ -SG seem to form a complex with SSPN, as can be deduced from partial colocalization of δ -SG and SSPN (fig. 2d-f). However, it is clear that in smooth muscles there is another complex composed of ϵ -SG/SSPN, which is the only one present in endothelial cells (fig. 2g-i).

Because the SG-SSPN complex is a component of DAGC [24], and taking into account that rabbit small arteries contain long forms of both utrophin and dystro-

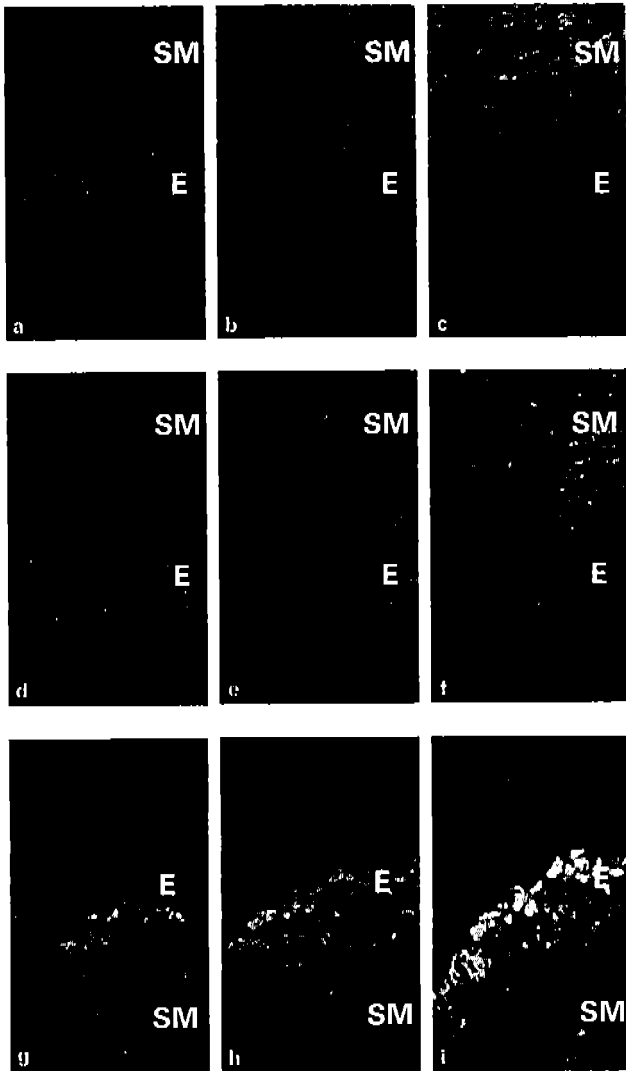


Fig. 2. Immunofluorescence analysis of the SG-SSPN complex in human umbilical cord vein. Transverse cryosections of the vessel were double stained with antibodies against β -SG/ δ -SG, δ -SG/SSPN and ϵ -SG/SSPN. Distinct panels show images obtained to β -SG (a), δ -SG (b, d), merge β -SG/ δ -SG (c), SSPN (e, h), merge δ -SG/SSPN (f), ϵ -SG (g), and merge ϵ -SG/SSPN (i). SM = Smooth muscle cell layer; E = endothelial cell layer. The white scale bar represents 25 μ m.

phin while small veins contained only the long form of utrophin [25], we assayed double staining of these proteins with SGs (fig. 3). Interestingly, antibodies that recognized the amino- (data not shown) and carboxyterminal portion of dystrophin only labeled smooth muscle

cells (fig. 3b, h); on the other hand, utrophin was detected in smooth muscle and endothelial cells (fig. 3c, k). Double staining in smooth muscle cells revealed partial staining of ϵ -SG and β -SG with dystrophin (fig. 3c, i) and utrophin (fig. 3f, l). In contrast, endothelial cells showed only strong colocalization of ϵ -SG utrophin (fig. 3d-f).

It was reported that dystrophin was specifically localized in the caveola-rich domains of smooth muscle sarcolemma [26]; thus, we decided to analyze whether components of the SG-SSPN complex colocalized with caveolin-1 in smooth muscle and endothelial cells. In smooth muscles, ϵ -SG and β -SG presented a partial colocalization with caveolin-1 (fig. 3m-r). In endothelium, ϵ -SG also showed colocalization areas with caveolin-1 (fig. 3m-o).

The staining pattern of δ -SG/dystrophin, δ -SG/utrophin and δ -SG/caveolin was the same in all cases as that obtained with β -SG, while the staining pattern of SSPN/dystrophin, SSPN/utrophin and SSPN/caveolin was the same as that observed for ϵ -SG (data not shown).

Discussion

In the recent past, several studies have shown the importance of the SG complex in vascular smooth muscle function [19, 20, 27]. To contribute to the knowledge of this complex in human vascular tissue, the aim of this work was to analyze the expression of the SG-SSPN complex in the artery and vein of human umbilical cord and to evaluate their possible association with other components of the dystrophin/utrophin complex. Results of the study showed that in smooth muscle cells of both vessels there was RNA expression for all SGs and SSPN, although levels of γ -SG were low. In contrast, there was only evident protein expression for β -, δ -, ϵ -SG and SSPN. Furthermore, in case of endothelial cells, the RT-PCR assay demonstrated RNA expression of β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN, but immunohistochemically only ϵ -SG and SSPN were detected.

According to our data, it can be suggested that in smooth muscles of human umbilical cord vessels the SG-SSPN complex could be composed of β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN. A previous study has also reported that β -, δ -, ϵ -SG, and SSPN were components of the SG-SSPN complex [11] in visceral and vascular smooth muscles of mice and hamster. Recently, the same group [28] evidenced by biochemical assays that γ -SG was also an integral component of the β -, δ -, and ϵ -SG complex in human coronary artery smooth muscles. In contrast, McNally's group [28]

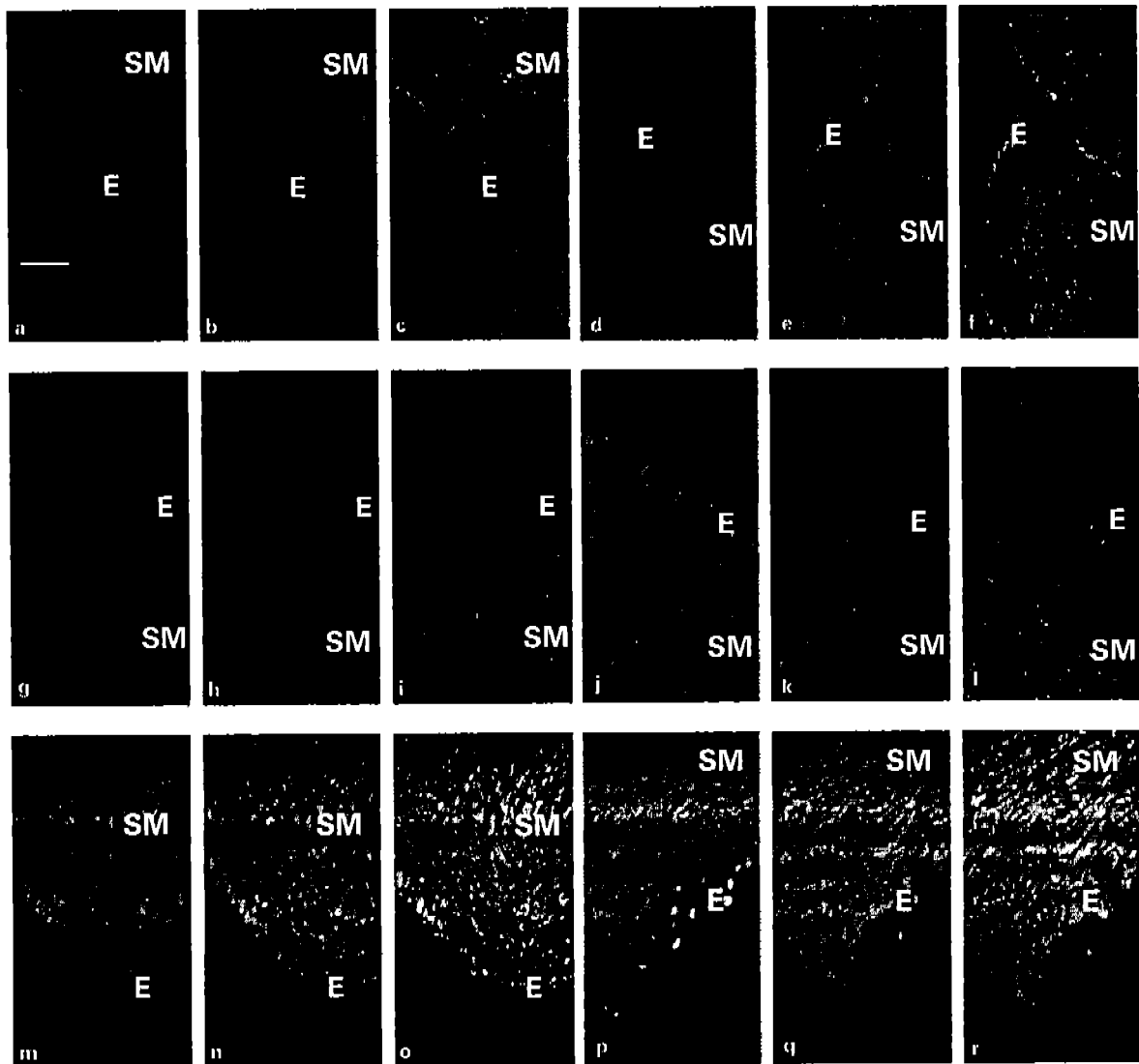


Fig. 3. Colocalization of β -SG, and ϵ -SG with dystrophin, utrophin, and caveolin in the umbilical cord vein. Transversal cryosections of the vessels were double stained with antibodies against ϵ -SG/dystrophin, ϵ -SG/utrophin, ϵ -SG/caveolin, β -SG/dystrophin, β -SG/utrophin, and β -SG/caveolin. Different panels show images obtained with ϵ -SG (**a, d, m**), β -SG (**g, j, p**), dystrophin (**b, h**), utrophin

(**e, k**), caveolin (**n, q**), merge ϵ -SG/dystrophin (**b**), merge ϵ -SG/utrophin (**c**), merge ϵ -SG/caveolin (**e**), merge β -SG/dystrophin (**i**), merge β -SG/utrophin (**j**), and merge β -SG/caveolin (**p**). SM = Smooth muscle cell layer; E = endothelial cell layer. The white scale bar represents 25 μ m.

observed that ζ -SG, not γ -SG, is the fourth component of the β -, δ -, and ϵ -SG complex in mouse coronary artery smooth muscles. The same group argues that contradictory results may be due to the high degree of similarity between γ -SG and ζ -SG [11], so antibodies directed against γ -SG may crossreact with ζ -SG [29].

Liu and Engvall [12] mentioned unpublished observations in which individual SG were also expressed in non-muscle tissues, including endothelial cells. However, by immunofluorescence analysis we merely evidenced the expression of ϵ -SG and SSPN in endothelial cells, with immunostaining being negative for other SG. This result

is in agreement with observations that ϵ -SG was present in arterioles and capillaries [30]. On the other hand, strong colocalization observed between ϵ -SG and SSPN indicated that the complex in the endothelial layer of the human umbilical cord vein and artery may solely be composed of these two proteins.

Surprisingly, the colocalization of the SG-SSPN complex with other components of the dystrophin/utrophin complex suggested that in vascular smooth muscles there were two complexes: one comprised β -, δ - and ϵ -SG, and SSPN associated with dystrophin, and the other formed by ϵ -SG and SSPN associated with utrophin. With respect to endothelial cells, results showed only the presence of the latter. These complexes may have mechanical and structural roles, and may participate in the maintenance of cells through signaling functions. In this regard, Rivier et al. [25], working with arterics and veins from rabbits, proposed that utrophin may play an important role in the correct assembly of muscle membrane proteins and may also have an architectural function in this structure; meanwhile, dystrophin has a mechanical role in the muscle membrane. On the other hand, there is evidence that DAGC may be associated with signal transduction pathways [31].

Weir et al. [31] demonstrated the presence of two isoforms of utrophin: utrophin A, which is expressed in striated muscle, peripheral nerves, and vascular smooth muscles, and utrophin B, present only in endothelial cells. According to these results, it may be suggested that in vascular smooth muscles the SG-SSPN complex may be associated with utrophin A, and that in vascular endothelium ϵ -SG and SSPN could be interacting with utrophin B. Additionally, our results (data not shown) and those of other studies disclosed in endothelial cells the presence of dystroglycans, α -dystrobrevin, and syntrophins [33–37]. Combining all this information, it may be hypothesized that in endothelial cells ϵ -SG and SSPN as well as dystroglycans, α -dystrobrevin, and syntrophins are com-

ponents of the utrophin-B-associated protein complex. Vascular smooth muscle cells may have a similar complex, but with proteins associated around utrophin A, and another complex included β -, δ -, ϵ -SG/SSPN, dystroglycans, α -dystrobrevin, and syntrophins as components of dystrophin-associated proteins.

Previous colocalization, co-immunoprecipitation, and cofractionation studies suggested that caveolin-3 was associated with the dystrophin-glycoprotein complex [38] and that this interaction was through the protein β -dystroglycan [39]. In addition, caveolin-1 has been colocalized with dystrophin in uterus smooth muscles [40]. In our work, we observed some coincidences in the localization of SG/SSPN with caveolin-1 in both vascular smooth muscles and endothelium, being more evident in the latter. These data indicated that the SG-SSPN complex, as part of the dystrophin-/utrophin-associated proteins, may be partially located in caveolae.

To the best of our knowledge, this is the first study showing the presence of alternative SG-SSPN complexes which may be part of dystrophin-/utrophin-associated proteins in vascular smooth muscles and endothelium, particularly in the human umbilical cord artery and vein. Additionally, some of these complexes could be located in caveolar domains of the sarcolemma. Identification of distinct SG-SSPN complexes may be important to apprehend the function of these proteins in vessels of different origins, and to better understand the pathogenesis of muscular dystrophies.

Acknowledgment

We gratefully acknowledge funding support from the 'Association Française contre les Myopathies' (grant MNM 2000 Groupe 1). I.R.-S. is a PhD student supported by CONACYT and the IMSS fellowship award. We also thank the Hospital de Gineco-Obstetricia 4 Luis Castelazo Ayala-IMMS for providing the human umbilical cords.

References

- 1 Angelini C: Advances and perspectives in muscular dystrophies. *Basic Appl Myol* 2002;12: 17–25.
- 2 Dalkilic I, Kunkel LM: Muscular dystrophies: Genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:231–238.
- 3 Hack AA, Groh M, McMally EM: Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* 2000;48:167–180.
- 4 Wheeler MT, Zamegar S, McNally EM: ζ -Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2002;11:2147–2154.
- 5 Crosbie RH, Lim LE, Moore SA, Hirano M, Hays AP, Maybaum SW, Collin H, Dovico SA, Stolle CA, Fardeau M, Tome FM, Campbell KP: Molecular and genetic characterization of sarcospan: Insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet* 2000;9:2019–2027.

- 6 Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB, Fardeau M, Beckman JS, Kaplan JC, Campbell KP: Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 1994;78:625-633.
- 7 Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP: Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 1995;11:266-273.
- 8 Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, Tomé FMS, Fardeau M, Jackson CE, Beckman JS, Campbell KP: Beta-sarcoglycan: Characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 1995;11:257-265.
- 9 Noguchi S, McNally EM, Ben Otmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, Kyriakides T, Middleton L, Hentati F, Hamida MB, Nonaka I, Vance JM, Kunkel LM, Ozawa E: Mutations in the dystrophin-associated protein sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 1995;270:819-822.
- 10 Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M: Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 1996;14:195-198.
- 11 Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP: ϵ -Sarcoglycan replaces α -sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 1999;274:27989-27996.
- 12 Liu LA, Engvall E: Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem* 1999;274:38171-38176.
- 13 Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyo-oka T, Hanaka F: Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: An animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13873-13878.
- 14 Van der Kooij AJ, de Voigt WG, Barth PG, Busch HF, Jennekens FG, Jongen PJ, de Visser M: The heart in limb girdle muscular dystrophy. *Heart* 1998;79:73-77.
- 15 Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Bernardinelli A, Danieli GA, Barchitta A, Hoffman EP, Dalla-Volta S, Angelini C: Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. *Muscle Nerve* 1999;22:473-479.
- 16 Barresi R, Moore SA, Stolle A, Mendell R, Campbell KP: Expression of γ -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Biol Chem* 2000;275:38554-38560.
- 17 Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA: Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest* 2000;106:655-662.
- 18 Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E: Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 1999;8:1589-1598.
- 19 Coral-Vázquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davison RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP: Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: A novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 1999;98:465-474.
- 20 Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL, Williamson RA, Campbell KP: Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell* 2000;5:141-151.
- 21 Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RC, Marie SK, Anderson LV, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M: The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet* 1996;5:1963-1969.
- 22 Bonnemann CG, Passos-Bueno MR, McNally EM, Vainzof M, de Sa Moreira E, Marie SK, Pavanello RC, Noguchi S, Ozawa E, Zatz M, Kunkel LM: Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: Missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Hum Mol Genet* 1996;5:1953-1961.
- 23 Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, Van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP: Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 1998;142:1461-1471.
- 24 Campbell KP: Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 1995;80:675-679.
- 25 Rivier F, Robert A, Hugon G, Mornet D: Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions. *FEBS Lett* 1997;408:94-98.
- 26 North AJ, Galazkiewicz B, Byers TJ, Glenney JR Jr, Small JV: Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. *J Cell Biol* 1993;120:1159-1167.
- 27 Cohn RD, Durbeej M, Steve M, Coral-Vázquez R, Sally P, Campbell KP: Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Clin Invest* 2001;107:R1-R7.
- 28 Wheeler MT, Korcarz CE, Collins KA, Lapidus KA, Hack AA, Lyons KA, Zarnegar S, Earley JU, Lang RM, McNally EM: Secondary coronary artery vasospasm promotes cardiomyopathy progression. *Am J Pathol* 2004;164:1063-1071.
- 29 Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR: Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 1997;272:32534-32538.
- 30 Rando TA: The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001;24:1575-1594.
- 31 Weir AP, Burton EA, Harroff G, Davies KE: A- and B-utrophin have different expression patterns and are differentially up-regulated in mdx mouse. *J Biol Chem* 2002;277:45285-45290.
- 32 Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW: Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 1999;147:645-658.
- 33 Loh NY, Newey SE, Davies KE, Blake DJ: Assembly of multiple dystrobrevin-containing complexes in the kidney. *J Cell Sci* 2000;113:2715-2724.
- 34 Zaccaria ML, Di Tommaso F, Brancaccio A, Paggi P, Petrucci TC: Dystroglycan distribution in adult mouse brain: A light and electron microscopy study. *Neuroscience* 2001;104:311-324.
- 35 Lumeng C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K, Chamberlain JS: Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* 1999;2:611-617.
- 36 Hosokawa H, Ninomiya H, Kitamura Y, Fujiwara K, Masaki T: Vascular endothelial cells that express dystroglycan are involved in angiogenesis. *J Cell Sci* 2002;115:1487-1496.
- 37 Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP: Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 1996;271:15160-15165.
- 38 Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP: Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta-dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 2000;275:38048-38058.
- 39 Hagiwara Y, Nishina Y, Yorifuji H, Kikuchi T: Immunolocalization of caveolin-1 and caveolin-3 in monkey skeletal, cardiac and uterine smooth muscles. *Cell Struct Funct* 2002;27:375-382.