



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**“CLONACIÓN DE LAS ISOFORMAS 1 Y 3 DEL GEN  
DELTA-SARCOGLICANO (SGCD) EN EL VECTOR DE  
EXPRESIÓN pcDNA3-MYC”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE.

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**ALMA ANGÉLICA CHIMAL ESPINOSA**

**ASESORES: Dra. ROSA MARÍA ORDOÑEZ RAZO  
Dr. RAMON MAURICIO CORAL VAZQUEZ**

LOS REYES IZTACALA, EDO DE MÉX.

2008



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.

## AGRADECIMIENTOS:

### DIOS

Por guiarme, bendecir mi camino y darme la oportunidad de vivir cada día.

### LOLA Y HECTOR

Mí trabajo, así como los aprendizajes de mi vida han sido gracias a ustedes, porque han sido y son un ejemplo de amor, tolerancia y comprensión, gracias por ir creciendo conmigo todos los días, por darme la oportunidad de vivir, por el incondicional apoyo, por creer en mí, porque siempre han estado en cada momento importante de mi vida, por ser una guía, por toda la comprensión y tolerancia por que gracias a ustedes existo, nuevamente gracias papá y mamá.

### RAQUEL, ADY E IVÁN

Hermanas gracias por ser ese hombro, esos oídos, esas palabras de aliento cuando son necesarias, por todas esas risas, lágrimas y momentos compartidos, las quiero mucho. Y a ti hermano por los momentos vividos.

### PAULINA

Hija gracias porque eres el ejemplo de vida más valiosos y hermoso que conozco y tengo, porque eres la escuela en la que he aprendido las mejores y más importantes lecciones de vida, porque me has enseñado que el amor es incondicional, que las cosas se dicen como se sienten, que las lágrimas también se expresan de felicidad, que primero hay que gatear para después correr, que tomadas de la mano y a pasos lentos andamos la vereda que encamino se ha de convertir, porque existes, porque eres mi inspiración, por ser, por existir y por todo lo bueno que has sembrado en mí jardín, te amo preciosa.

### Dra ROSA y Dr CORAL

Por su tolerancia, apoyo, asesoría, comprensión y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo.

**“Clonación de las isoformas 1 y 3 del gen delta-sarcoglicano (*SGCD*) en el vector de expresión pcDNA3-MYC”**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social. Bajo la tutoría de la Dra. Rosa María Ordoñez Razo.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

## Abreviaturas

## Resumen

<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1 Generalidades del músculo esquelético .....	1
1.2 Descripción estructural del DAPC .....	4
a) Distrofina .....	5
b) Distrobrevinas y sintrofinas .....	6
c) Distroglicanos .....	9
d) Sarcoglicanos y sarcospan .....	9
e) Delta sarcoglicano y la regulación de calcio .....	16
<b>2. Justificación</b> .....	20
<b>3. Objetivo general</b> .....	22
3.1 Objetivo particular .....	22
<b>4. Material y métodos</b> .....	23
4.1 Extracción de RNA total .....	23
4.2 cDNA .....	24
4.3 Amplificación de las isoformas $\delta 1$ y $\delta 3$ .....	24
4.4 Reacción de ligación y transformación .....	26
4.5 Obtención de DNA plasmídico (miniprep) .....	27
4.6 Desnaturalización y caracterización por restricción .....	28
4.7 Secuenciación .....	29
<b>5. Resultados</b> .....	30
5.1 Extracción de RNA total .....	30
5.2 Amplificación de los transcritos de cada una de las isoformas a partir de cDNA .....	31
5.3 Purificación y digestión de los amplificados de las isoformas y del vector pcDNA3-MyC .....	32
5.4 Clonación de los transcritos de las isoformas $\delta$ -SG1 y $\delta$ -SG3 en el vector pcDNA3-MyC .....	34
5.5 Secuenciación de los vectores pcDNA3-MyC $\delta 1$ y pcDNA3-MyC $\delta 3$ .....	37
<b>6. Discusión</b> .....	41
<b>7. Conclusiones</b> .....	43
<b>8. Literatura citada</b> .....	44
<b>9. Anexo</b> .....	51

## **ABREVIATURAS**

- (CM) Cardiomiopatía
- (CMD) Cardiomiopatía Dilatada
- (CMH) Cardiomiopatía Hipertrófica
- (CT) Cisterna Terminal
- (DAPC) Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina
- (DEPC) Dietilpirocarbonato
- (DG) Distroglicanos
- (DHPR) Receptor de Dihidropiridina
- (DMB) Distrofia Muscular de Becker
- (DMD) Distrofia Muscular de Deuchenne
- (DRP) Proteína Relacionada a Distrofina
- (LB) Luria Broth
- (LGMD) Limb Girdle Muscular Dystrophy
- (RS) Retículo Sarcoplásmico
- (RyR1) Receptores de Rianodina
- (SG) Sarcoglicanos
- (SGCD) Gen Delta Sarcoglicano
- (SSPN) Sarcospan
- (TT) Túbulos Transversos
- (ULC) Unidad Liberadora de Calcio

## 1. INTRODUCCIÓN.

### *Generalidades del músculo esquelético.*

Los músculos se pueden clasificar morfológicamente como: esquelético liso o estriado cardiaco. El músculo esquelético constituye el tejido más abundante del organismo y representa del 40 al 45% del peso corporal total, es también el elemento principal de la pared de los órganos huecos (Koenig, 1996).

El músculo esquelético realiza su trabajo gracias a tres características funcionales: excitabilidad o irritabilidad, contractilidad y distensibilidad. La característica de excitabilidad del músculo esquelético le permite dejarse estimular por un impulso nervioso, lo que lo llevará a la contractilidad donde se recibe la información a lo largo de todas las fibras musculares acortándolas para lograr la función. El músculo debe recobrar su forma para evitar una alteración en él mismo por su contracción sostenida y es en ese caso cuando alcanza la distensibilidad, donde simplemente sus fibras contraídas se relajan y esperan nuevamente ser estimuladas (Carpenter, 2001).

Los extremos de los músculos esqueléticos se insertan en estructuras óseas mediante tendones constituidos por tejido conjuntivo muy resistente.

Las proteínas del tejido conjuntivo fibroso de los tendones rodean al músculo con una disposición irregular formando una vaina denominada epimisio. El tejido conjuntivo procedente de esta cubierta externa se extiende hasta el interior del músculo y lo divide en columnas o fascículos. Así cada uno de estos fascículos está rodeado por su propia vaina o cubierta de tejido conjuntivo que se denomina perimisio. La disección de un fascículo muscular bajo el microscopio revela que, a su vez, el fascículo está constituido por numerosas fibras musculares o miofibrillas, cada una de las cuales está rodeada por una membrana celular denominada sarcolema, que aparece cubierta por una fina capa de tejido conjuntivo denominada endomisio (Stuart, 2004) (Fig. 1)

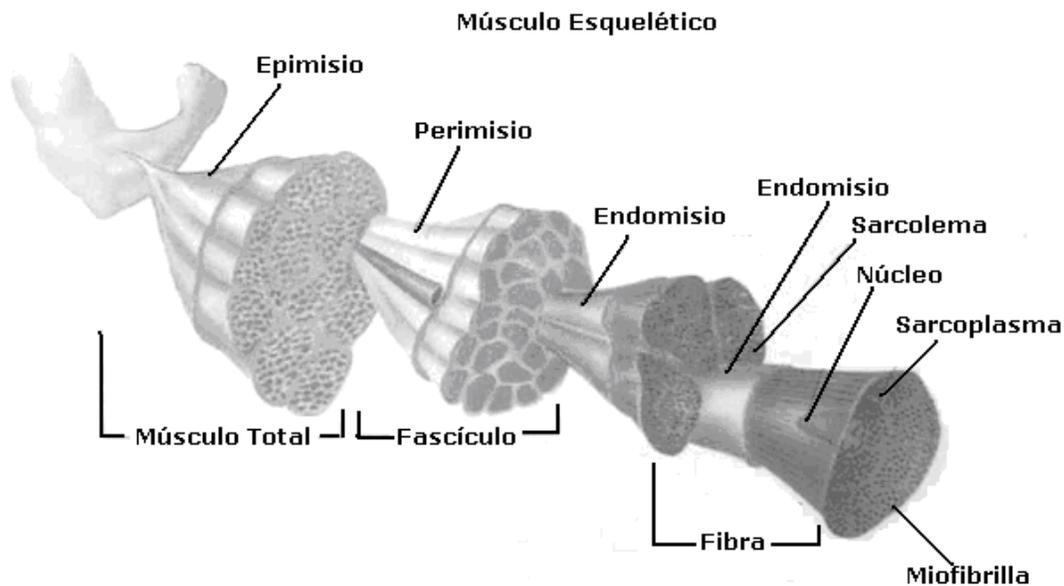


Fig. 1. Estructura del músculo esquelético

El sarcolema posee la capacidad de resistir los ataques del proceso mecánico, la cual es trascendental para el papel funcional del tejido. Ésta capacidad es conferida, tanto por el tejido elástico presente como por proteínas de disposición definida que se organizan e interaccionan entre sí (Holt y Campbell, 1998).

Se han identificado algunas de estas proteínas a raíz de las alteraciones estructurales que ocurren a nivel de la membrana en un sinnúmero de patologías musculares, tales proteínas en conjunto conforman un complejo denominado complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DAPC, por sus siglas en inglés “dystrophin associated protein complex”) (Campbell y Kahl, 1989).

La función principal de dicho complejo radica en el establecimiento de un puente transmembranal que contacta al citoesqueleto con la matriz extra-celular confiriendo estabilidad al sarcolema del estrés generado durante la contracción muscular (Hernández, 2004).

El DAPC se compone por los complejos sarcoglicano, distroglicano y las sintrofinas (Daniel, 2003).

Las alteraciones del DAPC afectan la conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto dando como resultado algún tipo de distrofia muscular. Una distrofia muscular es un término muy general que describe un grupo heterogéneo de desórdenes biogénicos heredables, caracterizados por un desgaste y debilitamiento progresivo del músculo, de gravedad y distribución variable (Durbeej y Campbell, 2002). Las mutaciones en el gen de la distrofina causan distrofia muscular de Duchenne/Becker (“Duchenne Muscular Dystrophy” DMD; “Becker Muscular Dystrophy”, BMD), y las mutaciones en los sarcoglicanos (subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) ocasionan distrofias musculares autosómicas recesivas de cintura (“Limb-girdle muscular dystrophy” LGMD), subtipos 2E-2F (Hofman et al, 1987). A la fecha no se han reportado mutaciones en  $\varepsilon$  y  $\zeta$  SG, y SSPN asociadas con distrofias musculares (Ettinger et al, 1997; Wheeler et al, 2002; Crosbie et al, 1997). Por otra parte, la presencia e integridad del complejo SG-SSPN en el tejido vascular es de gran importancia puesto que, su deficiencia o ausencia puede provocar el desarrollo de cardiomiopatías (CM) que pueden o no, estar asociadas a enfermedad muscular. En particular, se ha mencionado que las modificaciones en el gen *SGCD*, pueden ser causantes de cardiomiopatía hipertrófica (CMH) o cardiomiopatía dilatada (CMD) familiar o esporádica en la cual no se observa daño muscular (Sakamoto et al, 1997; Tsubata et al, 2000), o bien, ser un factor predisponente para el desarrollo de CMH (Honda et al, 2007).

En las distrofias musculares se produce un rompimiento de la membrana, lo que genera la pérdida de enzimas musculares (incluyendo la creatinina cinasa cuyo aumento en la concentración sérica se vincula a un proceso necrótico del tejido muscular) y la entrada de calcio causando un debilitamiento y subsecuente degeneración muscular por el efecto de proteasas (Emery, 2002; Porter, 2000).

La cantidad liberada de calcio del retículo sarcoplásmico durante cada contracción se encuentra reducida, ocurren eventos de liberación de calcio, y la recaptura se ve disminuida (Lunde et al, 2001). Esto sugiere que las alteraciones en la permeabilidad

del sarcolema al calcio pueden causar activación en vías de señalización dependientes de calcio provocando daño celular (Wang et al, 2005).

### *Descripción estructural del DAPC.*

El complejo DAPC, está conformado por un grupo de proteínas membranales, periféricas e integrales, que proporcionan un vínculo estructural entre la matriz extracelular y el citoesqueleto de las células musculares (Ervasti y Campbell, 1993; Lapidis et al, 2003).

La interrupción de esta unión, causada por mutaciones en dichas proteínas causa inestabilidad sarcolemal, lo que hace susceptible de necrosis a las fibras musculares, siendo este el principal evento en las distrofias musculares (Crosbie et al, 2000).

El complejo se encuentra localizado en el sarcolema y las proteínas que lo conforman se organizan estructuralmente en tres subcomplejos distintos según sus características bioquímicas (Ronald et al, 2000; Chan et al, 1998): (a) Complejo de proteínas citoplasmáticas dentro de las cuales se encuentran la distrofina y otras proteínas citoesqueléticas asociadas; distrofina/utrofina/DRP2, distrobrevinas (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) y sintrofinas (subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ); en neuronas se han identificado las subunidades  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ . (b) el segundo subcomplejo, es el denominado distroglicano (DG), formado por los distroglicanos (DGs; subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) y (c) el tercer subcomplejo consiste de un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG)  $\alpha$  ó  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$  y la proteína sarcospan (SG-SSPN) (Ronald et al, 2000; Koutarou et al, 2005).

De las proteínas presentes en el citoplasma asociadas al complejo DAPC, las distrofinas son las proteínas más ampliamente estudiadas. La familia de las distrofinas es una familia multigénica integrada por: la distrofina (427 kDa); la utrofina (un homólogo de la distrofina de 395 kDa); la proteína 2 relacionada a la distrofina (DRP 2, 120 kDa), la cual es homóloga a la región C-terminal de la distrofina y de las distrobrevinas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Rando, 2001).

La distrofina se expresa predominantemente en músculo esquelético y cardíaco, aunque también se encuentra presente en otro tipo de tejidos como el cerebro (Tokarz et al, 1998).

La proteína de la distrofina fue la primera en ser estudiada y se demostró que mutaciones en el gen que codifica para esta proteína (el gen más grande del genoma) provoca distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Davies et al, 2006), siendo ésta una de las enfermedades hereditarias de la niñez más prevalentes en el mundo (Wehling et al, 2001); además es heredada de manera recesiva ligada al cromosoma X (Yoshida et al, 2000), y dependiendo de la mutación puede también provocar distrofia muscular de Becker, presentando un fenotipo menos grave (Davies et al, 2006).

### a) Distrofina

La distrofina es una proteína de 427 kDa, la cual está ausente o reducida en la distrofia muscular Duchenne/Becker, formada por cuatro dominios: el dominio amino terminal, también llamado de unión a actina; el dominio central o rod domain; el dominio rico en cisteínas y el dominio carboxi-terminal o de unión a sintrofina (Crosbie et al, 1998; Chan Yiu-mo et al, 1998) (Fig. 2).

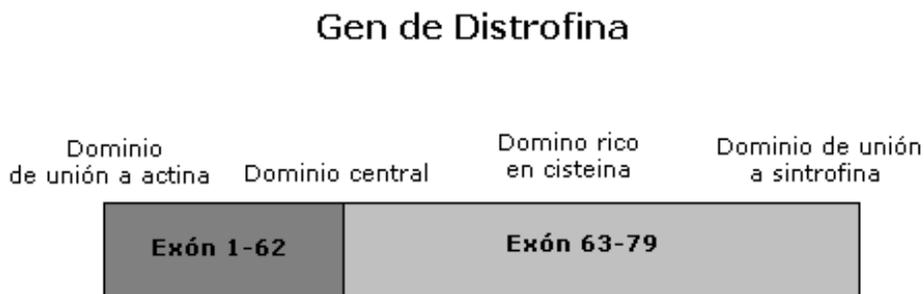


Fig 2. Dominios de unión presentes en el gen de distrofina, modificado de (Crosbie, 1998)

La distrofina se encuentra localizada adyacente a la cara citoplasmática de la membrana sarcolemal y particularmente dentro de la red del citoesqueleto interaccionando con una serie de proteínas que en conjunto se denominan costámeras (Ervasti, 2006). Las costámeras transmiten la fuerza lateralmente a través de la membrana sarcolemal a la lámina basal (Rybakova et al, 2000).

Se sugiere que la distrofina es una proteína elástica y flexible, es por eso que protege a las células musculares del estrés causado por la fuerza creada durante la contracción muscular (Davies et al, 2006).

En músculo esquelético, la distrofina se encuentra asociada con un gran complejo oligomérico de proteínas que incluye los distroglicanos ( $\alpha$  y  $\beta$ ), sarcoglicanos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), distrobrevinas, sintrofinas ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ ) y sarcospan (Rybakova et al, 2000; Michihiro et al, 2005).

La distrofina es una proteína del citoesqueleto que media la asociación de microfilamentos del citoplasma con el distroglicano, además proporciona la unión de la actina, que funciona como base en el citoesqueleto y la laminina en la matriz extracelular, causado por mutaciones en distrofina o los sarcoglicanos, propicia inestabilidad del sarcolema, lo que a su vez predispone a la fibra muscular a sufrir necrosis, principal evento en la distrofia muscular (Ronald et al, 2000) (Fig. 3).

#### *b) Distrobrevinas y sintrofinas.*

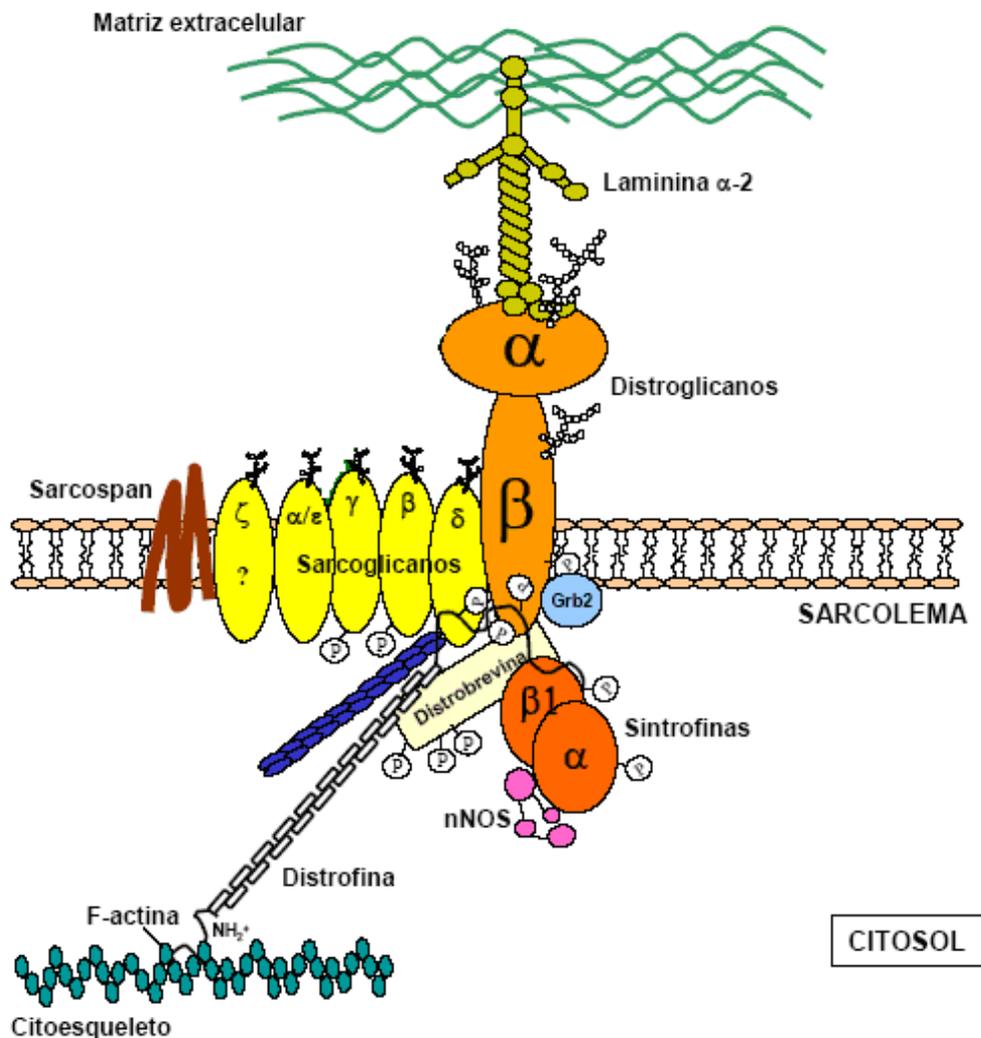
Otras proteínas del citoesqueleto asociadas al complejo DAPC son las distrobrevinas y las sintrofinas, ambas se unen directamente a secuencias dentro del dominio carboxi-terminal de la distrofina (Ervasti, 2006).

Las distrobrevinas son proteínas sarcoplásmicas, asociadas a distrofina con un peso molecular de 88 kDa. Sin embargo las distrobrevinas se consideran de manera separada ya que, contienen sitios de unión, por lo que pueden asociarse de manera alterna con distintas proteínas relacionadas a distrofina (Peters et al, 1997).

Por su parte, existen tres isoformas de sintrofinas;  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , las cuales son producto de diferentes genes;  $\alpha 1$  sintrofina, esta se expresa principalmente en músculo estriado y cerebro, mientras que  $\beta 1$  y  $\beta 2$  sintrofinas, se encuentran de manera ubicua en tejido de mamíferos (Oak et al, 2001).

Las sintrofinas se unen a la segunda mitad de la región C-terminal de la distrofina, específicamente la  $\alpha 1$ -sintrofina interacciona con los aminoácidos en las posiciones 3444-3494 (exón 73) (Suzuki et al, 1995) y la  $\beta$ -sintrofina se une a los 53 aminoácidos correspondientes al exón 74 (Ahn y Kunkel, 1995).

Se piensa que las sintrofinas tienen funciones de modulador (adaptador) al unirse a proteínas celulares del DAPC, al anclarse a los canales de iones y moléculas de señalización del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (Oak et al, 2001).



Modificado de Cohn y Campbell, 2000.

Fig 3. Representación esquemática del modelo actualmente aceptado del DAPC en el músculo esquelético. La conexión física entre el citoesqueleto y la matriz extracelular mediante el complejo DAPC inicia con la unión del dominio  $\text{NH}_2^+$  de la distrofina con la F-actina, un componente del citoesqueleto de los miocitos. Además el dominio  $\text{COO}^-$  de la distrofina se une a  $\beta$  distroglicano a través de una región rica en cisteínas y al complejo citosólico de sintrofinas. A su vez el  $\beta$  distroglicano se une a  $\alpha$  distroglicano y al subcomplejo intramembranal denominado sarcoglicano sarcospan (SG-SSPN).

### *c) Distroglicanos*

Los distroglicanos (DGs) conforman un subcomplejo de proteínas sintetizadas a partir de un solo gen, el transcrito de este gen codifica para un solo polipéptido de 97 kDa que es dividido postraduccionalmente en  $\alpha$  y  $\beta$ -DGs (Ibraghimov et al, 1993; Holt et al, 2000). En el músculo esquelético, las formas maduras glicosiladas de  $\alpha$  y  $\beta$ -DG (156 kDa y 43 kDa, respectivamente) forman un complejo ubicado en la membrana celular que se asocia fuertemente con la distrofina (Ibraghimov et al, 1992). El  $\beta$ -DG atraviesa la membrana mediante un solo dominio transmembranal y el  $\alpha$ -DG se une a la porción extracelular del  $\beta$ -DG (Henry y Campbell, 1999).

Además, se ha observado que en el músculo esquelético la región C-terminal del  $\beta$ -DG se une intracelularmente a la región rica en cisteínas de la distrofina o utrofina (Jung et al, 1995). Los distroglicanos se expresan en varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales (Durbeej et al, 1995), neuronas (Tian et al, 1996) y células de Schwann (Yamada et al, 1994; Rando, 2001).

Los distroglicanos son el componente central del DAPC, una de sus funciones es contribuir como un receptor de ligando y una proteína de adhesión que ayuda a estabilizar el sarcolema en relación a la matriz extracelular (Daniel et al, 2003).

### *d) Sarcoglicanos y sarcospan.*

El Sarcospan es una proteína de 25 kDa, componente del complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (Koutarou et al, 2005), con múltiples hélices que atraviesan el sarcolema, tiene cuatro dominios transmembranales y pertenece a la superfamilia de las tetraspaninas (Crosbie et al, 2000). Estas características de sarcospan la hacen única entre los otros miembros del DAPC (Koutarou et al, 2005). Se cree que sarcospan juega un papel importante en las interacciones mediante proteínas transmembranales.

En músculo esquelético de humano hay dos transcritos (RNAm) para sarcospan, mientras que en músculo esquelético de ratón sólo hay uno, lo cual sugiere diferencias en el procesamiento del RNA (splicing) o en la regulación de especies (Crosbie et al, 2000).

La pérdida de la expresión de sarcospan sugiere que esta proteína es un componente integral del complejo sarcoglicano (Franck et al, 2006). Interesantemente un ratón deficiente en sarcospan mantiene la expresión de todas las proteínas sarcoglicanos en el sarcolema y no desarrolla distrofia muscular (Ronald et al, 2000).

Los sarcoglicanos (SG) son un grupo de glicoproteínas transmembranales que junto con la proteína sarcospan (SSPN) forman un complejo multimérico específico en la membrana muscular (sarcolema) (Shi et al, 2004). Hasta la fecha han sido reportados seis sarcoglicanos, los cuales se conocen como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\varepsilon$  y  $\zeta$ .

Los SGs  $\beta$  y  $\delta$  se expresan en tejidos musculares y no musculares, mientras que  $\alpha$  y  $\gamma$  SG se han detectado únicamente en tejido muscular estriado, aunque recientemente se ha reportado la expresión de la proteína  $\gamma$ -SG en músculo liso. A sí mismo se ha detectado la expresión del mensajero de  $\alpha$ -SG en endotelio vascular de cordón umbilical, aunque no se ha confirmado la expresión de la proteína (Delgado, 2005).  $\varepsilon$ -SG se encuentra expresado en menor proporción en músculo esquelético, está expresado en una variedad de tejidos incluyendo músculo estriado, músculo liso, pulmón, hígado, riñón, bazo, testículo, cerebro, etc. (Michihiro et al, 2005). Al igual que  $\varepsilon$ -SG,  $\zeta$ -SG se expresa en el músculo esquelético, cardíaco, liso y en otros tejidos no musculares (Rando, 2001).

La deficiencia en la expresión de cualquiera de los genes que codifican para los SGs causan distrofia muscular de cintura (LGMD, por sus siglas en inglés) tipo 2D (deficiencia de  $\alpha$ -SG), 2E (deficiencia de  $\beta$ -SG), 2C (deficiencia de  $\gamma$ -SG) y 2F (deficiencia de  $\delta$ -SG), también llamadas en su conjunto sarcoglicanopatías (Delgado et al, 2004). Estas distrofias musculares son heredadas de forma autosómica recesiva (Yoshida et al, 2000).

En el caso particular de mutaciones en los SG- $\beta$ , SG- $\gamma$  y SG- $\delta$ , se ha reportado que también causan cardiomiopatía dilatada (Sakamoto, 1997; Coral et al, 1999). Mientras que las mutaciones en  $\epsilon$ -SG se vinculan a la patología neurológica conocida como distonía mioclónica (Nishiyama et al, 2004).

Todos los SG's tienen una topología similar en la membrana celular; cuentan con un dominio extracelular largo y un dominio citoplasmático corto, separados por un solo dominio transmembranal.

La estructura primaria de  $\alpha$  y  $\epsilon$ -SG indican que son proteínas transmembranales de tipo I, es decir, con la región carboxilo intracelular, y la región amino extracelular, la cual cuenta con sitios de glicosilación (Hack et al, 2000).

Las secuencias de aminoácidos de  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ -SG indica que son proteínas transmembranales de tipo II, es decir, con la región amino intracelular y la región carboxilo extracelular. Adicionalmente, presentan tres sitios de glicosilación en la región amino terminal (Liu y Engvall, 1999). Los sitios consenso de glicosilación para cada SG parecen afectar su estructura secundaria y terciaria, su oligomerización y transporte hacia la membrana (Campbell, 1995). Estas proteínas cuentan además con sitios potenciales de fosforilación en su dominio citoplasmático, por lo cual se cree que participan en procesos de transducción de señales (Shi et al, 2004). Los  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -SG tienen un grupo de residuos de cisteína localizados en la región carboxilo terminal, lo cual corresponde a una estructura frecuentemente encontrada en moléculas receptoras, como el factor de crecimiento epidermal (Matsamura et al, 1999).

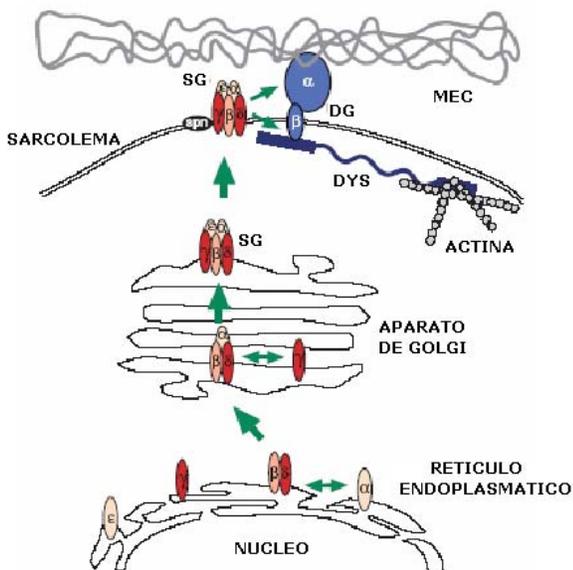
El análisis de la secuencia de  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , revela que poseen residuos de cisteína muy conservados en sus dominios extracelulares, los cuales le confieren el potencial para formar puentes disulfuro (Chan et al, 1998).

Por su parte  $\alpha$  y  $\gamma$ -SG presentan fosforilación *in vitro* en residuos de tirosina, lo cual se asocia con adhesión de células musculares (Thompson et al, 2000) y también con regulación de rutas de señalización celular que involucran interacciones de dominios SH2 (Chardin et al, 1995).

Las subunidades de los sarcoglicanos están asociadas en pequeños complejos en vesículas que son llevadas a la membrana donde finalmente son ensambladas. Esto implica que la síntesis simultánea de todas las subunidades es un prerrequisito para la formación del complejo SG y para su estabilidad en la membrana (Wakabayashi et al, 2001).

El complejo sarcoglicano se expresa durante la diferenciación muscular; además este complejo parece reforzar la interacción de  $\beta$ -dístroglicano con  $\alpha$ -dístroglicano y distrofina (Ervasti, 2006).

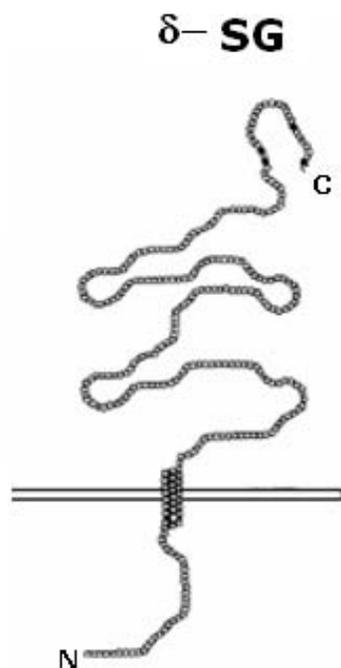
La deficiencia primaria de algún SG ocasiona la disminución o pérdida secundaria del resto de los componentes del complejo en la membrana como se ha demostrado mediante ensayos de inmunohistoquímica en pacientes con distrofia muscular (Kenji et al, 1999), así como en ratones genéticamente modificados, deficientes en la expresión de alguno de los SG (Delgado, 2005). Esto podría deberse a que la formación del complejo sigue una ruta de ensamblaje específica en la que  $\delta$ -SG sería esencial para dar la estabilidad inicial del complejo sarcoglicano en el retículo endoplásmico (Hack et al, 2000) (Fig. 4)



Hack A, et al 2000. J. Cell Sci 113:2535-2544

Fig 4. Ruta de ensamblaje del complejo sarcoglicano

El  $\delta$ -SG es una glicoproteína transmembranal de 35 kDa que posee un pequeño dominio intracelular, un solo dominio hidrofóbico transmembranal y un largo dominio carboxilo terminal extracelular que contiene cuatro residuos de cisteína que son una característica común de todos los miembros de los sarcoglicanos. Estos residuos se cree que participan en la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. Además posee sitios de glicosilación en asparaginas que se encuentran en el extremo C-terminal en la región extracelular (Jung et al, 1996) (Fig. 5).



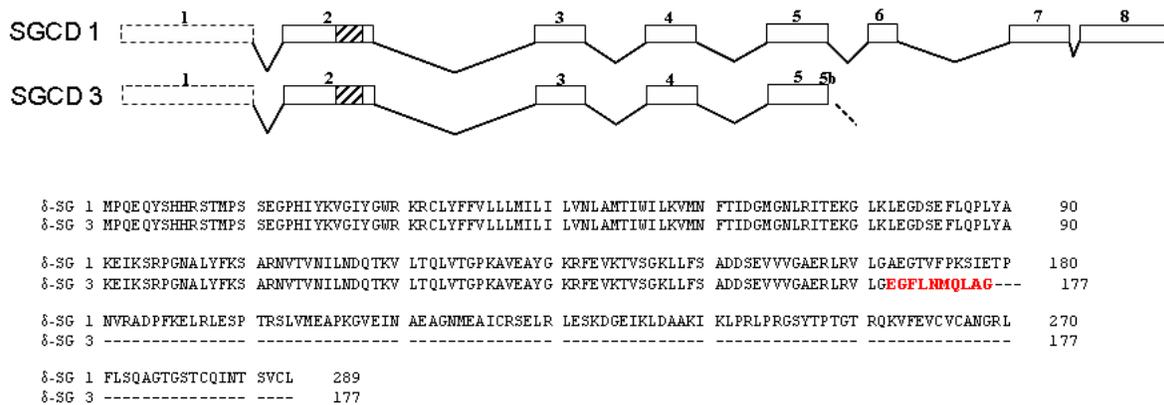
Hack A, 2000. *Microsc Res & Tech.* 48: 167-180

Fig. 5 Representación esquemática de la proteína de  $\delta$ -SG; se muestra el pequeño dominio amino (N) intracelular y su largo dominio carboxilo (C) terminal extracelular.



En nuestro grupo de investigación ha sido descrita una nueva isoforma de  $\delta$ -SG en ratón, la cual se denominó  $\delta$ -SG3 (Estrada et al, 2006). De acuerdo a la región codificante del transcrito de esta isoforma, el  $\delta$ -SG3 corresponde a una proteína de 177 aa codificada por los primeros 5 exones del gen *SGCD* y en su extremo carboxilo incorpora 10 aa nuevos y un codón de paro codificados por el principio del intrón 5.

Aún no ha sido determinado el tamaño del transcrito de  $\delta$ -SG3, sin embargo se sabe que posee una región UTR 3' que por lo menos contiene 181 nucleótidos (Fig.7).

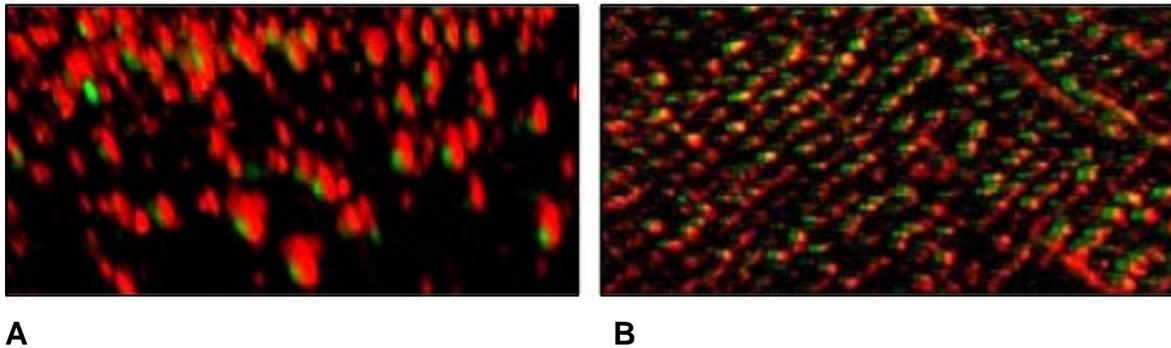


Estrada FJ, 2006. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(3):865-71.

Fig 7. Comparación de  $\delta$ -SG1 con  $\delta$ -SG3. En rojo se muestra la adición de los 10 nuevos aa en el extremo carboxilo en  $\delta$ -SG3

La isoforma  $\delta$ -SG3 se podría producir por un procesamiento alternativo en el cual la remoción de los aminoácidos en el extremo C-terminal produce la eliminación de un sitio de N-glicosilación y los cuatro residuos de cisteína. Estos cambios podrían modificar sus propiedades de plegamiento y sus capacidades para interactuar con otros miembros del complejo SG-SSPN. Los resultados obtenidos de dobles inmunofluorescencias en músculo esquelético mostraron que  $\delta$ -SG3 se localiza muy

cerca tanto del receptor de dihidropiridina (DHPR) como de la isoforma  $\delta$ -SG1 lo cual sugiere fuertemente su localización en el retículo sarcoplásmico (RS) (Fig. 8).



Estrada FJ, 2006. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(3):865-71.

Fig 8. Análisis doble inmunofluorescencia. En “A” se muestra una imagen en 3D de una sección longitudinal que indica la cercanía que hay entre las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG 3. Mientras que en “B” se ve una imagen que muestra a  $\delta$ -SG3, quien siempre esta acompañado de DHPR.

Recientemente se determinó que la expresión de  $\delta$ -SG no se restringe únicamente al sarcolema. Los sarcoglicanos  $\delta$  y  $\gamma$  se localizan en el retículo sarcoplásmico (RS) de músculo esquelético. En particular,  $\delta$ -SG fue localizado en la cisterna terminal de RS de manera independiente de distrofina. A partir de esta información se ha sugerido que  $\delta$ -SG podría participar en la regulación de calcio (Ueda et al, 2001).

#### e) Delta Sarcoglicano y la regulación de calcio.

La contracción muscular se inicia por una despolarización de las membranas de los túbulos transversos (TT), donde los DHPR actúan como sensores de voltaje, causando a su vez la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de calcio de las cisternas terminales (CT) del RS, denominados Receptores de Rianodina (RyR1). Los

receptores de rianodina (RyRs), son canales de calcio localizados en el retículo sarcoplásmico que permiten la liberación de calcio al citoplasma y son abiertos vía interacción física directa con los receptores de dihidropiridina (DHPRs receptores dependientes de voltaje), localizados en los túbulos enfrente de las cisternas terminales del RS. Este mecanismo favorece la respuesta sincronizada de todos los elementos liberadores de calcio (Ueda et al, 2001) (Fig. 9).

Con base en lo anterior, se ha propuesto que la alteración en la concentración de calcio citoplasmático crónico induce la formación de poros transitorios en la mitocondria, que unen a la matriz mitocondrial con el citoplasma permitiendo el paso de partículas. La formación de estos poros de transición también se ve favorecida por la formación de radicales libres, ocasionando así, mayor daño a la célula, activación de proteasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , alteraciones en el citoesqueleto, apagado y encendido de genes y en casos extremos necrosis y apoptosis, siendo esto responsable de la degeneración muscular en la distrofia muscular.

Se ha mencionado que  $\delta$ -SG podría estar relacionada con la correcta localización y mantenimiento de las proteínas que participan en la regulación del calcio en la cisterna terminal del RS durante la contracción, probablemente a través de una interacción directa con proteínas de la unidad liberadora de calcio (ULC). Con relación a esto, se ha observado en miotubos de hamster BIO14.6, un organismo mutante natural deficiente en  $\delta$ -SG, una homeóstasis de  $Ca^{2+}$  anormal. De hecho, la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) en los miotubos BIO14.6 es mayor en comparación con los controles normales aún en estado de reposo. Se ha propuesto que la elevada  $[Ca^{2+}]_i$  podría deberse a la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana plasmática como en el caso de canales activados por estiramiento (Iwata et al, 2005).

El grupo de Ueyama (1998), reportó que el hámster BIO14.6, un modelo bien caracterizado de miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca, basado en una mutación del gen  $\delta$ -SG, mostraba una expresión anormal del receptor de rianodina en el músculo cardíaco, lo que sugiere una regulación anormal de calcio en el modelo deficiente de  $\delta$ -SG. Estas observaciones, en conjunto con el grupo de Ueda (2001), muestran la localización de  $\delta$ -SG en retículo sarcoplásmico, esto sugiere que la

proteína se encuentra asociada con la regulación del calcio, lo que constituiría un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de distrofia muscular y cardiomiopatía de este modelo. También, se ha mostrado que bloqueadores de canales de calcio disminuyen la progresión de la enfermedad cardiaca en modelos deficientes en  $\delta$ -SG (Fig. 9).

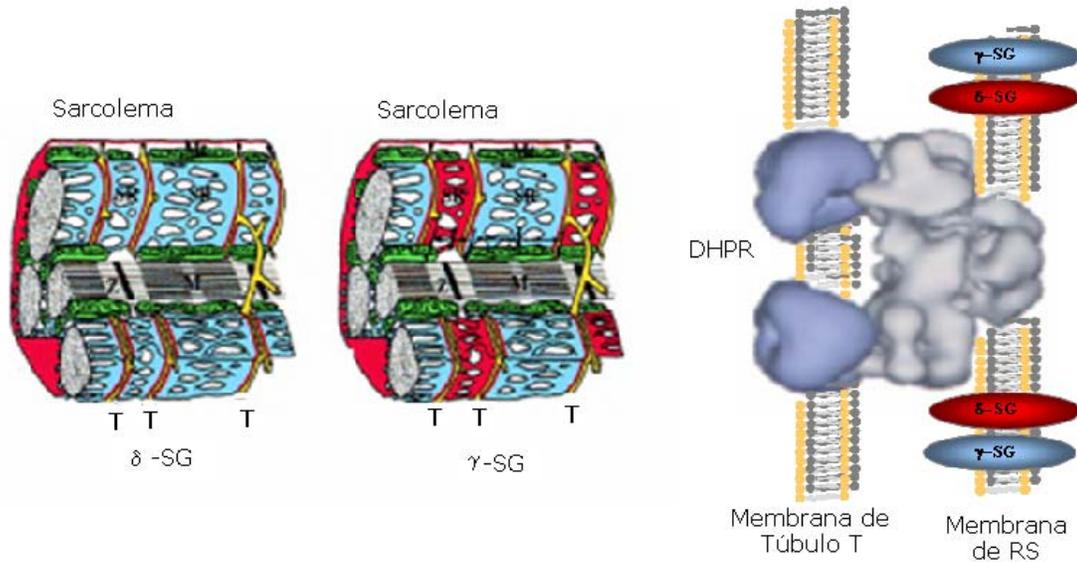


Fig 9. Localización de  $\delta$ -SG en retículo sarcoplásmico

Existen estudios donde se muestra la localización de  $\delta$ -SG en la cisterna terminal de RS, así como sobre las bandas I. Además esta expresión no se encuentra afectada por la ausencia de distrofina (Ueda et al, 2001). Aunque la función exacta de esta proteína es desconocida, los avances recientes en la genética molecular de las sarcoglicanopatías han permitido desarrollar ratones deficientes en alguna proteína para analizar la función biológica de los distintos sarcoglicanos (Durbeej et al, 2000; Duclos et al, 1998; Araishi et al 1999; Holt et al, 1998). Los hallazgos de diversos modelos murinos deficientes de sarcoglicanos parecen indicar que una característica general en la deficiencia de estos es la presencia de cambios en la permeabilidad de

la membrana plasmática (Hack et al, 2000), además de que la expresión de distrofina, distroglicano y laminina se encuentra intacta (Straub et al, 1998).

Por otro lado, la nueva isorforma ( $\delta$ -SG3) podría también estar relacionada con la correcta localización y mantenimiento de las proteínas que participan en la regulación del calcio en la cisterna terminal del RS durante la contracción debido a que se encuentra localizada cerca de  $\delta$ -SG1 y a los DHPR. Esta regulación probablemente sea a través de una interacción directa con proteínas de la unidad liberadora de calcio (ULC).

Finalmente, sí los cambios en la homeostasis del calcio intracelular son provocados por la ausencia de estas proteínas, entonces al reestablecer la expresión de ambas se podría disminuir e incluso detener el daño. Además, se podría aportar información novedosa que permita comprender mejor la fisiopatología de la distrofia muscular de cintura ocasionada por deficiencia del gen *SGCD*.

## PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA.

Las distrofias musculares son enfermedades degenerativas y discapacitantes para las que no hay tratamiento. Tanto la edad de manifestación como la distribución de afección muscular y severidad de la enfermedad son variables de acuerdo con el subtipo.

La deficiencia del gen delta-sarcoglicano (*SGCD*) provocada por mutaciones ocasiona distrofia muscular de cintura tipo 2F y generalmente se acompaña de cardiomiopatía. En estas distrofias, la función del músculo esquelético se encuentra afectada probablemente debido a una liberación de calcio aumentada y a una recaptura disminuida (Reiken et al, 2003).

Se ha mencionado que la degeneración muscular en la distrofia muscular puede ser iniciada por la despolarización de las membranas de los túbulos transversos (TT) y la liberación de  $Ca^{2+}$  al citoplasma a través de Receptores de Rianodina (RyR1) por interacción física directa con los DHPR, favoreciendo la respuesta sincronizada de todos los elementos liberadores de calcio induciendo la formación de poros transitorios en la mitocondria, lo que permite el paso de partículas, evento que a su vez se favorece por la formación de radicales libres, ocasionando así, daño a la célula, la activación de proteasas dependientes de  $Ca^{2+}$ , alteraciones en el citoesqueleto, apagado y encendido de genes y en casos extremos necrosis y apoptosis.

Los avances recientes en la genética molecular de las sarcoglicanopatías han permitido desarrollar ratones deficientes en proteínas para analizar la función biológica de los distintos sarcoglicanos (Durbeej et al, 2000; Duclos et al, 1998; Araishi et al, 1999; Holt et al, 1998). Los hallazgos de diversos modelos murinos parecen indicar que una característica general en la deficiencia de sarcoglicanos es la presencia de cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (Hack et al, 2000). Estudios en modelos animales deficientes de la proteína  $\delta$ -SG1 mostraron una expresión anormal del RyR1 en el músculo cardiaco, lo que sugiere una regulación anormal de calcio.

De hecho, la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  en los miotubos de estos animales es mayor en comparación con los controles normales aún en el estado de reposo. Aunado a lo anterior, la localización de  $\delta$ -SG1 en la cisterna terminal de el retículo sarcoplásmico así como sobre las bandas I, sugiere que esta proteína podría estar relacionada con la correcta localización y mantenimiento de las proteínas que participan en la regulación del calcio en la

cisterna terminal del RS durante la contracción, probablemente a través de una interacción directa con proteínas de la unidad liberadora de calcio (ULC), lo que constituiría un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de distrofia muscular y cardiomiopatía. Así mismo, se ha mostrado que bloqueadores de canales de calcio disminuyen la progresión de la enfermedad cardíaca en modelos deficientes en  $\delta$ -SG1.

Por otro lado, la nueva isoforma ( $\delta$ -SG3) podría de igual manera participar en el mecanismo de regulación del calcio en la cisterna terminal del RS debido a que se encuentra localizada cerca de  $\delta$ -SG1 y de los DHPR.

Considerando lo anterior, en un modelo murino deficiente de  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 se podría estudiar el efecto que causa la ausencia de ambas proteínas sobre la regulación de calcio al compararlo con ratones normales y ratones a los cuales se les inserte nuevamente mediante electroporación *in vivo* los transcritos que dan origen a cada una de estas proteínas y con ello reestablecer la función de las mismas. De tal manera que mediante este ensayo podamos analizar la participación de las mismas, en la homeostasis del calcio intracelular. Finalmente, la clonación de las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 en el vector de expresión pcDNA3-MYC, que puede ser rastreado mediante western blot, nos permitirá reestablecer la función de ambas isoformas (1 y 3) del gen delta-sarcoglicano y con ello aportar información novedosa en la comprensión de la fisiopatología de la distrofia muscular de cintura ocasionada por deficiencia del gen *SGCD*.

## ANTECEDENTES:

Los avances recientes en la genética molecular de las sarcoglicanopatías han permitido desarrollar ratones deficientes en proteínas para analizar la función biológica de los distintos sarcoglicanos (Durbeej et al, 2000; Duclos et al, 1998; Araishi et al, 1999; Holt et al, 1998).

Los hallazgos de diversos modelos murinos parecen indicar que una característica general en la deficiencia de sarcoglicanos es la presencia de cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (Hack et al, 2000). Estudios en modelos animales deficientes de la proteína  $\delta$ -SG1 mostraron una expresión anormal del RyR1 en el músculo cardiaco, lo que sugiere una regulación anormal de calcio.

El grupo de Ueyama (1998), reportó que el hámster BIO14.6, un modelo bien caracterizado de miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardiaca, basado en una mutación del gen  $\delta$ -SG, mostraba una expresión anormal del receptor de rianodina en el músculo cardiaco, lo que sugiere una regulación anormal de calcio en el modelo deficiente de  $\delta$ -SG.

El grupo de Ueda (2001), mostraron la localización de  $\delta$ -SG en retículo sarcoplásmico, esto sugiere que la proteína se encuentra asociada con la regulación del calcio, lo que constituiría un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de distrofia muscular y cardiomiopatía de este modelo. También, se ha mostrado que bloqueadores de canales de calcio disminuyen la progresión de la enfermedad cardiaca en modelos deficientes en  $\delta$ -SG.

Existen estudios donde se muestra la localización de  $\delta$ -SG en la cisterna terminal de RS, así como sobre las bandas I. Además esta expresión no se encuentra afectada por la ausencia de distrofina (Ueda et al, 2001). Aunque la función exacta de esta proteína es desconocida, los avances recientes en la genética molecular de las sarcoglicanopatías han permitido desarrollar ratones deficientes en alguna proteína para analizar la función biológica de los distintos sarcoglicanos (Durbeej et al, 2000; Duclos et al, 1998; Araishi et al 1999; Holt et al, 1998).

Los hallazgos de diversos modelos murinos deficientes de sarcoglicanos parecen indicar que una característica general en la deficiencia de estos es la presencia de cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (Hack et al, 2000), además de que la expresión de distrofina, distroglicano y laminina se encuentra intacta (Straub et al, 1998).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las distrofias musculares son enfermedades degenerativas y discapacitantes para las que no hay tratamiento. Tanto la edad de manifestación como la distribución de afección muscular y severidad de la enfermedad son variables de acuerdo con el subtipo.

La deficiencia del gen delta-sarcoglicano (*SGCD*) provocada por mutaciones ocasiona distrofia muscular de cintura tipo 2F y generalmente se acompaña de cardiomiopatía. En estas distrofias, la función del músculo esquelético se encuentra afectada probablemente debido a una liberación de calcio aumentada y a una recaptura disminuida (Reiken et al, 2003).

Se ha mencionado que la degeneración muscular en la distrofia muscular puede ser iniciada por la despolarización de las membranas de los túbulos transversos (TT) y la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma a través de Receptores de Rianodina (RyR1) por interacción física directa con los DHPR, favoreciendo la respuesta sincronizada de todos los elementos liberadores de calcio induciendo la formación de poros transitorios en la mitocondria, lo que permite el paso de partículas, evento que a su vez se favorece por la formación de radicales libres, ocasionando así, daño a la célula, la activación de proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , alteraciones en el citoesqueleto, apagado y encendido de genes y en casos extremos necrosis y apoptosis.

Los avances recientes en la genética molecular de las sarcoglicanopatías han permitido desarrollar ratones deficientes en proteínas para analizar la función biológica de los distintos sarcoglicanos (Durbeej et al, 2000; Duclos et al, 1998; Araishi et al, 1999; Holt et al, 1998). Los hallazgos de diversos modelos murinos parecen indicar que una característica general en la deficiencia de sarcoglicanos es la presencia de cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática (Hack et al, 2000). Estudios en modelos animales deficientes de la proteína  $\delta$ -SG1 mostraron una expresión anormal del RyR1 en el músculo cardiaco, lo que sugiere una regulación anormal de calcio.

De hecho, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  en los miotubos de estos animales es mayor en comparación con los controles normales aún en el estado de

reposo. Aunado a lo anterior, la localización de  $\delta$ -SG1 en la cisterna terminal de el retículo sarcoplásmico así como sobre las bandas I, sugiere que esta proteína podría estar relacionada con la correcta localización y mantenimiento de las proteínas que participan en la regulación del calcio en la cisterna terminal del RS durante la contracción, probablemente a través de una interacción directa con proteínas de la unidad liberadora de calcio (ULC), lo que constituiría un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de distrofia muscular y cardiomiopatía. Así mismo, se ha mostrado que bloqueadores de canales de calcio disminuyen la progresión de la enfermedad cardiaca en modelos deficientes en  $\delta$ -SG1.

Por otro lado, la nueva isoforma ( $\delta$ -SG3) podría de igual manera participar en el mecanismo de regulación del calcio en la cisterna terminal del RS debido a que se encuentra localizada cerca de  $\delta$ -SG1 y de los DHPR.

Considerando lo anterior, en un modelo murino deficiente de  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 se podría estudiar el efecto que causa la ausencia de ambas proteínas sobre la regulación de calcio al compararlo con ratones normales y ratones a los cuales se les inserte nuevamente mediante electroporación *in vivo* los transcritos que dan origen a cada una de estas proteínas y con ello reestablecer la función de las mismas. De tal manera que mediante este ensayo podamos analizar la participación de las mismas, en la homeostasis del calcio intracelular. Finalmente, la clonación de las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 en el vector de expresión pcDNA3-MYC, que puede ser rastreado mediante western blot, nos permitirá reestablecer la función de ambas isoformas (1 y 3) del gen delta-sarcoglicano y con ello aportar información novedosa en la comprensión de la fisiopatología de la distrofia muscular de cintura ocasionada por deficiencia del gen *SGCD*.

### **3. OBJETIVO GENERAL.**

- Clonar las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 de ratón en el vector de expresión pcDNA3-MYC.

#### **3.1 OBJETIVOS PARTICULARES.**

- Obtener el RNA de músculo esquelético de ratón.
- Generar cDNA a partir del RNA obtenido.
- Amplificar las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 del gen delta sarcoglicano
- Analizar las clonas obtenidas mediante PCR y digestión con enzimas de restricción
- Secuenciar las clonas obtenidas para cada vector para verificar el marco de lectura de los productos clonados.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1 Extracción de RNA total.

La extracción de RNA, se llevó a cabo a partir de músculo de ratón, mediante el método de extracción fenólica TRIZOL. Una vez obtenido el músculo, se colocó en un mortero previamente esterilizado y horneado, se maceró con nitrógeno líquido, y por cada 100 mg de tejido se agregó 1 ml de trizol (Reagent ® Invitrogen™ Life Technologies), posteriormente se homogenizó en politrón, se centrifugó a 2 500 rpm durante cinco minutos, transfiriendo el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml, se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó durante quince segundos. Se incubó en hielo cinco minutos, pasado este tiempo se centrifugó a 12 000 rpm quince minutos a 4°C. Después de centrifugar debido a que las fases se separan, la fase acuosa (transparente), se transfiere a otro tubo, precipitando con 1 volumen de isopropanol. Se incubó durante quince segundos a 4°C, posteriormente se centrifugó 12 000 rpm quince minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró con micropipeta y el RNA se lavó dos veces con etanol al 70%, centrifugando en cada lavado a 12 000 rpm durante cinco minutos a 4°C, hecho esto se dejó secar la pastilla misma que se resuspendió con 50 µl de agua DEPC (Dietil-Pirocarbonato); de este volumen se reservaron 5 µl para ver la integridad del RNA y para cuantificarlo, lo demás se precipitó con 1 volumen de acetato de potasio 2M y dos volúmenes de etanol absoluto, almacenándolo a -70°C.

#### NOTA:

Todo el material que se utilizó, previamente se esterilizó, así mismo, los reactivos se prepararon con agua DEPC estéril.

Es conveniente cambiar de guantes varias veces, esto, para evitar cualquier tipo de contaminación.

#### 4.2 cDNA.

A partir del RNA obtenido se preparó cDNA, para lo cual se tomó una alícuota del mismo, lo que fue equivalente a 3  $\mu\text{g}$ . Se centrifugó a 12 000 rpm durante quince minutos, se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 70% centrifugando durante diez minutos a 12 000 rpm, así se hicieron dos lavados, finalmente se resuspendió en 15  $\mu\text{l}$  de agua DEPC.

Para la obtención del cDNA se prepararon dos tubos; el tubo número 1 contendría 5  $\mu\text{l}$  del RNA (lavado), 0.5  $\mu\text{l}$  de random primers y 12  $\mu\text{l}$  de agua, este tubo se puso en el termociclador durante tres minutos a 72°C. Transcurrido el tiempo se puso en hielo y se agregó en contenido del tubo número 2 (4  $\mu\text{l}$  de buffer 5x para RT (transcriptasa reversa), 1  $\mu\text{l}$  de enzima RT, 1  $\mu\text{l}$  de dNTP's y 2  $\mu\text{l}$  de dTT's). Posteriormente se volvió a colocar en el termociclador 1 ciclo a 37°C por sesenta minutos, un ciclo a 94°C por seis minutos y finalmente 4°C  $\infty$ .

#### 4.3 Amplificación de las isoformas $\delta$ -1 y $\delta$ -3.

Debido a que se empleó el vector pcDNA3-MYC se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para este; con el fin de amplificar los insertos. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 1.

PRIMERS PARA AMPLIFICAR $\delta$ -SG1 Y $\delta$ -SG3			
VECTO	INSER	PRIM	SECUENCIA
pcDNA	$\delta$ -SG1	FWD	GCG CCT CGA GAT GCC TCA GGA ACA
		REV	CGC CTC TAG ATC AAA AGA CAC TTG
	$\delta$ -SG3	FWD	GCC TCG AGA TGC CTC AGA ACA GTA
		REV	GCG CTC TAG ATC AAA GGC AGA

Tabla 1. Primers diseñados para amplificar los insertos  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3

Las condiciones de amplificación, fueron las siguientes (Tabla 2).

AMPLIFICACION DE $\delta$ -SG1 Y $\delta$ -SG3			
	1 Rx	GAPDH	C-
Buffer 10X	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
dNTP'S 10 mM	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
MgCl2 mM	1.0 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
Primer F	1.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
Primer R	1.0 $\mu$ l	0.5 $\mu$ l	1.0 $\mu$ l
Taq	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.2 $\mu$ l
cDNA	2.0 $\mu$ l	2.0 $\mu$ l	----
H <sub>2</sub> O cbp	25.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l	25.0 $\mu$ l

Tabla 2. Reacción de PCR para la amplificación de los insertos  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3.

El tamaño de los productos que se esperaba eran de 869 pb para la isoforma  $\delta$ 1 y 534 pb para la isoforma  $\delta$ 3. Después de tener los fragmentos amplificados se hizo restricción tanto de insertos como de vector como se indica en la tabla 3.

VECTOR	INSERTO	ENZIMAS	SITIOS DE RESTRICCION
pcDNA3	$\delta$ -SG1	<i>Xho</i> I / <i>Xba</i> I	<i>Xho</i> I: 5'... C <sup>∇</sup> TCGAG ...3' 3'... GAGCT <sub>A</sub> C ...5'
	$\delta$ -SG3		<i>Xba</i> I: 5'... T <sup>∇</sup> CTAGA ...3' 3'... AGATC <sub>A</sub> T...5'

Tabla 3. Enzimas empleadas para la restricción del vector pcDNA=5 400 pb y así como para los respectivos insertos  $\delta$ -1=869 pb y  $\delta$ -3 =534 pb. También se presentan los sitios de restricción.

Una vez hecha la restricción, el vector se desfosforiló durante una hora usando fosfatasa alcalina para posteriormente correr un gel y ver que estuvieran los fragmentos íntegros, posteriormente se cuantificaron con espectrofotómetro a 260 nm.

Ya restringidos se realizó la reacción de ligación y transformación como a continuación se indica.

#### 4.4 Reacción de ligación y transformación.

Considerando los resultados de la cuantificación con el espectrofotómetro para el vector pcDNA y para los insertos:

Se realizó la reacción de ligación y transformación tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$(50 \text{ ng vector} \times \text{pb inserto/pb vector}) \times (3 \text{ inserto/1 vector}) = \text{ng de inserto.}$$

De tal modo, la reacción fue la siguiente: (Tabla 5)

Fragmentos puros a clonar		Control de Ligación (CL)
Vector	50 ng	50 ng
Inserto	ng de inserto	---
Buffer 2 (1X)	cbp 10.0 ul	cbp 10.0 ul
Buffer 1	10.0 ul	10.0 ul
Ligasa T4	1.0 ul	1.0 ul
Rx total	21.0 ul	21.0 ul

Tabla 5. Reacción de ligación

La reacción de ligación se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, se descongelaron las células competentes en hielo, posteriormente en una zona estéril se prepararon los tubos necesarios para la transformación (Tabla 6).

NOTA: Para este caso por sus características se utilizó la cepa JM109.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
<b>INSERTO</b>	<b>CL</b>	<b>CT</b>	<b>CR</b>	<b>CN</b>
50.0 ul C.C	50.0 ul C.C	50.0 ul C.C	50.0 ul C.C	50.0 ul C.C
21.0 ul Rx L	21.0 ul CL	0.5 ul plásmido probado	50 ng de vector	

Tabla 6, Reacción de transformación donde: C.C= células competentes; Rx L= reacción de ligación; CL= control de ligación; CR= control de restricción y CN= control negativo.

Los tubos se dejaron 20 minutos en hielo, posteriormente se les dio un choque térmico poniéndolos 50 segundos a  $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , transcurrido este tiempo, se colocaron 2 minutos en hielo para enseguida agregarles 600  $\mu\text{l}$  de medio líquido Luria Broth (LB) sin antibiótico. Posteriormente se dejaron 1  $\frac{1}{2}$  hrs en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , pasado el tiempo, se plaquearon 300  $\mu\text{l}$  de cada tubo en cajas petri previamente preparadas con LB y antibiótico (ampicilina en este caso), finalmente se dejaron toda la noche (16 hrs  $\approx$ ) a  $37^{\circ}\text{C}$ .

De este método se obtuvieron colonias (clonas positivas), mismas que se probaron por PCR. A partir de estos resultados se extrajo el vector que contenía el inserto usando la metodología descrita como miniprep.

#### 4.5 Obtención de DNA plasmídico (Miniprep).

Se preparó un cultivo con 4.0 ml de medio líquido LB con antibiótico (0.1 mg/ml) toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ , a partir del cual se tomó 1.0 ml para guardar en stock a  $-80^{\circ}\text{C}$ , el resto (3.0 ml) se repartió en dos tubos eppendorf, los cuales se centrifugaron a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos a 3 000 rpm, el medio se removió aspirando cuidadosamente, procurando dejar la pastilla bacteriana tan seca como fuera posible. Enseguida se procedió a la lisis bacteriana para lo cual fue necesario resuspender perfectamente (con vortex) en 100  $\mu\text{l}$  de solución I (Anexo).

Se agregaron 200  $\mu$ l de solución II (Anexo), misma que se prepara al momento de ser usada, se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces (NO VORTEX) y se puso el tubo en hielo.

Posteriormente se agregaron 150  $\mu$ l de solución III (Anexo), mezclando para dispersar la solución a través del lisado bacteriano viscoso. Se colocó el tubo en hielo durante 5 minutos, se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4°C, transfiriendo el sobrenadante a otro tubo. Se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo ( $\approx$  400  $\mu$ l), se mezcló en vortex y se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió nuevamente a un tubo limpio, en seguida, se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente ( $\approx$  800  $\mu$ l), se mezcló con vortex, la mezcla se dejó 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante por aspiración, colocando el tubo en posición invertida sobre una toalla. Finalmente se lavó con 1ml de etanol al 70% y se resuspendió con 50  $\mu$ l de agua de ampolleta, agregando 1  $\mu$ l de RNasa 10 minutos a 37°C. Se almacenó a -20°C para las pruebas siguientes.

#### *4.6 Desnaturalización y caracterización por restricción.*

Una vez hecho el miniprep, de las clonas seleccionadas se cuantificaron con espectrofotómetro a 260 nm. Considerando esta cuantificación, se tomó 1 $\mu$ g para restringir con las enzimas correspondientes, esto, con el propósito de “liberar” el fragmento que se introdujo al vector. Previo a la restricción, el vector se desnaturalizó, lo cual se hizo calentando agua hasta ebullición, se tomó una alícuota del miniprep y se metió durante 3 minutos al agua, inmediatamente se pasó a hielo en donde se prepararon las reacciones de restricción.

Posteriormente se corrió un gel de agarosa al 1%, con lo cual se demostró que los fragmentos correspondían a los tamaños esperados, según fuera el caso.

#### *4.7. Secuenciación.*

Con la certeza de que los fragmentos estaban dentro del vector, se llevó una muestra de estos con los oligonucleótidos correspondientes para ser analizados en un secuenciador ABI 3100 de 16 capilares que utiliza el MÉTODO BIG DYE Terminator fluorescence based sequencing para análisis de secuencia y utiliza la Matrix DS-30 para análisis de fragmentos.

## 5. RESULTADOS.

### *Extracción de RNA total.*

Con el fin de obtener el transcrito que da origen a cada una de las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 se realizó la extracción de RNA total de músculo esquelético de ratón. Este RNA fue de muy buena calidad, ya que como se puede ver en la figura 10, se observan perfectamente los RNAs ribosomales (18S y 28S). Además la concentración obtenida fue suficiente (1.08  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). El RNA fue utilizado para realizar la reacción de transcriptasa reversa (RT). En la RT se utilizaron 3  $\mu\text{g}$  del RNA purificado y se realizó la obtención del cDNA total.

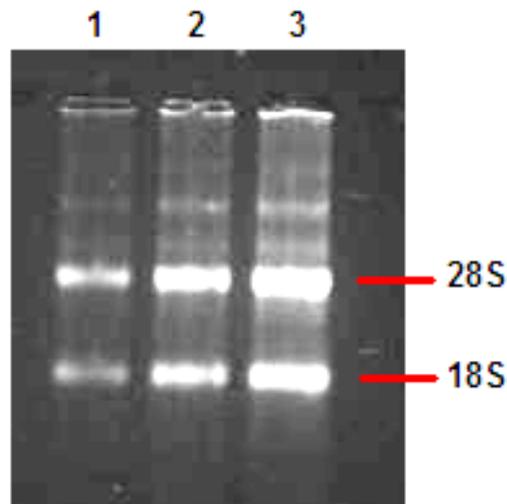


Fig. 10. Gel de agarosa al 1%. Se muestra la integridad del RNA extraído a partir de músculo de ratón. Se cargaron 0.2 $\mu\text{g}$  (carril 1); 0.5 $\mu\text{g}$  (carril 2) y 1.0 $\mu\text{g}$  (carril 3).

*Amplificación de los transcritos de cada una de las isoformas a partir del cDNA.*

Para lograr amplificar el cDNA completo y específico para cada una de las isoformas se utilizaron los oligonucleótidos denominados  $\delta$ SG1-FWD y  $\delta$ SG1-REV (para la isoforma  $\delta$ -1) así como los llamados  $\delta$ SG3-FWD y  $\delta$ SG3-REV (para la isoforma  $\delta$ -3). El amplificado obtenido contiene los extremos de restricción para las enzimas *Xho*I y *Xba*I así como la secuencia completa del transcrito (desde el ATG de inicio hasta el codón de paro) de las isoformas. El tamaño de cada uno de los transcritos amplificados fue de 869 pb para la isoforma  $\delta$ -1 y de 534 pb para la isoforma  $\delta$ -3 (Fig11).

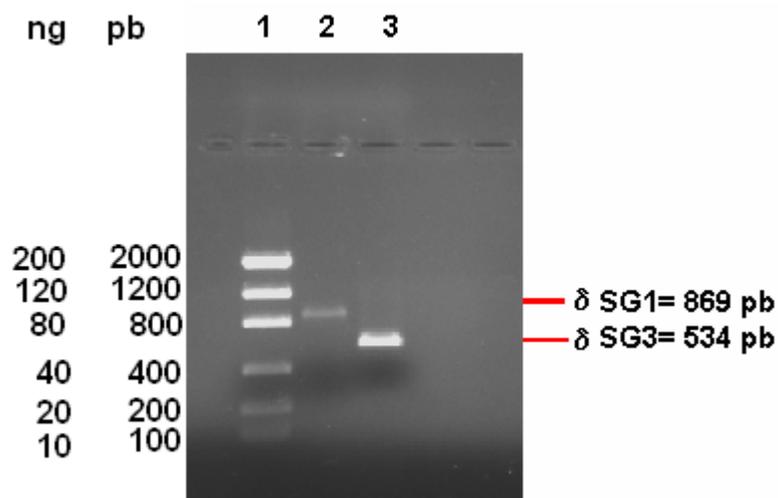


Fig 11. Amplificación de los transcritos de cada una de las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3. En un gel de agarosa al 1% se cargaron 2.0 $\mu$ l de marcador de masa (Low DNA Mass<sup>TM</sup> Ladder) (carril 1) y 2.0 $\mu$ l de cada uno de los amplificados (carriles 2 y 3).

*Purificación y digestión de los amplificadores de las isoformas y del vector pcDNA3-MYC.*

Los transcritos amplificados fueron limpiados para eliminar todos los reactivos utilizados en la reacción de PCR y posteriormente se sometieron a una digestión enzimática con las enzimas *Xho*I, y *Xba*I. Al mismo tiempo se realizó la digestión para el vector pcDNA3-MYC (5445 pb) utilizando las mismas enzimas. Este vector fue diseñado previamente (Donado por el Dr. Delgado-Olguín) y tiene una expresión constitutiva alta para células de mamífero. El nivel tan alto de expresión es debido a que contiene al promotor del citomegalovirus. También contiene un sitio múltiple de clonación con enzimas de uso frecuente así como una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento de bovino (BGH) y un codón de paro para la transcripción, lo cual permite la estabilidad del mRNA. También contiene genes para dos antibióticos distintos, para ampicilina y para neomicina. Aunado a todo lo anterior, contiene una bandera para el gen MYC (Fig. 12). Este gen es un proto-oncogen que da origen a una proteína denominada p64 y que actúa como factor de transcripción. En este vector se clonó la secuencia AAGCTT GCCA CCATGGAGCA GAAGCTGATC TCTGAGGAGG ACCTGAACGA ATTCGTCGAT AAGCTT la cual corresponde a MYC. La introducción de esta bandera en el vector permite que mediante anticuerpos específicos para este fragmento en un ensayo de Western Blot se pueda identificar indirectamente la expresión de la proteína de interés (en este caso  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3).

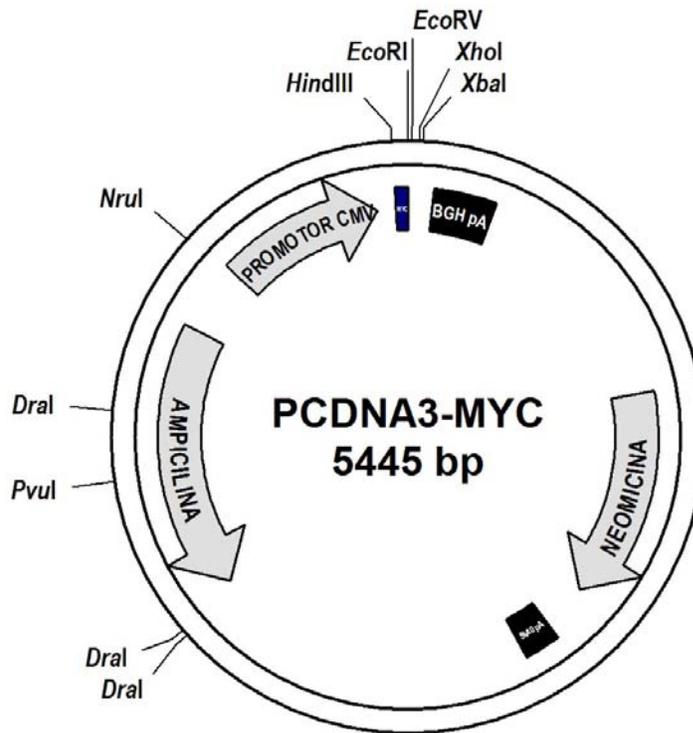


Fig 12. Mapa del vector pcDNA-3MYC, el cual se empleó para la clonación de las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3.

Después de la digestión con las enzimas *XhoI* y *XbaI*, tanto de los transcritos para cada una de las isoformas así como del vector, estos fueron limpiados y cuantificados usando un espectrofotómetro a 260 nm. La concentración fue confirmada mediante su corrimiento en un gel de agarosa con marcador de masa (Low DNA Mass™ Ladder), el cual nos dio una referencia aproximada de la concentración de cada muestra. En la figura 13 se observa al vector digerido (carril 1), así como su peso molecular. El tamaño correspondió con el esperado. También se observan las bandas que corresponden a los transcritos digeridos los cuales se ven muy bien y en el tamaño correspondiente (carriles 3 y 4).

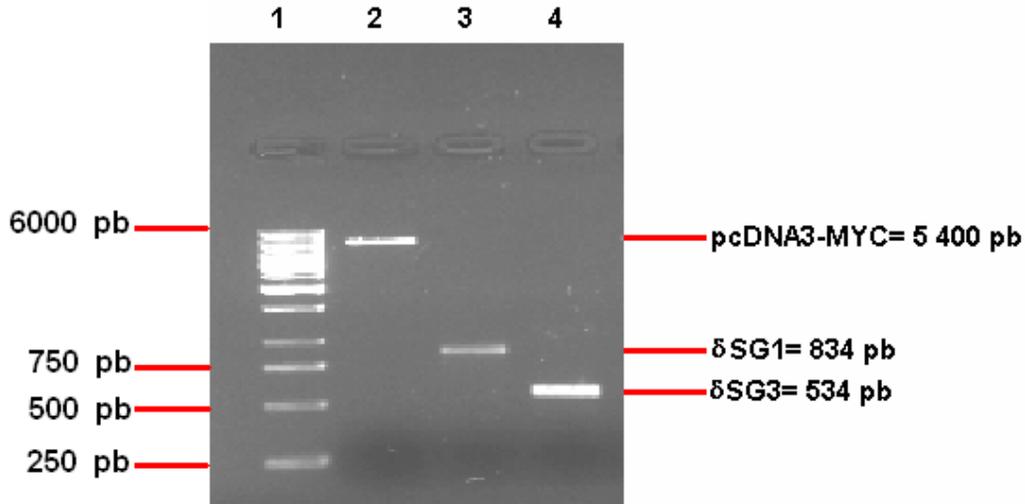


Fig 13. Restricción del vector y de los amplificados. Todas las muestras se digirieron con las enzimas *XhoI* y *XbaI* durante 1 hora a 37°C y posteriormente se analizaron en un gel de agarosa al 1% se corrieron 2.0µl de marcador de 1Kb (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder) (carril 1); 2.0µl del vector pcDNA3-MYC-δ3 (carril 2); 2.0µl de δ-SG1 y (carril 3) y 2.0µL de δ-SG3.

*Clonación de los transcritos de las isoformas δ-SG1 y δ-SG3 en el vector pcDNA3-MYC.*

Una vez que se corroboró la digestión y la concentración tanto de los transcritos amplificados (δ-1 y δ-3) como del vector (pcDNA3-MYC), se realizó la desfosforilación de este último con el fin de evitar la ligación del vector con sí mismo. Posteriormente se procedió a realizar la ligación y la transformación bacteriana. La cepa que se empleo fue la denominada JM109.

Dieciséis horas después de la incubación a 37°C se observó crecimiento de varias colonias, de éstas se seleccionaron 9 al azar, mismas que fueron probadas por PCR, obteniendo amplificación de los transcritos para cada una de las isoformas. Sin embargo, esto sólo dio un indicio de que el inserto se encuentra presente, pero había que corroborarlo, razón por la cual se realizó el miniprep de cada una de ellas. Estos minipreps fueron nuevamente amplificados por PCR y se encontró que de las 9 clonas sólo amplificaron 6, de las cuales tres fueron para δ-SG3 y 3 para δ-SG1 (Fig.14).

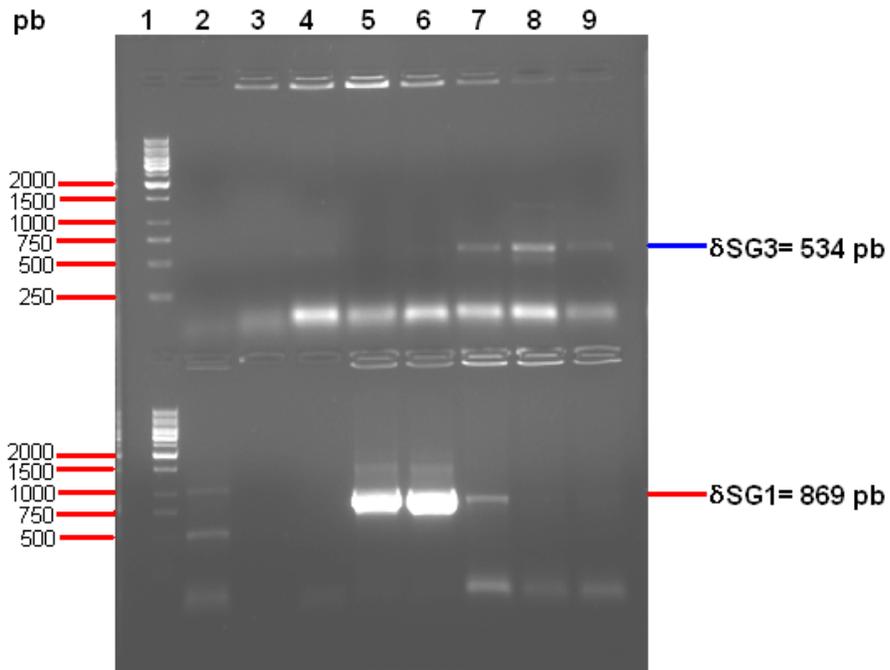


Fig 14. Gel de agarosa al 1% con TBE para confirmar la existencia del inserto. En el carril 1 se corrieron 2.0  $\mu$ l de marcador de 1 Kb (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder); del carril 2 al 9 se corrieron 2.0  $\mu$ l de cada muestra producto de la PCR, de los fragmentos amplificados se consideraron para los siguientes experimentos las muestras 7, 8 y 9 de  $\delta$ SG3 y las muestras 5, 6 y 7 de  $\delta$ SG1.

A partir de este momento, el vector con el inserto correspondiente para cada una de los transcritos de las isoformas se denominó pcDNA3-MYC- $\delta$ 1 y pcDNA3-MYC- $\delta$ 3 para las isoformas  $\delta$ 1 y  $\delta$ 3 respectivamente. Cada uno de ellos tenía un tamaño distinto y entonces el vector pcDNA3-MYC- $\delta$ 1 finalizó con un tamaño de 6309 pb en tanto que el pcDNA3-MYC- $\delta$ 3 con 5981pb (Fig. 15).

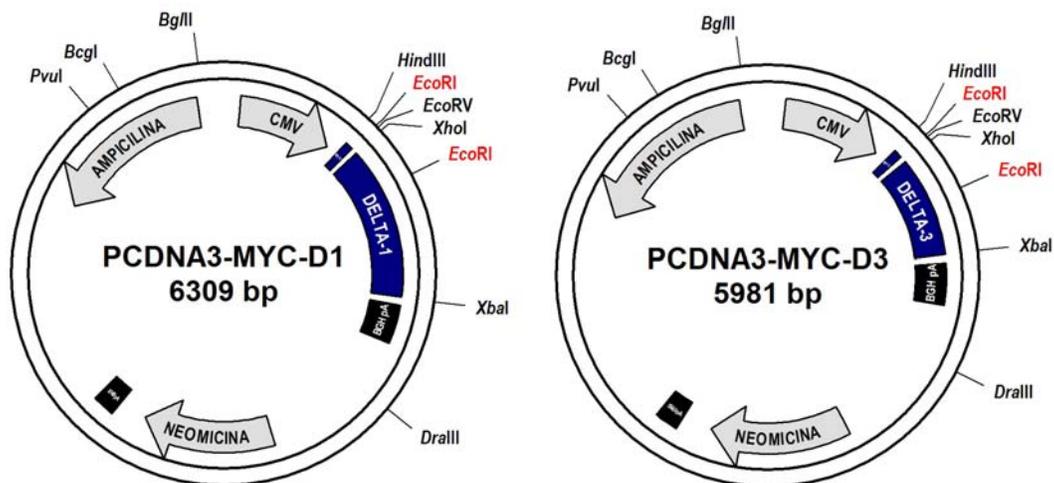


Fig 15. Mapa de los vectores generados después de la clonación de los transcritos en el vector pcDNA-3MYC. En la figura se observan los sitios en donde fue insertado cada uno de los transcritos de las isoformas así como el tamaño final de cada vector. En letra roja se muestran los sitios de corte con la enzima de restricción *EcoRI* con la cual se realizó la caracterización del inserto.

Con base en los resultados anteriores y con el fin de caracterizar al inserto se realizó una digestión con la enzima de restricción *EcoRI* la cual corta por dentro y por fuera del inserto con lo que fue posible confirmar tanto su presencia como el sentido en el que se encontraba. Después de esta digestión se obtuvo un fragmento de 260 pb para cada uno de los insertos  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3, siendo este el tamaño esperado (Fig. 16).

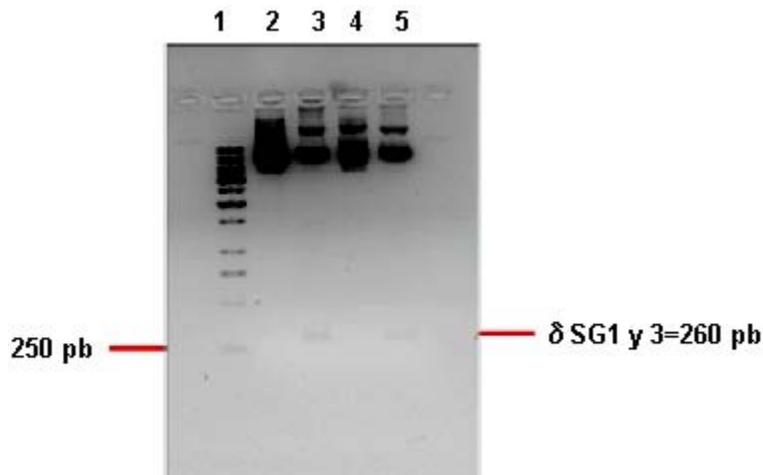


Fig. 16. Liberación de los insertos  $\delta 1$  y  $\delta 3$  de los vectores pcDNA3-MYC- $\delta 1$  y pcDNA3-MYC- $\delta 3$ . La liberación se hizo mediante la digestión con la enzima *EcoRI* y analizados en un gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se muestra el marcador de 1Kb (Gene Ruler™ 1Kb DNA Ladder). El carril 2 contiene 0.5  $\mu$ l del miniprep del vector denominado pcDNA 3-MYC- $\delta 1$  sin digerir; en el carril 3 hay 5.0  $\mu$ l de este mismo, pero digerido con *EcoRI*; carril 4, 0.5  $\mu$ l del miniprep del vector denominado pcDNA3-MYC- $\delta 3$  sin digerir y la digestión con la misma enzima para pcDNA3-MYC- $\delta 3$  (carril 5).

#### *Secuenciación de los vectores pcDNA3-MYC- $\delta 1$ y pcDNA3-MYC- $\delta 3$ .*

Una vez que se caracterizaron los vectores, se realizó la reacción de secuenciación con los oligonucleótidos que están diseñados para reconocer una secuencia dentro del vector que esta un poco después del promotor CMV. Las secuencias obtenidas (electroferogramas) se muestran en las figuras 17 y 18.

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el uso del programa "Chromas" en donde se compararon las secuencias obtenidas con las reportadas en el Gene Bank. Dicho análisis nos permitió saber que se encontraban en fase y que no contenían ningún cambio (mutación) en la secuencia de nucleótidos originada por la amplificación al compararla con las secuencias reportadas. La comparación obtenida mediante el programa se muestra en las figuras 19 y 20.

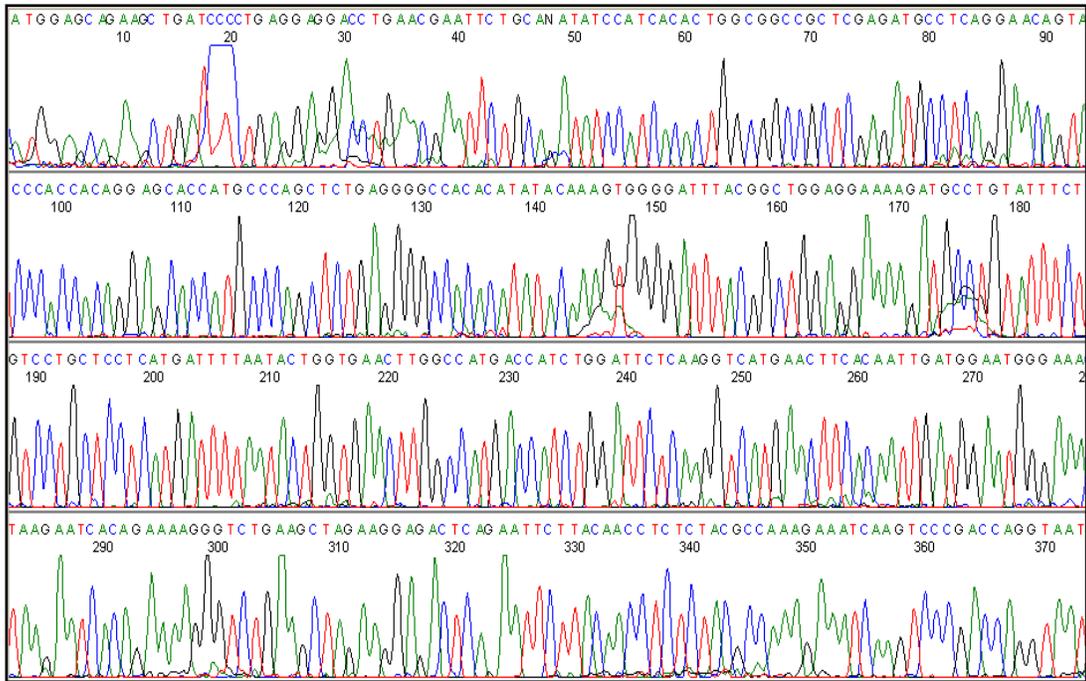


Fig17. Electroferograma de la secuencia del vector pcDNA3-MYC-δ1.

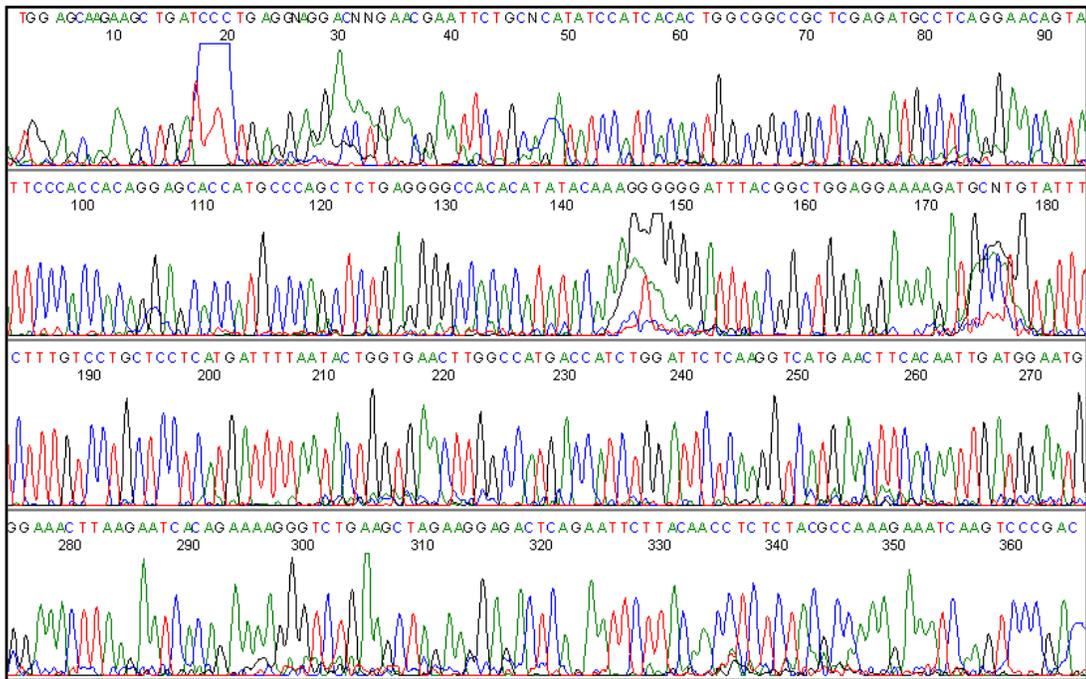


Fig 18. Electroferograma de la secuencia del vector pcDNA3-MYC-δ3.

```

Identities = 870/870 (100%), Gaps = 0/870 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ATGCCTCAGGAACAGTATTCCCACCACAGGAGCACCATGCCAGCTCTGAGGGGCCACAC 60
      |||
Sbjct 50 ATGCCTCAGGAACAGTATTCCCACCACAGGAGCACCATGCCAGCTCTGAGGGGCCACAC 109

Query 61 ATATACAAAGTGGGGATTTACGGCTGGAGGAAAAGATGCCTGTATTTCTTTGTCCTGCTC 120
      |||
Sbjct 110 ATATACAAAGTGGGGATTTACGGCTGGAGGAAAAGATGCCTGTATTTCTTTGTCCTGCTC 169

Query 121 CTCATGATTTTAATACTGGTGAACCTGGCCATGACCACTGGATTCTCAAGGTCATGAAC 180
      |||
Sbjct 170 CTCATGATTTTAATACTGGTGAACCTGGCCATGACCACTGGATTCTCAAGGTCATGAAC 229

Query 181 TTCACAATTGATGGAATGGGAAACTTAAGAATCACAGAAAAGGGTCTGAAGCTAGAAGGA 240
      |||
Sbjct 230 TTCACAATTGATGGAATGGGAAACTTAAGAATCACAGAAAAGGGTCTGAAGCTAGAAGGA 289

Query 241 GACTCAGAATTCTTACAACTCTCTACGCCAAAGAAATCAAGTCCCGACCAGGTAATGCC 300
      |||
Sbjct 290 GACTCAGAATTCTTACAACTCTCTACGCCAAAGAAATCAAGTCCCGACCAGGTAATGCC 349

Query 301 CTATACTTCAAATCTGCCAGGAACGTGACAGTGAACATTCTCAATGATCAGACAAAAGTG 360
      |||
Sbjct 350 CTATACTTCAAATCTGCCAGGAACGTGACAGTGAACATTCTCAATGATCAGACAAAAGTG 409

Query 361 CTGACTCAGCTGGTGACAGGTCCGAAGGCTGTGGAAGCATATGGCAAAGGTTTGAAGTA 420
      |||
Sbjct 410 CTGACTCAGCTGGTGACAGGTCCGAAGGCTGTGGAAGCATATGGCAAAGGTTTGAAGTA 469

Query 421 AAAACTGTTTCTGGAAAATTGCTCTTTTCTGCGGATGACAGTGAAGTGGTCGTGGGAGCT 480
      |||
Sbjct 470 AAAACTGTTTCTGGAAAATTGCTCTTTTCTGCGGATGACAGTGAAGTGGTCGTGGGAGCT 529

Query 481 GAGAGATTGAGAGTCTTAGGAGCTGAAGGCACAGTCTTCCCAAATCCATAGAAACACCT 540
      |||
Sbjct 530 GAGAGATTGAGAGTCTTAGGAGCTGAAGGCACAGTCTTCCCAAATCCATAGAAACACCT 589

Query 541 AATGTCAGAGCAGACCCCTTCAAGGAACTAAGGTTGGAGTCCCAACCCGATCTCTAGTG 600
      |||
Sbjct 590 AATGTCAGAGCAGACCCCTTCAAGGAACTAAGGTTGGAGTCCCAACCCGATCTCTAGTG 649

Query 601 ATGGAAGCCCCAAAAGGAGTAGAAATAAATGCAGAAGCTGGCAATATGGAAGCCATCTGC 660
      |||
Sbjct 650 ATGGAAGCCCCAAAAGGAGTAGAAATAAATGCAGAAGCTGGCAATATGGAAGCCATCTGC 709

Query 661 AGAAGTGAGCTGAGACTGGAGTCCAAGGATGGAGAGATTAAGTTAGATGCTGCGAAAATC 720
      |||
Sbjct 710 AGAAGTGAGCTGAGACTGGAGTCCAAGGATGGAGAGATTAAGTTAGATGCTGCGAAAATC 769

Query 721 AAACCTAGACTGCCTCGTGGATCCTACACACCCACAGGAACGAGGCAGAAGGTCTTC 780
      |||
Sbjct 770 AAACCTAGACTGCCTCGTGGATCCTACACACCCACAGGAACGAGGCAGAAGGTCTTC 829

Query 781 GAGGCTGCGTCTGCGCAATGGGAGGTTATTCTGTGCCAGGCAGGAACTGGTTCTACC 840
      |||
Sbjct 830 GAGGCTGCGTCTGCGCAATGGGAGGTTATTCTGTGCCAGGCAGGAACTGGTTCTACC 889

Query 841 TGTCAGATAAACACAAGTGTCTGCCTTTGA 870
      |||
Sbjct 890 TGTCAGATAAACACAAGTGTCTGCCTTTGA 919

```

Fig 19. Comparación de la secuencia de cDNA de  $\delta 1$  esperada con la que se obtuvo a partir de la secuenciación.

Score = 900 bits (487), Expect = 0.0  
 Identities = 491/493 (100%), Gaps = 0/493 (0%)  
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1   ATGCCTCAGGAACAGTATTCCCACCACAGGAGCACCATGCCCAGCTCTGAGGGGCCACAC 60
          |||
Sbjct 50   ATGCCTCAGGAACAGTATTCCCACCACAGGAGCACCATGCCCAGCTCTGAGGGGCCACAC 109

Query 61   ATATACAAAGTGGGGATTTACGGCTGGAGGAAAAGATGCCTGTATTTCTTTGTCCTGCTC 120
          |||
Sbjct 110  ATATACAAAGTGGGGATTTACGGCTGGAGGAAAAGATGCCTGTATTTCTTTGTCCTGCTC 169

Query 121  CTCATGATTTTAAATACTGGTGAACCTTGGCCATGACCATCTGGATTCTCAAGGTCATCAAC 180
          |||
Sbjct 170  CTCATGATTTTAAATACTGGTGAACCTTGGCCATGACCATCTGGATTCTCAAGGTCATGAAC 229

Query 181  TTCACAATTGATGGAATGGGAAACTTAAGAATCACAGAAAAGGGTCTGAAGCTAGAAGGA 240
          |||
Sbjct 230  TTCACAATTGATGGAATGGGAAACTTAAGAATCACAGAAAAGGGTCTGAAGCTAGAAGGA 289

Query 241  GACTCAGAATTCTTACAACCTCTCTACGCCAAAGAAATCAAGTCCCGACCAGGTAATGCC 300
          |||
Sbjct 290  GACTCAGAATTCTTACAACCTCTCTACGCCAAAGAAATCAAGTCCCGACCAGGTAATGCC 349

Query 301  CTATACTTCAAATCTGCCAGGAACGTGACAGTGAACATTCTCAATGATCAGACAAAAGTG 360
          |||
Sbjct 350  CTATACTTCAAATCTGCCAGGAACGTGACAGTGAACATTCTCAATGATCAGACAAAAGTG 409

Query 361  CTGACTCAGCTGGTGACAGGTCGGAAGGCTGTGGAAGCATATGGCAAAGGTTTGAAGTA 420
          |||
Sbjct 410  CTGACTCAGCTGGTGACAGGTCGGAAGGCTGTGGAAGCATATGGCAAAGGTTTGAAGTA 469

Query 421  AAAACTGTTTCTGGAAAATTGCTCTTTTCTGCGGATGACAGTGAAGTGGTCGTGGGAGCT 480
          |||
Sbjct 470  AAAACTGTTTCTGGAAAATTGCTCTTTTCTGCGGATGACAGTGAAGTGGTCGTGGGAGCT 529

Query 481  GAGAGATTGAGAG 493
          |||
Sbjct 530  GAGAGATTGAGAG 542
  
```

Fig. 20. Comparación de la secuencia de cDNA de  $\delta 3$  esperada con la que se obtuvo a partir de la secuenciación.

## 6. DISCUSIÓN.

Los sarcoglicanos son un grupo de glicoproteínas transmembranales que forman parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina. La deficiencia de los sarcoglicanos provocada por mutaciones es responsable de distintas formas de distrofia muscular de cintura tipo 2D, 2E, 2C, etc (Chan et al, 1998).  $\beta$ -SG es un componente del complejo sarcoglicano-sarcospan, y mutaciones en el gen causan distrofia muscular de cintura tipo 2F (LGMD 2F) (Yoshida et al, 2000; Delgado et al, 2004).

En estudios previos, se ha reportado que mutaciones en el gen *SGCD* y por consiguiente la deficiencia de la proteína  $\beta$ -SG, provoca una expresión anormal del receptor de rianodina en el músculo cardiaco, lo que sugiere una regulación anormal de calcio. Además, la localización de  $\beta$ -SG en retículo sarcoplásmico (RS), sugiere que esta proteína se encuentra asociada con la regulación del calcio, lo que constituiría un mecanismo fisiopatológico en el desarrollo de distrofia muscular y cardiomiopatía. Por otra parte, el uso de bloqueadores de canales de calcio disminuye la progresión de la enfermedad cardiaca en modelos deficientes de  $\beta$ -SG. En resumen, se cree que  $\beta$ -SG participa en la regulación de concentración de calcio intracelular, y que su ausencia provoca una entrada mayor de calcio, lo que a su vez genera debilitamiento y, subsecuente degeneración muscular (Emery, 2002), evento común en las distrofias musculares de cintura

Por otro lado, la isoforma recientemente identificada ( $\beta$ -SG3) podría también estar relacionada con la localización y mantenimiento de las proteínas que participan en la regulación del calcio en la cisterna terminal del RS durante la contracción debido a que se encuentra localizada cerca de  $\beta$ -SG1 y a los DHPR. Esta regulación probablemente sea a través de una interacción directa con proteínas de la ULC. Considerando lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la clonación de las isoformas  $\beta$ -SG1 y  $\beta$ -SG3 en el vector de expresión pcDNA3-MYC. Los vectores pcDNA3-MYC-1 y pcDNA3-MYC-3 generados de esta manera fueron caracterizados mediante restricción con la enzima *EcoRI* la cual corta por dentro de los insertos, lo que nos permitió confirmar su presencia y el sentido adecuado del mismo. Con la secuenciación

quedó finalmente corroborada la presencia de los insertos, el sentido y la no existencia de mutaciones.

Los vectores podrán ser utilizados posteriormente para los ensayos de transfección *in vivo* en un modelo murino deficiente de ambas isoformas. Con la electroporación se espera revertir los cambios en la homeostasis del calcio intracelular provocados tanto por la ausencia de las isoformas -SG1 y -SG3, al reestablecer la expresión de ambas isoformas. Lo anterior podría confirmar nuestra hipótesis de que estas isoformas tienen un papel importante en la regulación del calcio en las distrofias musculares y por tanto, el reestablecimiento de su función pueda ser una posibilidad para lograr una disminución o incluso detener el daño.

## 7. CONCLUSIONES.

1. Se aprendieron y aplicaron técnicas de disección de ratones y obtención de músculo esquelético.
2. Se estandarizaron y aplicaron técnicas de biología molecular tales como: extracción de RNA, cuantificación de ácidos nucleicos, RT, diseño de oligonucleótidos, PCR, electroforesis horizontal, digestión enzimática, ligación, transformación bacteriana y purificación plasmídica.
3. Se clonaron las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 en el vector pcDNA3-MyC generándose dos vectores nuevos denominados pcDNA3-MYC- $\delta$ 1 y pcDNA3-MYC- $\delta$ 3.
4. Con los resultados obtenidos, se abre la posibilidad de continuar con estudios *in vivo* que conduzcan hacia una disminución del daño provocado por la ausencia de las isoformas  $\delta$ -SG1 y  $\delta$ -SG3 al reestablecer su expresión. La función se reestablecerá al electroporar los vectores generados en ratones deficientes del gen delta sarcoglicano.

## 8. LITERATURA CITADA.

- Ahn, A.H; Kunkel, L.M. 1995. *Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin*. J Cell Biol. 128: 363–371.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M. 1999. *Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice*. Hum Mol Genet. 8:1589-98.
- Betto Romeo. 1999. *Ecto-ATPase Activity of  $\alpha$ -sarcoglycan (Adhalin)*. J Biol Chem. 273: 7907-7912.
- Campbell, K.P. 1995. *Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage*. Cell. 80:675-679.
- Campbell, K.P; Kahl, S.D. 1989. *Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein*. Nature. 338: 259-62.
- Carpenter, S; Karpati, G. 2001. *Pathology of skeletal muscle*. 2<sup>a</sup> Edition. Oxford University Press.
- Chan, Y.M; Bonnemann, C.G; Lidov, H.G; Kunkel, L.M. 1998. *Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture*. J Cell Biol. 143: 2033–2044.
- Chardin, P; Cussac, D; Maignan, S; Ducroix, A. 1995. *The Grb2 adaptor*. FEBS Lett. 369: 47-51.
- Coral, V.R; Cohn, R.D; Moore, S.A; Hill, J.A; Weiss, R.M; Davisson, R.L; Straub, V; Barresi, R; Bansal, D; Hrstka, R.F; Williamson, R; Campbell, K.P. 1999. *Disruption of the sarcoglycan–sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy*. Cell. 98: 465-474.
- Crosbie R. H; Lebakken C. S; Holt K. H; Venzke D. P; Straub V; Lee J. C; Grady R. M; Chamberlain J. S; Sanes J. R; Campbell K. P. 2000. *Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex*. J Cell Biol. 145: 153–165.
- Crosbie Rachele H. 1998. *mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation*. Hum Mol Genet. 7: 823-829.

- Crosbie R.H; Heighway J; Venzke D.P; Lee J.C; Campbell K.P. 1997. *Sarcospan the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin–glycoprotein complex*. J Biol Chem. 272: 31221–31224.
- Daniel E. 2003. *Dystrophin-Glycoprotein Complex: Post-traslational Precessecingand Dystroglycan Function*. J Biol Chem. 278: 15457-15460.
- Davies, J.E., Berger, Z; Rubinsztein, D.C. 2006. *Oculopharyngeal muscular dystrophy: potential therapies for an aggregate-associated disorder*. J Biochem. Cell Biol. 38: 1457–1462.
- Delgado Olguin Paul Demian. 2005. Tesis Doctoral. *Caracterización de la región promotora del gen sarcoglicano  $\alpha$* . UNAM. México DF. Pp. 8-60.
- Delgado O.P; Rosas V.H; Recillas T.F; Zentella D.A; Bermúdez M; Cisneros B; Salamanca F; Coral V.R. 2004. *NF1-C2 negatively regulates alpha-sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts*. Biochem Biophys Res Common. 319: 1032-1039.
- Duclos F; Straub V; Moore S.A; Venzke D.P; Hrstka R.F; Crosbie R.H; Durbeej M; Lebakken C.C; Ettinge A.J; van der Meulen J; Holt K.M; Lim L. E; Sanes J.R; Davinson B.L; Faulkner J.A; Williamson R; Campbell K.P. 1998. *Progressive muscular dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan-deficient mice*. J Cell Biol. 142:1461-1471.
- Duclos F. 2006. *Progressive Muscular Dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan-deficient Mice*. J Cell Biol. 142: 1461-1471.
- Durbeej M, Campbell K.P. 2002. *Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models*. Curr Opin Genet Dev. 12: 349-361.
- Durbeej, M. 2000. *Disruption of the  $\beta$ -sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E*. Mol Cell. 5: 141–151.
- Emery A.E.H. 2002. *The muscular dystrophies*. Lancet. 2: 687-695.
- Ervasti J.M; Campbell K.P. 1993. *Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of dystrophin-glycoprotein complex*. J Cell Biol. 122: 809–823
- Ervasti J.M. 2006. *Dystrophin its interactions whit other proteins, and implications for muscular dystrophy*, BBA. 15: 1-10.

- Estrada F.J; Mornet D; Rosas V.H; Angulo A; Hernández M; Becker V; Rendón A; Manuel R.K; Coral V.R. 2006. *A novel isoform of d-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle*. *Biochem Biophys Res Com* 340: 865–871.
- Ettinger A.J; Feng G; Sanes J.R. 1997. *Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy*. *J Biol Chem*. 272: 32534–32538.
- Hack A.A; Lam M.Y; Cordier L; Shoturma D.I; Ly C.T; Hadhazy M.A; Hadhazy M.R; Sweeney H.L; McNally E.M. 2000. *Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex*. *J Cell Sci*. 113: 2535-2544.
- Hernández Stengele Gabriel. 2004. Tesis de Licenciatura. *Identificación de transcritos del subcomplejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) y localización de la proteína sarcospan en el tejido adiposo parametrial de rata*. UDLA. Pue. Pp. 1-70.
- Hoffman E.P; Brown R.H; Kunkel L.M. 1987. *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. *Cell*. 51: 919-28.
- Holt K.H; Campbell K.P. 1998. *Assembly of the sarcoglycan complex*. Insight for muscular dystrophy, *J Biol Chem*. 273: 34667-34670.
- Holt K.H; Crosbie R.H; Venzke D.P; Campbell K.P. 2000. *Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide*. *FEBS Lett*. 468: 79–83.
- Honda T; Sugiyama S; Sakamoto T; Kaikita K; Ogawa H. 2007. *Impact of delta-sarcoglycan gene polymorphism on the occurrence of coronary spastic angina in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy*. *Circ J*. 71: 1263-1267.
- Ibraghimov B.O; Ervasti J.M; Leveille C.J; Slaughter C.A; Sernett S.W; Campbell K.P. 1992. *Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix*. *Nature* 355: 696–702.
- Ibraghimov B.O; Milatovich A; Ozcelik T; Yang B; Koepnick K; Francke U; Campbell K.P. 1993. *Human dystroglycan skeletal muscle DNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization*. *Hum. Mol Gene* 2: 1651–1657.

- Iwata Y; Katanosaka Y; Shijun Z; Kobayashi Y; Hanada H; Shigekawa M; Wakabayashi S. 2005. *Protective effects of Ca<sup>2+</sup> handling drugs against abnormal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells*. *Biochem Pharmacol.* 70: 740-51.
- Jung D.B; Yang J; Meyer J; Chamberlain; Campbell K.P. 1995. *Identification and characterization of the dystrophin anchoring site of beta-dystroglycan*. *J Biol Chem.* 45: 27305-27310.
- Jung D; Duclos F; Apostol B; Straub V; Lee J.C; Allamand V; Venzke D.P; Sunada Y; Moomaw C.R; Leveille C.J; Slaughter C.A; Crawford T.O; McPherson J.D; Campbell K.P. 1996. *Characterization of delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy*. *J Biol Chem.* 271: 32321-32329.
- Koenig M; Hoffmann E.P; Bretelson C.J; Monaco A.P; Feener C, Kunkel L.M. 1996. *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and individuals*. *Cell.* 50: 509-17.
- Hayashi K; Wakayama Y; Inoue M; Kojima H; Shibuya S; Jimi T; Hara H; Oniki H. 2005. *Sarcospan: ultrastructural localization and its relation to the sarcoglycan subcomplex*. *Micron.* 37: 591-6.
- Lapidos K.A; Kakkar R; Mc Nally E.M. 2003. *The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma*. *Circ Res* 94: 1023-1031.
- Liu L.A; Engvall E. 1999. *Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle*. *J Biol Chem.* 274: 38171-38176.
- Lunde P.K; Dahlstedt A.J; Bruton J.D. 2001. *Contraction and intracellular Ca (2+) handling in isolated skeletal muscle of rats with congestive heart failure*. *Circ Res.* 88:1299-1305.
- Matsamura K; Saito F; Yamada H; Hase A; Sunada Y; Shimizu T. 1999. *Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay*. *Cell Mol Biol.* 45: 751-762.
- Michiro Imamura. 2005.  *$\epsilon$ -sarcoglycan compensates for lack of  $\alpha$ -sarcoglycan in a Mouse model of limb-girdle muscular dystrophy*. *Hum Mol Genet.* 14: 775-783.
- Nigro V; Okazaki Y; Belsito A; Piluso G; Matsuda Y; Politano L; Nigro G; Ventura C; Abbondanza C; Molinari A.M; Acampora D; Nishimura M; Hayashizaki Y; Puca, G.A. 1997. *Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene*. *Hum Mol Gen.* 6: 601-607.

- Nigro V; Piluso G; Belsito A; Politano L; Puca A.A; Papparella S; Rossi E; Viglietto G; Esposito M.G; Abbondanza C; Medici N; Molinari A.M; Nigro G; Puca G.A. 1996. *Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein.* Hum Mol Gen. 5: 1179-1186.
- Nishiyama A; Endo T; Takeda S; Imamura M. 2004. *Identification and characterization of epsilon-sarcoglycan in the central nervous system.* Mol Brain Res. 312: 12510-12.
- Oak S.A; Russo K; Petrucci T.C; Jarrett H.W. 2001. *Mouse  $\alpha$ 1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling.* Biochem. 40: 11270–11278.
- Ozawa E; Noguchi S; Mizuho Y; Hagiwara Y; Yoshida M. 1998. *From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy evolution of a concept of muscular dystrophy.* Muscle Nerve. 21: 421-438.
- Peters M.F; Kramarcy N.R; Sealock R; Froehner S.C. 1997. Neuroreport. 5: 1577–1580.
- Porter J.D; Khanna S; Kaminski H.J; Rao J.S; Merriam A.P; Richmonds C.R; Leahy P; Li J; Guo W; Andrade F.H. 2000. *A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice.* Hum Mol Genet. 11: 263–272.
- Rando T.A. 2001. *The dystrophin–glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies.* Muscle Nerve. 24: 1575–1594.
- Reiken S; Lacampagne A; Zhou H. 2003. *PKA phosphorylation activates the calcium release channel (ryanodine receptor) in skeletal muscle: defective regulation in heart failure.* J Cell Biol. 160: 919-28.
- Ronald D.C. 2000. *Molecular Basis of Muscular Dystrophies.* Muscle Nerve. 29: 1456-1471.
- Rybakova I.N; Patel J.R; Ervasti J.M. 2000. *The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin.* J Cell Biol. 150: 1209–1214.

- Sakamoto A; Ono A; Abe M; Jasmin G; Eki T; Murakami Y; Mazaki T; Toyo-oka, T; Hanoaka F. 1997. *Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex.* Proc Natl Acad Sci. 94: 13873-13878.
- Shi W; Chen Z; Schottenfeld J; Stahl R.C; Kuncle L.M; Chan Y.M. 2004. *Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan.* Muscle Nerve. 29: 409-419.
- Straub V, Duclos F, Venzke D.P. 1998. *Molecular Pathogenesis of Muscle Degeneration in the {delta}-Sarcoglycan-Deficient Hamster.* Am J Pathol. 153: 1623-30.
- Stuart Ira Fox. 2004. *Fisiología Humana.* 7ª Edición, Mc Graw-Hill. España.
- Suzuki A; Yoshida M; Ozawa E. 1995. *Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture.* J Cell Biol. 128: 373–381.
- Thompson T.G; Chan Y.M; Hack A.A; Brosius M; Rajala M; Lidov H.G; McNally E.M; Watkins S; Kunkel L.M. 2000. *Filamin-2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein.* J Cell Biol. 148: 115-126.
- Tokarz S.A; Duncan N.M; Rash S.M; Sadequi A; Dewan A.K; Pillers D.A. 1998. *Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy.* Mol Genet Metab. 65: 272-81.
- Ueda H; Ueda K; Baba T; Ohno S. 2001. *Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle.* J Histochem Cytochem. 49: 529-537.
- Ueyama T; Ohkusa T; Hisamatsu Y. 1998. *Alterations in cardiac SR Ca (2+)-release channels during development of heart failure in cardiomyopathic hamsters.* Am J Physiol. 274: 1-7.
- Wang X; Weisleder N; Collet C. 2005. *Uncontrolled calcium sparks act as a dystrophic signal for mammalian skeletal muscle.* Nat Cell Biol. 7: 525-530.
- Wakabayashi T.E; Noguchi S; Ozawa E. 2001. *Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene.* Eur. Biochem. 268: 948-57.

- Wehling M; Spencer M.J; Tidball J.G. 2001. *A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice.* J Cell Biol. 155: 123–13.
- Wheeler M.T; Zarnegar S; McNally E.M. 2002. *ζ-Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy.* Hum Mol Genet. 11: 2147–2154.
- Yoshida M. 2000. *Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy.* Hum Mol Genet. 9: 1033–1040.

## 9. ANEXO.

Soluciones de miniprep:

- a) solución I
  - 50mM glucosa
  - 25mM Tris Cl pH 8.0 (ajustar con HCl)
  - Prepara 100ml (esterilizar en autoclave)
  
- b) solución II
  - 0.2N NaOH (stock 10N)
  - 1% SDS (stock 10%)
  - Preparar en el momento
  
- c) solución III
  - 5M acetato de potasio 60ml
  - Ácido acético glacial 11.5ml
  - H<sub>2</sub>O 28.5ml



