



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**DESCRIPCIÓN DE UN COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADO A UTROFINA EN
BALSAS LIPÍDICAS DEL MÚSCULO LISO DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA:
MODULACIÓN DE eNOS/cGMP MEDIANTE EL COMPLEJO UAP**

**TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
Q.F.B CARLOS PALMA FLORES**

**TUTOR PRINCIPAL
DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. DIEGO GONZÁLEZ HALPHEN
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MÉXICO D.F. MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dedicada a
Valentina Palma Montiel
y a Cynhtia Montiel Hernandez

"Imposible" es sólo una palabra que usan los hombres débiles para vivir fácilmente en el mundo que se les dio, sin atreverse a explorar el poder que tienen para cambiarlo. "Imposible" no es un hecho, es una opinión. "Imposible" no es una declaración, es un reto. "Imposible" es potencial. "Imposible" es Temporal, "Imposible" no es nada.

[Muhammad Ali]

Tu tiempo es limitado, de modo que no lo malgastes
viviendo la vida de alguien distinto. No quedes
atrapado en el dogma, de vivir como otros piensan
que deberías vivir. No dejes que los ruidos de las
opiniones de los demás acallen tu propia voz interior.
Y, lo que es más importante, ten el coraje para hacer lo
que te dicen tu corazón y tu intuición. Estos, de algún modo.
Ya saben en qué quieres convertirte realmente.
Todo lo demás es secundario.
Steve Jobs

Ten el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir
tus sueños; el mundo será tuyo.
Paulo Coelho

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

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 Nietzsche

Locura es hacer la misma cosa una y otra vez
esperando obtener diferentes resultados.
Albert Einstein

Tu trabajo va a llenar gran parte de tu vida, y la única forma de estar realmente
satisfecho, es hacer lo que consideren un trabajo extraordinario. El único camino
para lograrlo, es amar lo que haces. Si no lo has encontrado, sigue buscando.
No te detengas. Al igual que con todos los asuntos del corazón, lo sabrás cuando
lo encuentres. Y, como cualquier gran relación, sólo se pondrá mejor y mejor,
conforme los años pasen. Así que sigue buscando, no te detengas.
Steve Jobs

Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a mis padres, el Sr. Carlos Palma Ortiz y la Sra. Virginia flores Gómez, a quienes amo profundamente y han dado todo por mi. Sin su entrega y amor por mi familia, jamás habría llegado a esta nueva etapa. Gracias por su tiempo, su comprensión y apoyo incondicional. A mis hermanos, Erik palma, Gabriela Palma y Gabriel del Rey, quienes siempre llevo en mi mente y mi corazón. Gracias a sus experiencias he sabido tomar las mejores decisiones. A mi bella esposa, mi compañera de vida, Cynthia Montiel, por su sacrificio en este duro proceso, por sobre todo, su amor, paciencia y fortaleza que permitieron no sólo culminar este exitoso trabajo, sino también compartir la dicha de ser padre. Porque eres mi amor, mi todo, porque se que tu compañía se extenderá mucho más allá de este período. Gracias por creer en mí y darme tiempo. A mi hija Valentina, que ha sido mi luz y me ha trazado el camino. A Dios por haberme dado la sabiduría, el entendimiento y la fortaleza para poder llegar al final de esta nueva etapa. A cada uno de ustedes, que directa e indirectamente, han sido pieza fundamental en la realización de esta tesis. A todos y todas ustedes, muchas gracias . . .

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi asesor, el Dr. Ramón Mauricio Coral por su apoyo y orientación durante el tiempo que he estado en su laboratorio. Él ha sido un gran mentor y maestro excepcional, siempre me ha provisto de un ambiente que promueve mis logros académicos y el éxito científico.

También quiero agradecer al Dr. Israel Ramírez Sánchez por su invaluable apoyo y estímulo, sus conocimientos y enseñanzas contribuyeron de manera exitosa a la culminación de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutor, los Dres. Diego González Halphen y Alejandro Zentella Dehesa, les agradezco la orientación, sugerencias y tiempo. Su experiencia positiva y útil en cada tutorial fue un elemento importante para mi desarrollo académico y profesional.

Al Ingeniero Carlos Palma Ortiz y a la Q.F.B Cynthia Montiel Hernández por su confianza y su valioso apoyo económico para terminar este trabajo.

A la Dra., Patricia Canto Cetina del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, al Dr. Guillermo Ceballos Reyes de la Escuela Superior de Medicina del IPN, a la Dra. Blanca García Pérez y a la M. en C. Shantal Baltierra de la Escuela de Ciencias Biológicas del IPN.

A mis colegas y amigos, el Dr. Bladimir Roque y la Dra. Luz Berenice Lopez del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE.

Apoyos

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de proyecto 55199. Durante su desarrollo, el estudiante fue becario de tiempo completo del CONACYT con el número de registro 210369, y por parte del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS con número de matrícula 99093798.

La presente investigación se llevó a cabo 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-IMSS y en el laboratorio de la División de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre-ISSSTE, bajo la tutoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y de la asesoría del Dr. Diego González Halphen y del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

Publicaciones

Palma-Flores C, Ramírez-Sánchez I, Rosas-Vargas H, Canto P, Coral-Vázquez RM, (2014) Description of an utrophin associated protein complex in lipid rafts domains of human artery smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1838:1047-1057

Ramírez-Sánchez I, Zentella-Dehesa A, Ceballos-Reyes G, Canto P, **Palma-Flores C**, Coral-Vázquez RM. (2012) Caveolae and non-caveolae lipid raft microdomains of human umbilical vein endothelial cells contain utrophin-associated protein complexes. *Biochimie* 94:1884-1890.

Lista de contenido

Abreviaturas-----	12
Relación de figuras-----	14
Resumen-----	16
Abstract-----	18

Capítulo 1

Introducción

1.1. Distrofia muscular y el complejo de proteínas asociadas a distrofina-----	19
1.1.1.Distrofinopatias-----	19
1.1.1.1Distrofia muscular de Duchenne-----	20
1.1.1.2.Distrofia muscular de Becker-----	20
1.2. Sarcoglicanopatias-----	20
1.3. Complejo de proteínas asociadas a distrofina-----	23
1.3.1. Proteína citoplasmáticas y periféricas a la membrana celular -----	23
1.3.2. Complejo distroglicano-----	26
1.3.3. Complejo sarcoglicano-sarcospan-----	27
1.4. Cardiomiopatía dilatada y defectos funcionales en el musculo liso vascular -----	30
1.5. Musculo liso vascular y el complejo de proteínas asociado a distrofina en vasos sanguíneos-----	31
1.6. Complejos de proteínas asociadas a distrofina en balsas lipídicas-----	34
1.7. Complejos de proteínas asociadas a utrofina y su posible participación en balsas lipídicas del musculo liso vascular-----	35

Capítulo 2

Planteamiento del problema-----38

Capítulo 3

Hipótesis-----39

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo general-----40

4.2. Objetivos particulares-----40

Capítulo 5

Material y Métodos

5.1. Consideraciones Éticas-----42

5.2. Material Biológico-----42

5.3. Cultivo primario de MLAUH-----42

5.4. Caracterización de cultivo celular-----43

5.5. Inmunofluorescencia indirecta-----43

5.6. Inmunofluorescencia indirecta CTB-Alexa 594-----45

5.7. Separación de dominios membranales del MLAUH-----45

5.8. Co-Inmunoprecipitación Recíproca-----46

5.9. Western blot-----48

5.10. Dot Blot CTB-HRP-----49

5.11. Ensayos de RNA de Interferencia -----50
5.12. Cuantificación de niveles de Óxido Nítrico-----50
5.13. Anticuerpos-----51

Capítulo 6

Resultados

6.1. Caracterización del cultivo primario de células de MLAUH-----52
6.2. Presencia de miembros del complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina en células de MLAUH.-----54
6.3. Co-localización parcial de utrofina con marcadores de balsas lipídicas y de dominios caveolares en células de MLAUH. -----57
6.4. Co-fraccionamiento parcial de miembros del complejo de proteínas asociadas a utrofina en balsas lipídicas y dominios caveolares de células de MLAUH-----
-----61
6.5. Interacción de componentes UAPC y cav-1 en células de MLAUH-----
-----65
6.6. Deficiencia de α/β -DG en células de MLAUH; Efecto de la pérdida de α/β -DG en la síntesis de Óxido Nítrico, fosforilación de eNOS y vía de señalización de cGMP-----
-----68

Capítulo 7

Discusión-----72

Capítulo 8

Conclusión-----80

Capítulo 9

Perspectivas-----81

Capítulo 10

Referencias-----82

Capítulo 11

Anexo-----96

Abreviaturas

➤ BD	Bradicinina
➤ BSA	Albúmina sérica de bovino
➤ Cav-1	Caveolina-1
➤ Cav-3	Caveolina-3
➤ CDG	Complejo distroglicano
➤ CMD	Cardiomiopatía dilatada
➤ Co-IP	Co-inmunoprecipitación
➤ CSG-SSPN	Complejo sarcoglicano-sarcospán
➤ CT-B	Subunidad B de toxina colérica
➤ DAPC	Complejo de proteínas asociadas a distrofina
➤ DAPs	Proteínas asociadas a distrofina
➤ DG-β	Distroglicano beta
➤ DMB	Distrofia muscular de Becker
➤ DMD	Distrofia muscular de Duchenne
➤ E	Extractos de proteína total
➤ eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
➤ eNOS ^p	Sintasa de óxido nítrico endotelial fosforilada
➤ GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
➤ IP	Inmunoprecipitación
➤ KDa	Kilodaltones
➤ LGMD	Distrofia muscular de cintura
➤ ml	Mililitros
➤ MLV	Musculo liso vascular
➤ nNOS	Sintasa de óxido nítrico neuronal
➤ NO	Óxido nítrico
➤ PBS	Amortiguador de sales de fosfatos
➤ NO	Óxido Nítrico
➤ PM	Peso Molecular
➤ r.p.m.	Revoluciones por minuto

- SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato
- SG Sarcoglicano
- SG- ϵ Sarcoglicano ϵ
- SSPN Sarcospán
- UAPs Proteínas asociadas a utrofina
- UAPC Complejo de proteínas asociadas a utrofina

Relación de Figuras

Figura 1. Complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina (DAPC/UAPC).-----
-----21

Figura 2. Organización molecular a nivel de proteína de distrofina y utrofina.-----
-----27

Figura 3. Organización molecular a nivel de proteína del precursor de α -/ β - distroglicano.-
-----28

Figura 4. Vasoconstricciones coronarias en el ratón nulo de δ -SG.-----32

Figura 5. Representación esquemática de las balsas lipídicas en una membrana plasmática-
-----36

Figura 6. Caracterización del cultivo celular primario de MLAUH mediante ensayos de
inmunofluorescencia indirecta y Western blot.-----52

Figura 7. Detección de miembros del complejo DAP, utrofina, α -SMA, cav-1 y cavina-1
en cultivos primarios de MLAUH.-----55

Figura 8. Co-localización de utrofina y miembros del DAPC con el gangliósido GM1 en el
sarcolema de células de MLAUH.-----59

Figura 9. Co-localización de utrofina con cav-1 y cavina-1 en el sarcolema de células de
MLAUH.-----59

Figura 10. Detección de los componentes UAPC en los dominios caveolares y balsas
lipídicas del MLAUH.-----63

Figura 11. Interacción entre componentes del UAPC y caveolina-1 (Cav-1) en células de
MLAUH.-----66

Figura 12. Deficiencia de α/β -DG en células de MLAUH; Reducción en la síntesis de óxido nítrico, la fosforilación de eNOS y la activación de efectores de la vía cGMP.-----

-----69

Figura 13. Representación esquemática de modelo propuesto del UAPC descrito en balsas lipídicas con dominios caveolares y su papel fisiológico en células de MLAUH.-----

-----73

Resumen

El complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) es un complejo multiproteico localizado en la membrana de células musculares. En músculo esquelético, bajo ciertas condiciones, distrofina puede ser substituida por su homólogo autosómico utrofina y formar complejos de proteínas asociados a utrofina (UAPC). Ambos complejos mantienen la estabilidad de la membrana plasmática durante el proceso de contracción y juegan un papel fundamental en la señalización transmembrana. Las mutaciones en los miembros del DAPC están asociados con la distrofia muscular y cardiomiopatía dilatada (CMD). Observaciones en ratones nulos de algunos componentes del DAPC sugieren que la generación de vasoconstricciones en arterias coronarias desencadena la aparición de CMD. Estos hallazgos proponen que la disfunción vascular es un evento importante en el desarrollo de ciertos tipos de CMD, lo cual pone de manifiesto la importancia de estas proteínas en el músculo liso vascular (MLV). En el MLV la estructura del DAPC se encuentra mediada por un perfil de proteínas diferentes a las reportadas en músculo estriado y aunque en músculo liso se describe también la presencia de utrofina, no existe evidencia clara sobre su participación como parte de un potencial complejo. En un estudio previo en vasos sanguíneos de cordón umbilical humano, se observó que utrofina colocaliza con caveolina-1 (cav-1), lo cual sugiere la presencia de un UAPC en la membrana plasmática del MLV. En el presente estudio, se demostró mediante análisis de inmunofluorescencia, ensayos de co-inmunoprecipitación y fraccionamiento subcelular mediante gradientes de flotación en sacarosa, la existencia de un UAPC localizado en balsas lipídicas de células humanas de músculo liso de la arteria umbilical (MLAUH). Este complejo está constituido por utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -actina de músculo liso (α -SMA), cav-1, la enzima sintasa de óxido nítrico

(eNOS) y cavina-1. La presencia de distrofina, utrofina, β -DG, Dp71, α -SMA ϵ -SG, β -SG, δ -SG, δ -SG3 y sarcospan en fracciones ausentes de balsas lipídicas sustentan la presencia de complejos alternos UAPC/DAPC ubicados en diferentes membranas celulares. Por otra parte, el bloqueo de α -/ β -DG disminuye la síntesis de óxido nítrico (NO) y la presencia de la forma fosforilada (activa) de eNOS. En adición, esto reduce la activación de señales río abajo de algunos efectores de la vía de señalización de cGMP. En conclusión todos estos resultados en conjunto, muestran la presencia de un complejo UAPC que regula la actividad de eNOS/cGMP en células de MLAUH. La identificación, composición y distribución subcelular de este complejo, contribuye al entendimiento de la fisiopatología del MLV en el desarrollo de CMD.

Abstract

The dystrophin-associated protein complex (DAPC) is a multimeric complex that links the extracellular matrix to the actin cytoskeleton, in some cases dystrophin can be substituted by its autosomal homologue utrophin to form the utrophin-associated protein complex (UAPC). Both complexes maintain the stability of plasma membrane during contraction process and play an important role in transmembrane signaling. Mutations in members of the DAPC are associated with muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy. In a previous study with human umbilical cord vessels, we observed that utrophin colocalize with caveolin-1 (cav-1) which proposed the presence of UAPC in the plasma membrane of vascular smooth muscle (VSM). In the current study, we demonstrated by immunofluorescence analysis, co-immunoprecipitation assays, and subcellular fractionation by sucrose gradients, the existence of an UAPC in lipid raft domains of human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC). This complex is constituted by utrophin, β -DG, ϵ -SG, α -smooth muscle actin (α -SMA), cav-1, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and cavin-1. It was also observed the presence of dystrophin, utrophin, β -DG, Dp71, ϵ -SG, β -SG, δ -SG, δ -SG3 and sarcospan in non-lipid raft fractions. Furthermore, the knockdown of α/β -DG was associated with the decrease in both the synthesis of nitric oxide (NO) and the presence of the phosphorylated (active) form of eNOS; and with a reduction in the downstream activation of some cGMP signalling transduction pathway components. Together these results show the presence of an UAPC complex in HUASMC that may participate in the activity regulation of eNOS and in the vascular function.

Capítulo 1

Introducción:

1.1. Distrofia muscular y el complejo de proteínas asociadas a distrofina

Las distrofias musculares (DM) son un grupo de enfermedades que afectan principalmente al músculo estriado y se caracterizan por la pérdida progresiva de la fuerza e integridad muscular. Las principales formas de DM son causadas por anomalías en el complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC) (Figura 1). El DAPC es un complejo conformado por la interacción de múltiples proteínas asociadas estrechamente con la distrofina, que es la proteína central y de donde el complejo adquiere su nombre. El complejo sarcoglicano-sarcospan (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].

1.1.1. Distrofinopatías

Las distrofinopatías son las DM más prevalentes y están causadas por alteraciones en el gen distrofina. Éstas incluyen la distrofia muscular de Duchenne (DMD), y la forma alélica benigna distrofia muscular de Becker (DMB).

1.1.1.1. Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) consiste en una enfermedad recesiva ligada al cromosoma X que afecta a uno de cada 3,500 varones y se origina por mutaciones en el gen de la distrofina [2]. La DMD es causada por mutaciones como: deleciones (60-70%), duplicaciones (10%) y mutaciones puntuales (10-30%), las cuales alteran el marco de lectura y suprimen la expresión de distrofina [3]. Generalmente, la mayoría de los pacientes mueren a la edad de 20 años por complicaciones respiratorias o falla cardíaca [4].

1.1.1.2. Distrofia muscular de Becker

Al igual que en la DMD, los pacientes con distrofia muscular de Becker tienen una debilidad progresiva en miembros inferiores y músculos proximales. Adicionalmente, muestran pseudohipertrofia y niveles elevados de creatina quinasa. Aunque la DMD y la DMB muestran fenotipos similares, clínicamente existen diferencias significativas. En el caso de la DMB, la edad de inicio es más tardía, pues los primeros síntomas clínicos se manifiestan a los 11 años, la pérdida de la deambulacion entre los 20 y 30 años, y generalmente mueren a la edad de 40 años [5-7]. En el caso de la DMB viene causada por mutaciones que no impiden la expresión completa de distrofina, por el contrario permiten la expresión de formas cortas o truncas de la proteína, lo cual se traduce en un fenotipo distrófico menos grave [3,8].

1.2. Sarcoglicanopatias

Las sarcoglicanopatias son las DM causadas por alteraciones en el gen de los sarcoglicanos y se caracterizan por trastornos de desgaste muscular de herencia autosómica recesiva.

Las sarcoglicanopatías son incluidas en un gran grupo de distrofias musculares de cintura (LGMD) debido a que estos trastornos progresivos, afectan predominantemente, a los músculos proximales alrededor de la escápula y las cintura pélvica. Las mutaciones en SG individuales son responsables de la LGMD-2C (γ -SG) , LGMD-2D (α -SG), LGMD-2E (β -SG) y la LGMD-2F (δ -SG) [9-13]. El fenotipo clínico resulta muy heterogéneo, y la edad de inicio, tasa de progresión y la gravedad puede variar entre y dentro de las familias afectadas [14]. En general la enfermedad se caracteriza por debilidad progresiva y degeneración del músculo esquelético, esto lleva a la pérdida de la ambulación, dificultad en la respiración y, a menudo muerte prematura [15].

La mayoría de las sarcoglicanopatías se asocian con mutaciones de sentido erróneo. Estas mutaciones generan la sustitución de residuos individuales que podrían conducir a una proteína mal plegada. Los defectos en cada SG ocasiona el deterioro de los demás SG lo que resulta en la desestabilización del DAPC y en consecuencia la aparición de DM.

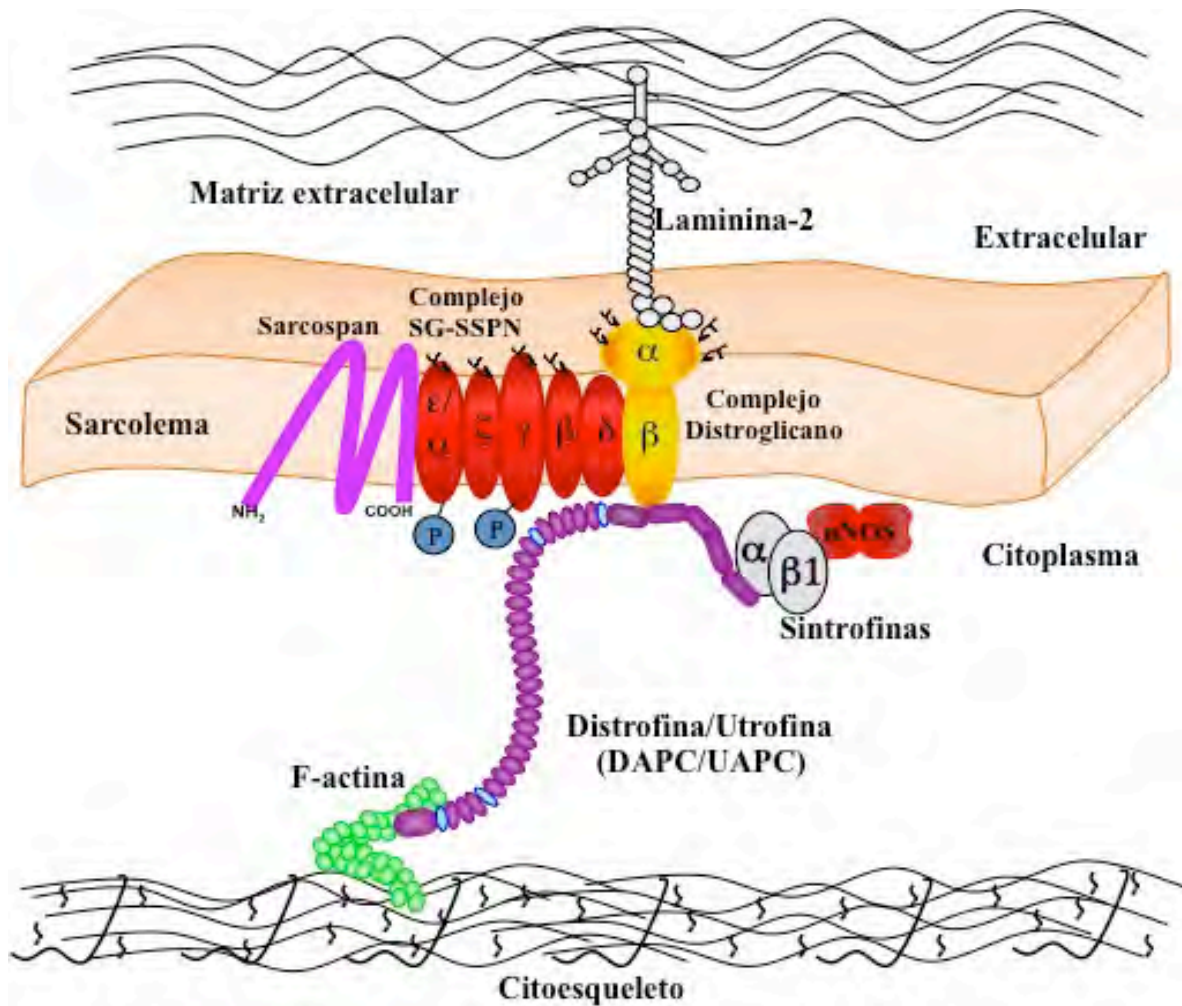


Figura 1 Complejo de proteínas asociadas a distrofina. Representación esquemática de la interacción entre distrofina y proteínas asociadas a distrofina (DAPs). En músculo esquelético, distrofina es substituida por su homólogo autosómico utrofina y forma complejos de proteínas asociados a utrofina (UAPC). La representación esquemática de ambos complejos muestra el puente de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, mediado por la interacción entre laminina-2, el complejo distroglicano y distrofina y/o utrofina.

1.3. Complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC)

El DAPC es un complejo multiproteico localizado en la membrana de células musculares. Su estructura y composición está mediada por la interacción entre distrofina, los distroglicanos (DG, α - y β -), sarcoglicanos (SG, α -/ ϵ -, β -, δ - y γ -/ ζ -), y sarcospan (SSPN) [16-19]. Bajo ciertas condiciones el homólogo autosómico de distrofina, la proteína utrofina, interacciona con las proteínas que estructuran el DAPC y forma complejos de proteínas asociados a utrofina (UAPC) [20]. En músculo estriado proteínas como las sintrofinas, las distrobrevinas y moléculas de señalización como: la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), la calmodulina y la caveolina-3 (Cav-3) forman parte del DAPC [1]. Por la parte externa de la célula, el DAPC se une a proteínas de la matriz extracelular como lo son laminina, agrina y perlecano, mientras que por su parte intracelular se une a los filamentos de actina [20,21]. A través de esta serie de interacciones el DAPC se encarga de unir al citoesqueleto y a la matriz extracelular. Esto confiere estabilidad estructural a la membrana celular y mantiene la unión mecanosensitiva entre el medio intra y extracelular durante el proceso contráctil [22-24]. La importancia de su estudio radica en que la disrupción del DAPC desestabiliza el puente de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto, promoviendo así el desarrollo de DM. De acuerdo con su ubicación celular el DAPC puede dividirse de manera general en al menos tres subgrupos; un componente citoplasmático, el CSG-SSPN y el CDG.

1.3.1. Proteínas citoplasmáticas y periféricas a la membrana celular

Dentro del componente citoplasmático destaca la presencia de distrofina y/o utrofina, por considerarse como las proteínas que anclan a la membrana celular las DAPs. La distrofina

es una proteína del citoesqueleto de 427 KDa expresada a partir del gen de DMD [25,26]. Su transcripción se encuentra controlada por tres promotores independientes; cerebro (B), músculo (M) y purkinje (P), estos reflejan la distribución tisular de la expresión de distrofina [1]. El promotor M expresa a distrofina en los músculos esqueléticos y cardíacos [27]. Adicionalmente, el gen de la DMD también tiene cuatro promotores internos, los cuales dan lugar a los transcritos más cortos que codifican las isoformas truncas de la región carboxilo terminal [260 KDa (Dp260) , 140 KDa (Dp140) , 116 KDa (Dp116), y 71 KDa (Dp71)] [28-30]. Estas isoformas contienen algunos sitios de unión que permiten la interacción con un gran número de proteínas asociadas a la distrofina.

La distrofina es un miembro de la familia de proteínas β -spectrina/ α -actinina [31], la cual esta organizada en cuatro dominios distintos: (i) El dominio amino-terminal que contiene un par de módulos de homología a calponina que se unen a la actina filamentosa [32]; (ii) El dominio en forma de varilla central compuesto de más de 2,800 aminoácidos. Estos forman 24 tripletes helicoidales homólogos y cuatro dominios bisagra [31], que confieren flexibilidad a la proteína (iii). El dominio WW [33], conforma un pequeño motivo en forma de hoja β plegada que reconoce secuencias ricas en prolina o sitios fosforilados. El dominio WW de distrofina se asocia con el motivo PPxY implicado en la interacción con β -DG. Este dominio WW es seguido por un dominio rico en cisteína y dos módulos de ZZ [34,35] de unión a la calmodulina dependiente de calcio [36]; (iv) El dominio carboxilo terminal que contiene dos regiones formando espirales α -helicoidales enrolladas [37,38], las cuales forman el sitio de unión para distrobrevinas.

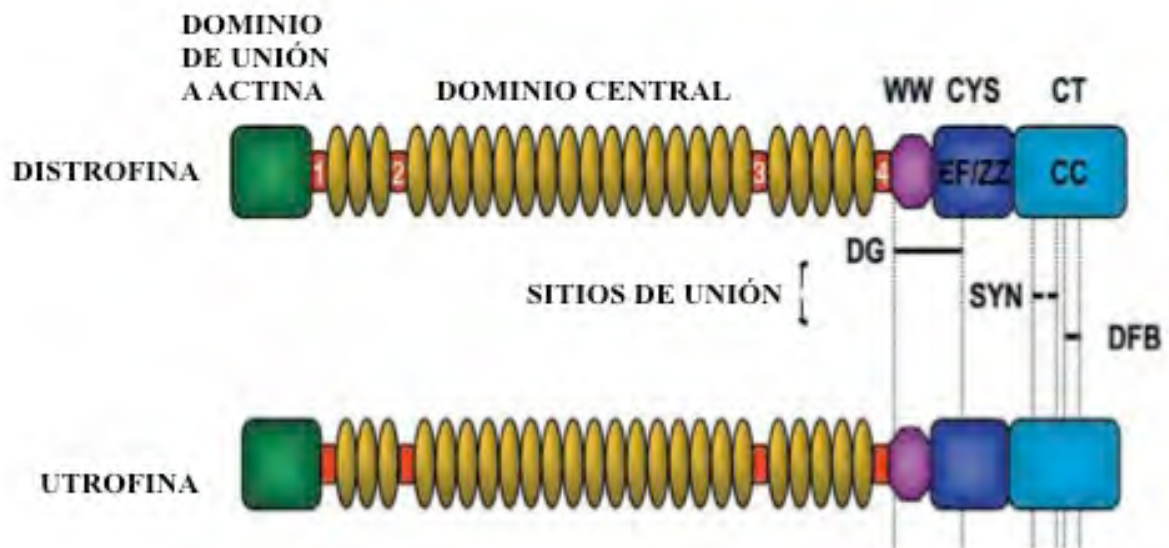


Figura 2. Organización molecular a nivel de proteína de distrofina y utrofina. En este esquema se representan los dominios más relevantes de cada proteína.

Por su parte, la utrofina es una proteína que pesa 397 KDa. Ésta posee las primeras cuatro regiones que componen la estructura primaria de la distrofina, sólo que con el dominio amino terminal más corto (Figura 2). La estructura primaria de la región carboxilo terminal de ambas proteínas es tan similar que utrofina es capaz de enlazar muchos componentes del DAPC [39]. Adicionalmente, en la región súper enrollada del extremo carboxilo terminal de utrofina y distrofina, interaccionan las proteínas α -distrobrevina y β -distrobrevina, las cuales poseen un PM de 78 y 59 KDa respectivamente [40,41]. Las distrobrevinas están codificadas por dos genes diferentes, α - y β -, y tienen una homología significativa con el dominio rico en cisteína de la distrofina [42,43]. Además de la distrofina, utrofina y las DAPs, las distrobrevinas tienen un conjunto de socios específicos vinculantes que participan en la integridad estructural: sincoilina; disbindina; desmuslina y DAMAGE [44,45].

Por otro lado, unidas a la porción carboxilo terminal de la distrofina, utrofina y/o a las distrobrevinas se encuentran las proteínas α -sintrofina, β -sintrofina y β -sintrofina las tres con un PM de 58 KDa. Estas proteínas son importantes en el mantenimiento y traducción de señales intra y extracelulares durante el proceso contráctil [20]. Finalmente, la enzima sintasa de óxido nítrico (NOS) con un PM de 130 KDa, se encuentra asociada al complejo mediante su interacción con el dominio homodimérico PDZ de la proteína α 1-sintrofina [46] y/o caveolinas [20].

1.3.2. Complejo distroglicano (CDG)

El CDG contiene dos proteínas glicosiladas: α -DG y β -DG, las cuales son producto de la expresión de un mismo gen. El gen que conduce a la expresión de un polipéptido precursor

de 97 KDa, el cual sufre corte y glicosilación para producir ambos distroglicanos (Figura 3) [18]. β -DG es una proteína transmembranal de 43 KDa, la cual queda enlazada directamente a la región carboxilo terminal de la proteína distrofina [47], o de la utrofina [48]. Por su parte, α -DG es una proteína altamente glicosilada con un PM de 156 KDa, que se encuentra unida a la porción extracelular de β -DG, la cual establece unión con la matriz extracelular mediante su interacción con la proteína laminina α -2 [49]. Además, se ha propuesto que β -DG está implicado en procesos de señalización celular debido a su interacción con la proteína Grb-2, de la cual se conoce su importancia en los procesos de transducción [50,51].

1.3.3. Complejo sarcoglicano-sarcospan (CSG-SSPN)

El CSG-SSPN está compuesto por un grupo de proteínas transmembranales conocidas como α -SG, β -SG, γ -SG, δ -SG, ϵ -SG y ζ -SG, las cuales son proteínas glicosiladas con PM de 50, 43, 35, 35, 45 y 45 KDa respectivamente [52]. De acuerdo con sus características estructurales α -SG y ϵ -SG se clasifican como proteínas transmembranales tipo I debido a que su extremo amino terminal se localiza en la región extracelular, mientras que β -SG, γ -SG, δ -SG y ζ -SG se clasifican como proteínas transmembranales tipo II con el extremo amino terminal localizado en la región intracelular [52].

Todos los SG poseen un dominio citoplasmático corto el cual contiene sitios putativos de fosforilación, además de un dominio extracelular largo constituido por sitios potenciales de glicosilación [21]. En el caso β -SG, γ -SG y δ -SG se han encontrado grupos residuales de

cisteinas [53], por lo cual se sugiere podrían actuar como moléculas receptoras para algún ligando extracelular [54].

Adicionalmente embebida en la membrana celular y adyacente a los SG se encuentra una proteína de 25 KDa llamada sarcospan (SSPN), la cual contiene 4 dominios transmembranales y estructuralmente pertenece a la familia de proteínas tetraspan [55]. Esta proteína en conjunto con los SG constituye el complejo SG-SSPN, el cual se cree, establece interacción directa con la proteína distrofina [56] y de manera particular γ -SG y/o δ -SG con β -DG [54,57]. Estudios de inmunoprecipitación han mostrado la interacción de los SG con la distrobrevina, sugiriendo una asociación múltiple entre distrofina, distrobrevinas, DG y los SG [58]. Esto propone que los SG y SSPN estabilizan la interacción entre la matriz extracelular y el citoesqueleto a través del complejo DG [52].

En músculo liso vascular (MLV), la pérdida de dichas interacciones en pacientes con LGMD 2C-F y DMD/BMD [59-66] se han relacionado con la aparición de ciertos tipos de cardiomiopatía dilatada (CMD). Interesantemente, observaciones en pacientes y modelos deficientes en ciertos componentes del DAPC han demostrado que este padecimiento, surge de la generación de vasoconstricciones en las arterias coronarias [67-69]. Esto sugiere que la disfunción vascular es un evento importante en el desarrollo de CMD.

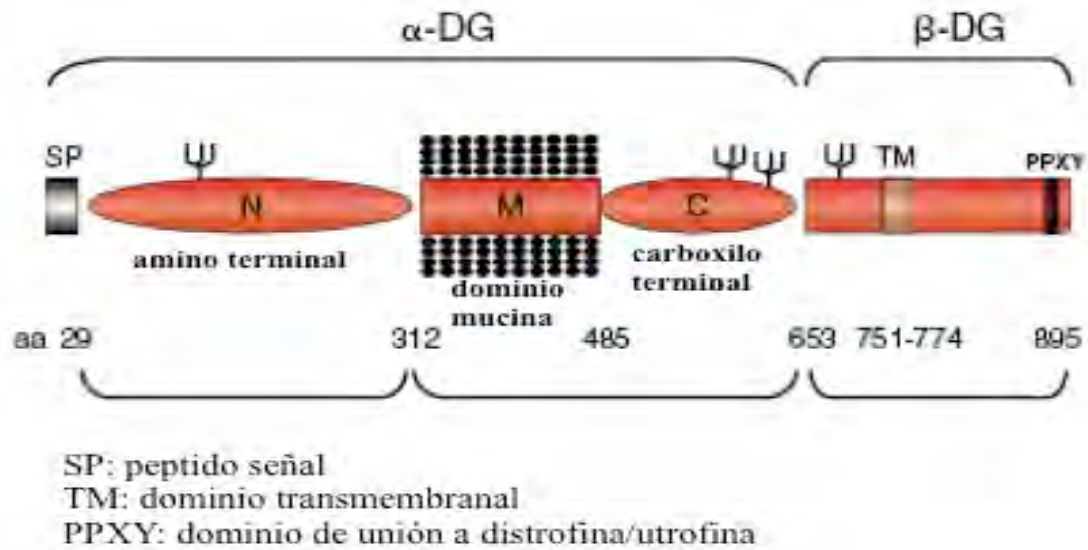


Figura 3. Estructura molecular a nivel de proteína del precursor de α-β-distroglicano. En este esquema se representan los dominios más relevantes de cada proteína.

1.4. Cardiomiopatía dilatada y defectos funcionales en el músculo liso vascular

La CMD es una enfermedad multifactorial considerada como un desorden primario del músculo cardíaco. Diversos estudios han determinado que esta enfermedad cardiovascular pueden ser heredada o adquirida [70]. La característica distintiva de la CMD es la dilatación de la cavidad ventricular izquierda o derecha y el incremento en el volumen y adelgazamiento de las paredes ventriculares [71]. La permanente dilatación y adelgazamiento ventricular conlleva a un desajuste grave del ciclo sístole-diástole, lo que provoca la posterior insuficiencia cardíaca. También y de manera importante se ha observado que en la CMD la presencia de lesiones isquémicas en las arterias coronarias que generan un desequilibrio entre el aporte y la demanda cardíaca de sangre oxigenada. Estudios recientes han determinado que el desarrollo de CMD puede ser causado por debilitamiento del citoesqueleto del cardiomiocito y del músculo liso de las arterias coronarias [72]. En el MLV se sabe que las proteínas involucradas en el desarreglo del citoesqueleto son componentes del DAPC.

Defectos funcionales del MLV asociados a mutaciones en los SG han propuesto nuevos mecanismos sobre la patogénesis de ciertas CMD asociadas al DAPC [67,68]. Estudios *in-vivo* de flujo de sangre coronaria en pacientes con DM de tipo LGMD 2C-F que desarrollan CMD [73-76] sugieren que la disfunción coronaria esta relacionada con defectos en el músculo liso de las arterias coronarias [67]. El impacto que esto genera ha sido estudiado en modelos animales carentes de ciertos componentes del DAPC.

Ratones con mutaciones nulas en γ -SG, δ -SG o β -SG desarrollan CMD, la cual se caracteriza por la degeneración focal [67,77,78]. En el caso de ratones nulos de δ -SG y β -

SG se ha observado la pérdida completa del complejo SG en MLV, mientras que en el caso de γ -SG sólo la ausencia de la proteína y no todo el complejo [78]. En contraste, los ratones que carecen de α -SG únicamente desarrollan distrofia muscular pero no CMD [79]. En estos ratones (mutantes de α -SG), el complejo sarcoglicano se mantiene intacto en el MLV. Por lo tanto, se ha propuesto que la pérdida del los SG en el DAPC particularmente, en el MLV promueve el desarrollo de CMD (Figura 4) [67]. En concordancia con esto, se han encontrado defectos en el llenado microvascular de ratones mutantes de β -SG o δ -SG, pero no en ratones mutantes α -SG [67,77]. Adicionalmente, modelos carentes de distrofina (ratones mdx) muestran alteraciones en las propiedades biomecánicas y defectos en la dilatación de los vasos sanguíneos, pero no CMD [80]. Por otro lado, la carencia natural de δ -SG en el hámster BIO 14.6, que desarrolla una sarcoglicanopatía espontánea y una CMD [81], confirma la importancia e integridad de estas proteínas en el músculo liso de los vasos sanguíneos. Lo anterior destaca el interés sobre el análisis y caracterización de estas proteínas en el músculo liso de vasos sanguíneos.

1.5. Músculo liso vascular y el complejo de proteínas asociado a distrofina en vasos sanguíneos

Los vasos sanguíneos se encuentran permanentemente sujetos a las fuerzas mecánicas traducidas por estiramientos, abarcando ciclos mecánicos de tensión debidos a la naturaleza pulsátil del flujo sanguíneo y al estrés interrumpido que se genera en las superficies del vaso. Las alteraciones en el estiramiento o el estrés interrumpido invariablemente producen modificaciones en la pared del vaso, lo cual se han correlacionado con ajustes pasajeros de su diámetro. Estos ajustes están mediados por la liberación de agonistas vasoactivos o

cambios en el tono miogénico. No obstante, si se alteran de forma crónica las fuerzas mecánicas, estas usualmente promueven la aparición de alteraciones adaptativas de la pared del vaso, y se afecta su composición estructural [82,83].

En los vasos sanguíneos, la principal función del MLV es mantener el tono vascular y la resistencia del vaso [82]. A diferencia de la célula endotelial, las células de MLV presentan propiedades morfológicas y funcionales diferentes dentro y a lo largo del mismo vaso, o de diferentes tipos. Dado que el MLV está sujeto a la deformación celular y a la tensión mecánica durante el proceso contráctil, la célula ha desarrollado mecanismos que le permiten transmitir la fuerza ejercida entre las células evitando así daños en la membrana plasmática [84,85]. Lo anterior involucra la expresión de los componentes de DAPC debido a que su estructura proporciona el enlace que estabiliza la membrana celular durante el proceso contráctil.

En MLV el DAPC está constituido de un perfil específico de proteínas, diferentes a las descritas en músculo estriado [86-88] y aunque algunos trabajos describen también la presencia de utrofina en MLV, no existe evidencia clara sobre su participación como parte de un potencial complejo. Dado que en el modelo carente de distrofina, utrofina restablece la función del músculo esquelético [89], en MLV este mecanismo destaca la importancia del estudio de complejos de proteína asociados a utrofina (UAPC) en vasos sanguíneos; no obstante su función y presencia no han sido determinadas.

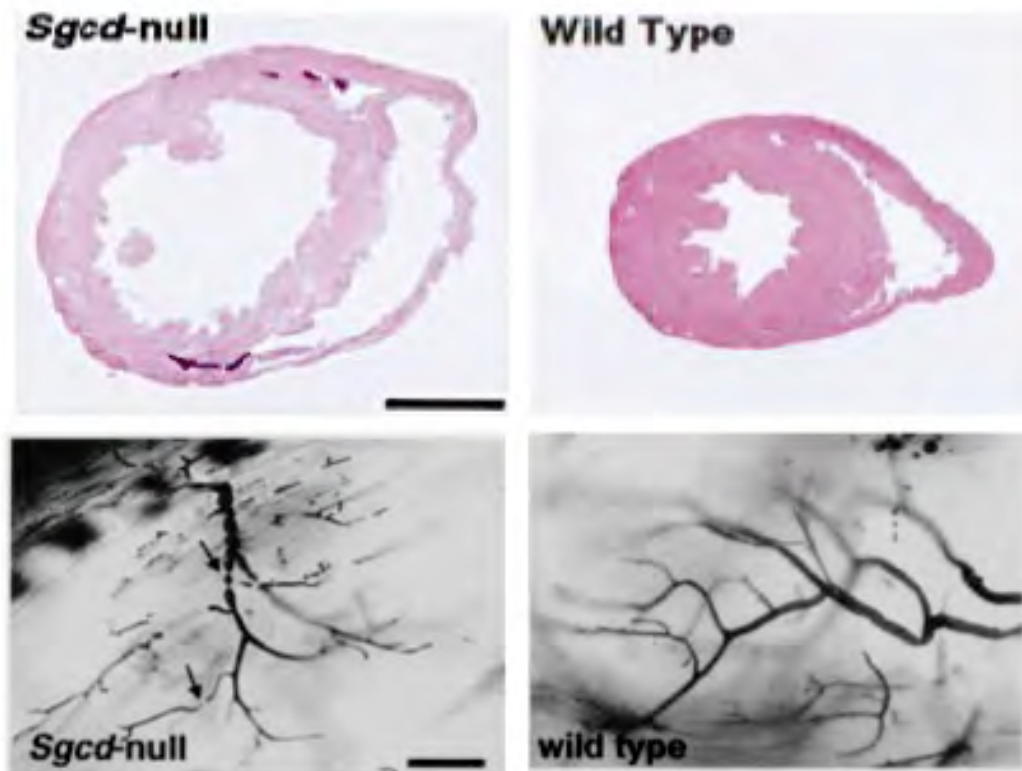


Figura 4. Análisis histológico y transiluminaciones en arterias coronarias del ratón carente de δ -SG. La imagen superior muestra la cardiomiopatía dilatada en el ratón carente de δ -SG en comparación con el corazón del ratón silvestre. La imagen inferior muestra la presencia de constricciones en las arterias coronarias del ratón carente de δ -SG en comparación con un ratón silvestre. Imagen tomada de Coral-Vázquez *et al*, Cell, 98, (1999) 465-474.

1.6. Complejos de proteínas asociadas a distrofina en balsas lipídicas

En músculo estriado la proteína utrofina se asocia con la mayoría de las proteínas que conforman el DAPC excepto con la propia distrofina [90]. Esto genera UAPC localizados en regiones independientes al DAPC [91]. Su presencia en diferentes regiones de la membrana celular juega un papel fundamental en la señalización transmembrana. En MLV la composición del DAPC esta constituida por distrofina, los DG α - y β -, y por los SG ϵ -, β -, δ - y γ - o ζ - además de SSPN [86-88]. Por otro lado, aunque utrofina esta presente, no se ha demostrado si interaccion con componentes del DAPC o si forma complejos UAPC. En músculo esquelético existe evidencia de su presencia en la unión neuromuscular (NM), en esta utrofina interacciona con agrina, el receptor de acetil colina y las DAPs, formando un UAPC, mientras que en el resto del sarcolema, un DAPC asociado a Grb2 por medio de β -DG y otro asociado a la enzima nNOS en dominios ricos en caveolina-3 (cav-3) [1]. Por otro lado, en músculo liso no vascular la proteína distrofina co-segrega con dominios en la membrana denominados balsas lipídicas; particularmente en aquellos conocidos como caveolas [92]. Esto sugiere la presencia de un DAPC en otras regiones del musculo liso no vascular independientes a los encontrados en las caveolas.

Las balsas lipídicas son dominios planares en la membrana que se enriquecen en contenido de colesterol y esfingolípidos [93]. Las caveolas o dominios caveolares representan un subtipo de balsa lipídica en forma de invaginación en la membrana plasmática (Figura 5) [94]. Estas entidades enriquecidas en colesterol y esfingolípidos se mueven lateralmente, sobre la superficie de la célula al tiempo que permiten el intercambio de proteínas y lípidos entre el dominio de la balsa y el medio ambiente circundante [93].

Esta regulación dinámica facilita en la superficie de la célula la formación de plataformas de señalización. Las caveolinas son proteínas únicas de la caveola que proporcionan integridad estructural y actúan como un andamio de moléculas de señalización [95]. En MLV la isoforma específica es caveolina-1 (cav-1) y sirve como un marcador bioquímico para la identificación de dominios caveolares. En músculo liso no vascular, esto se ha utilizado para describir la presencia de distrofina en las caveolas [92], no obstante en el caso de utrofina esto no se ha explorado. En arterias de modelos animales la presencia de isoformas largas de distrofina y utrofina en diferentes zonas del vaso [96] sugieren que ambas proteínas mantienen una distribución diferencial. Lo anterior, supone la presencia de complejos alternos de ambas proteínas en el MLV.

1.7. Complejos de proteínas asociadas a utrofina y su posible participación en balsas lipídicas del músculo liso vascular

En un estudio previo enfocado al análisis de la expresión del DAPC en arterias y venas de origen humano, nuestro grupo de trabajo determinó que en MLV y endotelio, utrofina colocalizaban con cav-1 [97]. Este hallazgo nos permitió reportar la presencia de un UAPC implicado en la señalización celular por su interacción con eNOS en balsas lipídicas del endotelio vascular [98]. Dado que, en el músculo liso no vascular, en el cual se expresan ambas proteínas (utrofina y distrofina), se ha demostrado que distrofina estructura un DAPC que regula la liberación de Ca^{2+} intracelular en el dominio caveolar [99], en MLV se ha propuesto la existencia de un complejo UAPC asociado a cav-1 en las balsas lipídicas del MLV. Haciendo una analogía con el complejo descrito en el endotelio y que en las caveolas se modula la actividad enzimática de eNOS mediante su interacción con caveolina-1, en el presente trabajo nos planteamos la hipótesis sobre la existencia de un

complejo de proteínas asociado a utrofina capaz de modular la actividad enzimática de eNOS y su función vascular en balsas lipídicas del músculo liso de arteria umbilical humana (MLAUH). Debido a que su presencia y participación en la fisiopatología de la CMD en afecciones dependientes del complejo DAPC se desconocen, la caracterización y distribución membranal de este complejo en estos dominios podría contribuir al entendimiento de la fisiopatología del MLV en el desarrollo de CMD.

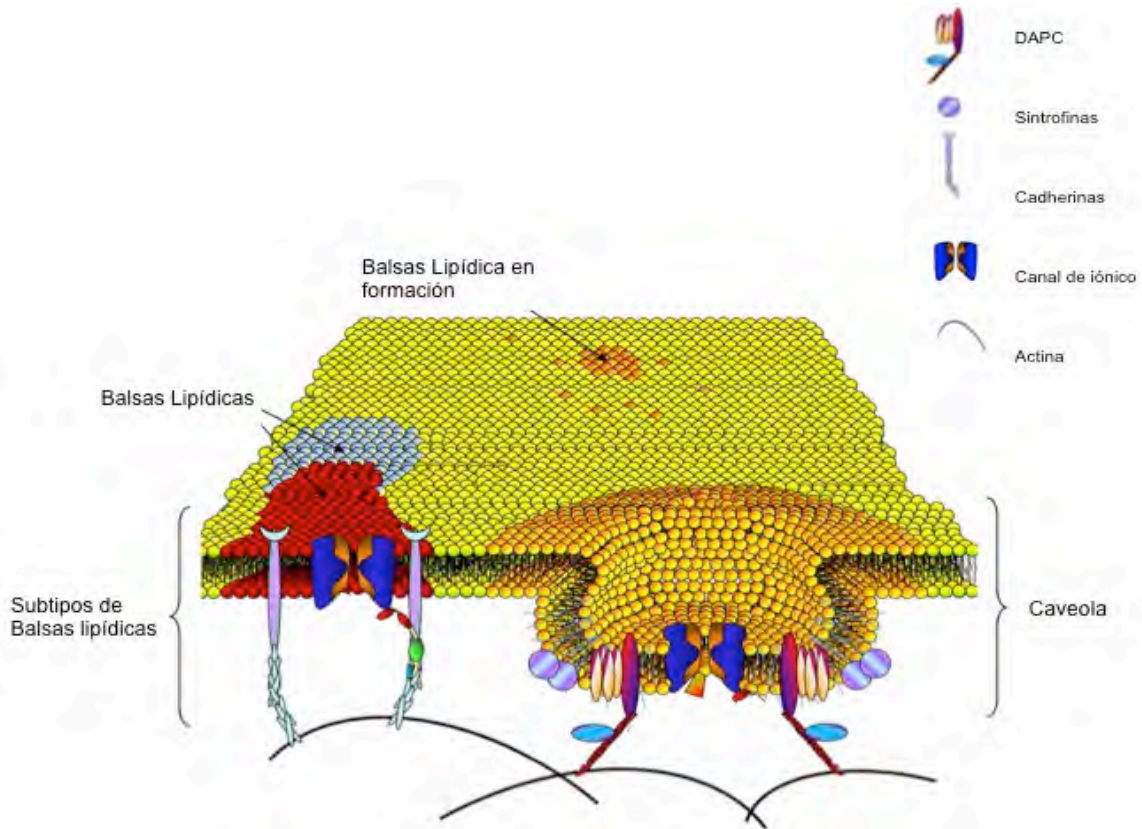


Figura 5. Representación esquemática de las balsas lipídicas en una membrana plasmática. Las balsas lipídicas en la membrana celular constituyen distintas plataformas de señalización. Mientras que algunas son estructuras invaginadas (caveolas), otras son planas. En músculo estriado el DAPC está anclado a la caveola y estabiliza las estructuras que interactúan con el citoesqueleto de actina, mientras que en otras balsas lipídicas interactúan preferentemente con proteínas como canales iónicos o cadherinas para el anclaje al citoesqueleto de actina. Imagen tomada de Maguy A *et al*, Cardiovasc. Res, 69 (2006) 798-807.

Capítulo 2

Planteamiento de problema

La cardiomiopatía dilatada es una enfermedad multifactorial que acompaña con frecuencia a la distrofia muscular de Duchenne/Becker y de cintura. Estas enfermedades se desarrollan a consecuencia de defectos o ausencia de los componentes del complejo de proteínas asociado a distrofina. En músculo liso vascular utrofina coexiste con distrofina y se postula que ambas proteínas forman complejos UAP/DAP independientes. No obstante, la presencia de un complejo UAP o formas alternativas de complejos UAP/DAP en el MLV no han sido descritas. Definir su papel y su participación en la fisiología del MLV abre una perspectiva relevante para el análisis de estas formas alternativas de complejo y comprender mejor su función. En un estudio previo identificamos la co-localización de utrofina con cav-1 en cortes transversales de vena umbilical humana. Dado que cav-1 es un componente esencial para la formación de dominios caveolares, esto nos estimuló a estudiar con mayor profundidad la probable existencia de un complejo UAP y sus posibles formas alternas UAPC o DAPC en balsas lipídicas y explorar su relevancia fisiológica en células de músculo liso de arteria umbilical humana (MLAUH).

Capítulo 3

Hipótesis

En MLV existe un complejo de proteínas asociado a utrofina que interacciona con cav-1 y se localiza en las balsas lipídicas de dominio caveolar. Este complejo se constituye de sarcoglicanos, distroglicanos e interacciona con la sintasa de óxido nítrico endotelial.

Capítulo 4

Objetivos

4.1. Objetivo general

Determinar la presencia de proteínas asociadas a utrofina en balsas lipídicas y su posible participación en la regulación de la actividad enzimática de eNOS mediante ensayos de inmunofluorescencia, gradientes de flotación en sacarosa, co-inmunoprecipitación y ensayos de RNA de interferencia en cultivos primarios de células de músculo liso de arteria umbilical humana (MLAUH).

4.2. Objetivos particulares

- Generar y caracterizar cultivos primarios de células de músculo liso de arteria umbilical humana (MLAUH).
- Identificar mediante inmunofluorescencia indirecta y ensayos de Western blot la presencia de componentes UAPC/DAPC y proteínas residentes de balsas lipídicas.
- Evaluar mediante inmunofluorescencia indirecta la co-localización de utrofina y distrofina con respecto al gangliósido GM1 que es residente de balsas lipídicas.
- Determinar por fraccionamiento celular en gradientes de flotación en sacarosa que proteínas estructuran un UAPC o DAPC en balsas lipídicas de dominio caveolar.
- Evaluar mediante ensayos de co-inmunoprecipitación recíproca la interacción de los componentes UAPC o DAPC y su asociación con proteínas residentes de balsas lipídicas, además de identificar su posible interacción con eNOS.

- Evaluar la posible participación del complejo descrito, en la función vascular del MLAUH mediante ensayos de RNA de interferencia para α - β -DG sometido a un estímulo químico con bradicinina 1 μ M.

Capítulo 5

Material y Métodos

5.1. Consideraciones éticas

El manejo del material biológico para el desarrollo de este estudio se aprobó por el Comité Institucional de Ética e Investigación del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS y del Hospital Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE.

5.2. Material Biológico

El material biológico utilizado fueron segmentos de cordón umbilical humano proporcionados por el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Luis Castelazo Ayala del IMSS y del Hospital General Xoco de la Secretaría de Salud del Distrito Federal.

Las muestras de cordón umbilical de recién nacidos vivos se obtuvieron de embarazos normales a término inmediatamente después del nacimiento. Para su traslado y disección, las muestras de entre 10 y 15 cm de longitud se colocaron en una solución al 0.9% de NaCl mas una mezcla al 2 % de antibiótico-antimicótico (Gibco-BRL Rockville MD, USA).

5.3. Cultivo primario de MLAUH

Para generar el cultivo primario, las arterias umbilicales fueron identificadas y removidas del cordón umbilical. Posteriormente, se lavaron tres veces en una solución balanceada de Hank's mas una mezcla al 2 % de antibiótico-antimicótico (Gibco-BRL Rockville MD, USA). Mediante digestión enzimática se eliminó el endotelio vascular y con ayuda de un bisturí y sin perder la luz del vaso, se disectaron pequeñas piezas de 3 a 5 mm de área de

arteria umbilical (explantes) [100]. Los explantes se colocaron sobre platos de cultivo celular de 100 mm de diámetro (aproximadamente 20 por plato) orientados con la luz del vaso sobre el plato de cultivo. Subsecuentemente, los explantes se cubrieron con seis ml de medio basal para músculo liso vascular (SmBm/SmGM-2 SingleQuot Kit, Lonza Walkersville, MD USA) suplementado con 15% de suero fetal bovino (Lonza) e incubados a 37°C con 5% CO₂. Las células de MLAUH en confluencia generadas a partir del explante (semana cuatro) se colectaron mediante el uso de tripsina y centrifugación a 1000 x g por 10 minutos. Finalmente, se resuspendieron en medio de músculo liso vascular e incubaron a 37°C con 5% CO₂. Los análisis realizados se hicieron entre los pases 3 y 4 del cultivo primario de MLAUH.

5.4. Caracterización de cultivo celular

Las células de MLAUH se caracterizaron mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando como marcador específico α -SMA (clona asm1; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Adicionalmente, mediante ensayos de Western blot utilizando marcadores específicos para endotelio (CD31) y fibroblastos (Fibronectina) se demostró la especificidad y pureza del cultivo. Típicamente estos ensayos fueron realizados entre los pases 8 y 10 del cultivo primario de MLAUH.

5.5. Inmunofluorescencia indirecta

Para determinar de manera cualitativa, la presencia de miembros del complejo de proteínas asociados a utrofina/distrofina y de componentes de balsas lipídicas de dominio caveolar, caveolina-1/cavina-1 en el cultivo primario de MLAUH se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta en células sembradas sobre cubreobjetos cubiertos con

colágena previamente fijadas en metanol por 10 minutos a -20 °C. En esta condición, las células bloqueadas y permeadas en una solución de 2 % de BSA y 0.25 % de Tritón X-100 en PBS durante una hora se incubaron con anticuerpos primarios diluidos 1:100 en PBS-T durante toda la noche a 4 °C. Al término de este procedimiento, las células se lavaron 4 veces en PBS-T por 10 minutos y consecutivamente, se incubaron con anticuerpos secundarios (Cy3, Jackson Laboratories) en una dilución 1:200 en PBS-T durante una hora. Finalmente, se lavaron de nuevo en PBS-T y se colocaron sobre portaobjetos utilizando medio de montaje para inmunofluorescencia (Vectasheal, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Para concluir, las preparaciones se analizaron mediante microscopia confocal (laser scanning Pascal-LSM 510, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) utilizando un objetivo con aceite de inmersión 63x/1.4 (Plan-Apochromat). Las imágenes adquiridas se procesaron y analizaron mediante el software Advanced Imaging Microscopy Release 4.0 (SP1) (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Como control negativo se realizó un marcaje con inmunoglobulinas (IgGs) no relevantes en lugar de los anticuerpos específicos.

Adicionalmente, se efectuaron ensayos de doble marcaje con el uso de anticuerpos dirigidos contra utrofina y caveolina-1/cavina-1 seguidos de una incubación con anticuerpos secundarios (Cy3, Jackson Laboratories y Alexa 488, Molecular Probes, respectivamente) como se describió con anterioridad.

5.6. Inmunofluorescencia indirecta CTB-Alexa 594

Para definir si utrofina o distrofina co-localizaban con el gangliósido GM1 presente en las balsas lipídicas con o sin dominio caveolar realizamos ensayos de doble marcaje utilizando el método descrito en [101]. Para esto, 10^5 células de MLAUH se lavaron con PBS frio y se incubaron en presencia de 5 ug/ml de subunidad B de toxina colérica acoplada a un fluorocromo (CT-B Alexa 594) disuelta en medio DMEM/Hepes suplementado con 0.5 % de BSA durante 30 minutos a 4 °C. Después, las células se lavaron tres veces en medio DMEM/Hepes/BSA frio y se fijaron con metanol durante 10 minutos a -20 °C. Para permeabilizar la membrana, las células se lavaron tres veces en PBS-T por 10 minutos y se incubaron con 0.2% de Tritón X-100 en PBS durante 5 minutos. En seguida, se incubaron en solución bloqueadora (2.5% de BSA y 0.5% de gelatina en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo primario en una dilución 1:100 durante toda la noche a 4°C. Subsecuentemente, se lavaron tres veces en PBS-T por 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario (Alexa 488, Molecular Probes) en una dilución 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de este procedimiento, las células se lavaron nuevamente, en PBS-T y se colocaron sobre portaobjetos, luego se recurrió al medio de montaje para inmunofluorescencia (Vectasheal, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Al finalizar, las preparaciones se procesaron y analizaron mediante microscopia confocal como se indica en la sección anterior.

5.7. Separación de dominios membranales del MLAUH

Para determinar la presencia de componentes pertenecientes al complejo de proteínas asociado a utrofina en las balsas lipídicas con o sin dominio caveolar se utilizó el método

previamente descrito en [102]. En este procedimiento las balsas lipídicas y los dominios caveolares son aislados por su insolubilidad en tritón X-100 a partir de ultra centrifugación en gradientes de flotación en sacarosa. Para realizar esto, aproximadamente 10^7 millones de células se lavaron tres veces en PBS frío y subsecuentemente, se lisaron en un ml de buffer TNE (20 mmol/L Tris, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA) más 0.05% de Tritón X-100 suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Applied Sciences). El lisado celular se homogenizó 20 veces a través de una jeringa de insulina y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido, sin núcleos ni restos celulares se incubó a 4°C con agitación constante durante 45 minutos y sucesivamente se mezcló con 1 ml de sacarosa al 80% en buffer TNE frío. La mezcla se colocó en el fondo de un tubo de ultracentrífuga (Beckman SW50.1) y enseguida le fue sobrepuesto 2 ml de sacarosa al 35% buffer TNE frío, 1 ml de sacarosa al 5% en buffer TNE frío e inmediatamente después se centrifugó a 130,000 x g durante 17 horas a 4°C. Al término de este procedimiento se colectaron 12 fracciones de 415 ul de la superficie del tubo hacia la base. Posteriormente, una alícuota de cada fracción se cuantificó, se mezcló con relación 3:1 con buffer de carga 4X (Laemli loading simple buffer) y se eluyó en geles de electroforesis en gradiente de 3-12% de dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE). Finalmente, las 12 fracciones se electrotransfirieron y analizaron mediante ensayos de Dot Blot y Western Blot con marcadores de dominios membranales y de miembros del complejo distrofina/utrofina.

5.8. Co-Immunoprecipitación Recíproca

Para demostrar si los componentes del complejo de proteínas asociadas a utrofina interactuaban con caveolina-1 se analizaron extractos de proteína total de células de MLAUH mediante ensayos de co-immunoprecipitación recíproca. Para realizar este

procedimiento los cultivos celulares se homogenizaron en buffer no desnaturizante (0.5% Triton X-100, 50 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 0.15 mol/L NaCl, 0.5 mmol/L EDTA) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa. A partir, de un sistema de inmunoprecipitación que sedimenta micro esferas metálicas recubiertas de proteína G (Dynabeads Protein G, Invitrogen) se lavaron tres veces 50 ul de micro esferas con 500 ul de buffer de citrato pH 5, durante 5 minutos. Luego, las micro esferas se incubaron con 2 ug de anticuerpo primario (utrofina, caveolina-1, flotillina-1 o PKG 1) en un volumen total de 50 ul de PBS-T a 4°C con agitación constante durante una hora. El inmunocomplejo formado (anticuerpo primario-micro esferas) se lavó tres veces con 500 ul de buffer de citrato pH 5 e inmediatamente, después se incubó a 4°C en agitación constante durante dos horas con 50 ul de extracto de proteína total previamente, lavado. Al término de esta incubación, el inmunocomplejo se lavó tres veces con 500 ul de PBS-T y el sobrenadante obtenido se almacenó a -80 °C. Las proteínas inmunoprecipitadas, el sobrenadante y lisado celular (input) se mezclaron con relación 3:1 con buffer de carga 4X (Laemli loading simple buffer). Finalmente, se eluyeron en geles de electroforesis en gradiente de 3-12% de dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE), se electrotransfirieron y analizaron mediante ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos dirigidos en contra de miembros del complejo distrofina/utrofina. Como control negativo incluimos dos ensayos co-inmunoprecipitación; en el primero utilizamos un anticuerpo monoclonal irrelevante acoplado a las micro esferas metálicas y en el segundo utilizamos buffer de lisis en lugar del lisado celular.

Con respecto, a los ensayos de RNA de interferencia las proteínas inmunoprecipitadas y el sobrenadante del lisado celular obtenidos de células estimuladas con el RNA de

interferencia para α/β -DG, el RNA aleatorio y el input, se analizaron mediante ensayos de Western Blot utilizando anticuerpos en contra de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), de la forma fosforilada (eNOS/Ser117), de la proteína cinasa dependiente de GMP Cíclico tipo 1 (PKG 1), de la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) y de la forma fosforilada (VASP/Ser239).

5.9. Western blot

Para analizar la presencia de miembros del complejo de proteínas asociados a utrofina/distrofina y de componentes de balsas lipídicas con dominio caveolar, caveolina-1/cavina-1 en el cultivo de MLAUH se analizaron extractos de proteína total mediante ensayos de Western blot. Para este procedimiento, las células en cultivo primario se homogenizaron en 50 μ l de buffer de lisis (1% Triton X-100, 20 mmol/L Tris, 140 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, and 0.1% SDS) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche). El lisado celular obtenido se hizo pasar a través de una aguja de insulina durante 5 veces, se sonicó por 30 minutos a 4°C y subsecuentemente, se centrifugó a 12000 x g durante 10 minutos. El contenido total de proteína se cuantificó mediante el método de Bradford (Bio-Rad) y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso. Posteriormente, se corrieron 40 μ g de proteína mezclados con relación 3:1 con buffer de carga 4X (Laemli loading simple buffer) en geles en gradiente del 2-13% de acrilamida a 80 Volts durante una hora y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa a 350 mA durante tres horas. Inmediatamente, cada membrana se incubó por una hora en solución bloqueadora (5% de leche baja en grasa en PBS mas 0.1% Tween 20 [PBS-T]) seguida de una incubación con anticuerpos primarios en una dilución en rango de 1:100 a 1:1000 en PBS-T

más 5% de leche durante toda la noche a 4 °C. Consecutivamente, las membranas se lavaron cuatro veces durante 10 minutos en PBS-T e incubaron con anticuerpos secundarios-HRP a una dilución 1:5000 en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron nuevamente en PBS-T e inmediatamente mediante el uso de un kit de detección de quimioluminiscencia (Thermo scientific, Rockford, Illinois, USA), placas radiográficas y soluciones de revelado, se detectó sobre la membrana la presencia de proteínas.

5.10. Dot Blot CTB-HRP

Para identificar las fracciones enriquecidas en las balsas lipídicas con y sin dominio caveolar separadas mediante gradientes de sacarosa se utilizó la subunidad B de la toxina colérica acoplada a peroxidasa (CT-B-HRP) que reconoce el gangliósido GM1 en balsas lipídicas y dominios caveolares. Para llevar a cabo esta detección, se colocó sobre una membrana de nitrocelulosa 10 ul de cada fracción. Posteriormente, la membrana se incubó por una hora en solución bloqueadora (5% de leche baja en grasa en PBS más 0.1% Tween 20 [PBS-T]) y se incubó en una concentración de 0.25 mg/ml en solución bloqueadora CT-B-HRP durante toda la noche a 4 °C. Finalmente, la membrana se lavó tres veces durante 15 min en PBS-T e inmediatamente, mediante el uso de un kit de detección de quimioluminiscencia (Thermo scientific, Rockford, Illinois, USA) se detectó la presencia del gangliósido GM1 como se describe en la sección anterior.

5.11. Ensayos de RNA de Interferencia

Para definir el papel fisiológico del complejo de proteínas asociado a utrofina en el MLAUH en cultivo, se bloqueó el RNA mensajero de α/β -DG y se midió el nivel de óxido nítrico. Para evaluar esto, en una placa de cultivo de seis pozos se sembraron alícuotas de 2×10^5 células. Después, utilizando un sistema de RNA de Interferencia (siRNA reagent system, Santa Cruz Biotechnology, sc-45064, 43488) las células en cultivo se transfectaron con una mezcla de tres siRNAs específicos en contra del precursor de α/β -DG o con un siRNA aleatorio (-siRNA) en medio reducido en SFB durante 7 horas. Después, de 7 horas de incubación la mezcla de transfección fue removida y remplazada por medio DMEM suplementado con 5% de SFB más 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico e incubada durante 72 horas [103]. Posteriormente, las células transfectadas se incubaron en medio DMEM sin rojo de fenol ni SFB durante 6 horas y se estimularon con 1 uM de Bradicinina durante 15 minutos. Finalmente, los niveles de óxido nítrico se midieron en el sobrenadante de las placas de cultivo y los lisados celulares analizados mediante ensayos de Western blot utilizando anticuerpos contra la enzima eNOS y efectores de la vía de señalización de GMP cíclico.

5.12. Cuantificación de niveles de Óxido Nítrico

Para evaluar los niveles de óxido nítrico (NO) en el cultivo primario de MLAUH se utilizó el método de Greiss como se describe en [98]. Inmediatamente, después de efectuar el estímulo con 1 uM de Bradicinina los sobrenadantes de células transfectadas con siRNA para α/β -DG, el del siRNA aleatorio (-siRNA) y el control (Input) se incubaron con volúmenes iguales de reactivo de Greiss (0.8% de sulfanilamida y 0.05% de dihidrocloruro

de N-1- naftiletilendiamina [NED] en 1N de ácido acético) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, mediante una curva estándar de NaNO_2 y espectrofotometría a 540 nm se midió la producción de nitratos utilizando un lector de placas de ELISA (Labsystems Multiskan Plus, Conquer Scientific).

5.13. Anticuerpos

Los anticuerpos empleados para el estudio se almacenaron y utilizaron según las especificaciones de cada fabricante. Utrofina (UTR) (H300), β -DG (C-20), ϵ -SG (C-17), enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) (NOS3 N-20) y proteína quinasa dependiente de GMP Cíclico tipo 1 (PKG 1) (cGK1 α/β , E-1) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc.; fosfo eNOS (se1177) eNOS (9572), flotillina-1 (3253), fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP, 9A2) y de la forma fosforilada (VASP/Ser239) de Cell Signalling; distrofina (Dys) (Rod domain), β -SG (β SARC/5B1) y δ -SG (δ SARC3/12C1) de Vector Laboratories; caveolina-1 (cav-1) (2297/caveolin-1) y PTRF (polymerase I and transcript release factor; cavin-1) (4/PTRF) de Transduction Laboratories BD Biosciences. En el caso de SSPN y DP71, estos fueron un generoso préstamo de los Dres. Rachelle H. Crosbie y Bulmaro Cisneros, respectivamente, mientras que δ -SG3 se obtuvo como se refiere en [104]. Anticuerpos conjugados Alexa-488 y CT-B Alexa-594 (C-34777) se obtuvieron de Molecular Probes (Invitrogen).

Capítulo 6

Resultados

6.1. Caracterización del cultivo primario de células de MLAUH.

Para verificar que la población predominante en el cultivo primario de arteria umbilical humana (Figura 6 A) correspondía a músculo liso vascular, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta utilizando como marcador específico α -actina de músculo liso (α -SMA). Mediante este análisis, se observó que más del 99% de las células en cultivo dieron señal positiva para esta inmunotinción (Figura 6 B). En el caso del control negativo de α -SMA, CD31(endotelio) y fibronectina (fibroblastos) no mostraron inmunotinción (dato no mostrado). Después, mediante ensayos de Western Blot en los extractos celulares se observó la presencia de α -SMA y no CD31, ni fibronectina (Figura 6 C). Finalmente, a través de microscopía óptica se observó en el cultivo, las características morfológicas del MLV. Estas incluyen la formación de células fusiformes y alargadas, distribuidas en filas paralelas y superpuestas (figura 6 A). En conjunto estos datos, confirman la especificidad y pureza del cultivo primario de MLAUH

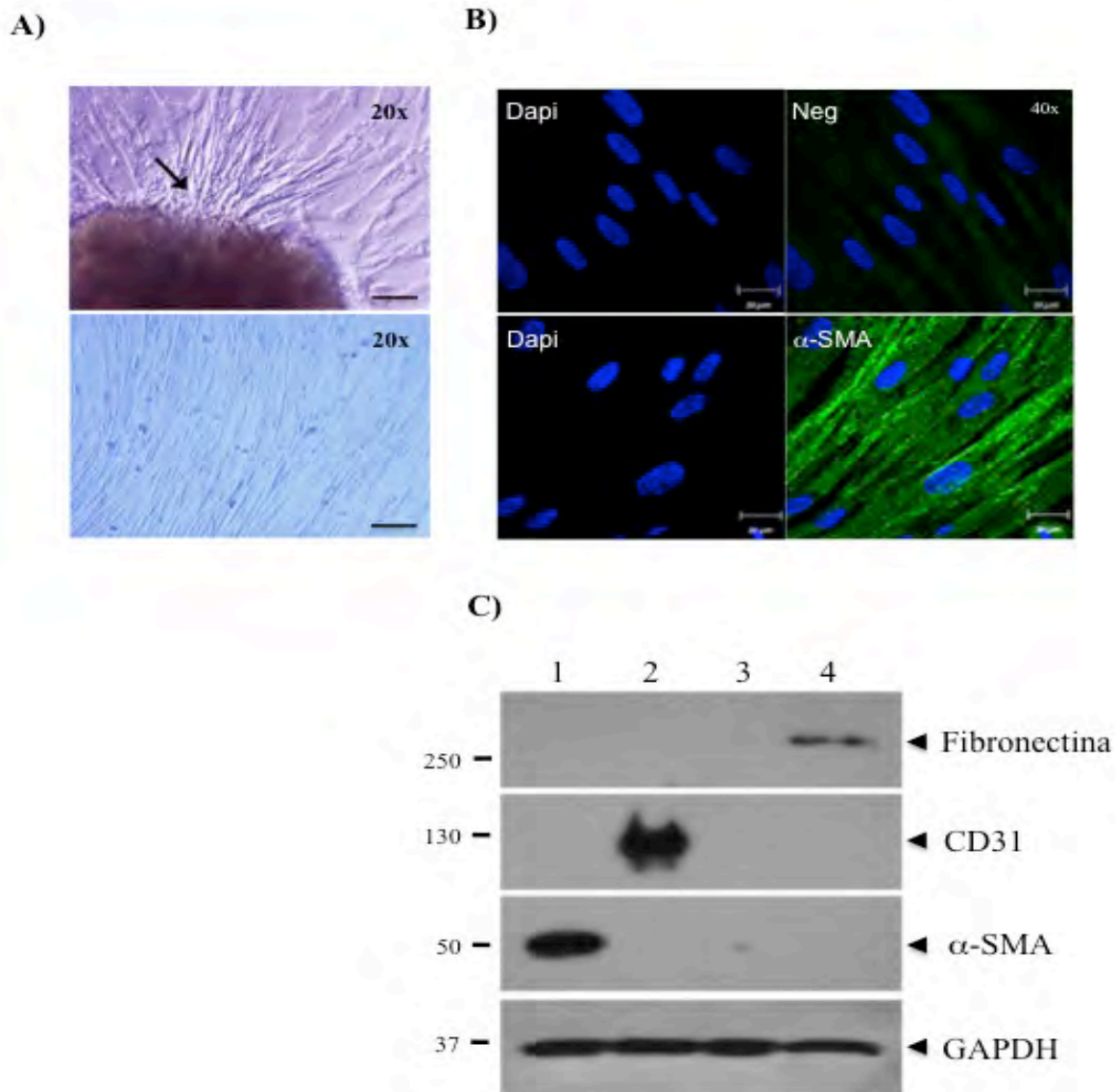
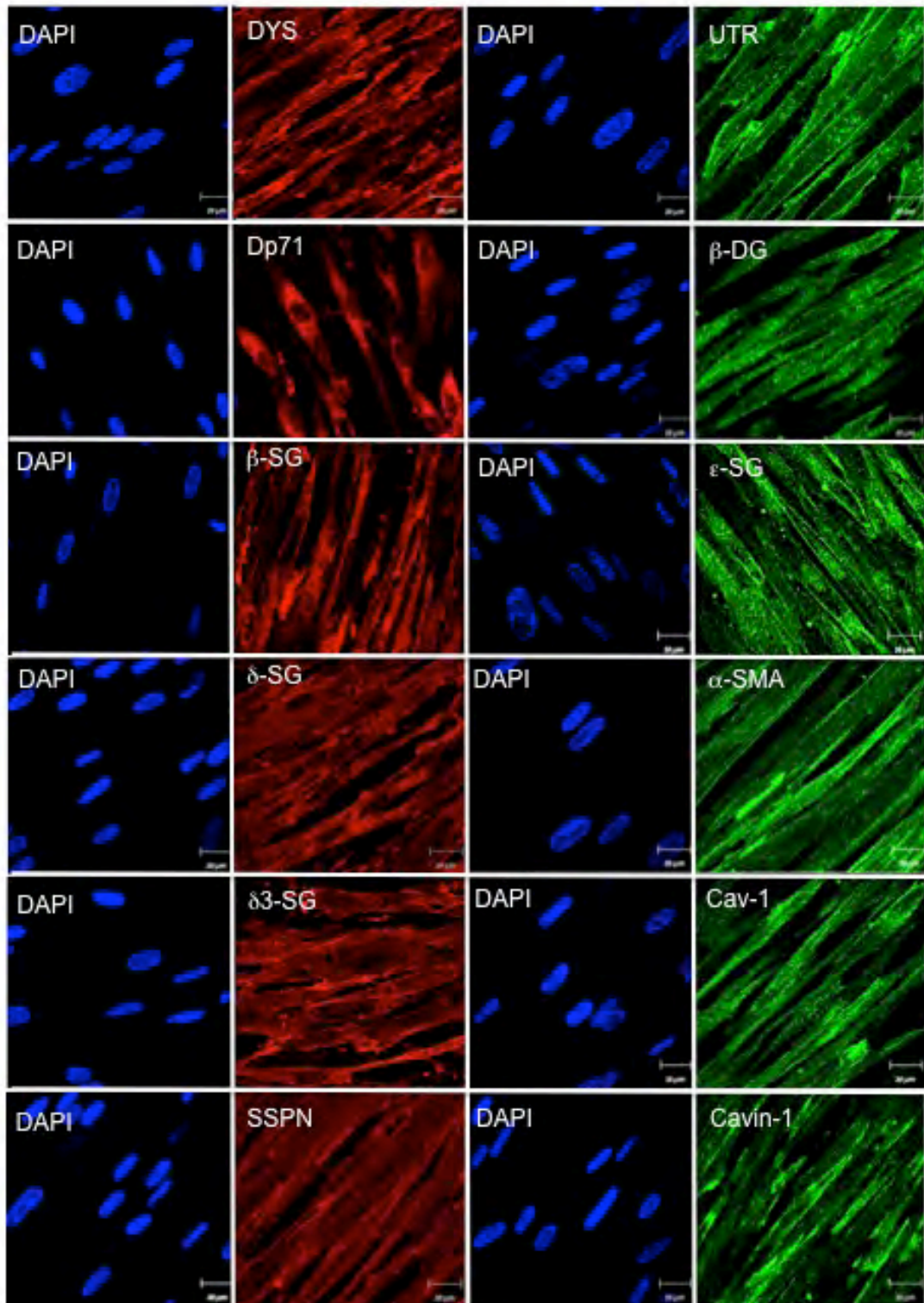


Figura 6. Caracterización del cultivo celular primario de MLAUH mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta y Western blot. (A) Cultivo primario derivado de explantes de arteria umbilical. (B) Cultivos primarios inmunomarcados con α -actina de musculo liso (α -SMA) usando el fluorocromo Alexa 488. El análisis mediante este ensayo muestra que más del 99% de las células dieron señal positiva para este marcador. Núcleos marcados con DAPI (C) Extractos de proteína total de MLAUH (1), HUVEC (2), Hep-G2 (3) y fibroblastos analizados mediante ensayos de Western Blot usando anticuerpos contra α -SMA, CD31 y fibronectina. En este caso, el análisis muestra la presencia de α -SMA y la ausencia de CD31 y Fibronectina. Como control negativo se utilizó el extracto de células Hep-G2 mientras que como control de carga la inmunodetección de GAPDH.

6.2. Presencia de miembros del complejo de proteínas asociadas a distrofina/utrofina en células de MLAUH.

Para determinar cualitativamente la presencia de los componentes UAPC/DAPC en el cultivo de MLAUH, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal. En este caso, el análisis con el fluorocromo Cy3 (rojo) determinó la presencia de distrofina, Dp71, β -SG, δ -SG, δ -SG3 y SSPN mientras que con Alexa 488 (verde) utrofina, β -DG, ϵ -SG y α -SMA (Figura 7 A). Por otro lado, mediante ensayos de Western blot en extractos de proteína total se identificó la presencia de distrofina, utrofina, Dp71, β -DG, ϵ -SG, β -SG, δ -SG, δ -SG3, SSPN y α -SMA (Figura 7 B). La presencia de estas proteínas fue consistente con los datos previamente, reportados en [97]. De forma adicional, mediante ambos análisis se observó la presencia de cav-1 y cavina-1, dos componentes esenciales para la biogénesis y función de dominios caveolares [94] (Figura 7 A y B).

A)



B)

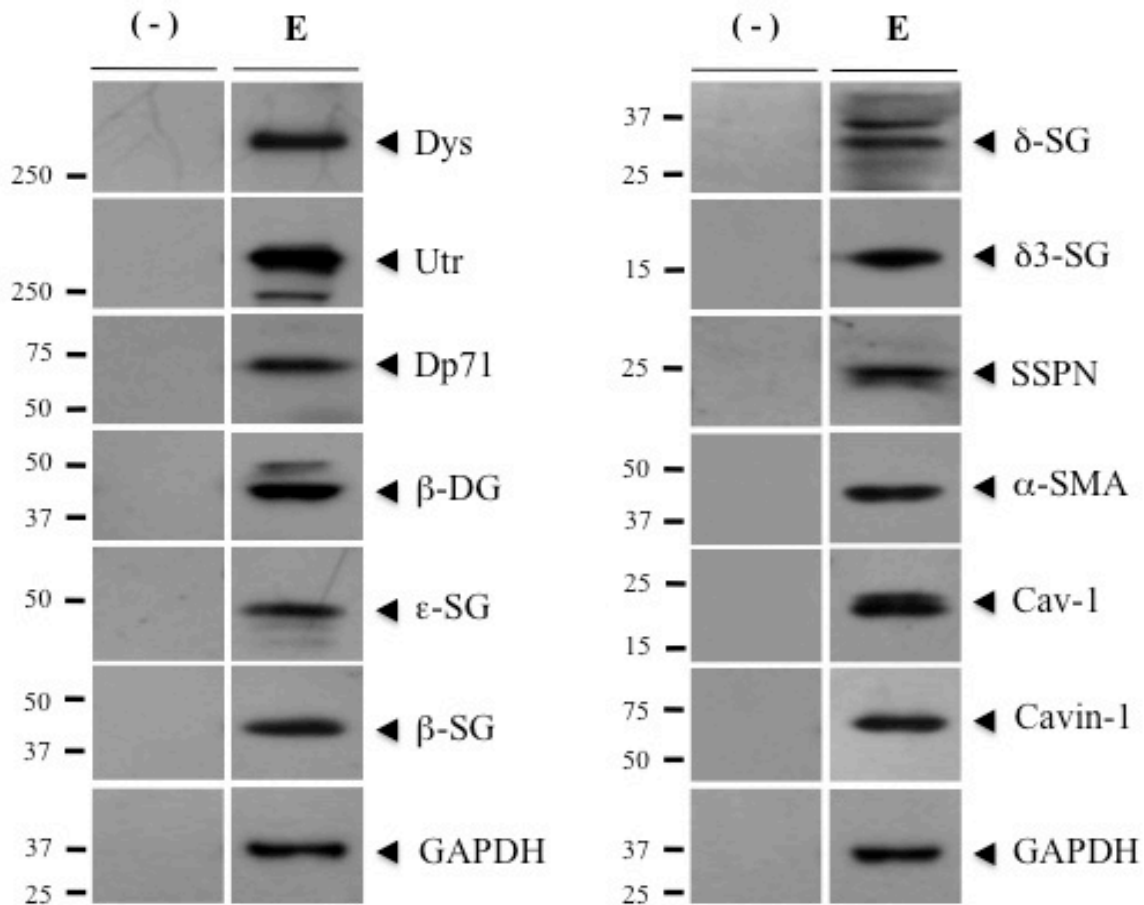


Figura 7. Detección de miembros del complejo DAP, utrofina, α -SMA, cav-1 y cavina-1 en cultivos primarios de MLAUH. (A) Cultivos primarios de MLAUH analizados mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal con fluorocromos Cy3 (rojo) y Alexa 488 (verde). El panel de imágenes muestra con Cy3 la presencia de distrofina (Dys), la isoforma de 71kDa de distrofina (Dp71), beta sarcoglicano (β -SG), delta sarcoglicano (δ -SG), la isoforma de 17KDa de delta sarcoglicano (δ -SG3), y sarcospan (SSPN) mientras que con Alexa 488 la presencia de utrofina (Utr), beta distroglicano (β -DG), épsilon sarcoglicano (ϵ -SG), α -SMA, caveolina-1 (cav-1) y cavina-1. Núcleos marcados con DAPI. (B) Extractos de proteína total (E) de células de MLAUH analizados mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos contra miembros del complejo DAP, utrofina, α -SMA, cav-1 y cavina-1 confirman la presencia de las proteínas inmunomarcadas en (A). Como control negativo (-) se analizaron extractos de proteína total sin anticuerpo primario. La inmunodetección de GAPDH fue utilizada como control de carga.

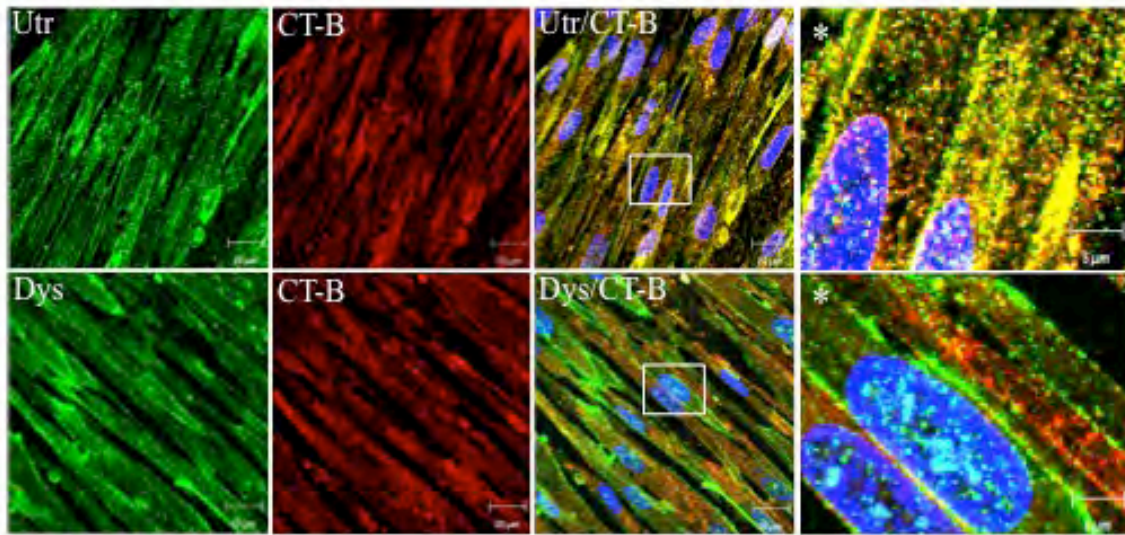
6.3. Co-localización parcial de utrofina con marcadores de balsas lipídicas y de dominios caveolares en células de MLAUH.

Para investigar la localización de utrofina o distrofina en balsas lipídicas y los dominios caveolares del MLAUH se realizaron análisis de doble inmunofluorescencia indirecta valiéndose del gangliósido GM1 como marcador específico. Dado que, en ambos dominios se encuentra presente el gangliósido GM1, el cual se detecta con la subunidad B de la toxina colérica (CT-B) [101,105], en este ensayo se recurrió a este marcador conjugado al fluorocromo Alexa 595 (Rojo) para identificar su co-localización. Mediante microscopia confocal, el análisis de las imágenes reveló una extensa co-localización de utrofina con el marcador GM1 (Figura 8 A Utr/CT-B). En contraste, distrofina no se observó co-localizada con este marcador (Figura 8 A Dys/CT-B). A través de la amplificación de estas imágenes, se observó claramente que utrofina y no distrofina co-localizaba con el gangliósido GM1 (Figura 8 A * Utr y * Dys). Además, se determinó la relación de este marcador con otros miembros del posible complejo UAP. En este caso, se detectó una parcial co-localización de β -DG, ϵ -SG y α -SMA con el gangliósido GM1 (Figura 8 B). Con la amplificación de los recuadros, se observó con mayor detalle la co-localización parcial de estas proteínas con el gangliósido GM1 en forma de puntos a lo largo de la membrana celular (Figura 8 B * β -DG, * ϵ -SG y * α -SMA).

Debido a que, el gangliósido GM1 es un marcador de caveolas y de balsas lipídicas, se realizó, realizamos un segundo marcaje entre utrofina y dos marcadores de dominios caveolares, caveolina-1 y cavina-1. Mediante este análisis, se observó una clara co-localización de utrofina con caveolina-1 y cavina-1 en diferentes áreas de la membrana

celular (Figura 9 Utr/cav-1 y Utr/cavin-1). A través de la amplificación de los recuadros en ambas imágenes, se determinó con mayor claridad la presencia de estas proteínas sobre la membrana (Figura 9 * cav-1 y * cavin-1). Estos resultados sugieren fuertemente, que utrofina y ciertos miembros del posible UAPC pueden estar formando un complejo en los dominios caveolares y balsas lipídicas.

A)



B)

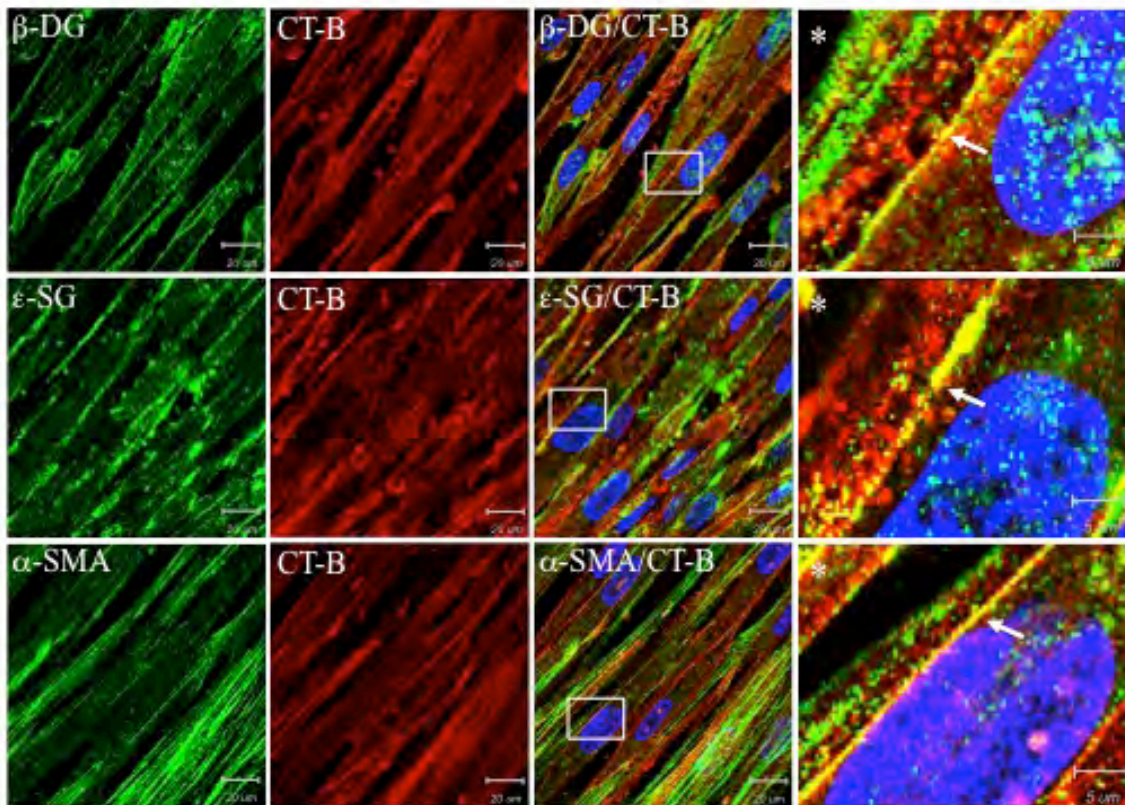


Figura 8. Co-localización de utrofina y miembros del DAPC con el gangliósido GM1 en el sarcolema de células de MLAUH. Cultivos primarios de MLAUH inmunomarcados con la subunidad B de la toxina colérica (CT-B) conjugada al fluorocromo Alexa 594 (rojo) que reconoce al gangliósido GM1. (A) Células incubadas con anticuerpos contra utrofina (Utr) o distrofina (Dys) e inmunomarcadas con Alexa 488 (verde). La sobre posición de señales mediante microscopia confocal revela que Utr (Utr/CT-B) y no Dys (Dys/CT-B) co-localiza con el gangliósido GM1. Las ampliificaciones de ambos recuadros muestran con mayor claridad la co-localización de Utr con el gangliósido GM1(*). (B) Células incubadas con anticuerpos contra β -distroglicano (β -DG), ϵ -sarcoglicano (ϵ -SG) y α -actina de musculo liso (α -SMA) inmunomarcadas con Alexa 488. La sobreposición de señal muestra la co-localización de las tres proteínas con el gangliósido GM1. Las ampliificaciones de los recuadros muestran a mayor detalle la sobreposición de señal (*). Núcleos marcados con DAPI.

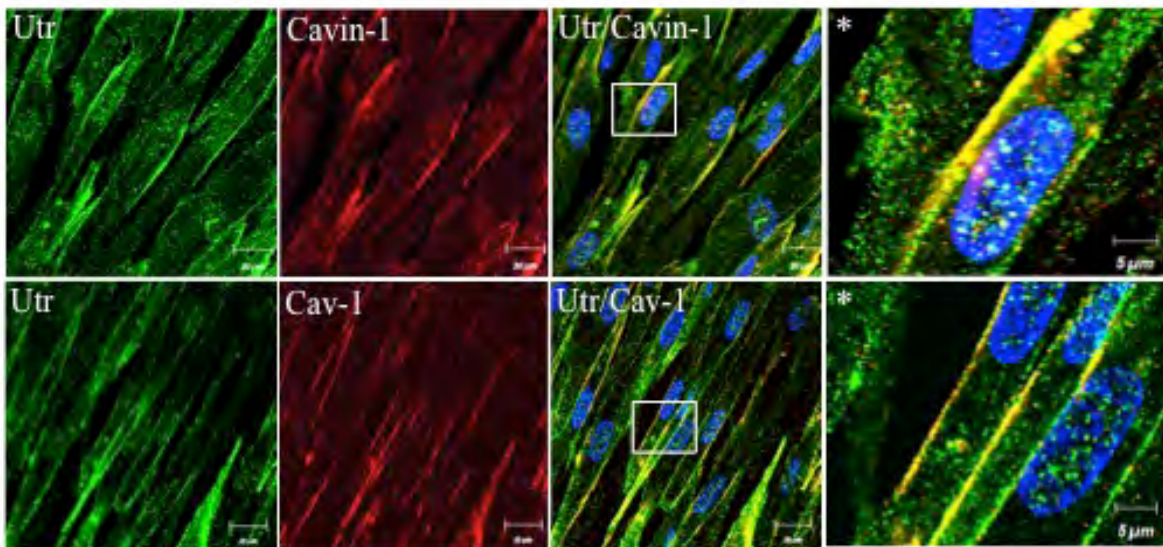


Figura 9. Co-localización de utrofina con cav-1 y cavina-1 en el sarcolema de células de MLAUH. Cultivos primarios de MLAUH inmunomarcados doblemente, con anticuerpos contra Utr/cavina-1 y Utr/cav-1 usando los fluorocromos Alexa 488 (verde) y Cy3 (rojo). La sobre posición de señales mediante microscopia confocal revela que utrofina co-localiza con cavina-1 y cav-1 (Utr/cavina-1 y Utr/cav-1, respectivamente). La ampliificaciones de imágenes muestra con mayor claridad la co-localización sobre el sarcolema (*). Núcleos marcados con DAPI.

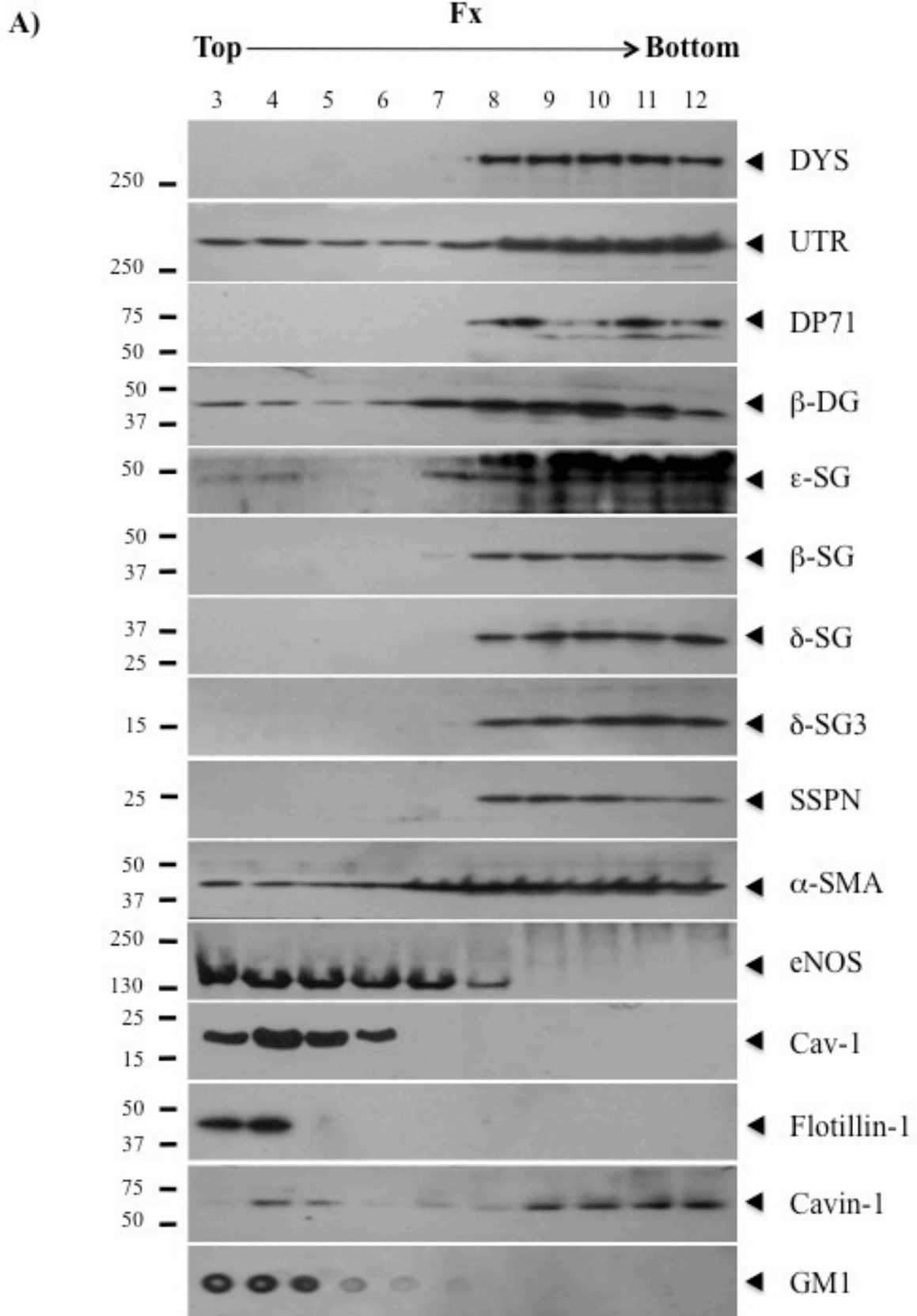
6.4. Co-fraccionamiento parcial de miembros del complejo de proteínas asociadas a utrofina en balsas lipídicas y dominios caveolares de células de MLAUH.

Cav-1 y cavina-1 son dos componentes esenciales de los dominios caveolares. Los dominios caveolares son balsas lipídicas especializadas, las cuales forman invaginaciones en la membrana celular y están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos [93,94]. Estos dominios juegan un papel importante en el transporte, traducción, mecanoseñalización y regulación de lípidos [95]. Por otra parte, las flotilinas son proteínas presentes en las balsas lipídicas de la membrana plasmática pero no constituyen dominios caveolares [106].

Para confirmar si en estos dominios se localizaban físicamente proteínas del UAPC, realizamos un fraccionamiento celular del MLAUH a través de gradientes de flotación en sacarosa. Mediante este procedimiento, se aislaron fracciones (Fx) ricas en membranas insolubles en Tritón X-100 con alto contenido en colesterol y esfingolípidos. Inicialmente, la pureza de las fracciones del gradiente se determinó mediante ensayos de Dot Blot utilizando el conjugado CT-B-HRP que se une al gangliósido GM1 presente en las balsas lipídicas. A partir de este ensayo, se observó un enriquecimiento del gangliósido GM1 en las fracciones menos densas del gradiente (Figura 10 A Fx 3-5). Posteriormente, se determinó la presencia de los componentes UAPC/DAPC en las fracciones del gradiente mediante ensayos de Western blot. A través de este procedimiento, se determinó que utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA y eNOS co-fraccionan con cav-1, flotilina-1 y cavina-1 así como también con el gangliósido GM1 (Figura 10 A Fx 3-5). Este resultado fue consistente con aquellos resultados obtenidos mediante ensayos de doble inmunofluorescencia con cav-1 y cavina-1. Este resultado confirmó la existencia de un UAPC en balsas lipídicas con

dominios caveolares del MLAUH. Por el contrario, con la presencia de distrofina, DP71, β -SG, δ -SG, δ -SG3 y SSPN en las fracciones más densas del gradiente (Figura 10 A Fx 8-12) en conjunto con utrofina, β -DG, ϵ -SG y cavina-1 se demostró la existencia de posibles complejos alternos UAPC/DAPC en otros sitios de la membrana celular.

Además, mediante ensayos de Western blot en fracciones de gradiente obtenidas a partir de membranas purificadas de la arteria umbilical (Tejido) [107], se observó en las fracciones menos densas del gradiente la misma distribución de las proteínas detectadas en el fraccionamiento celular a partir del cultivo primario. En este caso, el análisis mediante Western blot determinó la presencia de utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavina-1 en las fracciones menos densas del gradiente (Figura 10 B Fx 3-5). Este resultado corrobora la presencia del UAPC en balsas lipídicas y dominios caveolares del MLAUH.



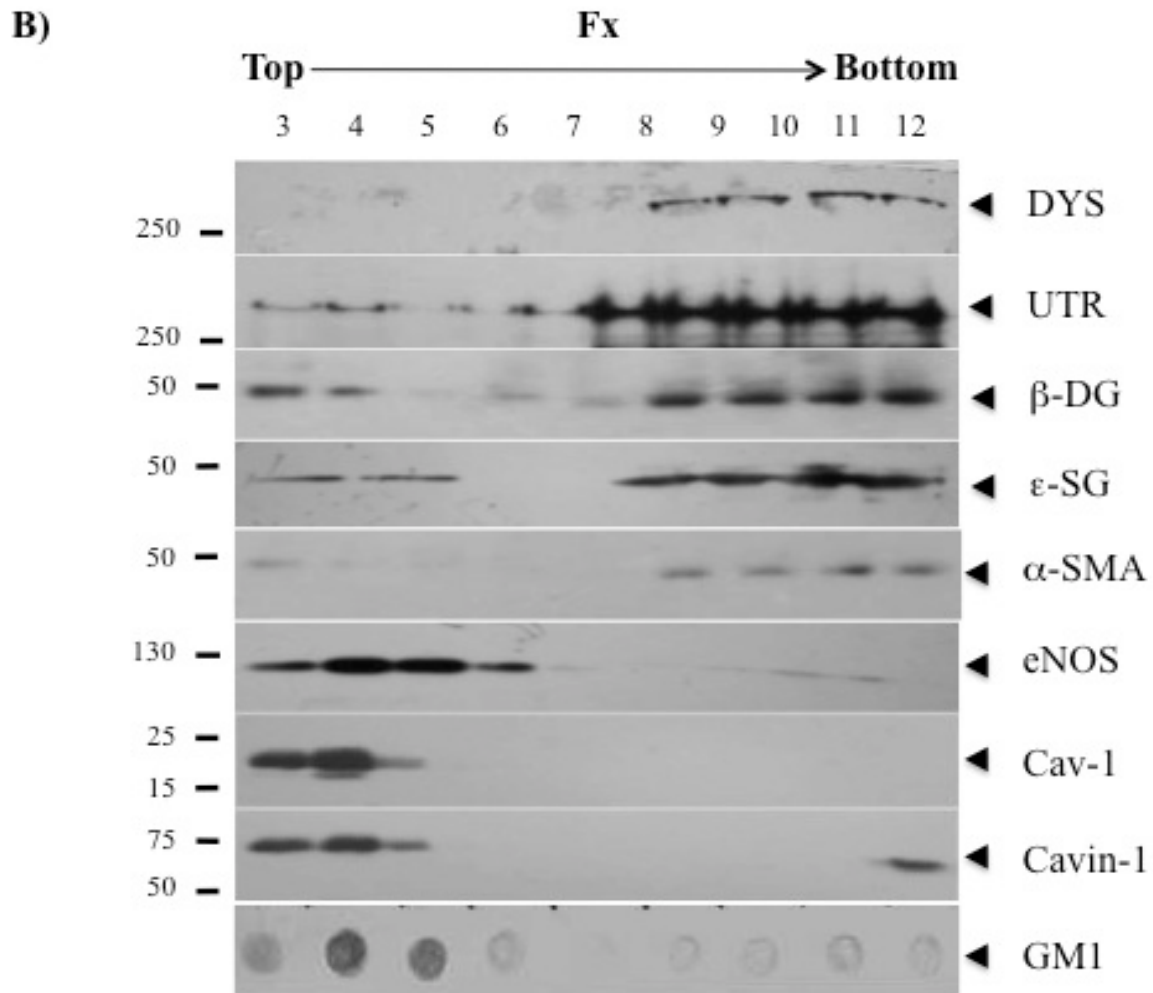
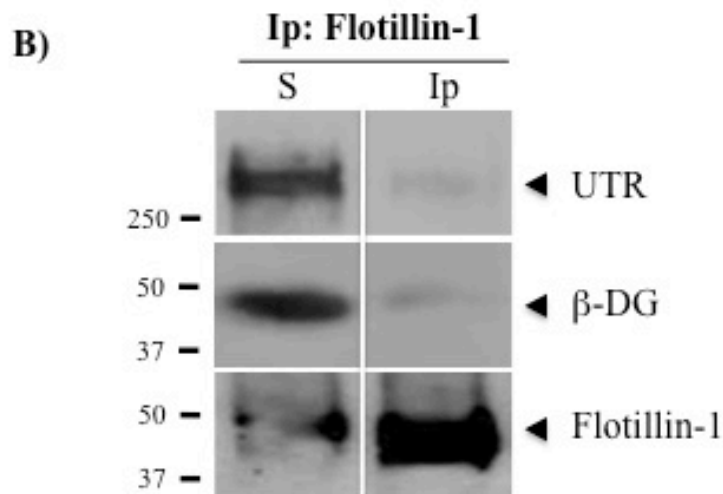
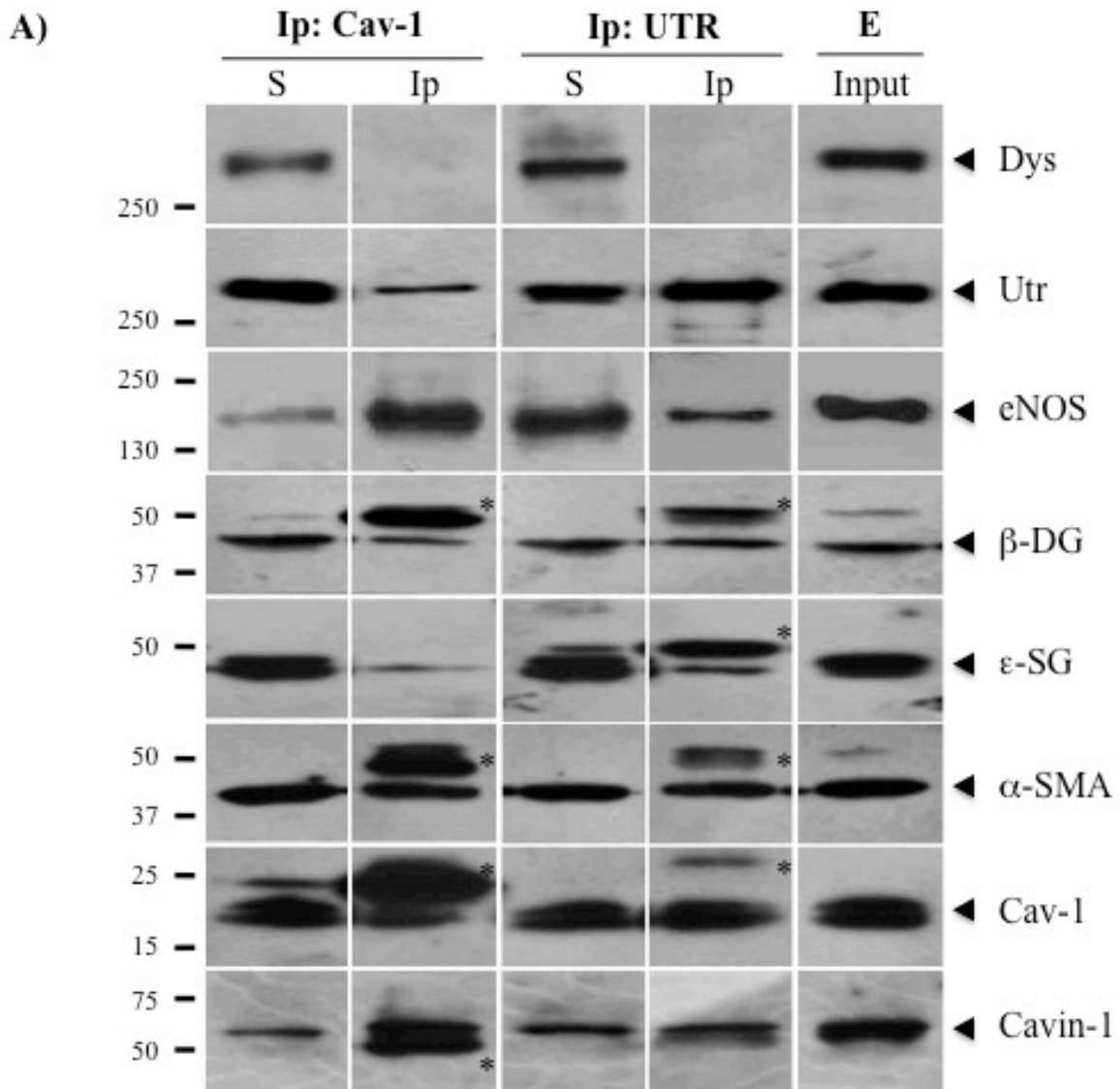


Figura 10. Detección de los componentes UAPC en los dominios caveolares y balsas lipídicas del MLAUH. Lisados de cultivos primarios o membranas purificadas de MLAUH fueron sometidos a gradientes de flotación en sacarosa para obtener dominios caveolares y balsas lipídicas como se describe en material y métodos. **(A)** Ensayos de Western blot sobre Fracciones (Fx) obtenidas de homogenados celulares usando anticuerpos contra distrofina (Dys), utrofina (Utr), la isoforma de 71kDa de distrofina (Dp71), beta distroglicano (β -DG), ϵ , β , δ sarcoglicano (ϵ - , β - y δ -SG), la isoforma de 17 KDa de delta sarcoglicano (δ -SG3), sarcospan (SSPN), α -SMA, la enzima oxido nítrico sintasa (eNOS), flotillina-1 (Flot-1), caveolina-1 (cav-1) y cavina-1. El análisis mediante este ensayo revela la co-fracción de una pequeña cantidad de utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA y eNOS con cav-1 y cavina-1 en las Fx 3-5. Por su parte el ensayo de Dot Blot con CT-B-HRP muestra la presencia del gangliósido GM1 en las Fx 3-5 que contienen cav-1. **(B)** Ensayos de Western blot sobre Fx obtenidas a partir de membranas purificadas. El análisis de estas Fx revela la co-fracción de las proteínas inmunodetectadas en (A). Así mismo el ensayo de Dot Blot revela la presencia del gangliósido GM1 en Fx 3-5. Las Fx 1 y 2 fueron descartadas debido a la ausencia de proteína en cada Fx.

6.5. Interacción de componentes UAPC y cav-1 en células de MLAUH.

Para evaluar si los componentes del UAPC interactúan con caveolina-1 en el MLAUH se analizaron mediante ensayos de co-inmunoprecipitación recíproca, utilizando anticuerpos contra utrofina y cav-1, extractos de proteínas totales de células en cultivo (Figura 11). El análisis de las proteínas inmunoprecipitadas mediante ensayos de Western blot reveló la presencia de utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS y cav-1 (Figura 11 A). Este resultado, demostró la interacción entre componentes del UAPC y cav-1, el mayor componente estructural de los dominios caveolares [108]. También este ensayo reveló la interacción entre cav-1 y/o utrofina con cavina-1, otro componente esencial en la formación de dominios caveolares [109]. Con respecto a distrofina, esta proteína se detectó sólo en el sobrenadante de ambos ensayos de co-inmunoprecipitación (Figura 11 A). Finalmente, todos estos resultados sugieren la presencia de un UAPC conformado por utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavina-1 en dominios caveolares del MLAUH (Figura 13).

Asimismo, para demostrar si este complejo también se encontraba presente en balsas lipídicas no caveolares realizamos una segunda co-inmunoprecipitación usando anticuerpos contra flotilina-1. En este caso, no se detectó la presencia de utrofina o β -DG en los ensayos de Western blot de proteínas inmunoprecipitadas con el anticuerpo flotillina-1 (Figura 11 B). Por su parte, el control negativo (esferas no conjugadas con anticuerpos o IgG irrelevante) confirmó lo anterior, ya que no mostró la presencia de proteínas en el análisis mediante Western blot (Figura 11 C).



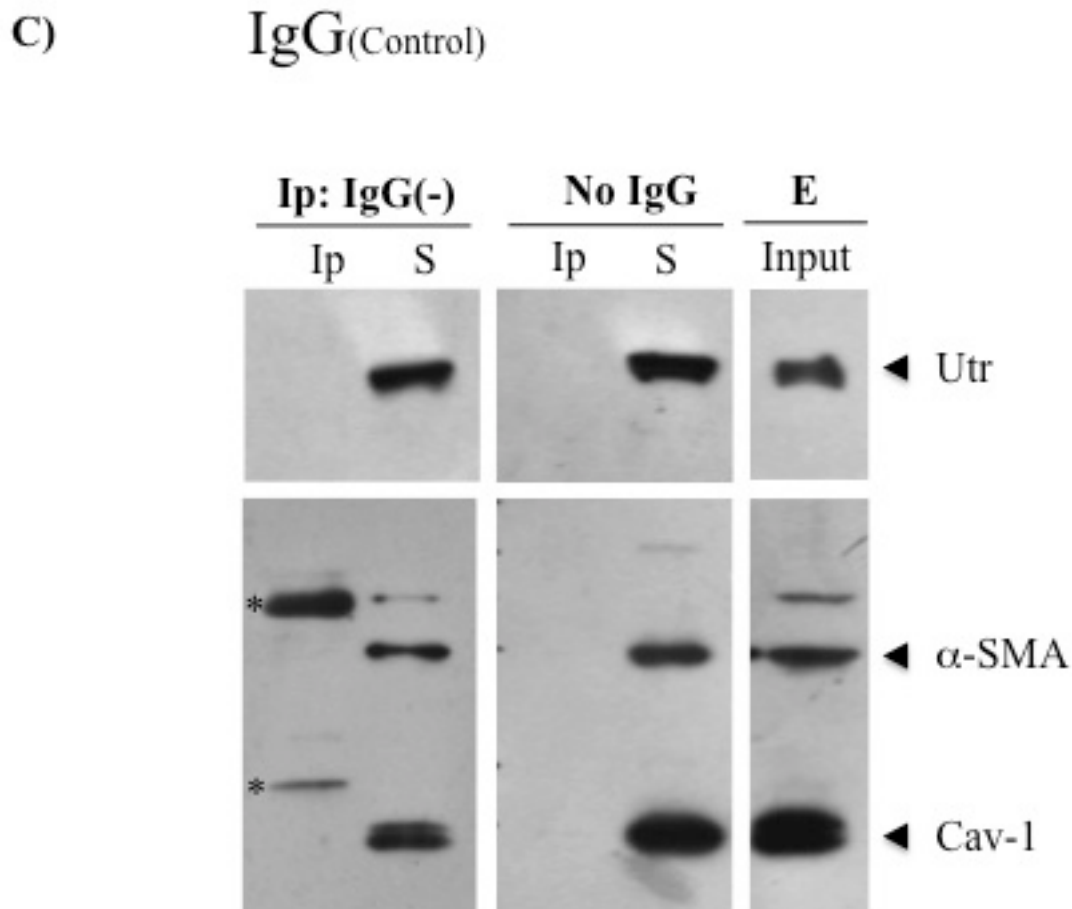


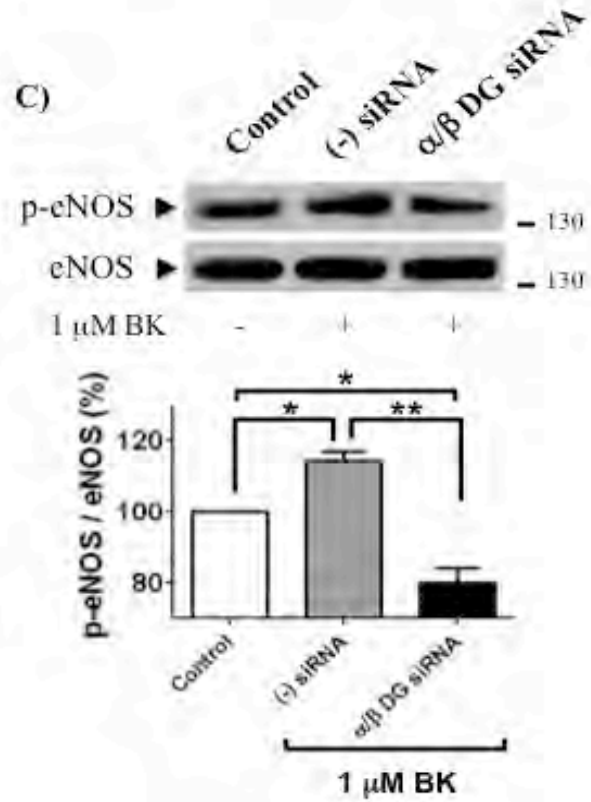
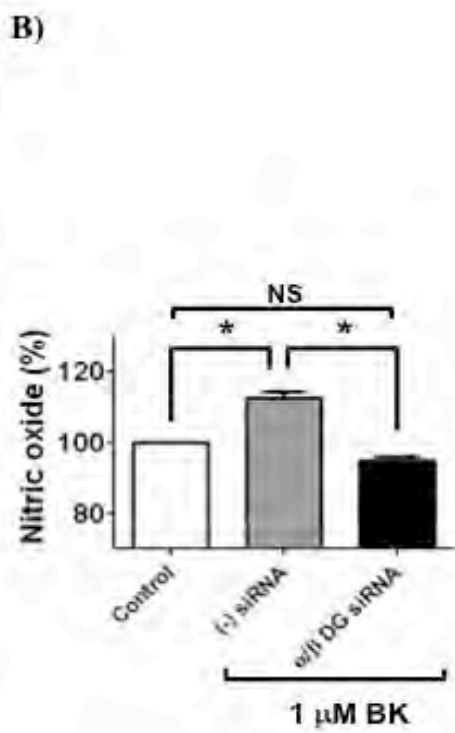
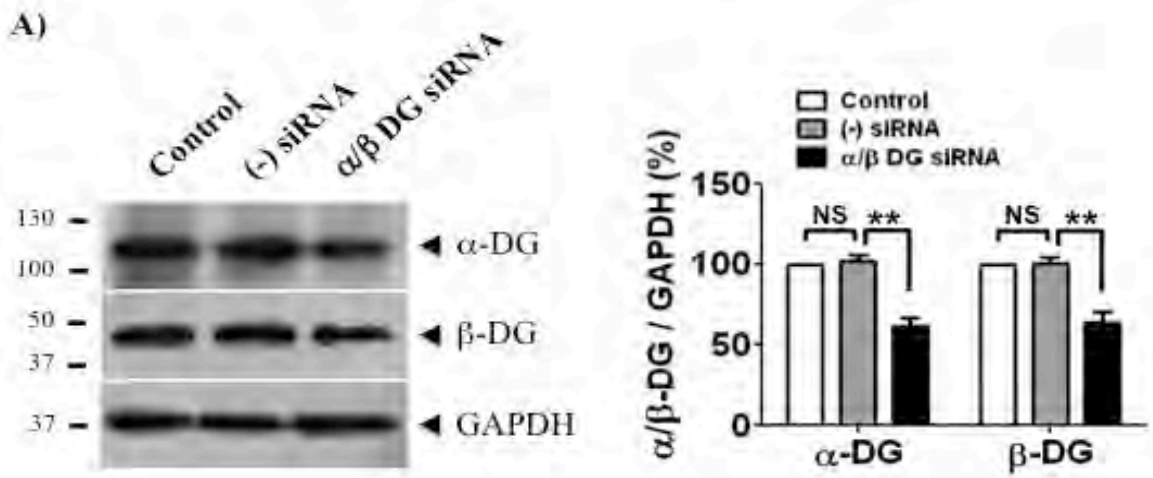
Figura 11. Interacción entre componentes del UAPC y caveolina-1 (Cav-1) en células de MLAUH. (A) Co-inmunoprecipitación (Co-IP) recíproca en lisados prelavados (E) usando anticuerpos contra caveolina-1 (cav-1) o utrofina (Utr). Lisados celulares (Input), sobrenadantes (S) y proteínas co-inmunoprecipitadas (Ip) fueron analizadas mediante ensayos de Western blot usando anticuerpos contra distrofina (Dys), Utr, beta distroglicano (β -DG), ϵ -sarcoglicano (ϵ -SG), α -actina de musculo liso (α -SMA), la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), caveolina-1 y cavina-1. El análisis de la co-IP revela la interacción entre Utr, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavina-1. La presencia de Dys en el Input y S de ambas co-IP demuestra que Utr y no Dys interacciona con cav-1. (B) Co-IP en (E) usando anticuerpos contra flotilina-1 (Flot-1). S y proteínas IP analizadas mediante ensayos de Western blot muestran la presencia de Utr y β -DG solo en S. La ausencia de ambas proteínas en Ip revela que flotilina-1 no interacciona con componentes del UAPC. Los asteriscos (*) mostrados en (A) corresponden a la inmunodetección de la cadena ligera y pesada de las inmunoglobulinas usadas en el ensayo (C) Control negativo; esferas no conjugadas y co-IP con IgG irrelevante.

6.6. Deficiencia de α/β -DG en células de MLAUH; Efecto de la pérdida de α/β -DG en la síntesis de óxido nítrico, fosforilación de eNOS y vía de señalización de cGMP

En un estudio previo realizado en células endoteliales derivadas de la vena umbilical humana (HUVEC), se propuso que el UAPC descrito en dominios caveolares y balsas lipídicas podría tener una función mecanosensora capaz de controlar la actividad enzimática de eNOS [110]. Para definir el papel fisiológico del UAPC sobre eNOS en las balsas lipídicas del MLAUH lo que se hizo fue bloquear el RNA mensajero de α/β -DG mediante un sistema de RNA de interferencia. Subsecuentemente, la forma fosforilada de la enzima y los niveles de óxido nítrico fueron analizados bajo el estímulo de Bradicinina (BK). El análisis de estos resultados mostró que la deficiencia de α/β -DG ($\approx 55\%$, Figura 12 A) induce una reducción de la forma fosforilada de eNOS (eNOSpSer1177) en aproximadamente 35% (Figura 12 B), en comparación con (-) siRNA después de ser estimulados con 1 μ M de BK. En adición, la deficiencia α/β -DG bajo las mismas condiciones produjo la reducción en la síntesis de NO ($\approx 20\%$, Figura 12 C).

Por otra parte, se sabe que el NO activa las guanilato ciclasas solubles y la síntesis de cGMP [111], así mismo, el incremento del cGMP celular activa a la proteína cínasa dependiente de GMP Cíclico tipo 1 (PKG 1) [112], la cual a su vez fosforila a la fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) en la serina 239 [113]. Para evaluar, si la reducción en la síntesis de NO en las células bloqueadas con el siRNA para α/β -DG afectan la vía de transducción de señales de cGMP se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos contra la proteína PKG-1. El análisis de las proteínas inmunoprecipitadas, mediante ensayos de Western blot arrojó una reducción del \approx

39% en la interacción de esta proteína con VASP en las células tratadas con el siRNA para α/β -DG (Figura 12 D). En consecuencia, este decremento mostró una reducción en los niveles de fosforilación de la proteína VASP ($\approx 57\%$, Figura 12 E).



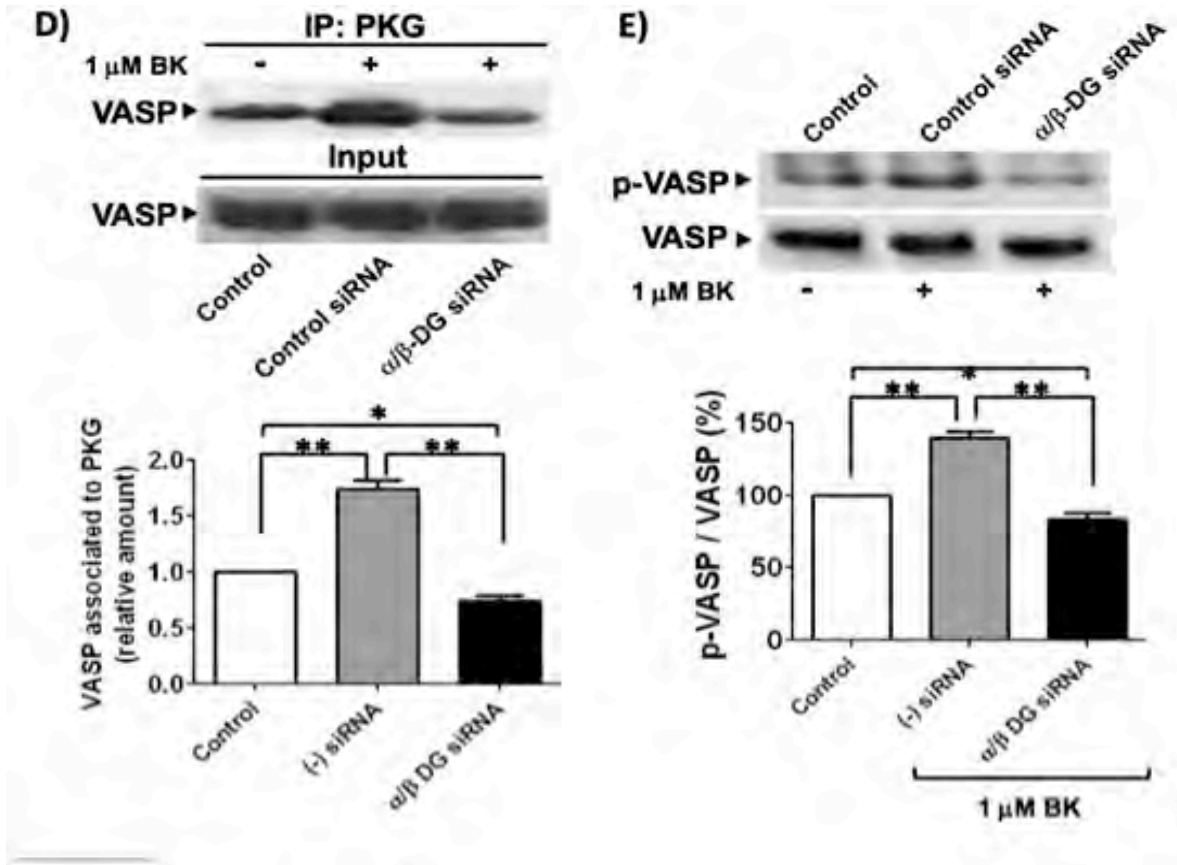


Figura 12. Deficiencia de α/β -DG en células de MLAUH; Reducción en la síntesis de óxido nítrico, la fosforilación de eNOS y la activación de efectores de la vía cGMP (A) Análisis mediante ensayos de Western blot de extractos de proteína total de células de MLAUH transfectadas con el siRNA para α/β -DG. El análisis densitométrico muestra la reducción en un 50% de α/β -DG en comparación con el control. (B) Determinación de NO en condiciones basales (control) o bajo el estímulo de Bradicinina (Bk) 1 μ M durante 15 minutos en células de MLAUH transfectadas con un siRNA irrelevante (-siRNA) o el siRNA para α/β -DG. (C) Análisis mediante ensayos de Western blot y densitometría de la forma no-fosforilada y fosforilada (p-eNOS) en extractos de proteína total de células transfectadas con un siRNA irrelevante o el siRNA para α/β -DG bajo el estímulo de Bk 1 μ M. (D) Ensayos de co-inmunoprecipitación con anticuerpos contra PKG-1 en extractos de proteína total de células de MLAUH transfectadas con un siRNA irrelevante o el siRNA para α/β -DG bajo el estímulo de Bk 1 μ M. La presencia de VASP en las proteínas inmunoprecipitadas fue analizada mediante ensayos de Western blot y análisis densitométrico. (E) Análisis mediante ensayos de Western blot y densitometría de la forma no-fosforilada y fosforilada (p-VASP) en extractos de proteína total de células transfectadas con un siRNA irrelevante o el siRNA para α/β -DG bajo el estímulo de Bk 1 μ M. Los datos se representan como la media del error estándar de tres experimentos independientes analizados con un pos hoc análisis "One Way Anova" and Tukey. * = P < 0.05. ** = P < 0.01. NS= Not Significant.

Capítulo 7

Discusión

En músculo estriado, distrofina y su ortólogo autosómico la proteína utrofina, anclan en la membrana al DAPC o UAPC. Estos complejos están constituidos por distrobrevinas, sintrofinas, distroglicanos y sarcoglicanos además de la proteína sarcospan [56]. Dependiendo del tejido y su ubicación subcelular, estos complejos difieren en el tipo de proteínas que los integran. [90, 91]. Ambos complejos unen a la matriz extracelular y a los filamentos de actina del citoesqueleto. Su principal función es proveer soporte y estabilidad a la membrana celular, durante los procesos de contracción y relajación muscular [114,115]. La presencia de complejos DAP en dominios caveolares, sugiere que estos complejos participan en la modulación de procesos de traducción de señales. Las caveolas o dominios caveolares representan un subtipo de balsa lipídica en la membrana plasmática. Estas entidades permiten el intercambio de proteínas y la regulación de moléculas señal entre el dominio de balsa y el medio ambiente circundante. En el músculo liso no vascular, se ha propuesto que el DAPC regula la liberación de Ca^{2+} intracelular y participa en el anclaje de la caveola al citoesqueleto intracelular.

Alteraciones en los genes que codifican para los sarcoglicanos β -, δ - y γ -, están asociadas con el desarrollo de DM y CMD [73-76]. En modelos murinos nulos de β - y δ - SG, se ha demostrado que la perturbación del complejo SG-SSPN en MLV origina el desarrollo de constricciones microvasculares en las arterias coronarias, diafragma y riñones [67,77,78]. Lo anterior destaca la importancia del DAPC músculo liso vascular. En MLV el DAPC, está constituido de un perfil específico de proteínas, diferentes a las descritas en músculo

estriado [86-88], y aunque algunos reportes describen la presencia de utrofina, no existe evidencia clara sobre su participación como parte de un potencial complejo. En modelos nulos de distrofina, utrofina restablece la función del musculo estriado [89], sin embargo en MLV no existen datos que demuestren este mecanismo ni la presencia de complejos UAP independientes a los descritos por distrofina.

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo enfocados al análisis de la expresión del DAPC en arterias y venas de origen humano, demostraron que en MLV utrofina colocalizaba con cav-1 [97]. Con base en lo anteriormente señalado, en el presente estudio se investigó la existencia y localización de un complejo UAP en células de MLAUH. Inicialmente, la presencia de distrofina y utrofina así como de otros miembros del DAPC en MLAUH se identificó mediante ensayos de inmunofluorescencia y Western blot en conjunto con cav-1 y cavina-1. Aunque estos resultados, sugieren la presencia de un DAPC o UAPC en los dominios caveolares de la membrana plasmática, el análisis de doble inmunofluorescencia indirecta muestra que utrofina co-localiza con el marcador de balsas lipídicas, el gangliósido GM1. En músculo esquelético se ha observado que cav-3 co-fracciona con la proteína distrofina y ciertos miembros del DAPC [116,117], sin embargo en MLV nuestros resultados de co-fraccionamiento celular y la co-inmunoprecipitación revelan la existencia de un complejo UAP constituido por utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavina-1. Dado que, las dos últimas proteínas son componentes estructurales de los dominios caveolares [109,118], se ha propuesto que utrofina y no distrofina es la proteína que ancla los componentes DAPs a la membrana del dominio caveolar.

Diversos reportes en músculo liso no vascular han demostrado que distrofina co-segrega con dominios en la membrana denominados balsas lipídicas; particularmente en aquellos conocidos como caveolas [92]. Su presencia en diferentes regiones de la membrana celular juega un papel fundamental en la señalización transmembrana. En músculo liso de vías aéreas, Sharma *et al.* [99], mediante los mismos procedimientos bioquímicos realizados en este estudio, demostró que distrofina co-segrega con β -DG en dominios ricos en cav-1, y mediante ensayos de co-inmunoprecipitación la interacción directa entre cavina-1 y β -DG. Adicionalmente ha propuesto que el DAPC descrito en el musculo de vías aéreas, regula la liberación de Ca^{2+} intracelular y participa en el anclaje de la caveola al citoesqueleto intracelular. Interesantemente, en la presente investigación, se ha demostrado que en el MLV utrofina -el homólogo autosómico de distrofina- es la proteína que estructura un complejo en la caveola vascular. Curiosamente, este complejo, conformado por utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavina-1 no incluye otros miembros importantes del DAPC, como lo son β -SG, δ -SG, SSPN, así como las isoformas de distrofina y δ -SG [104,119] (Dp71 y δ -SG3 respectivamente).

A este respecto, el grupo de investigación de la Dra. Crosbie-Watson, ha observado que la sobreexpresión de SSPN facilita el transporte del UAPC a la superficie celular en células de músculo esquelético [120]. En nuestro caso, no detectamos la presencia de SSPN como parte del UAPC descrito en los dominios caveolares del MLV. Por el contrario, su presencia fue detectada en la membrana celular donde no hay balsas lipídicas. Esto permite especular que SSPN es un componente importante en el transporte y ubicación de otros complejos DAPC/UAPC, los cuales no interactúan con componentes de la balsa lipídica

como son las cavinas y caveolinas. Por ejemplo, en el músculo esquelético el DAPC muestra una clara diferencia en su patrón de distribución en comparación con el UAPC; mientras que el DAPC se encuentra a lo largo del todo sarcolema, el UAPC se acumula sólo en la unión neuromuscular y miotendinosa [89-91]. Del mismo modo, se ha reportado la presencia de DP71 y de miembros del DAPC en la envoltura nuclear [121]. Debido a que, nuestro análisis mediante Western Blot en las fracciones obtenidas del gradiente mostró la presencia de distrofina, utrofina y Dp71 en la membrana celular donde no hay balsas lipídicas, es muy probable la existencia de diversos complejos DAPC/UAPC con diferentes combinaciones de componentes DAPs o UAPs en las membranas celulares internas y externas del MLAUH.

Un estudio que apoya esta idea es el realizado por Johnson, *et al.* [122,123] donde muestra la presencia de al menos tres combinaciones diferentes de complejos DAPs en músculo esquelético. Interesantemente, Johnson *et al.* [123] reportan que la composición de estos complejos cambia en función a su ubicación en la miofibrilla (membrana sináptica vs extra-sináptica) o el estado de desarrollo de la fibra muscular (regeneración vs no regeneración). Esto propone que hay mecanismos utilizados por las células que regulan la inclusión o exclusión temporal y espacial de las proteínas específicas del UAPC o DAPC [123].

La descripción de nuevos componentes DAPC en el músculo esquelético del diafragma que se expresan en el cuádriceps y que no interaccionan con distrofina o utrofina demuestran que estos complejos varían en composición [122]. En nuestro caso, hemos encontrado que cav-1, cavina-1 y eNOS interacciona con utrofina y no con distrofina. Interesantemente desde que ambas proteínas sirven como un andamio estructural y de señalización, se ha

propuesto que, las diferencias funcionales entre ambos complejos surgen de las interacciones de proteínas específicas de cada tejido.

Basándonos en el fraccionamiento subcelular de la membrana, la presencia del co-fraccionamiento de distrofina y utrofina en conjunto con δ -SG, β -SG, SSPN y de las isoformas δ -SG3 y Dp71 en las fracciones ausentes de balsas lipídicas sugiere la presencia de al menos dos complejos alternos independientes al complejo descrito en las Balsas lipídicas. Además, la descripción de complejos con diferente composición en el sarcolema del músculo esquelético y su presencia en las membranas del túbulo t y del retículo sarcoplásmico [24], demuestran que estas proteínas también pueden distribuirse en diferentes compartimentos. Estos datos, junto con nuestros resultados, ponen de manifiesto la diversidad de complejos DAPC/UAPC que se pueden originar en distintos tipos celulares y aún en una misma célula. Esto es relevante, ya que cada complejo puede participar en distintas vías de señalización o en diversos procesos estructurales, de acuerdo a las necesidades de la célula.

Las balsas lipídicas son dominios planares en la membrana plasmática, los cuales están enriquecidas en colesterol y esfingolípidos [93]. Las caveolas representan un subtipo de balsa lipídica en forma de invaginación. Su tamaño es altamente variable y contienen un gran número de moléculas de señalización [94]. Cav-1 es una proteína clave para la formación de la caveola, y regula positivamente o negativamente diferentes vías de señalización mediante la interacción directa o indirecta con otras proteínas. En células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) se ha descrito en dominios caveolares y no caveolares, la presencia de un complejo UAPC que regula y ancla a la membrana, a la

enzima eNOS [110]. En MLV la presencia de esta enzima no se ha descrito, sin embargo existen datos que sugieren su presencia y proponen mecanismos que regulan la mitogénesis y proliferación celular del MLV [126,127]. Haciendo una analogía con lo descrito en células HUVEC, en la presente investigación se analizó la posible interacción de eNOS con el complejo UAPC. Sorprendentemente, en MLV se detectó la presencia de la enzima eNOS como parte del complejo UAPC. Adicionalmente, para definir el papel fisiológico de este complejo sobre eNOS en el MLAUH se bloqueó el RNA mensajero de α/β -DG y subsecuentemente, se estimuló con bradicinina 1 μ M. En este procedimiento, se observó que la deficiencia de α/β -DG en las células del MLAUH indujo la reducción de la síntesis de NO y un decremento en la forma activa de la enzima después del tratamiento con 1 μ M de BK (Figura 11 B y C).

La enzima eNOS, responsable del incremento en la síntesis de óxido nítrico, juega un papel crítico en el control del tono vascular y la agregación plaquetaria. La importancia del óxido nítrico generado por la enzima está dada por la observación en ratones deficientes en eNOS que son hipertensos [111]. En MLV reciente evidencia sugiere que el óxido nítrico puede ejercer un efecto vasodilatador mediante dos mecanismos: a través de la activación de canales dependientes de Ca^{2+} y a partir de la activación de la enzima adenilato ciclasa.

En este último mecanismo, el óxido nítrico activa la enzima guanilato ciclasa e incrementa la síntesis de cGMP [111]. Esto a su vez activa a la proteína PKG 1 [112], y fosforila a la proteína VASP [113]. Interesantemente nuestras observaciones en los ensayos realizados mediante el bloqueo del siRNA para α/β -DG en el MLAUH muestran una reducción en la interacción de la proteína PKG1 con VASP y un decremento en la fosforilación de VASP

(p-Ser269). Esto demuestra que la falta de α/β -DG en el MLAUH afecta indirectamente la vía de transducción de señales de cGMP. En condiciones fisiológicas los miembros de la familia PKG se activan por el aumento de cGMP intracelular [111], y la forma activa de estas proteínas fosforilan a la proteína VASP en la serina 239 [112]. La activación de esta cascada de señales induce la activación plaquetaria y la relajación del músculo liso. El decremento en la interacción de la proteína PKG1 con VASP supone un desajuste en la activación de este vía y la subsecuente reducción del efecto vasodilatador del óxido nítrico [124]. En adición, al papel fundamental que desempeña PKG, la activación de vías de señalización mediadas por PKG son importantes en procesos celulares incluidos la contractilidad cardíaca, la guía de axones, el crecimiento de hueso, la contracción del músculo liso intestinal y la disfunción eréctil [125]. Por otro lado, la producción de óxido nítrico en las células de MLV *in vitro* modula la mitogénesis y la proliferación celular mediante la activación de cGMP [126,127]. Así mismo, la inhibición de eNOS en MLV de modelos murinos aumenta la constricción de la arteria femoral [128]. Teniendo en cuenta todas estas observaciones, el UAPC descrito en la presente investigación, demuestra la importancia de su presencia en la actividad reguladora de la eNOS/cGMP (Figura 13) en el MLAUH.

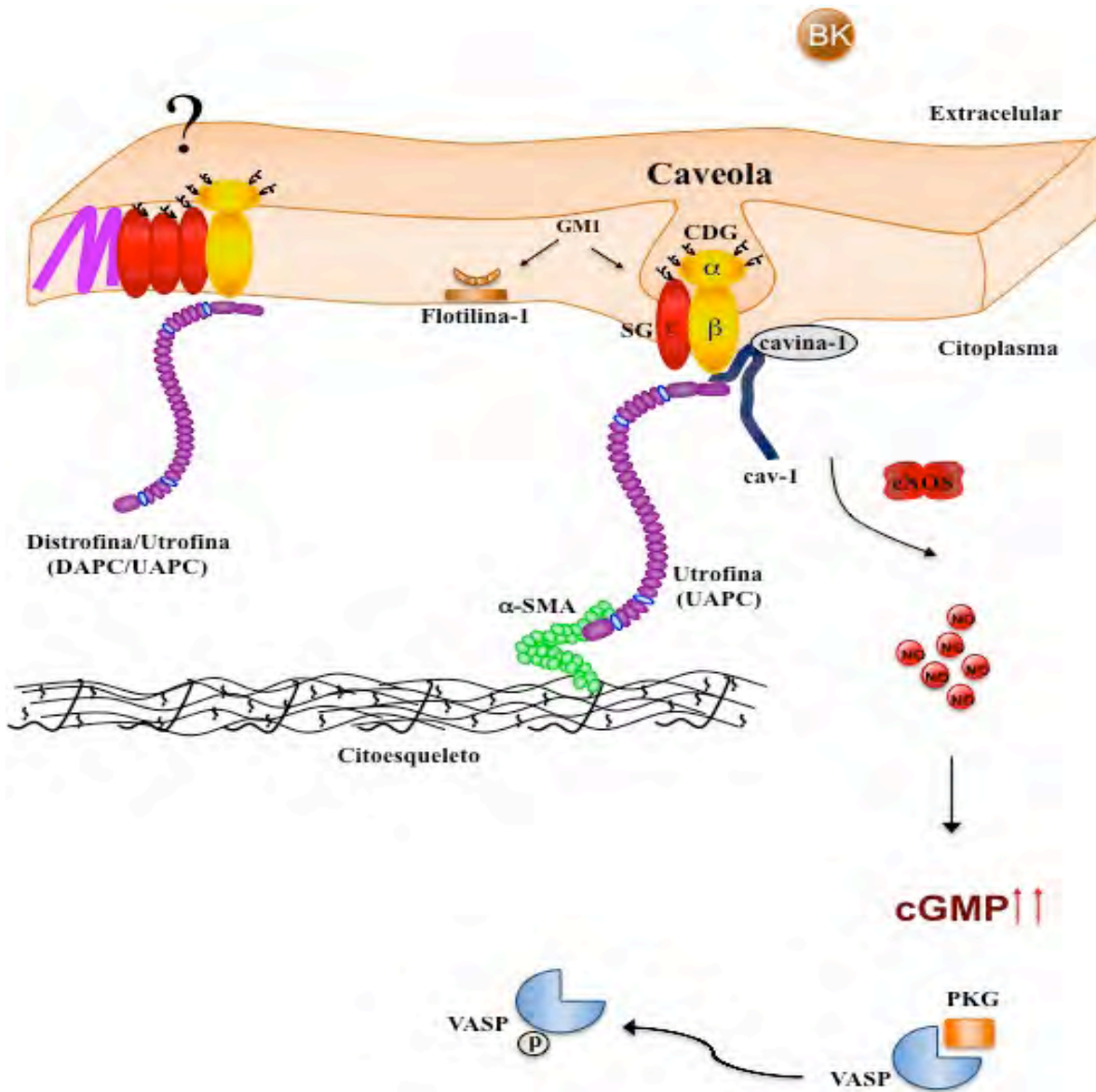


Figura 13. Representación esquemática de modelo propuesto del UAPC descrito en balsas lipídicas y su papel fisiológico en células de MLAUH. El esquema señala la existencia de un UAPC en la caveola vascular constituido por utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavin-1. La presencia de miembros del UAPC y DAPC en las fracciones mas densas del gradiente (Figura. 5 Fx 8-12) sugiere la existencia de complejos alternativos en otras regiones de la membrana. Bajo estímulo de Bradicinina (BK) la eNOS se disocia del complejo, se fosforila en la Ser 1177 e incrementa los niveles de oxido nítrico (NO). Esto promueve el incremento del cGMP intracelular lo cual activa a la proteína PKG que interacciona con el efector VASP. El resultado de esta interacción es la fosforilación de VASP en la Ser 239 y la activa mecanismos que regulan la función vascular.

Capítulo 8

Conclusión

En conclusión, nuestros resultados actuales confirman la existencia de un UAPC independiente de distrofina localizado en balsas lipídicas (dominios caveolares y balsas lipídicas no caveolares) de células de MLAUH. Este complejo está conformado por utrofina, β -DG, ϵ -SG, α -SMA, eNOS, cav-1 y cavina-1, y participa en modulación de la actividad de eNOS/cGMP.

La presencia de varios componentes del DAPC/UAPC en la membrana celular en regiones donde no hay balsas lipídicas, sugieren la presencia hipotética de complejos alternos en membranas externas e internas del MLAUH.

Su identificación en regiones del sarcolema con diferente composición lipídica o en membranas internas como el retículo sarcoplásmico o la membrana nuclear contribuye a la comprensión de su papel en la fisiología del MLV y su posible participación en distintas patologías cardiovasculares.

Capítulo 9

Perspectivas

En el presente trabajo, se determinó la existencia de un complejo de proteínas asociado a utrofina y su participación en la regulación de la vía eNOS/cGMP en MLV. Dado que, la presencia de utrofina no sólo se restringe a las fracciones del gradiente enriquecidas en balsas lipídicas sino también en otras membranas donde distrofina esta presente, hemos comenzado a explorar la participación de estas proteínas en la formación de complejos independientes al descrito en las balsas lipídicas del MLAUH.

Debido a que, la modulación la actividad de eNOS/cGMP depende de la presencia de α -/ β -DG en el complejo, resulta importante analizar el efecto que esto causa en los complejos DAPC localizados en otros dominios. Lo anterior, se podría evaluar mediante RNA de interferencia una vez que se haya identificado presencia y composición de complejos independientes al UAPC identificado en este trabajo.

Por otro lado, las evidencias aportadas con respecto a la presencia de la isoforma Dp71 y de δ -SG3 hacen interesante explorar su localización y papel como parte de estos complejos no sólo en el sarcolema sino también en membranas internas como el retículo sarcoplásmico o en la membrana nuclear.

Para ello, hemos realizado un fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial con el que se ha obtenido el sarcolema y las membranas internas del MLV. En ambos casos se ha decidido explorar la presencia de estos complejos mediante espectrofotometría de masas y ensayos de co-inmunoprecipitación.

Capítulo 10

Referencias

- [1] Rando, T.A, The dystrophin glycoprotein complex, cellular signaling and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies, *Muscle and Nerve*. 24 (2001) 1575-1594.
- [2] Hoffman EP, Dressman D, Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy, *Trends. Pharmacol. Sci*. 22 (2001) 465–470.
- [3] Kaspar, R. W., H. D. Allen, Current understanding and management of dilated cardiomyopathy in Duchenne and Becker muscular dystrophy, *J. Am. Acad. Nurse. Pract.* 21 (2009) 241-249.
- [4] Judge, D. P., D. A. Kass, Pathophysiology and Therapy of Cardiac Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*. 11 (2011) 287-94.
- [5] Bell, C. D. and P. E. Conen, Histopathological changes in Duchenne muscular dystrophy, *J. Neurol. Sci*. 7 (1968) 529-544.
- [6] Emery, A. E. and R. Skinner, Clinical studies in benign (Becker type) X-linked muscular dystrophy, *Clin. Genet*. 10 (1976)189-201.
- [7] Bushby, K. M., M. Thambyayah, Prevalence and incidence of Becker muscular dystrophy, *lancet*. 337 (1991) 1022-1024.
- [8] Darras, B. T., D. T. Miller, *Dystrophinopathies*, (1993)
- [9] Bonnemann, C.G, b-Sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex, *Nature Genetics*. 11 (1995) 266-273.
- [10] Lim, L.E, b-Sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12, *Nature Genetics*. 11 (1995) 257-265.
- [11] Nigro, V, Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the d-sarcoglycan gene, *Nature Genetics*. 14 (1996) 195-198.

- [12] Noguchi, Mutations in the dystrophin-associated protein g-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy, *Science*. 270 (1995) 819-822.
- [13] Roberds, S.L, Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*. 78 (1994) 625-633.
- [14] Angelini, C, The clinical spectrum of sarcoglycanopathies. *Neurology*, 52 (1999) 176-179.
- [15] Sandonà D, Betto R, Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects, *Expert. Rev. Mol. Med.* 28 (2009) 10-1017
- [16] D.J. Blake, R. Nawrotzki, N.Y. Loh, D.C. Gorecki, K.E. Davies, β -dystrobrevin, a member of the dystrophin related protein family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998) 241–246.
- [17] E.P. Hoffman, C.M. Knudson, K.P. Campbell, L.M. Kunkel, Subcellular fractionation of dystrophin to the triads of skeletal muscle, *Nature*. 330 (1987)754–758.
- [18] O. Ibraghimov-Beskrovnaya, J.M. Ervasti, C.J. Leveille, C.A. Slaughter, S.W. Sernett, K.P. Campbell, Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix, *Nature*. 355 (1992) 696–702.
- [19] M. Yoshida, E. Ozawa, Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma, *J. Biochem.*108 (1990) 748–752.
- [20] Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE, Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 291–329.
- [21] Campbell KP, Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage, *Cell*. 80 (1995) 675-679.
- [22] A. Kumar, N. Khandelwal, R. Malya, M.B. Reid, A.M. Boriek, Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibres, *FASEB J.* 18 (2004) 102–110.

- [23] A.A. Hassoni, M.J. Cullen, Calcium homeostasis and ultrastructural studies in a patient with limb girdle muscular dystrophy type 2C, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 25 (1999) 244–253.
- [24] A. Solares-Pérez, R. Alvarez, R.H. Crosbie, J. Vega-Moreno, J. Medina-Monares, F.J. Estrada, A. Ortega, R. Coral-Vazquez, Altered calcium pump and secondary deficiency of gamma-sarcoglycan and microspan in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from delta-sarcoglycan knockout mice, *Cell Calcium.* 48 (2010) 28–36
- [25] E.P.Hoffman, A.P. Monaco, C.C. Feener, L.M.Kunkel, Conservation of the Duchenne muscular dystrophy gene in mice and humans, *Science.* 238 (1987) 347.
- [26] M. Koenig, E.P. Hoffman, C.J. Bertelson, A.P. Monaco, C. Feener, L.M. Kunkel, Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals, *Cell* 50 (1987) 509.
- [27] E. Barnea, D. Zuk, R. Simantov, U. Nudel, D. Yaffe, Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells, *Neuron.* 5 (1990) 881.
- [28] H.G. Lidov, S. Selig, L.M. Kunkel, Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 329.
- [29] T.J. Byers, H.G. Lidov, L.M. Kunkel, An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve, *Nat. Genet.* 4 (1993) 77.
- [30] D.J. Blake, D.R. Love, J. Tinsley, G.E. Morris, H. Turley, K. Gatter, G. Dickson, Y.H. Edwards, K.E. Davies, Characterization of a 4.8 kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells, *Hum. Mol. Genet.* 1 (1992) 103.
- [31] M. Koenig, L.M. Kunkel, Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 4560.
- [32] S.J. Winder, T.J. Gibson, J. Kendrick-Jones, Dystrophin and utrophin: the missing

links! FEBS Lett. 369 (1995) 27.

[33] P. Bork, M. Sudol, The WW domain: a signalling site in dystrophin? Trends Biochem, Sci. 19 (1994) 531.

[34] M. Koenig, A.P. Monaco, L.M. Kunkel, The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein, Cell 53 (1988) 219.

[35] C.P. Ponting, D.J. Blake, K.E. Davies, J. Kendrick-Jones, S.J. Winder, ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins, Trends Biochem, Sci. 21 (1996) 11.

[36] J.T. Anderson, R.P. Rogers, H.W. Jarrett, Ca²⁺ –calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin, J. Biol. Chem. 271 (1996) 6605.

[37] J.M. Tinsley, D.J. Blake, A. Roche, U. Fairbrother, J. Riss, B.C. Byth, A.E. Knight, J. Kendrick-Jones, G.K. Suthers, D.R. Love, Primary structure of dystrophin-related protein, Nature. 360 (1992) 591.

[38] D.J. Blake, J.M. Tinsley, K.E. Davies, A.E. Knight, S.J. Winder, J. Kendrick-Jones, Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein–protein interactions, Trends Biochem. Sci, 20 (1995) 133.

[39] Tomamasi, D.I., Vignano, A., Di Zenzo, G., Sudor, M., Cesareni, G. Dente, L, Contribution of the different modules in the utrophin carboxy terminal region to the formation and regulation of the DAP complex. F.E.B.S. Lett, 471 (2000) 229-234.

[40] Sadoulet-Puccio, H.M., Rajala, M y Kunkel, L.M, Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (1997) 12413–12418.

[41] Peters, M.F., O’Brien, K.F., Sadoulet-Puccio, H.M., Kunkel, L.M., Adams, M.E y Froehner, S.C, b-Dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. J Biol. Chem. 272 (1997) 31561–31569.

- [42] H.J. Ambrose, D.J. Blake, R.A. Nawrotzki, K.E. Davies, Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene, *Genomics*. 39 (1997) 359.
- [43] N.Y. Loh, H.J. Ambrose, L.M. Guay-Woodford, S. DasGupta, R.A. Nawrotzki, D.J. Blake, K.E. Davies, Genomic organization and refined mapping of the mouse beta-dystrobrevin gene, *Mamm. Genome*. 9 (1998) 857.
- [44] M.L. Rees, C.F. Lien, D.C. Gorecki, Dystrobrevins in muscle and non-muscle tissues, *Neuromuscul. Disord*. 17 (2007) 123.
- [45] M. Nakamori, M.P. Takahashi, The role of alpha-dystrobrevin in striated muscle, *Int. J. Mol. Sci*. 12 (2011) 1660.
- [46] Brenman, J.E., Chao, D.S., Gree, S.H., McGee, A.W., Craven, S.E., Santillano, D.R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M.F., Froehner, S.C, Brecht, D.S, Interaction of nitric oxide synthase with the post-synaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains, *Cell*. 84 (1996) 757-767.
- [47] Pearce, M., Blake, D.J., Tinsley, J.M., Byth, B.C., Campbell, L., Monaco, A.P y Davies, K.E, The utrophin and dystrophin genes share similarities in genomic structure, *Hum. Mol. Genet*. 2 (1993) 1765-1772.
- [48] Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y y Ozawa, E, Molecular organization at the glycoprotein-complex binding site of dystrophin: three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxi-terminal portion of dystrophin, *Eur. J. Biochem*. 220 (1994) 283-292.
- [49] Dalkilic, I y Kunkel, M.L, Muscular Dystrophies: genes to pathogenesis, *Curr. Opin. in Genet. Develop*, 13 (2003) 231-238.
- [50] Oak, S.A., Russo, K., Petrucci, T.C y Jarrett, H.W, Mouse α 1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochem*. 40 (2001) 11270-11278.

- [51] Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G y Campbell, K. P, SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 11711-11714.
- [52] Hack, A.A., Groh, M y McMally, E.M, Sarcoglycans in Muscular Dystrophy, *Microsc. Res. And Tech.* 48 (2000) 167-180.
- [53] Matsumura, K., Saito, F., Yamada, H., Hase, A., Sunda, Y y Shimizu, T, Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell. And Mol. Biol.* 45 (1999) 751-762.
- [54] Chan, Y.M., Bonnemann, C.G., Lidov, H.G y Kunkel, L.M, Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture, *J. Cell. Biol.* 143 (1998) 2033-2044.
- [55] Crosbie, R.H., Heighmay, J., Venzke, D.P., Lee, J.C y Campbell, K.P, Sarcospan the 25kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31221-31224.
- [56] Vainzof, M., Moreira, E.S., Ferraz, G., Pasos-Bueno, M.R., Marin, S.K y Zatz, M, Further evidence for the organization of the four sarcoglycans proteins within the dystrophin-glycoprotein complex, *Eur. J. Hum. Genet.* 7 (1999) 251-254.
- [57] Noguchi, S., Wakabayashi, E., Imamura, M., Yoshida, M y Ozawa, E, Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur. J. of Biochem.* 267 (2000) 540-648.
- [58] Yoshida, M., Hama, H., Ishikawa-Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S., Sasaoka, T y Ozawa, E, Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1033-1040.
- [59] N. Cohen, F. Muntoni, Multiple pathogenetic mechanisms in X linked dilated cardiomyopathy, *Heart.* 90 (2004) 835–841.

- [60] A. Oldfors, B.O. Eriksson, M. Kyllerman, T. Martinsson, J. Wahlström, Dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene: an illustrated review, *Br. Heart. J.* 72 (1994) 344–348.
- [61] C.G.H. Lee, B.J. Lamphear, M.E. Martone, K.P. Campbell, R.E. Rhoad, K.U. Knowlton, Enteroviral protease 2A cleaves dystrophin: evidence of cytoskeletal disruption in an acquired cardiomyopathy, *Nat. Med.* 5 (1999) 320–326.
- [62] P. Melacini, M. Fanin, D.J. Duggan, M.P. Freda, A. Berardinelli, G.A. Danieli, A. Barchitta, E.P. Hoffman, S. Dalla Volta, C. Angelini, Heart involvement in muscular dystrophy due to sarcoglycan gene mutations, *Muscle Nerve.* 22 (1999) 473–479.
- [63] F.C. Goodwin, F. Muntoni, Cardiac involvement in muscular dystrophies: molecular mechanisms, *Muscle Nerve.* 32 (2005) 577–588.
- [64] P. Rimessi, F. Gualandi, L. Duprez, P. Spitali, M. Neri, L. Merlini, E. Calzolari, F. Muntoni, A. Ferlini, Genomic and transcription studies as diagnostic tools for a prenatal detection of X-linked dilated cardiomyopathy due to a dystrophin gene mutation, *Am. J. Med. Genet. A.* 132 (2005) 391–394.
- [65] A. Heydemann, E.M. McNally, Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy, *Trends Cardiovasc. Med.* 17 (2007) 55–59.
- [66] A. Romfh, E.M. McNally, Cardiac assessment in Duchenne and Becker muscular dystrophies, *Curr. Heart Fail. Rep.* 7 (2010) 212–218.
- [67] R. Coral-Vazquez, R.D. Cohn, S.A. Moore, J.A. Hill, R.M. Weiss, R.L. Davidson, V. Straub, R. Barresi, D. Bansal, R.F. Hrstka, R. Williamson, K.P. Campbell, Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy, *Cell.* 99 (1999)465–474.
- [68] R.D. Cohn, M. Durbeej, S.A. Moore, R. Coral-Vazquez, S. Prouty, K.P. Campbell, Prevention of cardiomyopathy in mouse models lacking the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex, *J. Clin. Invest.* 107 (2001) R1–R7.

- [69] M.T. Wheeler, C.E. Korcarz, K.A. Collins, K.A. Lapidos, A.A. Hack, M.R. Lyons, S. Zarnegar, J.U. Earley, R.M. Lang, E.M. McNally, Secondary coronary artery vasospasm promotes cardiomyopathy progression, *Am. J. Pathol.* 164 (2004) 1063–1071.
- [70] Towbin, J.A, The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10 (1998) 131-139.
- [71] Fatkin, D y Graham, R.M, Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies, *Physiol. Rev.* 82 (2002) 945-980.
- [72] Cox, J.F y Kunkel, L.M, Dystrophies and heart disease, *Curr. Opin. Cardiol.* 12 (1997) 329-343.
- [73] Nigro, G., Comi, L.I., Politano, L., and Bain, R.J. The incidence and evolution of cardiomyopathy in Duchenne muscular dystrophy. *Int. J. Cardiol.* 26 (1990) 271–277.
- [74] Moreira, E.S., A first missense mutation in the delta sarcoglycan gene associated with a severe phenotype and frequency of limb-girdle muscular dystrophy type 2F (LGMD2F) in Brazilian sarcoglycanopathies, *J. Med. Genet.* 35 (1998) 951–953.
- [75] Barresi, R., et al. 2000. Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J. Med.Genet.* 37:102–107.
- [76] Gneocchi-Ruscione, T., Cardiomyopathy in Duchenne, Becker and sarcoglycanopathies: a role for coronary dysfunction?, *Muscle Nerve.* 22 (1999) 1549–1556.
- [77] Durbeej, M., Cohn, R.D., Hrstka, F., Moore, S.A., Allamand, V., Davidson, B.L., Williamson, R.A y Campbell, K.P, Disruption of b-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E, *Mol. Cell. Biol.* 5 (2000) 141-151.
- [78] McNally, E.M., Pasos-Bueno, M.R., Bonnemann, C.G., Vainzof, M., De sa Moreira, E., Lidov, H.G., Othmane, K.B., Denton, P.H., Vance, J.M., Zatz y Kunkel, L.M, Mild and severe muscular dystrophy caused by a single g-sarcoglycan mutation, *Am. J. Hum. Genet.*

59 (1998) 1040-1047.

[79] Duclos, F., Straub, V., Moore, S.A., Venzke, D.P., Hrstka, R.F., Crosbie, R.H., Durbeej, M., Lebakken, C.S., Ettinger, A.J., Van der Meulen, J., Holt, K.H., Lim, L.E., Sanes, J.R., Davidson, B.L., Faulkner, J.A., Williamson, R. Campbell, K.P, Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice, *J. Cell. Biol.* 142 (1998) 1461–1471.

[80] Dye WW, Gleason RL, Wilson E, Humphrey JD, Altered biomechanical properties of carotid arteries in two mouse models of muscular dystrophy. *J Appl Physiol* 103 (2007) 664–672.

[81] Sakamoto, A., Abe, M y Masaki, T, (1999). Delineaton of genomic deletion in cardiomiopatic hamster. *F.E.B.S. Lett.* **447**:124-128.

[82] Lehoux S, Tedgui A, Cellular mechanics and gene expression in blood vessels, *J Biomech*, 36 (2003) 631-43.

[83] Moiseeva. E.P, Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions, *Cardiovasc. Res.* 52 (2001) 372-86.

[84] Kuo, K. H, Seow, C. Y, Contractile filament architecture and force transmission in swine airway smooth muscle. *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1503-1511.

[85] Lavidos, K. A., Kakkar, R. McNally, E. M, The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma, *Circ. Res.* 94 (2004)1023-1031.

[86] R. Barresi, S.A. Moore, C.A. Stolle, J.R. Mendell, K.P. Campbell, Expression of gamma-sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38554–38560.

[87] V. Straub, A.J. Ettinger, M. Durbeej, D.P. Venzke, S. Cutshall, I.R. Sanes, K.P. Campbell, ε-Sarcoglycan replaces α-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27989–27996.

- [88] M.T. Wheeler, M.T. Allikian, A. Heydemann, E.M. McNally, The sarcoglycan complex in striated and vascular smooth muscle, *Cold Spring Harb.Symp. Quant. Biol.* 67 (2002) 389–397.
- [89] K. Matsumura, J.M. Ervasti, K. Ohlendieck, S.D. Kahl, K.P. Campbell, Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle, *Nature.* 360 (1992) 588–591.
- [90] Khurana TS, Davies, K.E, Pharmacological strategies for muscular dystrophy, *Nat Rev Drug Discov.* 5 (2003) 379-390.
- [91] T.S. Khurana, S.C. Watkins, P. Chafey, J. Chelly, F.M. Tomé, M. Fardeau, J.C. Kaplan, L.M. Kunkel, Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle, *Neuromusc. Disord.* 1 (1991) 185–194.
- [92] North, A. J., Galazkiewicz, B., Byers, T. J., Glenney, J. R., Jr and Small, J. V. Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. *J. Cell Biol.* 120 (1993)1159-1167.
- [93] Rajendran L and Simons K, Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118(Pt 6 (2005) 1099-1102.
- [94] Parton RG and Simons K, The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (2007)185-194.
- [95] Williams T.M and Lisanti M.P, The Caveolin genes: from cell biology to medicine, *Ann Med.* 36(2004)584-595.
- [96] Rivier, F., Robert, A., Hugon, G y Mornet, D, Different utrophin and dystrophin properties related to their vascular smooth muscle distributions. *F.E.B.S. Lett.* 408 (1997) 94-98.
- [97] I. Ramírez-Sánchez, H. Rosas-Vargas, G. Ceballos, F.Salamanca, R.M. Coral-Vázquez, Expression analysisof the SG-SSPN complex in smooth muscle and endothelialcells of human umbilical cord vessels, *J. Vasc. Res.* 42 (2005)1–7.

- [98] I. Ramírez-Sánchez, G.M. Ceballos-Reyes, H. Rosas-Vargas, D. Cerecedo-Mercado, F. Salamanca, R.M. Coral-Vázquez, Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS, *Front. Biosci.* 12 (2007) 1956–1962.
- [99] P. Sharma, S. Ghavami, G.L. Stelmack, K.D. McNeill, M.M. Mutawe, T. Klonisch, H. Unruh, A.J. Halayko, β -Dystroglycan binds caveolin-1 in smooth muscle: a functional role in caveolae distribution and Ca^{2+} release, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 3061–3070.
- [100] J. Abramowitz, C. Dai, K.K. Hirschi, R.I. Dmitrieva, P.A. Doris, L. Liu, J.C. Allen, Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, A7r5. *Circulation.* 108 (2003) 3048–3053.
- [101] H. Pang, P.U. Le, I.R. Nabi, Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 1421–1430.
- [102] E.B. Thorp, T.M. Gallagher, Requirements for CEACAMs and cholesterol during murine coronavirus cell entry, *J. Virol.* 78 (2004) 2682–2692.
- [103] I.A. Martínez-Viera, A. Vásquez-Limeta, R. González-Ramírez, S. L. Morales-Lázaro, M. Mondragon, R. Mondragon, A. Ortega, S. J. Winder, B. Cisneros, A role for β -dystroglycan in the organization and structure of the nucleus in myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1833 (2013) 698–711.
- [104] F.J. Estrada, D. Mornet, H. Rosas-Vargas, A. Angulo, M. Hernández, V. Becker, A. Rendón, M. Ramos-Kuri, R.M. Coral-Vázquez, A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 3 (2006) 865–871.
- [105] B.J. Nichols, GM1-containing lipid rafts are depleted within clathrin-coated pits, *Curr. Biol.* 13 (2003) 686–690.

- [106] C.A. Stuermer, Microdomain-forming proteins and the role of the reggies/flotillins during axon regeneration in zebrafish, *Biochim. Biophys. Acta.* 1812 (2011) 415–422.
- [107] Roseblatt M, Hidalgo C, Vergara C, and Ikemoto N. Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 256 (1981) 8140–8148.
- [108] K.G. Rothberg, J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, R.G. Anderson, Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats, *Cell.* 68 (1992) 673-682.
- [109] M.M. Hill, M. Bastiani, R. Luetterforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S.J. Nixon, P. Walser, D. Abankwa, V.M. Oorschot, S. Martin, J.F. Hancock, R.G. Parton, PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function, *Cell.* 132 (2008) 113–124.
- [110] I. Ramírez-Sánchez, P. Mendoza-Lorenzo, A. Zentella-Dehesa, E. Méndez-Bolaina, E. Lara-Padilla, G. Ceballos-Reyes, P. Canto, C. Palma-Flores, R.M. Coral-Vázquez, Caveolae and non-caveolae lipid raft microdomains of human umbilical vein endothelial cells contain utrophin-associated protein complexes, *Biochimie.* 94 (2012) 1884-1890.
- [111] T. Münzel, R. Feil, A. Mülsch, S.M. Lohmann, F. Hofmann, U. Walter, Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase, *Circulation.* 108 (2003) 2172-2183.
- [112] A.B. Van-dragger, H.R. de Jonge, Signalling by cGMP-dependent protein kinases, *Mol. Cell. Biochem.* 157 (1996) 23-30.
- [113] E. Butt, K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, U. Walter, cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in Vitro and in intact human platelets, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14509-14517.

- [114] B.J. Petrof, J.B. Shrager, H.H. Stedman, A.M. Kelly, H.L. Sweeney, Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 3710–3714.
- [115] J.M. Ervasti, K.P. Campbell, A role for dystrophin associated glycoproteins as a transmembrane linker between laminin and actin, *J. Cell. Biol.* 122 (1993) 809–824.
- [116] K.S. Song, P.E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D.S. Kohtz, M.P. Lisanti, 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.* 271 (1996) 15160–15165.
- [117] F. Sotgia, J.K. Lee, K. Das, M. Bedford, T.C. Petrucci, P. Macioce, M. Sargiacomo, F.D. Bricarelli, C. Minetti, M. Sudol, M.P. Lisanti, 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.* 275 (2000) 38048–38058.
- [118] L. Liu, P.F. Pilch, A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 4314–4322.
- [119] R. Tadayoni, A. Rendon, L.E. Soria-Jasso, B. Cisneros, Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene, *Mol. Neurobiol.* 45 (2012) 43–60.
- [120] J.L. Marshall, J. Holmberg, E. Chou, A.C. Ocampo, J. Oh, J. Lee, A.K. Peter, P.T. Martin, R.H. Crosbie-Watson, Sarcospan-dependent Akt activation is required for utrophin expression and muscle regeneration, *J. Cell Biol.* 197 (2012) 1009–1027.
- [121] R. González-Ramírez, S.L. Morales-Lázaro, V. Tapia-Ramírez, D. Mornet, B. Cisneros, Nuclear and nuclear envelope localization of dystrophin Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) in the C2C12 muscle cell: DAPs nuclear localization is modulated during myogenesis, *J. Cell. Biochem.* 105 (2008) 735–745.
- [122] Johnson, E.K., Zhang, L., Adams, M.E., Phillips, A., Freitas, M.A., Froehner, S.C., Green-Church, K.B., Montanaro, F. Proteomic analysis reveals differences in the cell

signaling components of the dystrophin-associated protein complex between cardiac and skeletal muscle. *PLOS ONE*. 7 (2012) e43515.

[123] Yoon, Jung; Johnson, Eric; Xu, Rui; Martin, Laura; Martin, Paul; Montanaro, Federica. Comparative proteomic profiling of dystroglycan-associated proteins in wild type, mdx and Galgt2 transgenic mouse skeletal muscle. *J Proteome Res* 11 (2012) 4413-4442.

[124] A. Friebe, D. Koesling, Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase, *Circ. Res.* 93 (2003) 96-105.

[125] F. Hofmann, R. Feil, T. Kleppisch, J. Schlossmann, Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion, *Physiol. Rev.* 86 (2006) 1-23.

[126] U.C. Garg, A. Hassid, Nitric oxide generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular SMCs, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 1774-1776.

[127] I.J. Kullo, R.S. Schwartz, V.J. Pompili, Expression and function of recombinant endothelial NO synthase in coronary artery smooth muscle cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 (1997) 2405–2412.

[128] J.A. Han, E.Y. Seo, H.J. Kim, S.J. Park, H.Y. Yoo, J.Y. Kim, D.M. Shin, J.K. Kim, Y.H. Zhang, S.J. Kim, Hypoxia-augmented constriction of deep femoral artery mediated by inhibition of eNOS in smooth muscle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304 (2013) 78-88.

Capitulo 11

Anexo

ARTICLE IN PRESS

BBAMEM-81383; No. of pages: 8; 4C: 4, 5

Biochimica et Biophysica Acta xxx (2013) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

Description of a utrophin associated protein complex in lipid raft domains of human artery smooth muscle cells

Carlos Palma-Flores^a, Israel Ramírez-Sánchez^b, Haydeé Rosas-Vargas^c,
Patricia Canto^a, Ramón Mauricio Coral-Vázquez^{b,d,*}

^a División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., Mexico

^b Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., Mexico

^c 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

^d Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2012

Received in revised form 6 September 2013

Accepted 12 September 2013

Available online xxx

Keywords:

Utrophin associated protein complex

Caveolae domains

Cavin-1

Vascular smooth muscle

ABSTRACT

The dystrophin-associated protein complex (DAPC) is a multimeric complex that links the extracellular matrix to the actin cytoskeleton, and in some cases dystrophin can be substituted by its autosomal homologue utrophin to form the utrophin-associated protein complex (UAPC). Both complexes maintain the stability of plasma membrane during contraction process and play an important role in transmembrane signaling. Mutations in members of the DAPC are associated with muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy. In a previous study with human umbilical cord vessels, we observed that utrophin colocalize with caveolin-1 (Cav-1) which proposed the presence of UAPC in the plasma membrane of vascular smooth muscle (VSM). In the current study, we demonstrated by immunofluorescence analysis, co-immunoprecipitation assays, and subcellular fractionation by sucrose gradients, the existence of an UAPC in lipid raft domains of human umbilical artery smooth muscle cells (HUASMC). This complex is constituted by utrophin, β -DG, ϵ -SG, α -smooth muscle actin, Cav-1, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and cavin-1. It was also observed the presence of dystrophin, utrophin Dp71, β -SG, δ -SG, δ -SG3 and sarcospan in non-lipid raft fractions. Furthermore, the knockdown of α / β -DG was associated with the decrease in both the synthesis of nitric oxide (NO) and the presence of the phosphorylated (active) form of eNOS; and with a reduction in the downstream activation of some cGMP signaling transduction pathway components. Together these results show the presence of an UAPC complex in HUASMC that may participate in the activity regulation of eNOS and in the vascular function.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Muscular dystrophies (MD) are caused by genetic alterations in several components of the DAPC [1]. This complex is known as a large multimeric complex of cytoskeletal and membrane-spanning proteins composed by dystrophin, syntrophins, dystrobrevin, dystroglycans (DG) (α - and β -), sarcoglycans (SG) (α -/ ϵ -, β -, δ - and γ -/ ζ -), and sarcospan (SSPN) [2–5]. The DAPC serves as a molecular scaffold in maintaining membrane stability, mechanotransduction signals during contraction and relaxation process, and Ca^{2+} homeostasis [6–9]. Mutation in the dystrophin gene causes Duchenne/Becker type muscular dystrophy (DMD/BMD), whereas defects in α -, β -, γ - and δ - SG cause limb girdle muscular dystrophy (LGMD 2D-F, respectively) [10–12].

Utrophin, the autosomal homologue of dystrophin, is an ubiquitous protein found in striated and smooth muscle [13,14] as well as in non-muscular tissues like brain, kidney and endothelial cells [15–17]. By interacting with some DAPC members, utrophin can replace its homologue dystrophin to form a UAPC [18]. In the dystrophin-deficient mdx mouse, a model of DMD, utrophin overexpression corrects the dystrophic phenotype, so that it has been proposed that utrophin may rescue the muscular functionality in DMD patients [19,20].

Several evidences have shown that patients with DMD/BMD and LGMD 2C-F are accompanied by dilated cardiomyopathy (DCM) [21–28]; which has been also observed in null mice models for β -, δ - and γ - SG [29–31]. Besides, the presence of coronary artery constrictions in these models has led to propose that these irregularities are one of the causes to develop DCM [29]. All these results show the importance that proteins of the DAPC/UAPC may have in the function of VSM.

VSM tissue contains a specific profile of DAPC proteins which consists of dystrophin, α - and β -DG, ϵ -, β -, δ - and γ - or ζ -SG and SSPN [32–34]. Although several reports describe the expression of utrophin in this tissue, there has been little focus on its presence as a component

* Corresponding author at: Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, Mexico. Tel.: +52 55 57296300x62820; fax: +52 55 57296300x16820.

E-mail addresses: rmcoralv@gmail.com, rcoral@ipn.mx (R.M. Coral-Vázquez).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Caveolae and non-caveolae lipid raft microdomains of human umbilical vein endothelial cells contain utrophin-associated protein complexes

Israel Ramírez-Sánchez^a, Patricia Mendoza-Lorenzo^b, Alejandro Zentella-Dehesa^c, Enrique Méndez-Bolaina^d, Eleazar Lara-Padilla^a, Guillermo Ceballos-Reyes^a, Patricia Canto^e, Carlos Palma-Flores^e, Ramón Mauricio Coral-Vázquez^{a,f,*}

^aSección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., Mexico

^bDepartamento de Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, México, D.F., Mexico

^cDepartamento de Genética, Instituto de Fisiología Celular UNAM and Departamento de Bioquímica Instituto Nacional de Nutrición S. Zubiran, México, D.F., Mexico

^dFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Orizaba Veracruz, México and Centro de Investigaciones Biomédicas-Doctorado en Ciencias Biomédicas-Universidad Veracruzana, Xalapa, Mexico

^eDivisión de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., Mexico

^fSubdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2012

Accepted 1 May 2012

Available online 16 May 2012

Keywords:

UAPC

HUVEC

eNOS

Lipid rafts

Mechanical strain

ABSTRACT

Several studies have shown the importance of dystrophin-associated protein complex in the development of muscular dystrophies and dilated cardiomyopathy associated to vascular dysfunction. In vascular endothelium, dystrophin is substituted for utrophin (autosomal homolog of dystrophin); however, its role in this tissue is unknown. Therefore, it is important to obtain a more extensive knowledge of utrophin and its associated proteins in endothelial cells. In a previous study, we demonstrated the presence of utrophin-associated protein complex (UAPC) in human umbilical vein endothelial cells HUVEC, which interacts with caveolin-1 (Cav-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Also, some of our observations suggested the presence of this complex in distinct membrane domains. Therefore, the aim of this study was to analyze the presence of the UAPC in caveolae and non-caveolae lipid raft domains of HUVEC at baseline and with a mechanical stimulus. It was demonstrated, by subcellular fractionation and co-immunoprecipitation assays, the association of UAPC with Cav-1 and eNOS in caveolae domains, as well as its interaction with eNOS in non-caveolae lipid raft domains. Additionally, it was also observed that mechanical stress on endothelial cells induced activation and release of eNOS from both caveolae and non-caveolae lipid raft associated to UAPC. Together these results suggest that UAPC located in caveolae and non-caveolae lipid raft domains of HUVECs may have a mechanosensory function that could participate in the control of eNOS activity.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

A large group of muscular dystrophies (MD) is characterized by the presence of cardiac abnormalities. Dilated cardiomyopathy (DCM) is a remarkable feature of MD [1]. Several pieces of evidence show that hereditary and acquired forms of cardiomyopathy may be caused by alterations within the dystrophin-associated protein complex (DAPC); like mutations in the dystrophin gene causing

X-linked DCM [2–6]. Furthermore, patients with limb/girdle MD caused by mutations in β -, γ -, or δ -sarcoglycans (SG) frequently develop DCM [7–9], which has also been observed in β -, γ - and δ -SG null mice models [10–12]. Likewise, in these animal models it has been observed coronary microvasculature constrictions, which may compromise coronary blood flow and endothelial cell function [10–12]; however, the molecular and cellular mechanisms that lead to DCM are not entirely understood.

The utrophin protein is a natural candidate for dystrophin replacement protein in Duchenne MD, and its expression in vascular endothelial cells has been reported by our group and others; but, its role in this tissue is unknown. For this reason, the study of utrophin and associated proteins in vascular endothelium has gained attention.

* Corresponding author. Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, 11340 México, Mexico. Tel./fax: +(5255) 57296300x62820.
E-mail address: rmcoralv@prodigy.net.mx (R.M. Coral-Vázquez).