



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“LOCALIZACIÓN Y PARTICIPACIÓN DE LAS ISOFORMAS 1 Y 3 DE
δ-SARCOGLICANO EN LAS MEMBRANAS REGULADORAS DE
CALCIO DE MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES NORMALES
Y DEFICIENTES EN EL GEN δ-SG”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BIOQUÍMICA ALHONDRA SOLARES PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F. MAYO 2010



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.

¡Deja que la vida fluya, da lo mejor de ti y agradece cada día!

Detrás de cada línea de llegada, hay una de partida.
Detrás de cada logro, hay otro desafío.
Mientras estés viva, siéntete viva.
Lo importante nunca cambia,
tu fuerza y tu convicción no tienen edad.
Cuando por los años no puedas correr, trota.
Cuando no puedas trotar, camina.
Cuando no puedas caminar, usa el bastón.
¡Pero nunca te detengas!

Madre Teresa de Calcuta

Vivir para dar. Caminar para encontrar.
Sonreír para alegrar. Tener para compartir.
Repartir para aliviar. Esperar para abrazar...
La hermosa aventura del ser humano.

María Rijke

A crecer en la virtud bajaste,
sólo cuando la das o la recibes eres feliz
porque te alimentas de su energía

Pitágoras

La Vida es una oportunidad, aprovéchala.
La Vida es belleza, admírala.
La Vida es beatitud, saboréala.
La Vida es un sueño, hazlo realidad.
La Vida es un reto, afróntalo.
La Vida es un juego, júégalo.
La Vida es preciosa, cuídala.
La Vida es riqueza, consévala.
La Vida es un misterio, descúbrela.
La Vida es promesa, cúmplala.
La Vida es amor, gózalo.
La Vida es tristeza, supérala.
La Vida es un himno, cántalo.
La Vida es una tragedia, domínala.
La Vida es una aventura, vívela.
La Vida es felicidad, merécela.
La Vida es vida, defiéndela.

Madre Teresa de Calcuta

El mundo está en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y de correr el riesgo de vivir sus sueños.

Paulo Coelho

APOYOS

Este proyecto fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con el número de proyecto 2006/1A/I/078, así como por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de proyecto 55199 (R.M.C.V.).

Durante el desarrollo de este trabajo la estudiante fue becaria de tiempo completo del CONACYT con el número de registro 223377. Además contó con apoyos del PAEP UNAM, becas mixtas CONACYT y del IMSS.

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 del IMSS, en el laboratorio del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en el laboratorio del departamento de farmacología, Cinvestav-IPN y en el laboratorio de Physiological Science en la Universidad de California (UCLA) en Los Angeles, California bajo la tutoría principal del Dr. Ramón M. Coral Vázquez y la asesoría de la Dra. Alicia Ortega Aguilar, la Dra. María C. García y la Dra. Rachelle H. Crosbie.

AGRADECIMIENTOS

En este largo camino han sido muchas las personas que han creído en mí, que me han enseñado y apoyado para realizar mis sueños. Algunas están lejos y otras cerca, pero todas han dejado una huella en mi existencia.

Agradezco el amor y apoyo de mi familia. Mi madre es la estrella más grande que Dios pudo regalarme. Mi tía es el ángel con más luz y bondad sobre la tierra. Mi hermana y mi prima Gina son la extensión de mi espíritu que me da la fuerza y amor para ser mejor cada día. A mis abuelos Dora y Felipe por dejar en mí tanto amor y un ejemplo puro de honestidad. Muy especialmente agradezco a mi sobrina Sofía por su enseñanza de sabiduría, fortaleza, amor y alegría por la vida.

Agradezco a mi tutor Ramón, quien me ha dado dirección durante tantos años. Gracias por tu apoyo incondicional, por tu inteligencia y dedicación. Sin duda el mejor maestro que la vida pudo darme en todos los aspectos de mi vida. Me quedo con tu pasión y amor por lo que haces. Siempre serás parte de mí. Gracias a todos mis compañeros del laboratorio por su cariño y apoyo.

Agradezco a la Dra. Alicia por ser una mujer excepcional. Gracias por su amor y paciencia. Gracias por inspirarme a todo lo que una mujer puede lograr. Siempre estará en mi corazón. Gracias por el apoyo a todos los que trabajan en su laboratorio.

Agradezco profundamente a mis maestros. Todos han contribuido con su dedicación a construir la escalera que me ha hecho alcanzar mis objetivos. Mis triunfos son la suma de sus esfuerzos.

Agradezco a mis amigos por ser fuertes pilares en mi vida que nunca me dejan caer. Gracias por su amor incondicional. Un beso para el flaco.

¡Gracias especiales a Dios y a mis ángeles!

CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	9
RELACIÓN DE FIGURAS.....	11
RESUMEN.....	15
ABSTRACT.....	16

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 DISTROFIAS MUSCULARES.....	18
1.2 EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA.....	19
1.3 LOS SARCOGLICANOS.....	24
1.4 MEMBRANAS REGULADORAS DE CALCIO.....	27
1.5 COMPONENTES SG-SSPN EN MEMBRANAS REGULADORAS DE CALCIO.....	28
1.6 PROTEÍNAS SG-SSPN Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN HOMEOSTASIS DE CALCIO INTRACELULAR.....	31

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
---------------------------------	----

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS.....	36
----------------	----

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS.....	37
----------------	----

CAPÍTULO 5

METODOLOGÍA

5.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	38
5.2 ANIMALES.....	39
5.3 AISLAMIENTO DE FIBRAS MUSCULARES.....	39
5.4 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.....	39
5.5 PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS DE TÚBULOS TRANSVERSOS Y RETÍCULO SARCOPLÁSMICO.....	41
5.6 WESTERN BLOT.....	42
5.7 CAPTURA DE CALCIO.....	42
5.8 SALIDA PASIVA DE CALCIO.....	43
5.9 ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE SERCA1.....	43
5.10 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO.....	44
5.11 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN DE FIBRAS AISLADAS.....	45
5.12 REGISTROS DE CALCIO DE FIBRAS AISLADAS.....	45
5.13 PREPARACIÓN DE MÚSCULOS.....	46
5.14 PROTOCOLO DE FATIGA Y RECUPERACIÓN DE FATIGA.....	46

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 δ -SG3 SE LOCALIZA EN EL INTERIOR DE LAS FIBRAS MUSCULARES Y COLOCALIZA CON RYR Y SERCA1.....	47
6.2 LAS ISOFORMAS DE δ -SG, γ -SG y μ SPN SE LOCALIZAN EN MEMBRANAS DE TT Y RS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	52
6.3 AUMENTO EN CAPTURA Y SALIDA DE CALCIO EN MEMBRANAS PURIFICADAS DE RSL DE RATONES δ -SG KO EN COMPARACIÓN CON RATONES WT.....	57
6.4 LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE SERCA1 ESTÁ AUMENTADA EN RSL DE RATONES δ -SG KO.....	59
6.5 CAMBIO CONFORMACIONAL DE SERCA1 EN MEMBRANAS PURIFICADAS DE RSL DE RATONES δ -SG KO EN COMPARACIÓN CON RATONES WT.....	61
6.6 LAS FLUCTUACIONES DE FLUORESCENCIA DE LAS SEÑALES DE CALCIO SON SIMILARES EN FIBRAS MADURAS AISLADAS DE RATONES WT Y δ -SG KO.....	63
6.7 LA PRESENCIA O AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR NO CAUSA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN LAS SEÑALES DE CALCIO EN FIBRAS MUSCULARES AISLADAS DE RATONES δ -SG KO.....	67
6.8 EL BLOQUEADOR 2-APB NO CAUSA NINGÚN EFECTO EN LAS SEÑALES DE CALCIO EN FIBRAS MUSCULARES DE RATONES δ -SG KO.....	69
6.9 LOS MÚSCULOS EDL DE LOS RATONES δ -SG KO PRESENTAN RECUPERACIÓN PARCIAL DESPUÉS DE ESTIMULACIÓN CONSECUTIVA.....	72

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN.....	74
----------------	----

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES.....82

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS.....84

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS.....85

CAPÍTULO 11

ANEXO.....92

ABREVIATURAS

Act	Actina
2-APB	2-Aminoetoxidifenil borato
BMD	Distrofia muscular de Becker
BSA	Albúmina de suero bovino
$([Ca^{2+}]_i)$	Concentración intracelular de calcio
Cp	Calor específico
CSC	Calsecuestrina
Cy3	Carboximetil indocianina-3
DAPC	Complejo de proteínas asociadas a distrofina
DTAM	Duración total en la amplitud media
DHPR	Receptor de dihidropiridina
DI	Dominio indeterminado
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DUC	Dominio de unión a calcio
DUN	Dominio de unión a nucleótido
E-C	Acoplamiento excitación contracción
EDL	Extensor digitorum longus
FDB	Flexor digitorum brevis
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
KO	Knockout
LGMD	Distrofia muscular de cinturas
μ SPN	Microspan
ME	Matriz extracelular

MRC	Membranas reguladoras de calcio
MRCSS	Membranas reguladoras de calcio sarcoglicano-sarcospan
nNOS	Sintasa de oxido nítrico neuronal
RS	Retículo sarcoplásmico
RSH	Retículo sarcoplásmico pesado
RSL	Retículo sarcoplásmico ligero
RyR	Receptor de rianodina
SERCA1	ATPasa de Calcio
SFB	Suero fetal bovino
SG	Sarcoglicano
SL	Sarcolema
SOC	Store-operated channels
SSPN	Sarcospan
T _m	Temperatura de transición
TR	Triadina
TT	Túbulos transversos
ULC	Unidad liberadora de calcio

RELACION DE FIGURAS

Figura 1. Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC) presente en el sarcolema de las fibras de músculo esquelético.

Figura 2. Modelo de ensamblaje del complejo sarcoglicano. El complejo SG se ensambla tempranamente en la vía secretoria alrededor de un complejo nucleador formado por β y δ -SG. MEC: Matriz extracelular. Imagen tomada de Hack A et al., 2000.

Figura 3. Organización de las membranas reguladoras de calcio de TT y RS en fibras de músculo esquelético. Modificada de Rossi et al., 2008.

Figura 4. Localización de δ - y γ -SG en membranas reguladoras de calcio en músculo esquelético de ratón. Inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen: A) y E) α -SG, B) y F) β -SG, C) y G) δ -SG, D) y H) γ -SG. Imagen tomada de Ueda et al., 2001.

Figura 5. Inmunolocalización de δ -SG3 en criosecciones y fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. Doble inmunomarcaje de δ -SG3 (rojo) y β -DG (verde) en criosecciones de músculos de ratones A) WT y B) δ -SG KO. La tinción del sarcolema dada por β -DG se observa en ambos músculos, mientras que δ -SG3 está únicamente presente en WT. C) Inmunofluorescencia de δ -SG3 (rojo) usando fibras aisladas del FDB de ratones WT confirma el patrón estriado perpendicular al sarcolema (D). Los núcleos celulares se tiñeron usando Vectashield-DAPI (azul). Barra: 20 μ m.

Figura 6. Inmunolocalización de δ -SG3 y marcadores específicos de TT y RS por microscopía de 2 fotones. Utilizando músculos FDB de ratones WT se realizó la doble inmunofluorescencia para A) δ -SG3 y DHPR, B) δ -SG3 y RyR, C) δ -SG3 y SERCA1. La sobreposición de las imágenes muestra una colocación de la isoforma δ -SG3 con RyR y SERCA1.

Figura 7. Pruebas de pureza de las fracciones obtenidas por gradiente diferencial de sacarosa. A) Western blot de β -DG utilizando las fracciones de TT, RSL y RSH. La señal se observa únicamente en la fracción de TT del ratón δ -SG KO, lo cual podría indicar una contaminación de sarcolema en dicha fracción. Sin embargo, los componentes del complejo SG-SSPN están ausentes en el sarcolema del ratón KO debido a la deficiencia secundaria de los componentes como resultado de la deficiencia primaria de δ -SG. Por lo tanto esta contaminación no interfiere con nuestros experimentos. B) Western blot de DHPR, RyR y SERCA1 en diferentes fracciones de los microsomas musculares después del gradiente de sacarosa. DHPR se observa en TT, SERCA1 se ve enriquecida en RSL y RyR se observa en RSH en ambos ratones.

Figura 8. Localización de δ -SG1, δ -SG3, γ -SG y μ SPN en membranas purificadas de TT y RS. Las membranas fueron obtenidas de los músculos esqueléticos de ratones WT y δ -SG KO. A) La fracción purificada de TT fue analizada con anticuerpos específicos para DHPR, δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN. DHPR es un marcador de TT. δ -SG1 y γ -SG se encuentran en el ratón WT, pero ausentes en el distrófico. B) La fracción RSL fue

analizada con anticuerpos específicos para SERCA1, δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN. SERCA1 está enriquecida en RSL. Todos los SGs y μ SPN están presentes en el ratón WT, pero ausentes en el ratón KO. C) La fracción RSH fue analizada con anticuerpos específicos para RyR, triadina, calsecuestrina, δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN. RyR, triadina y calsecuestrina se encuentran en RSH. Triadina y calsecuestrina se observan un poco disminuidas en el δ -SG KO. δ -SG3 está presente en el ratón WT, pero está ausente en el distrófico. μ SPN se observa en el ratón WT, pero está casi ausente en el δ -SG KO.

Figura 9. Captura de calcio dependiente de ATP y salida pasiva de calcio en vesículas de RSL de ratones WT y δ -SG KO como función del tiempo. Los experimentos se realizaron con vesículas aisladas de animales WT (●) y δ -SG KO (○), respectivamente. A) Transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP con alícuotas de RSL. La captura de calcio en los músculos de los ratones KO incrementa al doble en relación con los controles WT después de 30 minutos de reacción. B) Salida pasiva de calcio normalizada con alícuotas de RSL. A los 30 minutos se observa una salida del 30% y 90% para WT y KO, respectivamente. La salida se ve disminuida al utilizar el inhibidor específico tapsigargina en las vesículas de ratones WT (▲) y δ -SG KO (△), respectivamente.

Figura 10. Actividad hidrolítica de la ATPasa de calcio aislada de vesículas de RSL de ratones WT y δ -SG KO como función del tiempo. Los experimentos se realizaron con vesículas de animales WT (●) y δ -SG KO (○) respectivamente. La actividad a los 30 minutos fue de 7.64 μ moles P_i /mg de proteína para el ratón WT y 12.42 μ moles P_i /mg de proteína para el ratón δ -SG KO. La actividad hidrolítica en presencia del inhibidor específico tapsigargina se ve disminuida en vesículas de ratones WT (▲) y δ -SG KO (△), respectivamente.

Figura 11. Perfiles de calorimetría diferencial de barrido (C_p vs temperatura) de A) RSL aislado de ratones WT y B) RSL aislado de ratones δ -SG KO. Las membranas de RSL fueron escaneadas con un incremento de temperatura de 1°C/min. El pico DUN corresponde al dominio de unión a nucleótido, el pico DUC corresponde al dominio de unión a calcio y los picos marcados con asterisco son dominios estructurales indeterminados.

Figura 12. Señales de Ca^{2+} en fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. A) Registros de fluorescencia $\Delta F/F$ fluo-3 de una fibra muscular aislada de ratones WT y δ -SG KO. El tétanos es precedido por una sacudida simple. B) Gráfica con valores promedio $\Delta F/F$ de los registros de ratones WT (barras blancas) y δ -SG KO (barras negras). C) Izquierda: valores promedio de la proporción $(\Delta F/F_{\text{tet}})/(\Delta F/F_{\text{SS}})$ de fibras WT (barras blancas) y δ -SG KO (barras negras). Derecha: Valores promedio de DTAM de la sacudida simple de fibras WT (barras blancas) y δ -SG KO (barras negras). No existen diferencias significativas.

Figura 13. Señales de Ca^{2+} con estimulación repetitiva y recuperación en fibras aisladas. A) Señales de fluorescencia de una fibra aislada de ratones WT y δ -SG KO con estimulación repetitiva. Los segmentos sin fluorescencia se hicieron para evitar fototoxicidad, pero la estimulación eléctrica fue realizada durante todo el tiempo. B)

Registros de las señales $\Delta F/F$ del primer y último registro de SS y tétanos de A en una escala de tiempo expandida. C) Valores promedio de los picos $\Delta F/F$ de SS y tétanos como función del tiempo de fibras aisladas de ratones WT (\circ) y δ -SG KO (\bullet). La caja rayada indica la duración del protocolo de estimulación. La flecha indica el inicio de la recuperación. La línea punteada indica el valor promedio del valor del pico tetánico $\Delta F/F$ de las fibras WT al final de los ciclos de estimulación (n=4).

Figura 14. Influencia del Ca^{2+} extracelular en las señales de calcio de SS y tétanos en fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. Cada panel (A-D) ilustra el primer y último registro de fluo-3 Ca^{2+} durante ciclos de estimulación de experimentos separados. (A,C) Fibras WT en presencia (A) y ausencia (C) de calcio extracelular. (B,D) Corresponden a los registros de las fibras KO. La escala de tiempo es la misma para los paneles A-D. (E,F) Gráficas de los valores promedio del pico $\Delta F/F$ de la SS y tétanos como función del tiempo en las soluciones libres de calcio. La caja rayada indica el periodo de aplicación de los ciclos de estimulación. La flecha indica el inicio de la recuperación. (E) y (F) resultados de fibras WT (\circ) y δ -SG KO (\bullet). La línea punteada en F es el valor promedio del decline final de los valores $\Delta F/F$ tetánicos de las fibras musculares WT en solución con calcio extracelular de la Figura 13.

Figura 15. Influencia de 2-APB en las señales de Ca^{2+} durante SS y tétanos en fibras musculares de ratones WT y δ -SG KO durante actividad prolongada. A) Registros $\Delta F/F$ de fluorescencia de una fibra muscular aislada WT en presencia de 2-APB. B) Registros correspondientes a una fibra muscular aislada δ -SG KO. La amplitud y escala de tiempo es la misma para A y B. C) Las barras representan los valores promedio de los picos $\Delta F/F$ de la última señal tetánica (\diamond) de experimentos realizados en la ausencia (control) o en la presencia de 2-APB, como en A y B. Barras blancas son de experimentos con fibras WT y barras negras con KO (n=7-10). Las diferencias en los valores de los picos $\Delta F/F$ entre el control y los experimentos con 2-APB son significativos únicamente para las fibras WT (*)($P > 0.05$).

Figura 16. Fatiga y recuperación en músculos EDL de ratones WT y δ -SG KO. A) Protocolo de fatiga y recuperación. La fatiga es obtenida después de estimulación tetánica y la recuperación después de un periodo de reposo. B) Fuerza normalizada obtenida del experimento de fatiga con músculos de ratones WT (\bullet) y δ -SG KO (\circ). La pérdida de fuerza del 70% fue alcanzada en ambos músculos al mismo tiempo (70 seg), siendo 77mN para el WT y 67 mN para el δ -SG KO. C) Porcentaje de recuperación después del protocolo de fatiga con intervalos de reposo de 5 min entre estimulaciones para el WT (\bullet) y el δ -SG KO (\circ).

Figura 17. Modelo de la posible participación del complejo MRC SG-SSPN (MRCSS) en la patogénesis de la distrofia muscular. El diagrama esquemático ilustra las diferencias en el manejo de Ca^{2+} en el músculo de ratones WT (A) y δ -SG KO (B). La deficiencia primaria de δ -SG lleva a la ausencia del complejo SG-SSPN en sarcolema (SL), el cual estabiliza al complejo DAPC. Basado en la evidencia presentada en este trabajo, encontramos que además en las membranas reguladoras de calcio (MRC) (Túbulos transversos, TT y

retículo sarcoplásmico, RS) la deficiencia primaria de δ -SG lleva a la ausencia de MRCSS. Este complejo alternativo podría estar formado por las isoformas de δ -SG, γ -SG y μ SPN, sin embargo la combinación depende de la fracción membranal y por esa razón proponemos subtipos de complejos (MRCSS_{TT}, MRCSS_{RSL}, MRCSS_{RSH}). En el caso de los animales distróficos, la ausencia de este posible complejo alternativo CRMSSRSL afecta la estructura y función de SERCA1 sugiriendo que esto podría ser otra fuente que afecta la homeostasis de Ca²⁺ y contribuye a la patogénesis de la distrofia muscular. Triadina (TR) y calsecustrina (CSC) aparecen un poco disminuidos en comparación con el control. También indicado en el modelo: Matriz extracelular (ME), distrofina (Dis), actina (Act), receptor de dihidropiridina (DHPR) y receptor de rianodina (RyR).

RESUMEN

Los sarcoglicanos (SG) y sarcospan (SSPN) son proteínas transmembranales que pertenecen al complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC, de sus siglas en inglés). Mutaciones en los genes que codifican para los SGs causan distintas formas hereditarias de distrofia muscular. En este estudio, utilizando membranas purificadas de ratones wild type (WT) y δ -SG knockout (KO), encontramos la localización específica de las isoformas SG-SSPN en membranas de túbulos transversos (TT) y retículo sarcoplásmico (RS) de músculo esquelético. Mediante Western blot se mostró que la ausencia de las isoformas de δ -SG en TT y RS resulta en una deficiencia secundaria de γ -SG y μ SPN; un fenómeno comparable a lo que ocurre en sarcolema con el complejo SG-SSPN. Aunado a esto, nuestros resultados muestran un aumento en la toma y salida de calcio, así como en la actividad hidrolítica de SERCA1 en los ratones δ -SG KO comparados con los WT. Así mismo, encontramos por análisis de calorimetría, un cambio conformacional de SERCA1 aislada del músculo de los animales δ -SG KO. Por otra parte, utilizando un marcador fluorescente sensible a calcio en fibras aisladas musculares se determinó que los SOC (del inglés store-operated channels) de los ratones δ -SG KO presentan una deficiencia en el abastecimiento de calcio en los reservorios intracelulares. Finalmente para completar el análisis, examinamos las propiedades mecánicas de los músculos WT y δ -SG KO. En el caso de los animales δ -SG KO encontramos una disminución en recuperación después de fatiga en comparación con los ratones WT. A partir de las evidencias experimentales proponemos, por primera vez, que las isoformas de δ -SG podrían

estabilizar la localización de γ -SG y μ SPN en membranas de TT y RS y que este potencial complejo podría participar en el mantenimiento de un nivel estable de concentración de calcio citosólico en músculo esquelético. Nuestros datos demuestran alteraciones en el manejo de calcio y en las propiedades mecánicas del músculo distrófico, lo cual es un factor que contribuye de manera importante a la fisiopatología de la distrofia muscular.

ABSTRACT

Sarcoglycans (SGs) and sarcospan (SSPN) are transmembrane proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. Mutations in the genes encoding the SGs cause many inherited forms of muscular dystrophy. In this study, using wild type (WT) and δ -SG knockout (KO) purified membranes, we found the specific localization of the SG-SSPN isoforms in transverse tubules (TT) and sarcoplasmic reticulum (SR) membranes of skeletal muscle. Immunoblotting revealed that the absence of δ -SG isoforms in TT and SR results in a secondary deficiency of γ -SG and μ SPN, a phenomenon comparable to what occurs in the sarcolemma with the SG-SSPN complex. Our results show augmented calcium uptake, calcium release and hydrolytic activity of SERCA1 in KO compared to WT mice. In fact, we found a conformational change in SERCA1 isolated from KO muscle as demonstrated by calorimetric analysis. Furthermore, using a sensitive calcium fluorescent marker in isolated muscle fibers we determined that the δ -SG KO store-operated channels

(SOC) have a deficiency in the refilling of the intracellular stores. Finally to complete the analysis, we examined the mechanical properties of WT and KO muscle. We found in KO a decreased fatigue recovery comparing to WT. Taken together, our observations suggest for the first time that the δ -SG isoforms could stabilize the expression of γ -SG and μ SPN in the TT and SR membranes and that this possible complex might have a role in the maintenance of a stable level of resting cytosolic calcium concentration in skeletal muscle. Our data demonstrate Ca^{2+} mishandling and alterations in the mechanical properties within dystrophic muscle, which is a contributing factor in the physiopathology of muscular dystrophy.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 DISTROFIAS MUSCULARES

Las distrofias musculares son un grupo de enfermedades hereditarias que son clínica y genéticamente heterogéneas. Se caracterizan por mostrar procesos de degeneración y regeneración del músculo, infiltrado de tejido conectivo y adiposo, diámetro irregular las de fibras musculares y concentración elevada de creatina cinasa en suero (Bushby 1999; Comerlato et al., 2005). Genéticamente, el patrón de herencia puede estar ligado al cromosoma X de forma recesiva como en la distrofia muscular de Duchenne o Becker (DMD/BMD), autosómica dominante como en la distrofia muscular de cinturas tipo 1 (LGMD) o autosómica recesiva como en la distrofia muscular de cinturas tipo 2. La DMD es el tipo más común de distrofia muscular y afecta aproximadamente a 1 de cada 3,500 varones, mientras que las distrofias musculares de cintura afectan a 1 de cada 20,000 (Campbell, 1995; Straub & Campbell, 1997; Lim & Campbell, 1998; Bushby, 1999). Clínicamente, los pacientes con DMD manifiestan signos y síntomas de la enfermedad en la niñez (~3 años) y mueren en la segunda década de vida como resultado de falla respiratoria o cardíaca, mientras que pacientes con BMD presentan debilidad moderada en la etapa adulta y podrían tener periodos de vida normales. Las distrofias musculares de cintura presentan un comienzo del fenotipo y progresión variable, pero su característica principal es la afectación inicial de los músculos de hombros y cadera. En general, tenemos que las distrofias musculares pueden o no estar asociadas a cardiomiopatía dilatada (Durbeej &

Campbell, 2002). Varias de estas enfermedades musculares son el resultado de la deficiencia de algún componente del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC).

1.2 EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA

El DAPC es un complejo multimérico que fue aislado por primera vez de membranas de músculo esquelético (Ervasti and Campbell, 1991). El DAPC se encuentra en el sarcolema de miocitos de corazón, músculo esquelético y músculo liso (Ervasti et al., 1990; Yoshida & Ozawa, 1990; Yoshida et al., 1994) y constituye un puente de conexión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto. Como funciones de este complejo se incluyen protección contra el daño inducido por la contracción y también se ha sugerido que podría participar en vías de transducción de señales (Cohn & Campbell, 2000; Rando 2001).

La distrofina es una proteína de citoesqueleto de 427 kDa de peso molecular y es codificada por un gen de 79 exones (Ervasti y Campbell, 1993). Mutaciones en el gen de distrofina resultan en la distrofia muscular DMD/BMD (Monaco et al., 1986; Burghes et al., 1987). La distrofina se divide en cuatro regiones principales. Una región amino terminal con similitud a α -actinina, la cual se encuentra unida a los filamentos de actina del citoesqueleto (Rybakova et al., 2000). Una región central en forma de bastón que se compone de 24 secuencias repetidas similares a espectrina, dentro de esta región las secuencias repetidas del 11 al 17 constituyen un segundo sitio de unión a actina (Rybakova et al., 2002). Una región rica en cisteínas que interactúa con la parte intracelular de la proteína transmembranal β -

distroglicano anclando a la distrofina al sarcolema (Lapidos et al., 2004). Finalmente, una región carboxilo terminal que contiene varios sitios de unión a proteínas y participa en la interacción con las sintrofinas (Ahn et al., 1995; Suzuki et al., 1995). El gran complejo DAPC consiste de subcomplejos más pequeños como lo son el subcomplejo distroglicano, el subcomplejo sarcoglicano sarcospan (SG-SSPN) y el subcomplejo citoplasmático de sintrofinas y distrobrevinas (Ervasti et al., 2008) (Figura 1).

El subcomplejo distroglicano constituye la parte central del DAPC que conecta a los componentes del citoesqueleto con la matriz extracelular. El distroglicano es codificado en un solo gen. Al sintetizarse, es procesado postraduccionalmente para producir una proteína periférica y una proteína transmembranal llamadas α - y β -distroglicano respectivamente (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). El β -distroglicano posee una masa molecular de 43 kDa y tiene un solo segmento transmembranal. Su carboxilo terminal interactúa con el dominio rico en cisteínas de la distrofina. La caveolina 3 también interactúa con el β -distroglicano y podría competir por el mismo sitio de unión que la distrofina (Sotgia et al., 2000). A través de su extremo amino terminal, el β -distroglicano interactúa con el α -distroglicano.

El α -distroglicano posee una masa molecular de 156 kDa y forma una importante conexión con la matriz extracelular a través de su interacción con la cadena α_2 de la laminina 2 (Henry & Campbell, 1999).

En el subcomplejo citoplasmático encontramos a las sintrofinas α_1 , β_1 y β_2 , las tres con una masa molecular de 58 kDa (Suzuki et al., 1995) y presentan 50% de

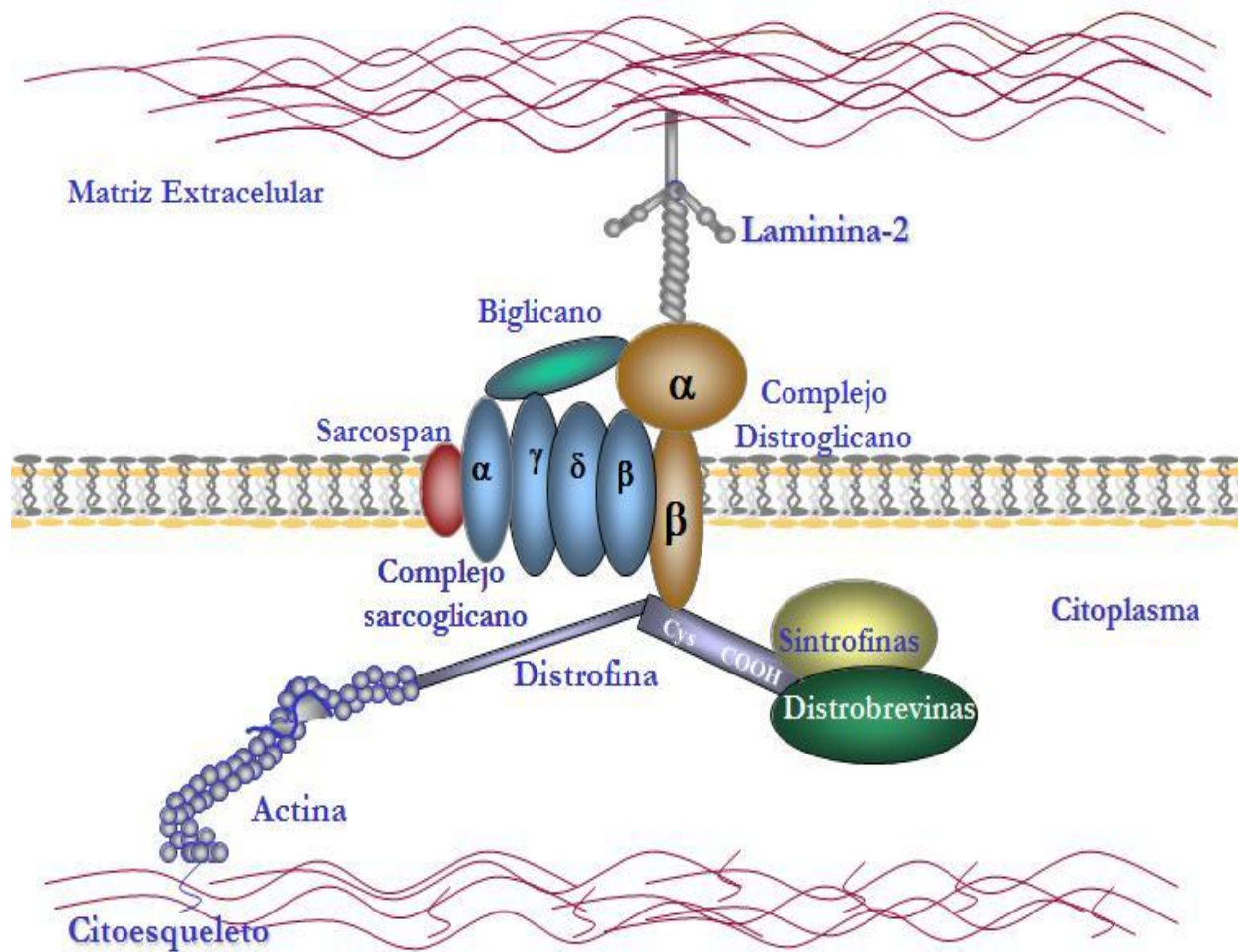


Figura 1. Complejo de Proteínas Asociadas a Distrofina (DAPC) presente en el sarcolema de las fibras de músculo esquelético.

similitud entre ellas a nivel de secuencia primaria. Las sintrofinas son codificadas por diferentes genes (Adams et al., 1995; Ahn et al., 1996).

Las tres proteínas son expresadas en músculo estriado, siendo la sintrofina $\alpha 1$ la de mayor nivel de expresión en este tejido, encontrándose mayoritariamente concentrada en las uniones neuromusculares (Peters et al., 1997). Se sabe que las sintrofinas tienen interacción con la distrofina y que ésta es regulada por calmodulina (Newbell et al., 1997) y por fosforilación de una región del dominio carboxilo terminal de la distrofina (Milner et al., 1993), lo cual sugiere la participación de estas proteínas en procesos de transducción de señales (Michalak et al., 1996). Además tenemos que cada sintrofina presenta un dominio PDZ que se sabe facilita la homo- y heterodimerización de proteínas con esta secuencia. Entre las asociaciones conocidas mediadas por el dominio PDZ de las sintrofinas se encuentra la asociación con la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), localizando a esta molécula de señalización en el sarcolema (Brenman et al., 1996).

Mutaciones en los genes de sintrofinas no han sido asociadas a enfermedades como las distrofias musculares. Sin embargo, en modelos KO deficientes en $\alpha 1$ sintrofina, aunque no muestran ninguna patología muscular si se aprecian anomalías como la ausencia de nNOS en el sarcolema (Kameya et al., 1999), la reducción secundaria de utrofina en las uniones neuromusculares y una reducción del receptor de acetilcolina y de la acetilcolinesterasa (Adams et al., 2000).

Otras proteínas que forman parte del complejo citoplasmático son la distrobrevina α de 80 kDa y la distrobrevina β de 59 kDa (Yoshida et al., 1994; Blake et al., 1996). Estas proteínas se encuentran en una gran variedad de tejidos, sin embargo la que se ha encontrado en músculo esquelético en particular es la distrobrevina α , principalmente en la unión neuromuscular (Blake et al., 1996). Las distrobrevinas tienen una región con alta similitud a la región carboxilo terminal de la distrofina, la cual presenta sitios ricos en tirosinas que podrían ser blancos de fosforilación (Balasubramanian et al., 1998). Esta región además permite la interacción con distrofina y sintrofinas (Sadoulet-Puccio et al., 1997). En humanos no se han detectado mutaciones en distrobrevinas que se asocien a distrofia muscular. Sin embargo, en el modelo murino que carece de distrobrevina α se observó distrofia muscular de severidad media, aunque no se presentó deficiencia en el DAPC (Grady et al., 1999).

Finalmente, tenemos al tercer componente del DAPC, el subcomplejo SG-SSPN que está compuesto por una familia de proteínas llamadas sarcoglicanos (SG) α (50 kDa), β (43 kDa), γ (35 kDa), δ (35 kDa), ϵ (50 kDa) y ζ (40 kDa) (Campbell et al., 1995) y una proteína de la familia tetraspan llamada sarcospan (SSPN) (25 kDa) (Crosbie et al., 1999). Este complejo SG-SSPN se piensa que estabiliza la interacción de α y β distroglicano, así como la interacción de distrofina y β distroglicano (Ozawa et al., 2005). En el caso de los SGs α y γ su expresión se encuentra restringida al músculo estriado, mientras que los SGs β , δ , ϵ y ζ además de expresarse en el músculo esquelético, cardíaco y liso también se expresan en otros tejidos no musculares (Rando 2001). Las mutaciones en los genes que

codifican para los SGs α , β , γ y δ se asocian a distrofias musculares de cintura autosómicas recesivas (Hack et al., 2000a), y en el caso particular de mutaciones en los genes de β -, γ - y δ -SGs, se ha encontrado que también causan cardiomiopatía dilatada (Sakamoto et al., 1997, Coral-Vazquez et al., 1999). Por otra parte las mutaciones en ε -SG se vinculan a la patología neurológica distonía mioclónica (Nishiyama et al., 2004).

1.3 LOS SARCOGLICANOS

Los SGs son proteínas que poseen un corto dominio intracelular, un solo dominio transmembranal y un largo dominio extracelular con múltiples sitios de N-glicosilación y residuos de cisteína conservados a través de las especies (McNally et al., 1996). Estas proteínas comparten un alto grado de conservación y se ha sugerido que son el resultado de múltiples eventos de duplicación genética (Lapidos et al., 2004). En el caso de los SGs α y ε tenemos que sus genes tienen una estructura intrón-exón idéntica y poseen un 60% de similitud a nivel de aminoácidos (Ettinger et al., 1997). En el caso de los SGs δ , γ y ζ tenemos que sus genes tienen una estructura intrón-exón idéntica y tienen un 70% de similitud a nivel de aminoácidos (Hack et al., 2000a). β -SG tiene muy baja similitud con respecto a los demás SGs (Lapidos et al., 2004).

Los sarcoglicanos α y ε son proteínas transmembranales tipo I con la región carboxilo terminal en el lado intracelular y el amino terminal en la parte extracelular. En contraste, tenemos que los demás sarcoglicanos son proteínas transmembranales tipo II con la región carboxilo terminal en la parte extracelular y

el amino terminal en el lado intracelular (Hack et al., 2000a). Los SGs cuentan además con sitios potenciales de fosforilación en su dominio citoplasmático, que en el caso de α y γ se ha comprobado la fosforilación in vitro en residuos de tirosinas, por lo cual se cree que participan en procesos de transducción de señales (Campbell 1995b). Además, se ha sugerido una interacción del complejo SG-SSPN con una proteína denominada filaminina-2, la cual es miembro de una familia de proteínas implicadas en procesos de transducción de señales en distintos tipos celulares (Thompson et al., 2000). Otra proteína que interactúa con el complejo SG-SSPN es el biglicano, el cual se une a α y γ -SG y se ha propuesto que regula su expresión en distintas etapas del desarrollo (Rafii et al., 2006).

El complejo SG se ensambla tempranamente en la vía secretoria alrededor de un complejo nucleador formado por β y δ -SG (Figura 2). A un nivel molecular, la pérdida de δ -SG lleva a una completa ausencia de α , β , γ y ε -SG, a pesar de niveles normales de transcripción. En contraste, una mutación en γ -SG reduce, pero no elimina la presencia de α -, β -, δ - y ε -SG (Hack et al., 2000b).

La localización de los componentes del complejo SG-SSPN se pensaba que era exclusiva de sarcolema de la fibra muscular, sin embargo nueva evidencia demostró la localización de estas proteínas en las membranas reguladoras de calcio (Ueda et al., 2001; Miller et al., 2006).

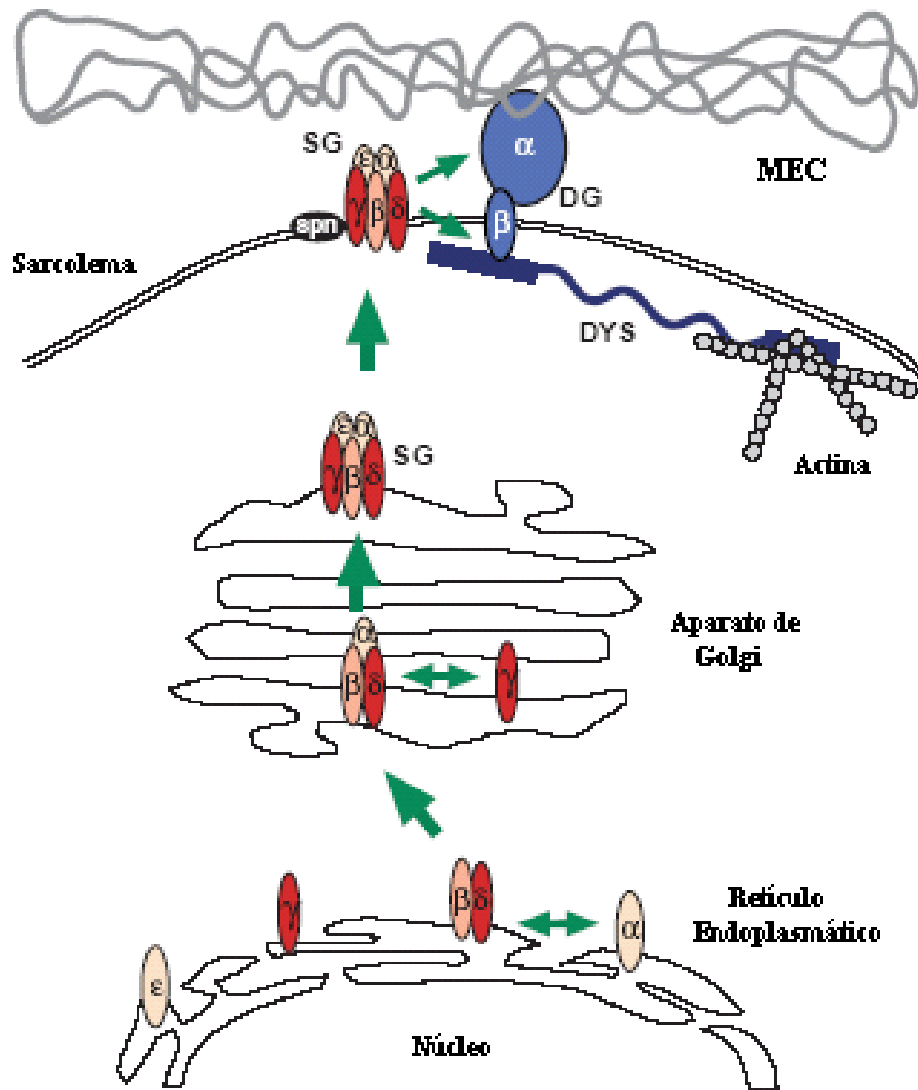


Figura 2. Modelo de ensamblaje del complejo sarcoglicano. El complejo SG se ensambla tempranamente en la vía secretoria alrededor de un complejo nucleador formado por β y δ -SG. MEC: Matriz extracelular. Imagen tomada de Hack A et al. 2000.

1.4 MEMBRANAS REGULADORAS DE CALCIO

Las fibras musculares poseen sistemas membranales conocidos como membranas reguladoras de calcio entre las que tenemos a los túbulos transversos (TT) y al retículo sarcoplásmico (RS) que juegan un papel primordial para el funcionamiento del músculo (Porter y Palade 1957). El RS puede ser dividido por lo menos en dos dominios, uno llamado RS longitudinal y el RS de unión. El RS longitudinal está formado por numerosos túbulos interconectados que forman una red alrededor de la miofibrilla. En sus extremos, los túbulos longitudinales se unen en un saco dilatado llamado cisterna terminal. Dos cisternas terminales (RS unión) y un TT forman la triada. El RS longitudinal y de unión muestran una organización espacial específica con respecto a las miofibrillas, siendo alineadas regularmente con regiones específicas de los sarcómeros. En el músculo esquelético de mamíferos, el RS longitudinal rodea a las bandas A e I del sarcómero, mientras que el RS de unión se encuentra en las uniones de la banda A e I (Franzini-Armstrong 2004; Rossi et al., 2008) (Figura 3). Para sincronizar la liberación de calcio del RS con la despolarización de la membrana plasmática (un mecanismo llamado acoplamiento Excitación-Constracción (E-C)), los TT entran a la fibra de músculo esquelético y se asocian con el RS en triadas. En los TT se encuentran agrupados los receptores de dihidropiridina (DHPR) dependientes de voltaje en relación precisa con los receptores de rianodina (RyR) localizados en la parte de unión de la cisterna terminal del RS. Cada RyR se asocia con cuatro DHPR (Rossi et al., 2009). De manera general, en músculo esquelético, tenemos que un potencial de acción es generado a través de la membrana de las fibras en respuesta a los receptores de acetilcolina. Este potencial de acción se propaga a

través de los TT donde se activan los DHPR que son sensibles a voltaje. La señal de activación se transmite a los RyR resultando en un cambio conformacional que abre el canal y se libera calcio del RS. La concentración de calcio en citoplasma aumenta considerablemente y eso permite que se lleve a cabo el proceso de contracción. El calcio es bombeado de regreso a RS por medio de la ATPasa de calcio (SERCA1) (Dulhunty, 2006).

1.5 COMPONENTES SG-SSPN EN MEMBRANAS REGULADORAS DE CALCIO

Los componentes del complejo SG-SSPN se pensaba que eran exclusivos de la membrana plasmática de las fibras musculares. Sin embargo, Ueda y colaboradores en el 2001 presentaron evidencia que demuestra que δ y γ -SG se localizan no sólo en sarcolema, sino también en el interior de las fibras de músculo esquelético en membranas reguladoras de calcio y al parecer la expresión de ambos SGs es independiente de la deficiencia de distrofina (Ueda et al., 2001) (Figura 4).

En el 2006 se identificó una nueva isoforma de δ -SG, la cual fue llamada δ -SG3 que también se localiza en RS (Estrada et al., 2006). A la fecha tres isoformas de delta sarcoglicano, δ -SG1, δ -SG2 y δ -SG3, han sido identificadas.

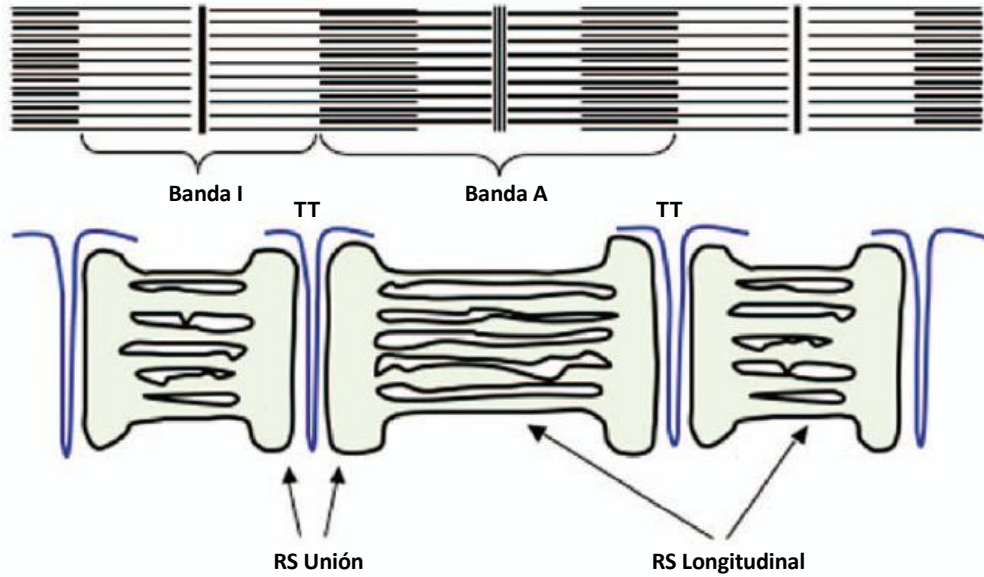


Figura 3. Organización de las membranas reguladoras de calcio de TT y RS en fibras de músculo esquelético. Modificada de Rossi et al., 2008.

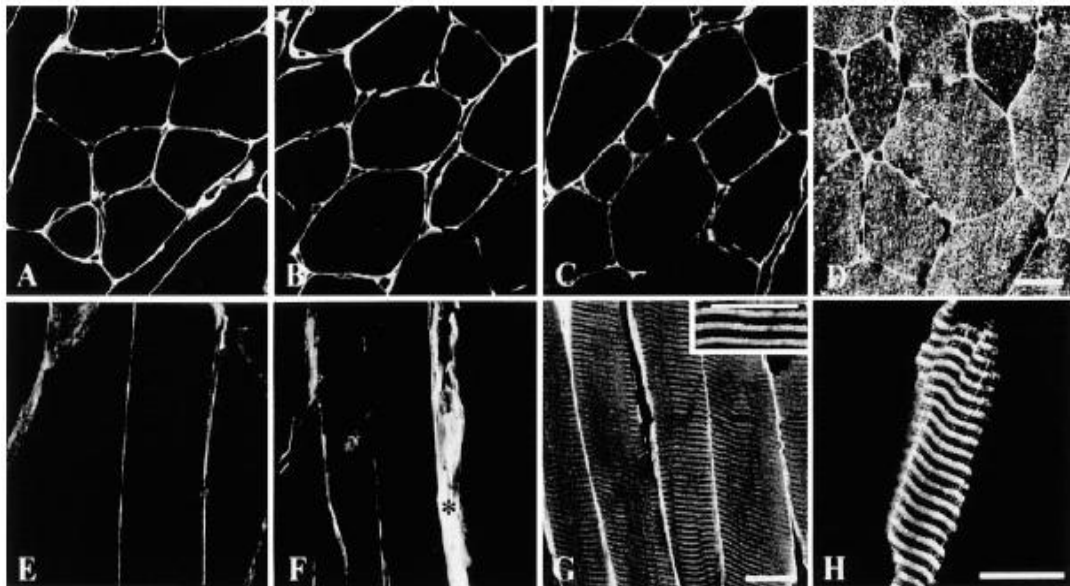


Figura 4. Localización de δ - y γ -SG en membranas reguladoras de calcio en músculo esquelético de ratón. Inmunofluorescencia con anticuerpos que reconocen: A) y E) α -SG, B) y F) β -SG, C) y G) δ -SG, D) y H) γ -SG. Imagen tomada de Ueda et al., 2001.

El transcrito de δ -SG1, contiene 9 exones que son traducidos en una proteína transmembranal de 35 kDa con 290 aminoácidos (Nigro et al., 1996; Jung et al., 1996) mientras que el transcrito de δ -SG2 carece del exón 9, termina en el intrón 8 y codifica para una proteína con un carboxilo terminal distinto, intercambiando los últimos 57 aminoácidos de δ -SG1 por 23 aminoácidos nuevos (Leiden Muscular Dystrophy pages, <http://www.dmd.nl/>). La isoforma δ -SG3, es originada por un procesamiento alternativo del transcrito de δ -SG y tiene 10 aminoácidos nuevos en el carboxilo terminal que sustituyen a los últimos 122 aminoácidos de la isoforma δ -SG1 (Estrada et al., 2006). Únicamente las isoformas δ -SG1 y δ -SG3 han sido encontradas en las membranas reguladoras de calcio.

El trabajo presentado por Ueda y colaboradores (2001) es muy relevante al mostrar la localización de componentes del complejo SG-SSPN en membranas reguladoras de calcio. Sin embargo dado que sus resultados están basados en microscopías y a que las estructuras de TT y RS se encuentran muy cercanas físicamente no es posible concluir con certeza en cual de estas dos membranas se localiza cada proteína. Además, el anticuerpo utilizado para sus experimentos reconoce la parte amino terminal de las isoformas de δ -SG, por lo que no es posible tampoco diferenciar entre las isoformas δ -SG1 y δ -SG3.

Por su parte, Miller y colaboradores dieron a conocer la existencia de una isoforma de SSPN que se localiza en membranas de RS. Esta isoforma, llamada microspan (μ SPN), tiene dos dominios transmembranales y un nuevo carboxilo terminal en relación con SSPN. Esta isoforma no se ve afectada por la deficiencia de distrofina. Los autores también demostraron que la sobreexpresión de μ SPN

provoca una dramática perturbación en la estructura de la triada (Miller et al., 2006).

1.6 PROTEÍNAS SG-SSPN Y SU POSIBLE PARTICIPACIÓN EN HOMEOSTASIS DE CALCIO INTRACELULAR

En las distrofias musculares la degeneración muscular se ha atribuido principalmente a defectos de membrana al presentarse una mayor fragilidad ante el estrés mecánico y a una homeostasis alterada de calcio (Fong et al., 1990; Robert et al., 2001).

Se ha propuesto que la pérdida de la homeostasis intracelular de calcio en los pacientes es un proceso temprano que inicia la activación de las proteasas dependientes de calcio (Turner et al., 1991, 1993; Bakker et al., 1993). La inhibición de la proteólisis al cultivar células musculares en presencia de leupeptina previene el aumento en la probabilidad de apertura de los canales permeables a calcio en células mdx (Turner et al., 1993). Los resultados anteriores llevan a la hipótesis de la existencia de un ciclo de retroalimentación positiva entre la activación de los canales permeables a calcio de sarcolema y la proteólisis contribuyendo a la necrosis muscular. En el caso de la deficiencia de distrofina se ha demostrado que las células de los ratones mdx experimentan rupturas transitorias en el sarcolema con mucha frecuencia, especialmente durante el ejercicio (Clarke et al., 1993). También se ha demostrado que estas rupturas locales de la membrana contribuyen a incrementar la probabilidad de apertura de los canales permeables a calcio (McCarter et al., 2000). Sin embargo, algunos

grupos de investigación no concuerdan con la idea de un incremento drástico en los niveles de calcio totales en citoplasma (Gailly et al., 1993; Pressmar et al., 1994; Collet et al., 1999) y debido a ello se ha planteado la posibilidad de que el incremento en la concentración de calcio no es global, sino que está restringido a dominios subsarcolemales en las fibras distróficas (Mallouk et al., 2000; McCarter et al., 2000).

La presencia de diferentes componentes SG-SSPN en las membranas reguladoras de calcio abre también la posibilidad de investigar si la alteración de la homeostasis podría estar relacionada con estas membranas, sin embargo aún no se tiene mucha evidencia al respecto. En relación a este tema, tenemos que existen varios modelos animales que permiten explorar esta posibilidad.

El hámster BIO 14.6 y el ratón KO deficiente en el gen *sgcd* que codifica para todas las isoformas de δ -SG, presentan características histológicas de distrofia muscular. Además estos animales presentan cardiomiopatía dilatada y problemas de constricción vascular (Straub et al., 1998; Coral-Vazquez et al., 1999; Hack et al., 2000). La histopatología de músculo esquelético es similar a la distrofia muscular de cinturas que se presenta en humanos, por lo tanto estos modelos son muy valiosos para la investigación biomédica básica y clínica.

Con relación a estudios de calcio, se ha observado en miotubos de hamsters BIO14.6, una homeostasis intracelular de Ca^{2+} anormal. De hecho, la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) en los miotubos BIO14.6 es mayor en comparación con los controles normales aún en el estado de reposo. La elevada $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aparentemente podría deberse a una alteración en vías de entrada de Ca^{2+} a través del sarcolema, sin embargo, este resultado también fue observado al

utilizar un medio extracelular con muy baja concentración de calcio (Iwata et al., 2005).

Los resultados mencionados anteriormente en los modelos animales nos sugieren una participación de los componentes SG-SSPN de las membranas reguladoras de calcio en la homeostasis de calcio intracelular.

CAPÍTULO 2

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El complejo SG-SSPN se describió inicialmente en el sarcolema del músculo esquelético y se determinó que estaba conformado por α -, β -, γ -, δ -SG y SSPN. Dada su asociación con el complejo mayor DAPC, se le adjudicó inicialmente una función meramente estructural. Sin embargo, en años posteriores se determinó que en el sarcolema del músculo esquelético coexisten al menos dos complejos SG-SSPN, el ya mencionado y otro en el que ε -SG sustituye a α -SG. Aunado a esto, recientemente se identificó otro componente del complejo SG-SSPN, ζ -SG. Todos estos trabajos, junto con otros, han puesto de manifiesto que las proteínas del complejo SG-SSPN pueden formar diferentes complejos que se ha sugerido pueden tener diversas funciones, además del papel estructural. Dentro de estas funciones se encuentran la transducción de señales, proliferación y adhesión. En 2001 Ueda y colaboradores demostraron que δ -SG1 y γ -SG, se localizan también fuera del sarcolema, en retículo sarcoplásmico y que esta expresión es independiente del complejo DAPC. En nuestro grupo de trabajo, hemos identificado una isoforma nueva de δ -SG, que denominamos δ -SG3. La isoforma δ -SG3, se produce por un procesamiento alternativo que deja parte del intrón 5 en el extremo 3' de la secuencia del exón 5. La secuencia predicha del péptido de la isoforma δ -SG3, conserva la porción N-terminal, el dominio transmembranal, pierde los últimos 77 aminoácidos de la porción C-terminal y en su lugar tiene diez aminoácidos nuevos. Nuestros experimentos de doble inmunofluorescencia con el antisuero anti δ -SG3 y un anticuerpo policlonal que

reconoce la porción C-terminal de δ -SG1, sugieren que ambas isoformas δ -SG3 y δ -SG1 están localizadas en el RS. Además, la doble inmunofluorescencia con anticuerpos para δ -SG3 y DHPR mostró que δ -SG3 se localiza muy cerca de DHPR, lo cual sugiere fuertemente su localización en el RS. Como es bien sabido, la contracción se inicia por una despolarización de la membrana de TT, donde DHPR actúa como un sensor de voltaje, el cual a su vez causa la liberación de Ca^{2+} vía RyR. Basándonos en toda esta información, consideramos la posibilidad de que δ -SG3 tenga un papel en la contracción muscular y/o en la regulación del Ca^{2+} . Nuestra hipótesis se dirige a un papel estructural relacionado 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, y probablemente a través de una interacción con un canal de Ca^{2+} . Por lo mismo, el determinar si δ -SG3 y δ -SG1 forman otro tipo de complejo en retículo sarcoplásmico, el cual pueda participar en la regulación de calcio intracelular, daría información relevante que nos permite plantear una nueva función para proteínas pertenecientes al complejo SG-SSPN y en consecuencia esta información nos permitirá entender mejor la fisiopatología de la distrofia muscular de cintura ocasionada por mutaciones en el gen *sgcd*.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

Las isoformas de δ -SG forman complejos alternativos en las membranas reguladoras de calcio que participan en la homeostasis de calcio intracelular en músculo esquelético de ratón.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

1. Determinar la localización de la isoforma δ -SG3 en relación a marcadores específicos de membranas reguladoras de calcio (DHPR, RyR y SERCA1) por métodos de microscopía.
2. Determinar por métodos bioquímicos la localización de las isoformas de δ -SG, γ -SG y μ SPN en membranas reguladoras de calcio (TT y RS) de músculo esquelético de ratón.
3. Determinar la posible participación de las isoformas de δ -SG en homeostasis de calcio utilizando membranas purificadas de retículo sarcoplásmico, fibras aisladas y músculo completo de ratones WT y δ -SG KO.

CAPÍTULO 5

METODOLOGÍA

5.1 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources of the United States” conforme fue aprobado en México por la academia Nacional de Medicina (<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>). La política, principios y regulación que se deben seguir básicamente son los siguientes:

- El diseño y realización de los procedimientos con base en su relevancia para la salud humana y animal, el avance del conocimiento y el bien de la sociedad.
- El uso de las especies, calidad y número apropiado de animales.
- El evitar o reducir al mínimo la incomodidad, estrés y dolor; siempre y cuando sea compatible con una buena ciencia.
- El uso apropiado de la sedación, analgesia y anestesia.
- El establecimiento de metas y objetivos en el experimento.
- Brindar un manejo apropiado a los animales, dirigido y realizado por personas calificadas.
- La conducción de experimentos en animales vivos sólo bajo la estricta supervisión de personas calificadas y con experiencia.

En general dichos principios establecen responsabilidad para los investigadores, cuyas actividades relacionadas con el empleo de animales está sujeta a vigilancia por un comité institucional para el cuidado y uso de animales (CICUAL).

5.2 ANIMALES

Los ratones WT y δ -SG KO (δ -sarcoglycan null B6.129-*Sgca*^{tm1Mcn/J}) fueron adquiridos de los Laboratorios Jackson. El genotipo fue determinado usando un protocolo dado por esta compañía para diferenciar entre los ratones WT y KO (<http://jaxmice.jax.org/strain/004582.html>).

5.3 AISLAMIENTO DE FIBRAS MUSCULARES

Músculos flexor digitorum brevis (FDB) e interóseos de ratones WT y δ -SG KO (~9 semanas) fueron aislados e incubados a 34°C por 60 minutos en una solución libre de Ca²⁺/Mg²⁺ con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco-Invitrogen) y colagenasa tipo IV (0.5 mg/ml, Sigma). Los músculos después fueron enjuagados y disociados gentilmente triturando los músculos tratados con enzima a través de una pipeta pasteur con solución tyrode libre de colagenasa que contiene (mM): 146 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 11 glucosa, 10 HEPES a pH 7.4.

5.4 INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

Cuadriceps de ratones WT fueron disectados, congelados en nitrógeno líquido-isopentano y cortados en criosecciones de 8 μ m. Por otra parte, fibras aisladas del

FDB se colocaron en cubreobjetos y se fijaron con metanol a -20°C por 10 minutos. Las criosecciones y las fibras fueron bloqueadas y permeabilizadas con 5% SFB, 5% albúmina de suero bovino (BSA), 0.5% gelatina y 0.5% Tritón X-100 diluido en PBS por una hora. El anticuerpo primario δ -SG3 (Invitrogen) y β -DG (Universidad de Iowa, Hybridoma Facility) fueron diluidos en 2.5% SFB, 2.5% BSA, 0.25% gelatina y 0.5% tween 20 en PBS. Anticuerpos secundarios acoplados a carboximetil indocianina-3 (Cy3) o isotiocianato de fluoresceína (FITC) fueron diluidos 1:250 en PBS, 3% NGS, 1% BSA y 0.5% Tween 20. Tejidos y fibras fueron incubados con los anticuerpos por 120 min. Después de la incubación con el anticuerpo primario y secundario, tejidos y fibras fueron lavados tres veces con 0.5% Tween 20 en PBS. Los núcleos celulares fueron teñidos usando vectashield-DAPI (Vector laboratorios, Burlingame CA). Los tejidos y las fibras fueron después analizados con un microscopio de fluorescencia (Axionplan 2 Imaging Zeiss) bajo parámetros convencionales (Apotome Zeiss System).

Para las inmunofluorescencias de microscopía de dos fotones, se obtuvo el FDB de ratones controles. Las fibras del FDB se estiraron y fueron fijadas en 2% formaldehído en PBS pH 7.4 por 1 hora. Posteriormente los músculos se permeabilizaron en 0.2% Triton x-100 en PBS con 1% suero de caballo (SC). Se realizaron 2 inmunofluorescencias consecutivas para obtener el doble marcaje. Incubación del anticuerpo primario por 7 horas a temperatura ambiente. Incubación del anticuerpo secundario durante toda la noche a 4°C . Tres lavados consecutivos en PBS con 1% SC por 10 minutos entre cada paso. Los anticuerpos primarios utilizados dirigidos contra las proteínas: DHPR (IIID5), RyR (34C) (Iowa

Hybridoma Facility) y SERCA1 (Affinity BioReagents). El anticuerpo de δ -SG3 fue obtenido en conejos inmunizados con los 10 aminoácidos específicos de la isoforma δ -SG3 (Invitrogen). Secundarios: anti conejo Alexa 488 y anti ratón Texas red. La captura de las imágenes se hizo mediante un microscopio de dos fotones (Olympus, BX51WI con wavelength Chameleon Ti/Sapphire laser system (Coherent) y un Radiance 2000 Scanning Head (Bio-Rad, UK).

5.5 PURIFICACIÓN DE MEMBRANAS DE TÚBULOS TRANSVERSOS Y RETÍCULO SARCOPLÁSMICO

Las membranas de TT y RS fueron obtenidas de músculo esquelético (extremidades superiores, inferiores y de espalda) de ratones WT y δ -SG KO (4 meses de edad). Se utilizaron 50 ratones WT y 50 ratones δ -SG KO para cada preparación. El aislamiento se llevó a cabo por centrifugación diferencial con un gradiente discontinuo de sacarosa como se describe previamente (Roseblatt et al., 1981). El primer gradiente consistió de 25%, 27.5% y 35% de sacarosa. La fracción entre el 25% y 27.5% fue colectada y caracterizada como TT. La banda del 35% fue colocada en un segundo gradiente discontinuo que consiste de 27.5%, 30%, 32%, 35% y 45% de sacarosa. La fracción obtenida en la interfase de 32% y 35% fue identificada como RS ligero (RSL) y entre 35% y 45% como RS pesado (RSH). La pureza de las fracciones fue analizada por medio de Western blot donde se pudo localizar a cada uno de los marcadores característicos de cada membrana: DHPR en TT, SERCA1 en RSL y RyR en RSH. Además se realizó para el caso de RSL una prueba de actividad ATPasa estimulada por calcio donde

se encontró actividad máxima en esta fracción. La concentración de la proteína se determinó usando el reactivo de Coomassie Plus y por el método de Lowry (Pierce, Rockford, IL, los E.E.U.U.) con albúmina sérica bovina (ASB) como el estándar.

5.6 WESTERN BLOT

Las muestras de proteína se corrieron en geles de 4-20% (Pierce) y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore Corp.). El Western Blot fue realizado usando los siguientes anticuerpos primarios dirigidos contra: γ -SG (NCL-g-SARC Novocastra), DHPR (IIID5) y RyR (34C) (Iowa Hybridoma Facility). SERCA1 (Affinity BioReagents); Triadina (GE 4.90); Calsecuestrina (VIIIID12); y el δ -SG anti C-terminal de (δ -SG1, Abcam). El anticuerpo de δ -SG3 fue obtenido en conejos inmunizados con los 10 aminoácidos específicos de la isoforma (Invitrogen) y el de μ SPN fue dado generosamente por la Dra. Rachelle H. Crosbie de la Universidad de California, UCLA (Miller et al., 2006). Se utilizaron los anticuerpos secundarios específicos acoplados a peroxidasa y los blots fueron revelados usando quimioluminiscencia (Pierce).

5.7 CAPTURA DE CALCIO

El transporte del calcio se determinó a temperatura ambiente (25°C) por el método de filtración, incubando alícuotas de RSL en una solución que contiene (mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 0.1 CaCl₂, 1 μ Ci ⁴⁵ [CaCl₂], 20 Tris-Malato (pH 7.0), 5mM K-Oxalato, 4 ATP con 150 μ g proteína/ml. La reacción se detuvo con 0.5 ml de solución

amortiguadora fría que contiene (mM): 5 MgCl₂, 4 EGTA, y 20 Tris-Malato (pH 7.0). Las vesículas de RSL (0.9 ml) se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45µm, se lavaron, secaron y después se contaron por centelleo.

5.8 SALIDA PASIVA DE CALCIO

Las vesículas de RSL se cargaron con ⁴⁵Ca²⁺ durante 30 minutos, incubándolas en una solución que contiene (mM): 0.1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 100 KCl, 20 Tris-Malato, 1 Mg-ATP, 1 µCi [⁴⁵CaCl₂] pH 7.0 a una concentración de 300 µg proteína/ml en ausencia de K-Oxalato. Después de 30 minutos las vesículas fueron diluidas en una solución fría que contiene 2 mM EGTA. El ⁴⁵Ca²⁺ residual en las vesículas de RSL fue determinado a diferentes tiempos por filtración y su radiactividad se midió con un contador de centelleo. Para el experimento de inhibición de SERCA1 se usó 2.5 µM de tapsigargina (Sigma, Corp.).

5.9 ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA SERCA1

La actividad de la ATPasa se determinó por colorimetría midiendo el fosfato inorgánico (Pi) liberado, que reacciona con verde de malaquita, tal como ha sido descrito anteriormente en Ortega et al., 2004. Alícuotas de 5 µg/ml de proteína fueron incubadas en una solución que contiene (mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 5 NaN₃, 1 ouabaina, 0.1 CaCl₂ ó 1 EGTA, 0.33 ATP y 20 Tris-Malato, pH 7. La reacción se detuvo a diferentes tiempos con una solución que contiene: 0.045% de hidrocloreuro de verde de malaquita, 4.2% de molibdato de amonio en 4N HCl, 0.8 ml Triton-X100 por cada 100 ml de solución y 0.25 ml de citrato de sodio (34%), la

absorbancia fue leída en 660 nm. Para el experimento de inhibición de la ATPasa de calcio (SERCA1) se usó 500 nM de tapsigargina (Sigma, Corp.).

5.10 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) fue utilizada para medir la temperatura de transición (T_m) de SERCA1 en RSL obtenido de ratones WT y δ -SG KO. La T_m se define como temperatura a la cual la capacidad calorífica es máxima. El RSL fue disuelto en un amortiguador que contiene (mM): 100 KCl y Tris-Malato 20, pH 7.0. El registro de la capacidad calorífica (C_p) en función de la temperatura de barrido a una velocidad de $1^\circ\text{C}/\text{min}$, se realizó con un calorímetro diferencial de barrido de alta resolución VP-DSC. (MicroCal Inc., MA USA). Las muestras (1mg/ml) y las soluciones de la referencia fueron desgasificadas cuidadosamente al vacío por 5 minutos antes de ser inyectadas a las celdas del DSC cuya capacidad es de 0.56 ml. Cuando se llega al equilibrio a los 10°C , se incrementa la temperatura hasta 100°C . Para determinar la reversibilidad de la desnaturalización de la proteína, se disminuye la temperatura hasta los 10°C y se repite el barrido hasta los 100°C . La línea basal se corrige restando el pre barrido del barrido original. En todos los casos no hay evidencia de reversibilidad. De los perfiles de desnaturalización de SERCA1 analizados a partir de un ajuste teórico de las curvas, se calculó asumiendo la irreversibilidad del proceso de desnaturalización de la proteína según lo descrito previamente para el RS (Lepock et al., 1990).

5.11 PROTOCOLO DE ESTIMULACIÓN DE FIBRAS AISLADAS

Las fibras musculares aisladas fueron sometidas a estimulación de campo eléctrico usando electrodos de platino paralelos colocados a ambos lados de la cámara experimental donde el cubreobjetos con las fibras musculares aisladas fue colocado. La cámara fue llenada con solución Tyrode. Un generador de pulsos (modelo DS2A, Digitimer, Hertfordshire, England) fue utilizado para generar el estímulo eléctrico y producir twitch y tétanos a diferentes frecuencias. Para producir fatiga se utilizó el siguiente protocolo: Primero, un estímulo produce una sacudida simple (SS) seguido de un tren de estímulos que produce un tétanos 200 mseg después de la SS. Este tren tuvo una duración de 300 mseg de duración y una frecuencia de 45 Hz. El patrón de estimulación fue repetido cada 3 seg por 6 min. La recuperación de la fatiga fue evaluada utilizando usando el mismo protocolo de estimulación (SS más tren) aplicado cada 5 min.

5.12 REGISTROS DE CALCIO DE FIBRAS AISLADAS

Con el objetivo de evaluar fluctuaciones de Ca^{2+} a 22-23°C se utilizó Fluo3-AM (1-10 μM) (Molecular Probes, Eugene, OR). Este colorante presenta grandes cambios de fluorescencia con la unión de Ca^{2+} y baja compartimentalización (Thomas et al., 2000), además de que ha sido muy utilizado en músculo (Caputo et al., 1994, Lacampagne et al., 2000). Las fibras se montaron en una cámara debajo de un microscopio Optiphot (Nikon, Tokio Japón). La fluorescencia emitida por una región preseleccionada de una fibra teñida, iluminada episódicamente con luz monocromática a una longitud de onda de 485 nm, fue filtrada (longitud de

onda 535 nm) y detectada con un fotodiodo conectado en una configuración fotovoltaica.

5.13 PREPARACIÓN DE MÚSCULOS

Ratones WT y δ -SG KO de ~4 a 6 meses de edad fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente el músculo extensor digitorum longus (EDL) fue aislado a temperatura ambiente. El músculo aislado fue colocado en una cámara de acrílico que está equipada con electrodos de platino a lo largo de cada lado de la pared de la cámara y que contiene solución de Krebs (mM): 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 11 Dextrosa, 1 NaPO₄ Dibásico, 15 NaHCO₃ y es burbujeado con 95% O₂ y 5% CO₂ alcanzando un pH 7.0. El músculo EDL es sujetado del tendón distal a un fórceps y del tendón proximal a un transductor de fuerza. Los electrodos de platino están colocados en paralelo a dos estimuladores (Grass SD9).

5.14 PROTOCOLO DE FATIGA Y RECUPERACIÓN DE FATIGA

La fatiga fue inducida con ciclos de estimulación eléctrica para producir estimulación tetánica de 75 Hz, 100V y 0.6 seg durante 70 seg (Figura 16, Fatiga). Después del protocolo de fatiga, el músculo descansó 5 minutos y una nueva estimulación tetánica de 75 Hz, 100V y 0.6 seg muestra la fuerza de recuperación del músculo (Figura 16, Recuperación). Cada 5 minutos la estimulación fue repetida por lo menos 5 veces.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 δ -SG3 SE LOCALIZA EN EL INTERIOR DE LAS FIBRAS MUSCULARES Y COLOCALIZA CON RYR Y SERCA1.

En un estudio preliminar de nuestro grupo de trabajo identificamos una forma alterna de δ -SG, que denominamos δ -SG3 y que sugerimos podría localizarse en RS de músculo esquelético de ratón (Estrada et al., 2006). El anticuerpo anti δ -SG3 utilizado en estos experimentos fue obtenido inmunizando conejos con los 10 aminoácidos específicos de la isoforma (Invitrogen) y que no se encuentran presentes en δ -SG1 (Invitrogen). Los demás anticuerpos utilizados son comerciales (detalles en la sección de Metodología).

Con la finalidad de confirmar el patrón estriado de δ -SG3 que se presenta en el interior de las fibras musculares de ratones WT y la ausencia de dicha isoforma en las fibras de ratones δ -SG KO se realizaron inmunofluorescencias de doble marcaje (Figura 5). Utilizando criosecciones con cortes longitudinales de cuádriceps de ratones WT (Figura 5A) y δ -SG KO (Figura 5B) fue realizada una doble inmunofluorescencia para detectar la localización de δ -SG3 y β -DG. Utilizamos a β -DG como marcador de sarcolema de las fibras musculares y lo observamos en color verde debido a que el anticuerpo secundario utilizado está acoplado a FITC. β -DG se localiza en el sarcolema de las fibras de los músculos de los ratones WT y δ -SG KO (Figura 5A y 5B). Sin embargo, en el caso de δ -SG3 que observamos en color rojo, debido a que el anticuerpo secundario está acoplado a Cy3, únicamente se encuentra presente en el músculo de los ratones

WT y se caracteriza por un patrón estriado perpendicular a sarcolema (Figura 5A). Este resultado confirma la especificidad del anticuerpo y la ausencia de la isoforma δ -SG3 en los ratones δ -SG KO, los cuales tienen una modificación en el gen *sgcd* debido a que en lugar del exón 2 (que codifica para la región citoplasmática y transmembranal de la proteína δ -SG) tienen un cassette de resistencia a neomicina, lo que hace que estos ratones carezcan de las isoformas de δ -SG. Por otra parte, en el caso de las fibras aisladas de los músculos FDB de ratones WT también se observa el patrón estriado perpendicular a sarcolema de δ -SG3 (rojo) en el interior de las fibras musculares. En color azul se presentan los núcleos celulares de células satélite debido a que se utilizó Vectashield-DAPI (Figura 5C y D).

Posteriormente, para determinar con más precisión la localización de la isoforma δ -SG3 en las membranas internas de las fibras musculares se realizó una microscopía de 2 fotones utilizando varias inmunofluorescencias de doble marcaje con anticuerpos que identifican proteínas específicas de TT y RS (Figura 6). Los marcadores característicos son DHPR para TT, RyR para las cisternas terminales de RS y SERCA1 para la parte longitudinal de RS.

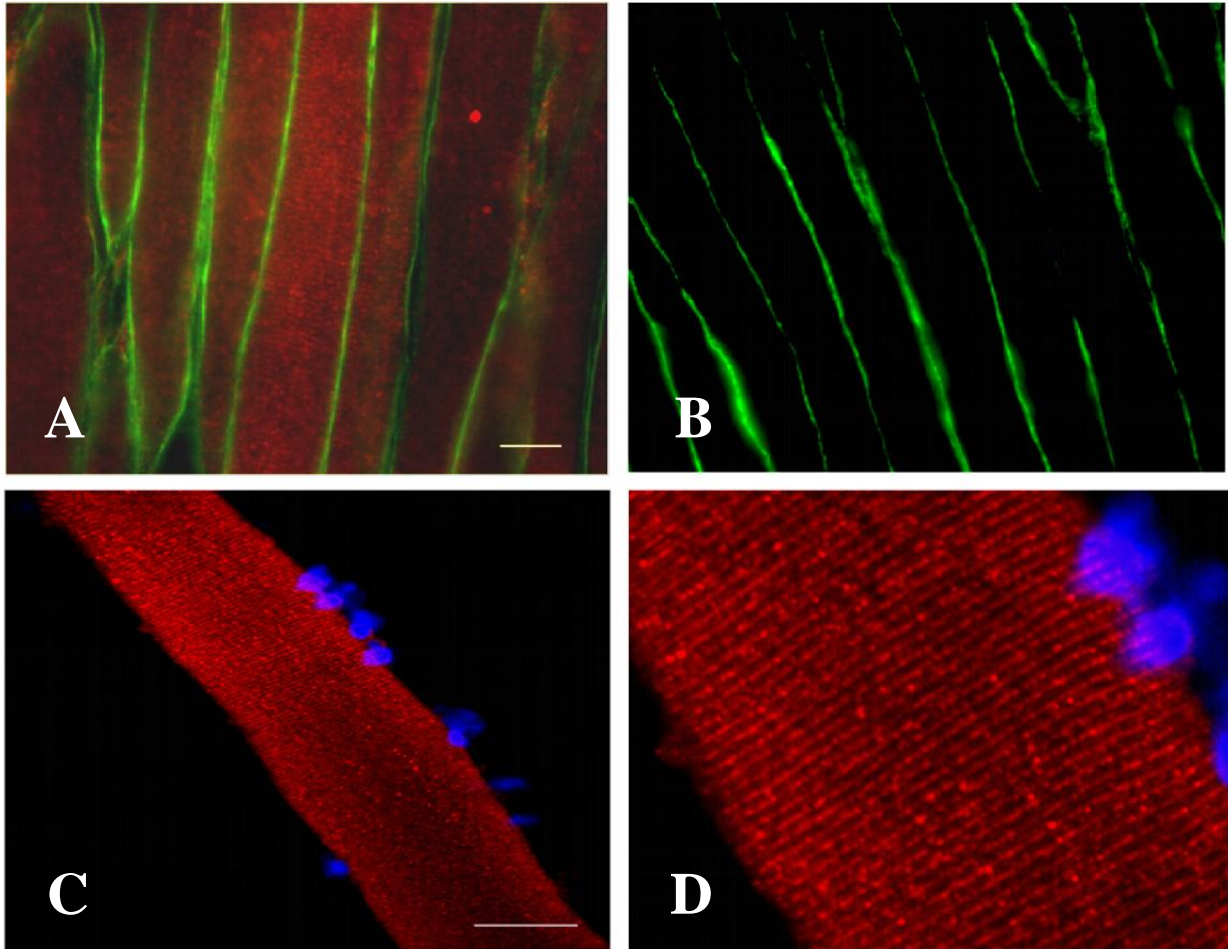


Figura 5. Inmunolocalización de δ -SG3 en criosecciones y fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. Doble inmunomarcaje de δ -SG3 (rojo) y β -DG (verde) en criosecciones de músculos de ratones A) WT y B) δ -SG KO. La tinción del sarcolema dada por β -DG se observa en ambos músculos, mientras que δ -SG3 está únicamente presente en WT. C) Inmunofluorescencia de δ -SG3 (rojo) usando fibras aisladas del FDB de ratones WT confirma el patrón estriado perpendicular al sarcolema (D). Los núcleos celulares se tiñeron usando Vectashield-DAPI (azul). Barra: 20 μ m.

Para este experimento se utilizaron músculos FDB completos de ratones WT. La tinción obtenida con el anticuerpo anti δ -SG3 mostró el patrón estriado dentro de las fibras musculares (Figura 6). Este patrón fue similar al observado con las tinciones obtenidas para DHPR (Figura 6A), RyR (Figura 6B) y SERCA1 (Figura 6C). Sin embargo, al realizar la sobreposición de las imágenes únicamente se observó colocalización de δ -SG3 con RyR (Figura 6B) y SERCA1 (Figura 6C). Lo anterior sugiere que δ -SG3 puede estar presente en cisternas terminales y en la parte longitudinal de RS.

Teniendo esta evidencia, se realizaron pruebas bioquímicas que confirmaran los resultados obtenidos por microscopía.

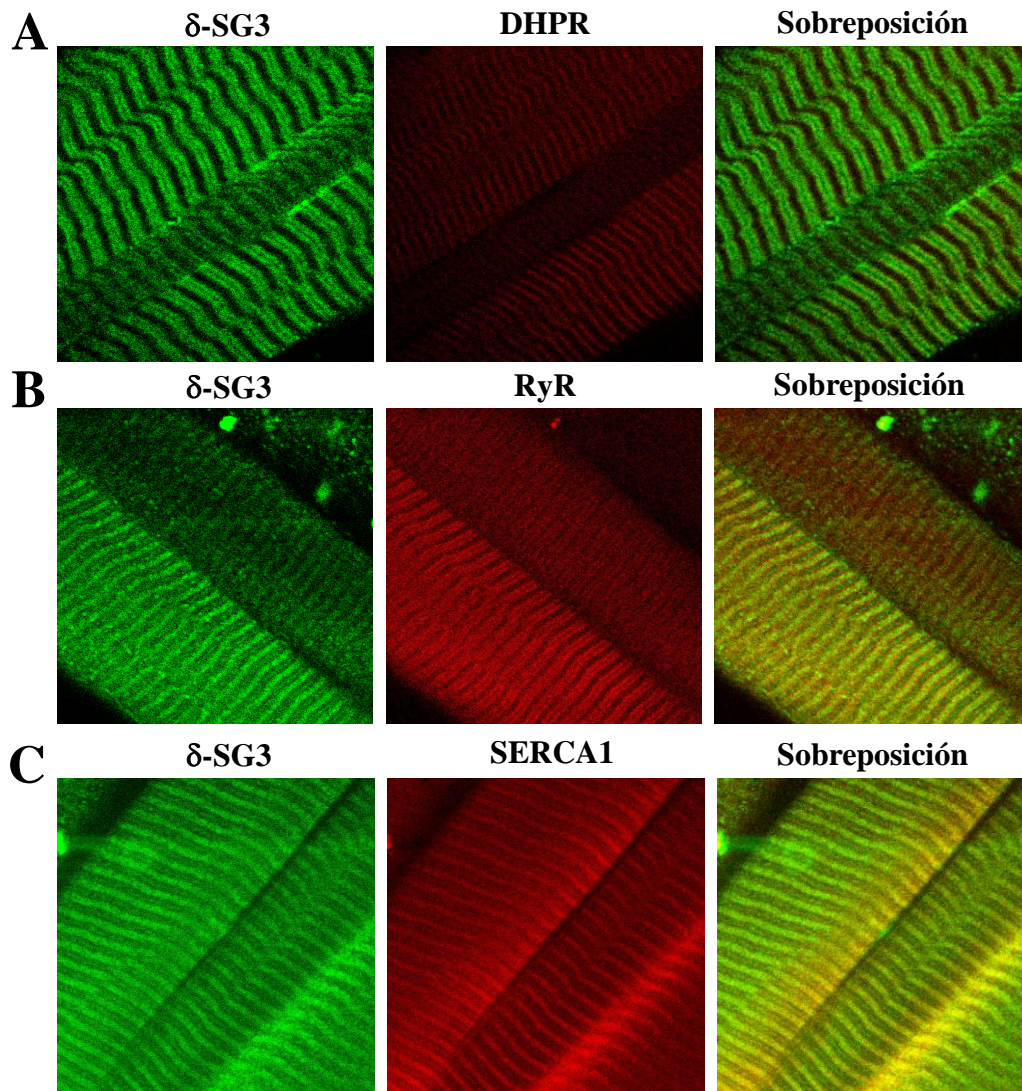


Figura 6. Inmunolocalización de δ -SG3 y marcadores específicos de TT y RS por microscopía de 2 fotones. Utilizando músculos FDB de ratones WT se realizó la doble inmunofluorescencia para A) δ -SG3 y DHPR, B) δ -SG3 y RyR, C) δ -SG3 y SERCA1. La sobreposición de las imágenes muestra una colocalización de la isoforma δ -SG3 con RyR y SERCA1.

6.2 LAS ISOFORMAS DE δ -SG, γ -SG y μ SPN SE LOCALIZAN EN MEMBRANAS DE TT Y RS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO.

Dados los resultados de las inmunofluorescencias dobles por microscopía de dos fotones se decidió analizar por Western blot la presencia de δ -SG3 y de otras proteínas del complejo SG-SSPN en fracciones enriquecidas de membranas de TT, la parte longitudinal de RS (que en un gradiente de sacarosa corresponde a la fracción ligera de RS, RSL) y las cisternas terminales de RS (que en un gradiente de sacarosa corresponde a la fracción pesada de RS, RSH). Para obtener estas membranas se hizo la disección del músculo esquelético de 50 ratones WT y 50 ratones δ -SG KO. Posteriormente se realizó un gradiente de centrifugación diferencial de sacarosa donde pudieron obtenerse las distintas fracciones. Para analizar el grado de pureza de las fracciones enriquecidas en los distintos tipos membranales se realizó un Western blot con distintos anticuerpos específicos. Para analizar una posible contaminación con sarcolema en las distintas fracciones (TT, RSL, RSH) de los ratones WT y δ -SG KO se utilizó el anticuerpo contra β -DG (Figura 7A). Como puede observarse en la figura 7A, la proteína β -DG únicamente se encuentra en la fracción que está enriquecida en los TT del ratón δ -SG KO. Sin embargo, los componentes del complejo SG-SSPN están ausentes en el sarcolema del ratón δ -SG KO debido a la deficiencia secundaria de los componentes del complejo como resultado de la deficiencia primaria de δ -SG, ya que esta proteína sirve como proteína nucleadora de dicho complejo (Hack et al., 2000). Por lo tanto esta contaminación no interfiere con nuestros experimentos.

Por otra parte, también se realizaron Western blots utilizando anticuerpos contra DHPR, SERCA1 y RyR con las fracciones enriquecidas en todos los tipos membranales (TT, RSL y RSH) de ratones WT y δ -SG KO (Figura 7B). El resultado de la figura 7B muestra que 1) DHPR está presente en las fracciones enriquecidas en TT, 2) RyR es detectado en las fracciones que corresponden a RSH y 3) SERCA1 fue detectado en ambas fracciones de RS, sin embargo el enriquecimiento de esta proteína es evidente en RSL. Aproximadamente el 90% de las proteínas presentes en RSL corresponden a SERCA1, sin embargo esta proteína también se encuentra en baja proporción en RSH.

Una vez que se confirmó que las fracciones estaban enriquecidas en los distintos tipos membranales, se realizó la inmunolocalización de los componentes del complejo SG-SSPN con las fracciones de los ratones WT y δ -SG KO (Figura 8). En la fracción de TT de los ratones WT se localiza a δ -SG1 y γ -SG, los cuales están ausentes en el caso de los ratones distróficos (Figura 8A). En la fracción de RSL de los ratones WT encontramos a δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN, sin embargo estas proteínas están ausentes en el caso de los ratones δ -SG KO (Figura 8B). Finalmente, en la fracción de RSH de los ratones WT encontramos a δ -SG3 y mSPN. En el caso de los ratones δ -SG KO, δ -SG3 no se observa y μ SPN está severamente disminuida. Además en el caso de otras proteínas características de RSH, como lo son triadina y calsecuestrina, tenemos que se observan ligeramente disminuidas en el caso de los ratones distróficos (Figura 8C).

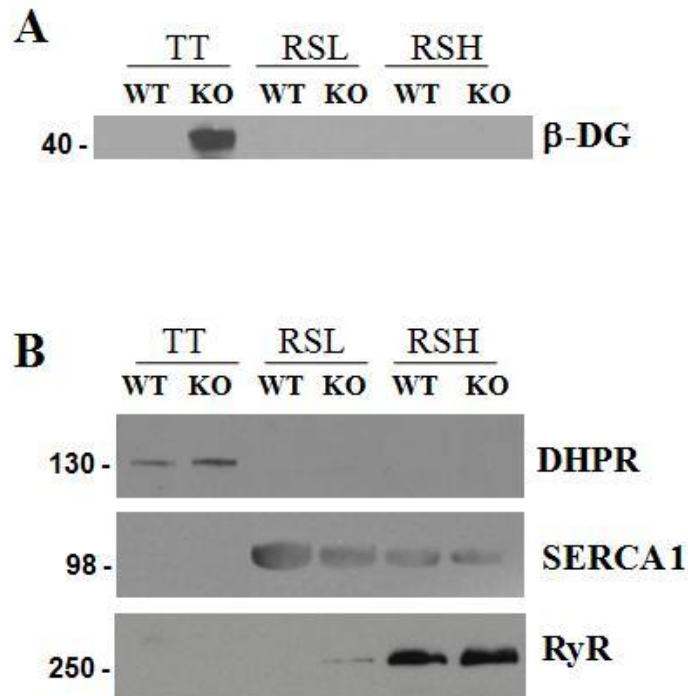


Figura 7. Pruebas de pureza de las fracciones obtenidas por gradiente diferencial de sacarosa. A) Western blot de β -DG utilizando las fracciones de TT, RSL y RSH. La señal se observa únicamente en la fracción de TT del ratón δ -SG KO, lo cual podría indicar una contaminación de sarcolema en dicha fracción. Sin embargo, los componentes del complejo SG-SSPN están ausentes en el sarcolema del ratón KO debido a la deficiencia secundaria de los componentes como resultado de la deficiencia primaria de δ -SG. Por lo tanto esta contaminación no interfiere con nuestros experimentos. B) Western blot de DHPR, RyR y SERCA1 en diferentes fracciones de los microsomas musculares después del gradiente de sacarosa. DHPR se observa en TT, SERCA1 se ve enriquecida en RSL y RyR se observa en RSH en ambos ratones.

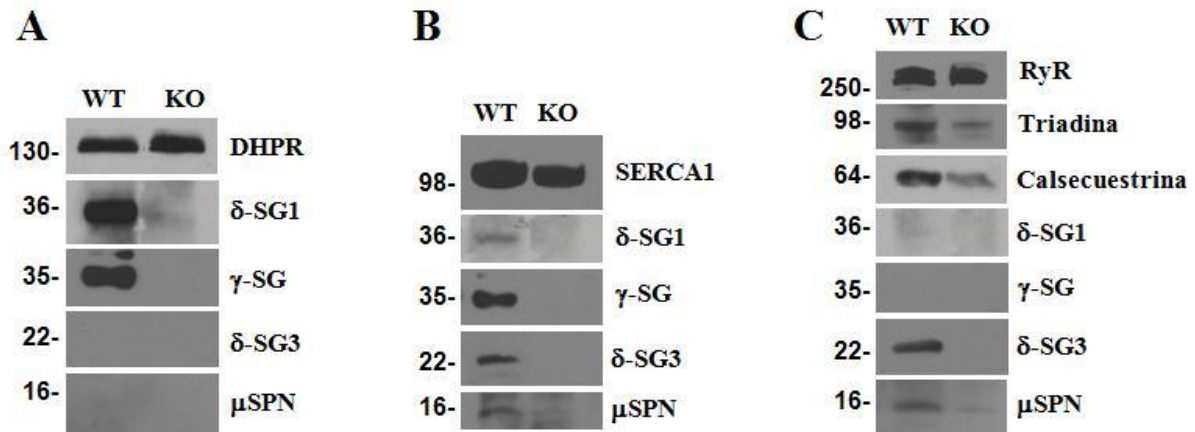


Figura 8. Localización de δ -SG1, δ -SG3, γ -SG y μ SPN en membranas purificadas de TT y RS. Las membranas fueron obtenidas de los músculos esqueléticos de ratones WT y δ -SG KO. A) La fracción purificada de TT fue analizada con anticuerpos específicos para DHPR, δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN. DHPR es un marcador de TT. δ -SG1 y γ -SG se encuentran en el ratón WT, pero ausentes en el distrófico. B) La fracción RSL fue analizada con anticuerpos específicos para SERCA1, δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN. SERCA1 está enriquecida en RSL. Todos los SGs y μ SPN están presentes en el ratón WT, pero ausentes en el ratón KO. C) La fracción RSH fue analizada con anticuerpos específicos para RyR, triadina, calsecuestrina, δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y μ SPN. RyR, triadina y calsecuestrina se encuentran en RSH. Triadina y calsecuestrina se observan un poco disminuidas en el δ -SG KO. δ -SG3 está presente en el ratón WT, pero está ausente en el distrófico. μ SPN se observa en el ratón WT, pero está casi ausente en el δ -SG KO.

Todos estos datos sugieren la presencia de formas alternas de complejos SG-SSPN específicos para cada una de las membranas estudiadas. Lo anterior se ve apoyado por los resultados de Western blot de las membranas obtenidas de ratones δ -SG KO. Estas inmunoréplicas muestran que la ausencia de todas las isoformas de δ -SG ocasiona la deficiencia secundaria de las otras proteínas que forman parte de estos potenciales complejos SG-SSPN, el mismo fenómeno que ocurre en sarcolema con el complejo SG-SSPN. Lo anterior nos sugiere que las isoformas de δ -SG también podrían funcionar como proteínas nucleadoras en las membranas reguladoras de calcio (TT y RS).

Debido a que los resultados anteriormente mencionados sugieren la presencia de formas alternas de complejos SG-SSPN específicos para membranas reguladoras de calcio, es factible proponer que la deficiencia de éstos pueda afectar la homeostasis de calcio intracelular en las fibras musculares. Por lo mismo, se midió la captura y salida de calcio de vesículas de RSL y RSH de ratones WT y δ -SG KO.

6.3 AUMENTO EN CAPTURA Y SALIDA DE CALCIO EN MEMBRANAS PURIFICADAS DE RSL DE RATONES δ -SG KO EN COMPARACIÓN CON RATONES WT.

En el caso de las mediciones en el RSH no se encontraron diferencias entre ratones control y δ -SG KO. En contraste, la captura y salida pasiva de Ca^{2+} está notablemente afectada en las vesículas de RSL provenientes de los ratones δ -SG KO en comparación con los ratones WT. En la figura 9A se muestra el transporte de calcio dependiente de ATP utilizando vesículas de RSL. La captura de calcio en los músculos de los ratones KO incrementa al doble en relación con los controles WT después de 30 minutos de reacción. El transporte a los 30 minutos incrementó de 84 ± 7 a 160 ± 18 nmol/mg de proteína ($n=3$). En la figura 9B se muestra la salida pasiva de Ca^{2+} normalizada. A los 30 minutos a partir del inicio de la reacción observamos un 30% y 90% de salida de calcio para el RSL de los músculos de ratones WT y δ -SG KO respectivamente. Para investigar si la proteína SERCA1 está involucrada en la salida pasiva de calcio, utilizamos el inhibidor específico tapsigargina. Agregando 2.5 μM de tapsigargina obtuvimos una inhibición de la salida pasiva de calcio de un 14%, mientras que en el δ -SG KO hay una inhibición del 83%, dejando la liberación pasiva de calcio de RSL a un nivel equivalente en ambos músculos en presencia del inhibidor (Figura 9B).

Dados estos resultados también fue de nuestro interés explorar el comportamiento de SERCA1 midiendo su actividad hidrolítica de ATP para así saber si esta función también es anormal en el caso de los animales distróficos δ -SG KO.

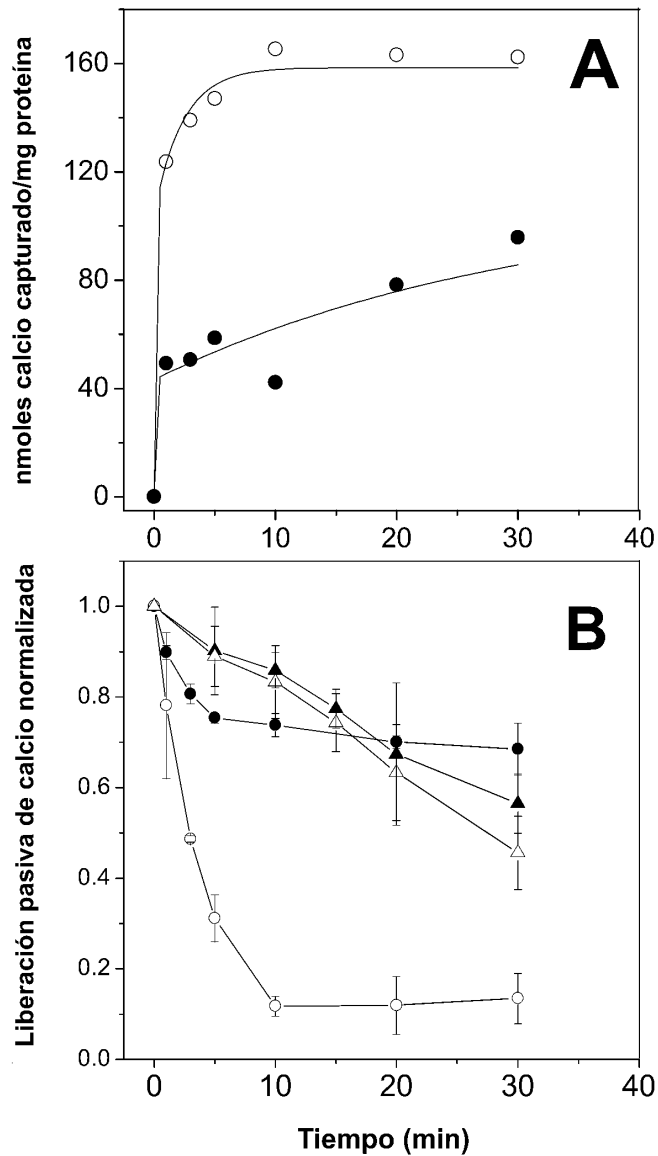


Figura 9. Captura de calcio dependiente de ATP y salida pasiva de calcio en vesículas de RSL de ratones WT y δ -SG KO como función del tiempo. Los experimentos se realizaron con vesículas aisladas de animales WT (●) y δ -SG KO (○), respectivamente. A) Transporte de Ca^{2+} dependiente de ATP con alícuotas de RSL. La captura de calcio en los músculos de los ratones KO incrementa al doble en relación con los controles WT después de 30 minutos de reacción. B) Salida pasiva de calcio normalizada con alícuotas de RSL. A los 30 minutos se observa una salida del 30% y 90% para WT y KO, respectivamente. La salida se ve disminuida al utilizar el inhibidor específico tapsigargina en las vesículas de ratones WT (▲) y δ -SG KO (△), respectivamente.

6.4 LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE SERCA1 ESTÁ AUMENTADA EN RSL DE RATONES δ -SG KO.

En el músculo esquelético, durante la activación muscular, la liberación de Ca^{2+} del RS produce la interacción de actina-miosina y la contracción. La captura de Ca^{2+} de regreso al RS por la ATPasa de calcio, SERCA1, disminuye la concentración de calcio intracelular a un nivel basal, produciendo relajación. Para comparar la actividad hidrolítica dependiente de ATP de SERCA1 de ratones WT y δ -SG KO, realizamos un experimento colorimétrico donde podemos medir la cantidad de fosfato inorgánico liberado como resultado de la hidrólisis de ATP. En la figura 10 se muestra la actividad hidrolítica como función del tiempo. La actividad a los 30 minutos fue de 7.64 $\mu\text{moles P}_i/\text{mg}$ de proteína para el ratón WT y 12.42 $\mu\text{moles P}_i/\text{mg}$ de proteína para el ratón δ -SG KO. La actividad hidrolítica fue 1.6 veces mayor en las vesículas de los ratones distróficos que en los WT. Con 0.5 μM de tapsigargina se obtuvo una inhibición de la actividad hidrolítica de SERCA1 a los 30 minutos de 75% y 65% para WT y δ -SG KO, respectivamente (Figura 10).

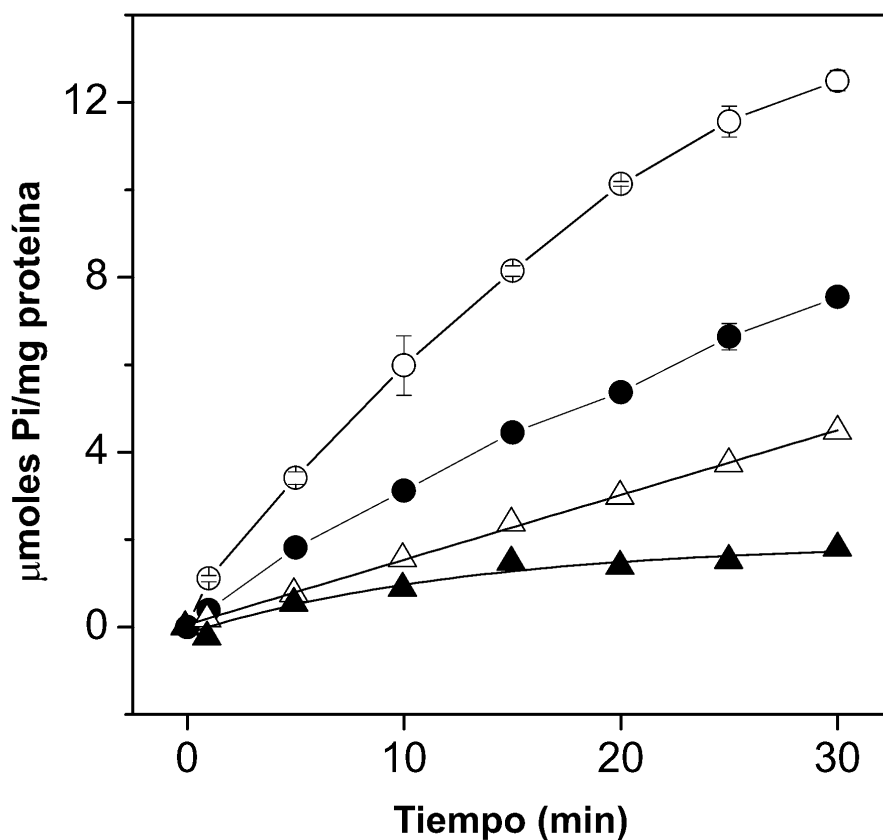


Figura 10. Actividad hidrolítica de la ATPasa de calcio aislada de vesículas de RSL de ratones WT y δ -SG KO como función del tiempo. Los experimentos se realizaron con vesículas de animales WT (●) y δ -SG KO (○) respectivamente. La actividad a los 30 minutos fue de 7.64 μ moles P_i /mg de proteína para el ratón WT y 12.42 μ moles P_i /mg de proteína para el ratón δ -SG KO. La actividad hidrolítica en presencia del inhibidor específico tapsigargina se ve disminuida en vesículas de ratones WT (▲) y δ -SG KO (△), respectivamente.

6.5 CAMBIO CONFORMACIONAL DE SERCA1 EN MEMBRANAS PURIFICADAS DE RSL DE RATONES δ -SG KO EN COMPARACIÓN CON RATONES WT.

Para investigar si la deficiencia de las isoformas de δ -SG induce cambios conformacionales en las proteínas de RS, usamos la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Esta técnica nos permitió analizar el perfil de desnaturalización de las membranas de RSL de ratones WT y δ -SG KO. La T_m y el calor de transición de las bombas de Ca^{2+} indican que la estructura nativa de las proteínas ha cambiado en los ratones KO. El patrón electroforético de proteínas de RSL usado en estos experimentos revela que SERCA1 es el componente principal de esta membrana (90% de la proteína total). Lepock et al., 1990 demostraron que existen 2 diferentes transiciones (A y B) que aparecen en DSC. La transición A, corresponde a la desnaturalización del dominio de unión a nucleótido (DUN) y la transición B, corresponde a la desnaturalización del dominio de unión a calcio (DUC). La figura 11 muestra el perfil de DSC de las membranas de RSL aisladas de músculos de ratones WT (A) y δ -SG KO (B). En el perfil del ratón WT detectamos dos transiciones, T_m (DUN) 49 ± 1.3 °C ($n = 3$) y T_m (DUC) 61.7 °C ± 1.02 °C ($n = 3$) (Figura 11A). En el perfil del ratón δ -SG KO detectamos cuatro transiciones, T_m (DUN) 50.5 ± 1.03 °C ($n = 3$), T_m (DUC) 66.6 ± 0.58 °C ($n = 3$) y dos nuevas que llamamos dominios indeterminados (DI) que tiene T_m (DI1) 40 ± 0.33 °C ($n = 3$) y T_m (DI2) 56.6 ± 0.33 °C que están solo presentes en el perfil de desnaturalización del ratón distrófico (Figura 11B).

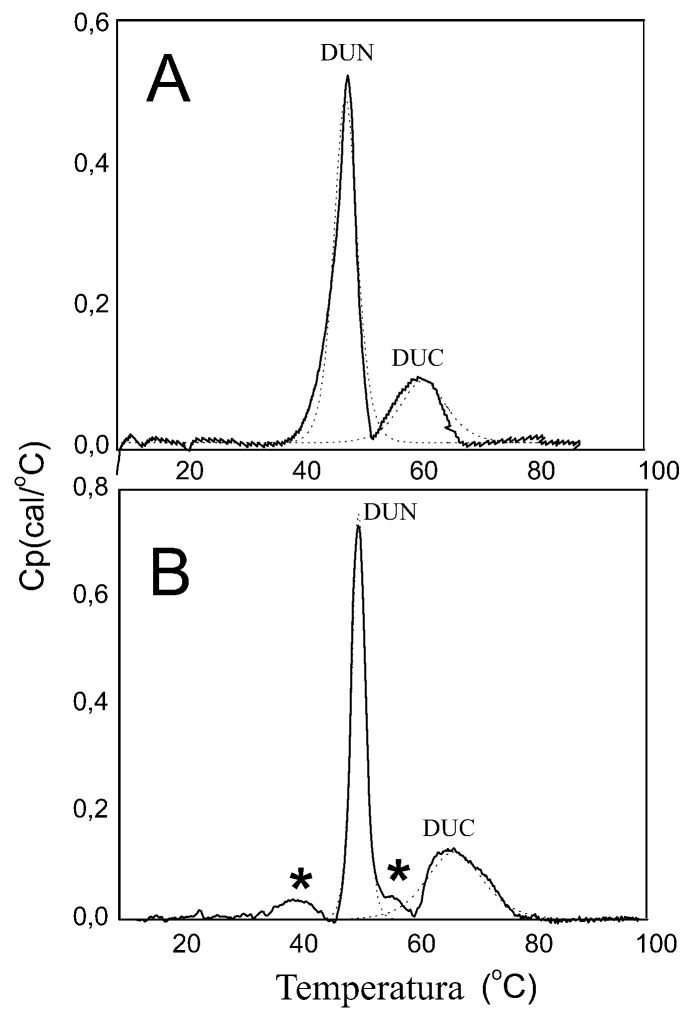


Figura 11. Perfiles de calorimetría diferencial de barrido (Cp vs temperatura) de A) RSL aislado de ratones WT y B) RSL aislado de ratones δ -SG KO. Las membranas de RSL fueron escaneadas con un incremento de temperatura de 1°C/min. El pico DUN corresponde al dominio de unión a nucleótido, el pico DUC corresponde al dominio de unión a calcio y los picos marcados con asterisco son dominios estructurales indeterminados.

6.6 LAS FLUCTUACIONES DE FLUORESCENCIA DE LAS SEÑALES DE CALCIO SON SIMILARES EN FIBRAS MADURAS AISLADAS DE RATONES WT Y δ -SG KO.

Para seguir investigando sobre la homeostasis de calcio intracelular, se realizaron experimentos utilizando fibras musculares aisladas y el marcador fluorescente Fluo-3, el cual emite fluorescencia al unir Ca^{2+} . La figura 12 muestra fluctuaciones de fluorescencia producidas por las fibras aisladas provenientes de músculos FDB de ratones WT y δ -SG KO. La señal de fluorescencia se genera durante la sacudida simple (SS) seguida por un tétanos (Tet) de alta frecuencia. Las fluctuaciones de fluorescencia y el curso temporal registrado en las fibras aisladas de los ratones δ -SG KO fueron similares a las de los WT (Figura 12A). Las gráficas de los valores promedio $\Delta F/F$ (fluorescencia final en relación a la fluorescencia basal) de los registros de fluorescencia para los ratones WT y δ -SG KO no presentan diferencias significativas en SS ni en tétanos (Figura 12B). Como era de esperarse, no hubo diferencias en la proporción entre las señales de calcio ($\Delta F/F_{\text{Tet}}/\Delta F/F_{\text{SS}}$) es decir, proporción tétanos/SS comparando los registros de las fibras aisladas de ambos animales (Figura 12C). Por otra parte, tenemos que la duración total en la amplitud media máxima (DTAM) de la SS fue similar en el caso de las fibras aisladas de ratones δ -SG KO y WT (Figura 12C).

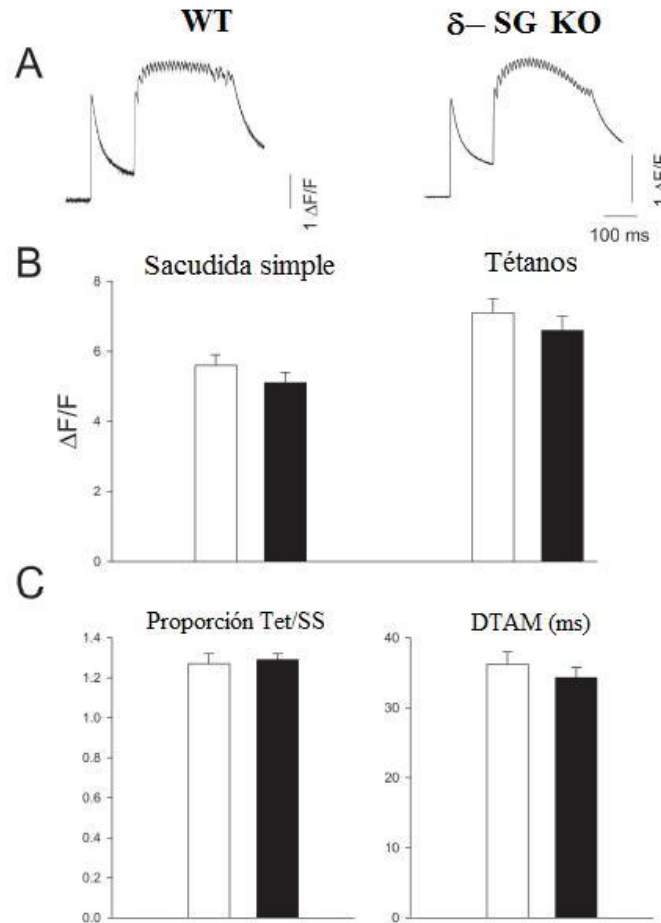


Figura 12. Señales de Ca^{2+} en fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. A) Registros de fluorescencia $\Delta F/F$ fluo-3 de una fibra muscular aislada de ratones WT y δ -SG KO. El tétanos es precedido por una sacudida simple (SS). B) Gráfica con valores promedio $\Delta F/F$ de los registros de ratones WT (barras blancas) y δ -SG KO (barras negras). C) Izquierda: valores promedio de la proporción $(\Delta F/F_{\text{Tet}})/(\Delta F/F_{\text{SS}})$ de fibras WT (barras blancas) y δ -SG KO (barras negras). Derecha: Valores promedio de DTAM de la SS de fibras WT (barras blancas) y δ -SG KO (barras negras). No existen diferencias significativas.

Por otra parte, para investigar sobre las señales de calcio bajo actividad prolongada se realizaron ciclos de estímulos repetidos secuencialmente durante 6 minutos. Los experimentos consistieron: Primero, un estímulo produce una SS y 200 mseg después se produce un tren de estímulos que produce un tétanos. Este tren tuvo una duración de 300 mseg de duración y una frecuencia de 45 Hz. El patrón de estimulación fue repetido cada 3 seg por 6 min. La recuperación después de la actividad prolongada fue evaluada usando el mismo protocolo de estimulación (SS más tren) aplicado cada 5 min.

La figura 13A muestran los experimentos utilizando las fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. La fluctuación de fluorescencia progresivamente declina. Al final de los ciclos de estimulación, la señal decrece a una pequeña fracción de la señal inicial. En las fibras de los ratones δ -SG KO, la disminución de los valores $\Delta F/F$ se da con más rapidez con el mismo patrón de estimulación que en el caso de los WT. La disminución en la magnitud de la fluctuación de fluorescencia durante la SS y los tétanos se muestra con una resolución de tiempo mayor en la figura 13B, donde se presentan el primer y último registro de la figura 13A.

Las fibras de los ratones δ -SG KO no solo presentan fluctuaciones de fluorescencia más pequeñas en la SS y tétanos al final de los ciclos de estimulación, sino que también presentan una menor recuperación. La figura 13C resume los resultados de los experimentos de recuperación. Los valores promedio de la primera ($t=-6$) y última ($t=0$) señal $\Delta F/F$ producidas por el patrón de estimulación fueron graficadas.

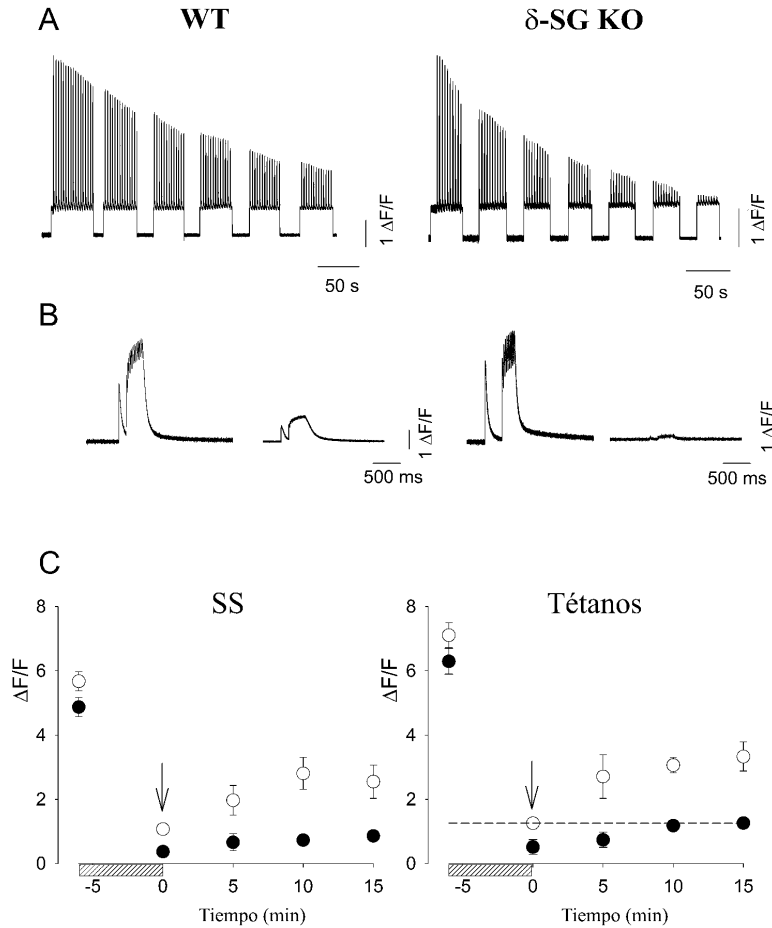


Figura 13. Señales de Ca^{2+} con estimulación repetitiva y recuperación en fibras aisladas. A) Señales de fluorescencia de una fibra aislada de ratones WT y δ -SG KO con estimulación repetitiva. Los segmentos sin fluorescencia se hicieron para evitar fototoxicidad, pero la estimulación eléctrica fue realizada durante todo el tiempo. B) Registros de las señales $\Delta F/F$ del primer y último registro de SS y tétanos de A en una escala de tiempo expandida. C) Valores promedio de los picos $\Delta F/F$ de SS y tétanos como función del tiempo de fibras aisladas de ratones WT (\circ) y δ -SG KO (\bullet). La caja rayada indica la duración del protocolo de estimulación. La flecha indica el inicio de la recuperación. La línea punteada indica el valor promedio del valor del pico tetánico $\Delta F/F$ de las fibras WT al final de los ciclos de estimulación ($n=4$).

La línea punteada indica el valor promedio del valor del pico tetánico $\Delta F/F$ de las fibras WT al final de los ciclos de estimulación, el cual fue incluido en la gráfica para comparar. La recuperación fue iniciada en el tiempo señalado por la flecha ($t=0$). De manera consistente con los experimentos de la figura 13B, la disminución de los valores en las fibras δ -SG KO es mayor en comparación con WT. Además, existe poca recuperación en el caso de los animales distróficos.

6.7 LA PRESENCIA O AUSENCIA DE CALCIO EXTRACELULAR NO CAUSA DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN LAS SEÑALES DE CALCIO EN FIBRAS MUSCULARES AISLADAS DE RATONES δ -SG KO.

Los experimentos ilustrados en la figura 14 exploran el papel del Ca^{2+} extracelular en las señales de calcio durante la estimulación prolongada en fibras aisladas de ratones WT y δ -SG KO. De manera consistente con los resultados de la figura 13 utilizando la solución Tyrode normal que contiene calcio, la amplitud de las fluctuaciones de fluorescencia en las fibras WT asociados a SS y tétanos significativamente disminuyen al final del protocolo de estimulación (Figura 14A). En ausencia de calcio de la solución externa, la amplitud de la fluctuación de fluorescencia declina de una manera más pronunciada (Figura 14C). Estos resultados demuestran la importancia del calcio extracelular en las fibras WT. Cuando el mismo experimento se realizó con fibras aisladas de los ratones δ -SG KO, la amplitud de las fluctuaciones de fluorescencia disminuyen a casi cero en presencia (Figura 14B) y en ausencia (Figura 14D) de Ca^{2+} extracelular.

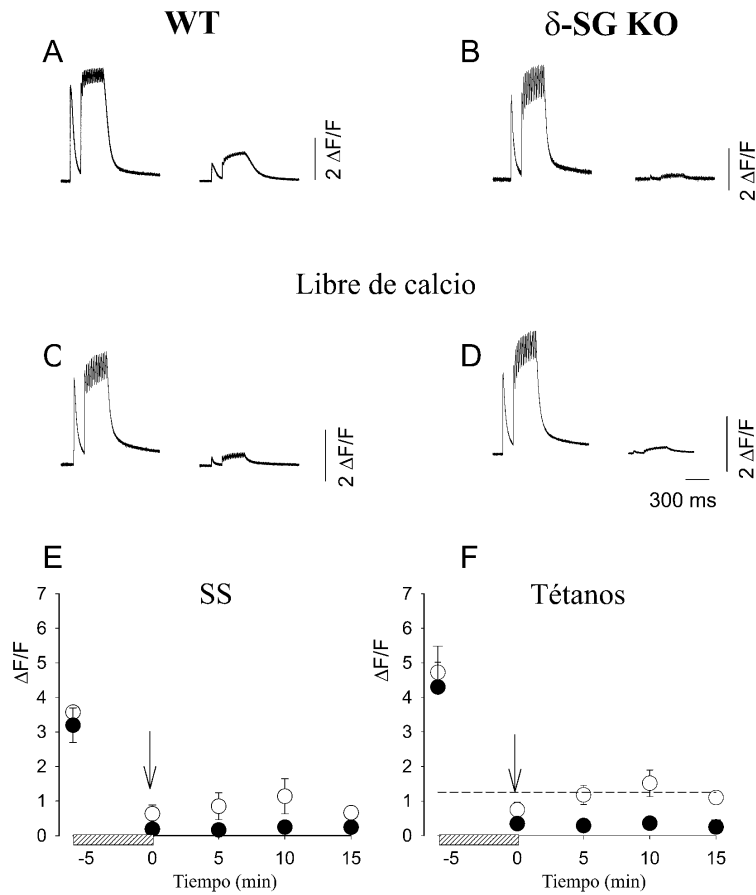


Figura 14. Influencia del Ca^{2+} extracelular en las señales de calcio de SS y tétanos en fibras aisladas de ratones WT y $\delta\text{-SG KO}$. Cada panel (A-D) ilustra el primer y último registro de fluo-3 Ca^{2+} durante ciclos de estimulación de experimentos separados. (A,C) Fibras WT en presencia (A) y ausencia (C) de calcio extracelular. (B,D) Corresponden a los registros de las fibras KO. La escala de tiempo es la misma para los paneles A-D. (E,F) Gráficas de los valores promedio del pico $\Delta F/F$ de la SS y tétanos como función del tiempo en las soluciones libres de calcio. La caja rayada indica el periodo de aplicación de los ciclos de estimulación. La flecha indica el inicio de la recuperación. (E) y (F) resultados de fibras WT (\circ) y $\delta\text{-SG KO}$ (\bullet). La línea punteada en F es el valor promedio del decline final de los valores $\Delta F/F$ tetánicos de las fibras musculares WT en solución con calcio extracelular de la Figura 13.

La figura 14E y 14F muestra el resumen de resultados de la caída de los valores $\Delta F/F$ y de su recuperación de estimulación repetitiva en soluciones libres de calcio. En estas figuras se muestran los resultados promedio en función del tiempo. En la ausencia de Ca^{2+} externo los valores $\Delta F/F$ al final de los ciclos de estimulación (flecha) de SS y tétanos, disminuyen mucho más que en una solución que contiene calcio. Además, las fibras se recuperan menos. En el caso de las fibras de los ratones δ -SG KO, la presencia o ausencia de calcio no causa diferencias significativas, pero casi no hay signos de recuperación después de que el protocolo de estimulación ha terminado (Figura 14E y 14F).

6.8 EL BLOQUEADOR 2-APB NO CAUSA NINGÚN EFECTO EN LAS SEÑALES DE CALCIO EN FIBRAS MUSCULARES DE RATONES δ -SG KO.

La gran disminución en las señales de Ca^{2+} observadas en las soluciones libres de calcio durante estimulación repetitiva como se describió anteriormente, sugiere que los almacenes intracelulares vuelven a llenarse a partir del calcio del espacio extracelular. Los canales “store operated” (SOC) tienen un papel clave en estos sistemas (Carroll et al., 1995); por lo que decidimos investigar si en los ratones δ -SG KO este mecanismo no está operando apropiadamente. Para este experimento utilizamos el bloqueador farmacológico 2-Aminoetoxidifenil borato (2-APB), el cual bloquea a los SOC. La figura 15 ilustra señales $\Delta F/F$ representativas de las fibras musculares WT incubadas en solución tyrode normal a la cual 2-APB fue agregado. La disminución en la amplitud de las señales $\Delta F/F$ al final de los ciclos de estimulación de SS y tétanos fue más pronunciada que en la ausencia

del bloqueador (Figura 13), sugiriendo que el bloquear la actividad SOC contribuye a una disminución mayor. La figura 15B muestra los resultados correspondientes de un experimento representativo llevado a cabo en una fibra muscular asilada de un ratón δ -SG KO en presencia de 2-APB. El bloqueador de SOC tiene muy poco efecto en las fibras musculares KO. La figura 15C resume los resultados de experimentos similares mostrados en la figura 15A y 15B. Las barras representan el valor promedio del pico $\Delta F/F$ de la última señal tetánica. En las fibras musculares WT (barras blancas) la disminución al final de la estimulación fue distintivamente mayor cuando los SOC fueron bloqueados con 2-APB que en la ausencia del bloqueador y el nivel alcanzado en presencia de 2-APB fue similar al de los registros de las fibras δ -SG KO en solución tyrode normal con calcio (Figura 13 y 15C). Finalmente, cuando 2-APB fue probado en las fibras δ -SG KO (barras negras), ningún efecto en la disminución tetánica fue observado.

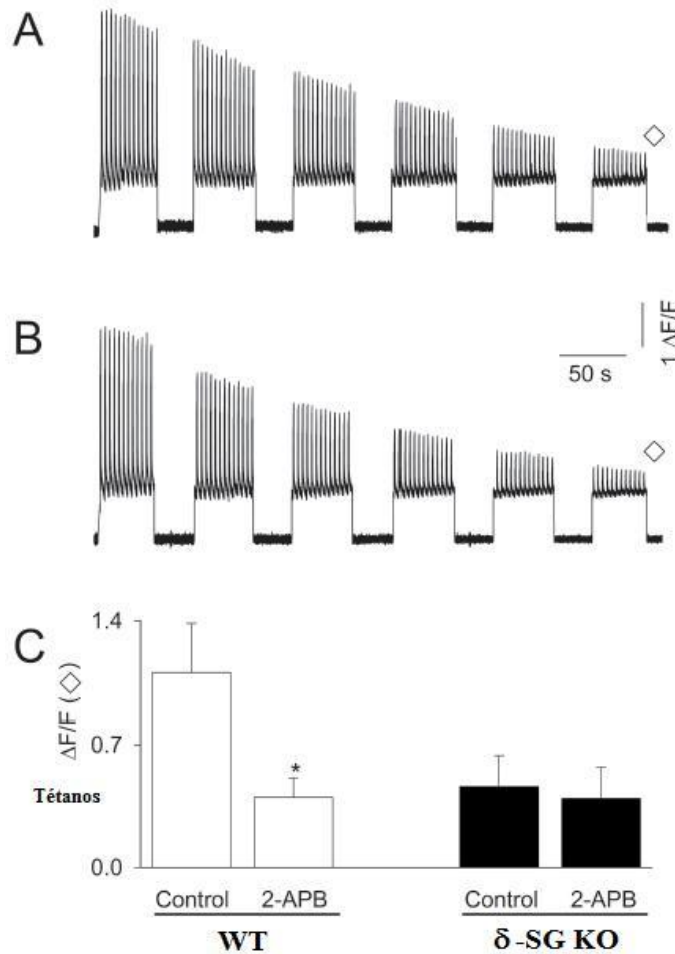


Figura 15. Influencia de 2-APB en las señales de Ca^{2+} durante SS y tétanos en fibras musculares de ratones WT y δ -SG KO durante actividad prolongada. A) Registros $\Delta F/F$ de fluorescencia de una fibra muscular aislada WT en presencia de 2-APB. B) Registros correspondientes a una fibra muscular aislada δ -SG KO. La amplitud y escala de tiempo es la misma para A y B. C) Las barras representan los valores promedio de los picos $\Delta F/F$ de la última señal tetánica (\diamond) de experimentos realizados en la ausencia (control) o en la presencia de 2-APB, como en A y B. Barras blancas son de experimentos con fibras WT y barras negras con KO (n=7-10). Las diferencias en los valores de los picos $\Delta F/F$ entre el control y los experimentos con 2-APB son significativos únicamente para las fibras WT (*) ($P > 0.05$).

6.9 LOS MÚSCULOS EDL DE LOS RATONES δ -SG KO PRESENTAN RECUPERACIÓN PARCIAL DESPUÉS DE ESTIMULACIÓN CONSECUTIVA.

Para analizar las propiedades mecánicas de los músculos de ratones WT y ratones distróficos se aislaron músculos EDL que fueron sometidos a protocolos de contracción mecánica (detalles en sección de metodología). En la figura 16A, se muestra un protocolo de fatiga y recuperación. La fatiga se obtiene después de estimulación tetánica y la fuerza de recuperación después de un periodo de reposo. La figura 16B muestra la fuerza normalizada del experimento de fatiga para los músculos de los ratones WT y δ -SG KO (n=3).

La pérdida de fuerza del 70% fue alcanzada en ambos músculos al mismo tiempo (70 segundos), siendo 77mN para el WT y 67 mN para el δ -SG KO; lo cual no tiene diferencia significativa. En la figura 16C se muestra el porcentaje de recuperación después del protocolo de fatiga, a los 5 minutos el músculo del ratón WT tiene una recuperación del 70%, mientras que la del δ -SG KO es de 55%. La fuerza de recuperación máxima fue a los 20 minutos con una recuperación de 89% para el WT, en contraste en ese mismo tiempo se registró una fuerza de recuperación de solamente 46% para el δ -SG KO. En el músculo de los ratones WT se observó un incremento en fuerza durante la recuperación que da evidencia del fenómeno de fatiga. En el caso de los ratones δ -SG KO, se observó una recuperación parcial con una caída de fuerza significativa después de estimulación consecutiva, lo cual muestra un daño de las fibras musculares.

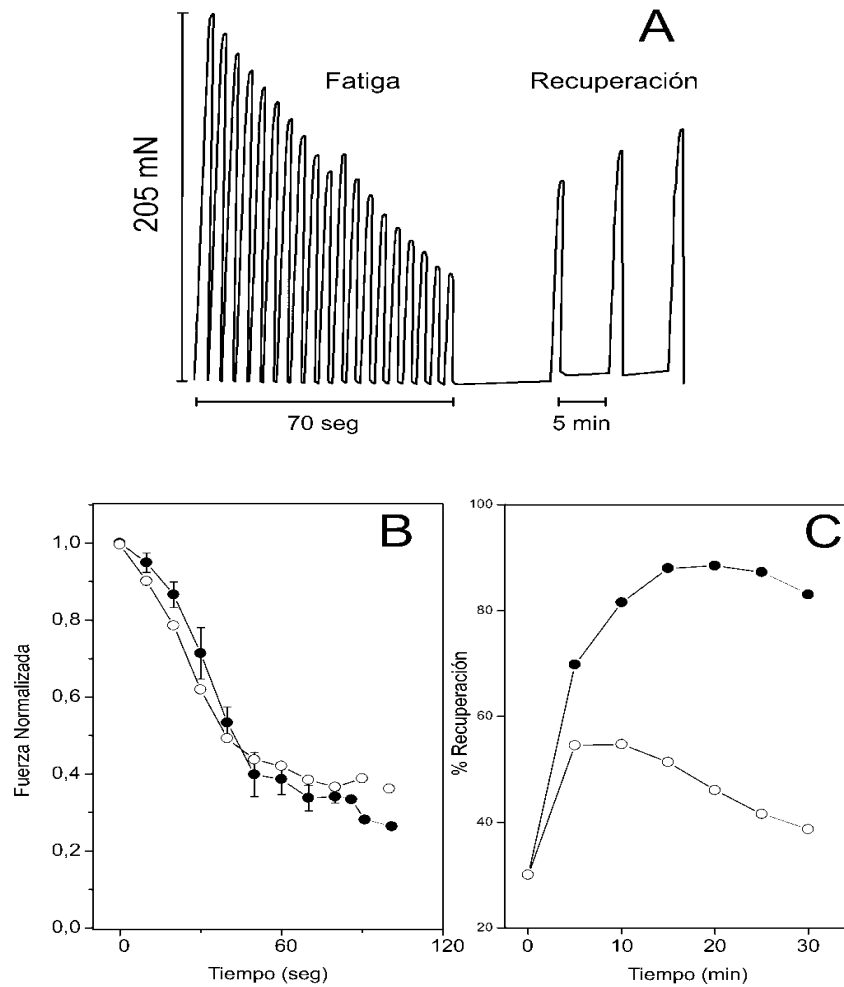


Figura 16. Fatiga y recuperación en músculos EDL de ratones WT y δ -SG KO. A) Protocolo de fatiga y recuperación. La fatiga es obtenida después de estimulación tetánica y la recuperación después de un periodo de reposo. B) Fuerza normalizada obtenida del experimento de fatiga con músculos de ratones WT (●) y δ -SG KO (○). La pérdida de fuerza del 70% fue alcanzada en ambos músculos al mismo tiempo (70 seg), siendo 77mN para el WT y 67 mN para el δ -SG KO. C) Porcentaje de recuperación después del protocolo de fatiga con intervalos de reposo de 5 min entre estimulaciones para el WT (●) y el δ -SG KO (○).

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

El complejo SG-SSPN forma parte del DAPC en sarcolema y se ha demostrado que mutaciones en los genes que codifican para estas proteínas causan distrofias musculares y en algunos casos cardiomiopatía dilatada (Straub et al., 1997, Coral-Vázquez et al., 1999). El complejo SG es ensamblado a partir de un núcleo compuesto por β y δ -SG. La pérdida de δ -SG produce la ausencia completa de los demás SGs. En contraste, una mutación en γ -SG reduce, pero no elimina la expresión de α -, β -, δ - y ε -SG (Hack et al., 2000, Ozawa et al., 2005). Los sarcoglicanos no únicamente se localizan en el sarcolema de las fibras musculares, en nuestro grupo de investigación, recientemente ha sido identificada la isoforma δ -SG3 que se propone se localiza en RS (Estrada et al., 2006), además otros grupos han localizado a δ -SG, γ -SG (Ueda et al., 2001) y μ SPN (Miller et al., 2006) en membranas de RS de las fibras de músculo esquelético.

En este proyecto, hemos profundizado en el conocimiento que tenemos sobre la isoforma δ -SG3 al realizar experimentos de microscopía y pruebas bioquímicas que nos han permitido localizar específicamente la isoforma. Encontramos que δ -SG3 colocaliza con el RyR y SERCA1, lo cual nos indica que la isoforma se encuentra en la parte longitudinal y cisternas terminales de RS.

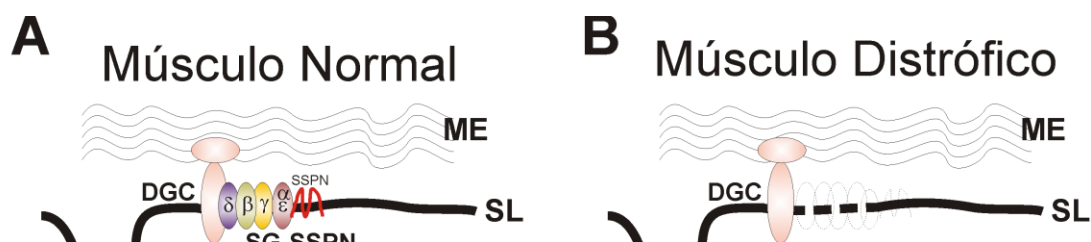
Por otra parte, en este estudio también hemos realizado pruebas bioquímicas que consisten en análisis de inmunolocalización utilizando membranas purificadas de músculo esquelético de ratones WT y δ -SG KO. En las membranas de los ratones WT encontramos a δ -SG1 y γ -SG en membranas de TT, a δ -SG1, γ -SG, δ -SG3 y

μ SPN en RSL y a δ -SG3 y μ SPN se localizan predominantemente en RSH. Recientemente, Ueda y colaboradores (2001) publicaron un trabajo donde se propone que δ -SG1 se localiza en la cisterna terminal de RS y γ -SG en la parte longitudinal y cisterna terminal de RS. Los autores proponen esta localización basados en experimentos de microscopía, en los cuales es difícil apreciar la localización específica de las proteínas debido a la pequeña distancia entre TT y cisternas terminales de RS, las cuales en promedio se encuentran entre 20 y 50 nm conforme ha sido determinado por microscopía electrónica (Suzuki et al., 2003). La evidencia presentada en esta tesis se basa en un análisis bioquímico de membranas purificadas, el cual revela que δ -SG1 y γ -SG se localizan en TT y no en la cisterna terminal de RS en las fibras de músculo esquelético. Además, en nuestros experimentos hemos podido distinguir entre las isoformas de δ -SG, mostrando que δ -SG3 está localizada en la cisterna terminal de RS junto con μ SPN.

Las membranas de TT y RS aisladas del músculo esquelético de ratones δ -SG KO presentan una deficiencia secundaria de γ -SG y μ SPN. Este fenómeno es similar a lo que ocurre en sarcolema (Hack et al., 2000), sugiriendo que las isoformas de δ -SG podrían participar en una función similar como proteína nucleadora para el ensamblaje de un posible complejo homólogo SG-SSPN en TT y RS.

En músculo, la activación está controlada por las interacciones cercanas de dos sistemas membranales, los TT y el RS, los cuales están estructural y funcionalmente unidos en unidades liberadoras de calcio (ULC). Las ULC son sitios en los cuales el Ca^{2+} es rápidamente liberado del RS a través de RyR, bajo

el control del sensor de voltaje DHPR localizado en TT (Franzini-Armstrong et al., 1997). La bomba de calcio (SERCA1) funciona para bombear el calcio de regreso al RS terminando con ello la contracción muscular. Debido a que estas membranas están involucradas en la regulación de la concentración de calcio dentro del músculo esquelético, nos referimos a ellas como membranas reguladoras de calcio (MRC). Nuestros resultados demuestran que podría existir un complejo homólogo SG-SSPN, el cual denotaremos como complejo MRC SG-SSPN (MRCSS). Hasta ahora, este complejo está compuesto de las isoformas de δ -SG, γ -SG y μ SPN y la combinación depende de la membrana específica (TT, RSL o RSH). Por esa razón, proponemos subtipos de este complejo (MRCSS_{TT}, MRCSS_{RSL}, MRCSS_{RSH}) (Figura 17).



Aunado a lo anterior, en la distrofia muscular, la homeostasis intracelular alterada de calcio es una señal de mal funcionamiento muscular y se ha propuesto como un proceso temprano de iniciación de la activación de las proteasas dependientes de calcio (Turner et al., 1991, 1993). Algunos estudios han demostrado el

incremento de la concentración de calcio citosólico debajo del sarcolema o dentro de compartimentos celulares en las fibras de músculo esquelético de pacientes con DMD y ratones mdx (Mallouk et al., 2000, Robert et al., 2001).

En cuanto a proteínas de membrana que son claves para la regulación de Ca^{2+} han sido publicados distintos trabajos que muestran evidencia contradictoria. Estudios previos del músculo de ratones distróficos deficientes en distrofina (mdx) muestran que SERCA1, calsecuestrina, DHPR y parvalbumina podrían estar afectadas en el proceso de enfermedad (Niebroj-Dobosz et al., 1989, Gailly et al., 1993, Kargacin et al., 1996, Pereon et al., 1997). Sin embargo, Culligan y colaboradores (2001) presentaron evidencia que no revela ningún cambio drástico en los perfiles de inmunoquímicos de calsecuestrina y DHPR utilizando preparaciones de músculo de ratones mdx en comparación con los controles. Estos autores propusieron una disminución drástica en las proteínas parecidas a calsecuestrina de 150-220 kDa y con ello, una disminución en la unión de Ca^{2+} en el RS del músculo distrófico. En el caso de SERCA1, análisis bioquímicos previos muestran que el coeficiente de Hill y la sensibilidad al calcio de la ATPasa fueron los mismos en vesículas de RS aislado de animales WT y mdx, sin embargo el bombeo de calcio era menor en el músculo mdx (Kargacin et al., 1996). En contraste, otros resultados mostraron que ni la abundancia ni la actividad total de la bomba de calcio está alterada (Culligan et al., 2001).

En el caso de los modelos distróficos deficientes en δ -SG, también ha sido presentada evidencia que muestra homeostasis de Ca^{2+} anormal en músculo esquelético (Iwata et al., 2005). Estos estudios se han realizado con cultivos de

miotubos del hámster BIO 14.6 que es deficiente en δ -SG. Ninguna deficiencia aparente en los niveles de expresión de DHPR, RyR, SERCA1 o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fueron encontradas. También se analizaron proteínas específicas como actina y el receptor de acetilcolina, así como proteínas del complejo DAPC y únicamente se encontraron deficiencias en SGs y SSPN (Iwata et al., 2005).

En este trabajo utilizando un modelo distrófico de ratón con deficiencia δ -SG, encontramos que al igual que en el hámster BIO 14.6 no hay diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión de las proteínas DHPR, RyR y SERCA1. Por primera vez en un modelo deficiente de δ -SG, se investigó la repercusión funcional de la ausencia en MRC de las isoformas de δ -SG para determinar si esto contribuye a la homeostasis de calcio intracelular alterada, que es parte de la patología de la distrofia muscular.

Para este análisis funcional fueron realizados experimentos comparando las membranas aisladas de los músculos esqueléticos de los ratones WT y δ -SG KO. Los resultados descritos en este trabajo muestran que la SERCA1 de los animales distróficos tiene las siguientes características en comparación con los WT: 1) Un incremento considerable en la liberación pasiva de Ca^{2+} , en el bombeo de Ca^{2+} dependiente de ATP y en la actividad hidrolítica de ATP de SERCA1 en vesículas de RSL en comparación con los WT; 2) Una modificación en la estabilidad térmica de la bomba de Ca^{2+} causada por cambios en los dominios de unión a calcio, a nucleótidos y la presencia de dominios no determinados de transición presentes sólo en los perfiles de los animales distróficos.

Por lo tanto, en este trabajo hemos encontrado que la ausencia de las isoformas de δ -SG en RS provoca un mal funcionamiento de SERCA1 que podría estar relacionada a la homeostasis alterada de calcio y con ello contribuir a la patología de la enfermedad (Figura 17).

Para continuar investigando el papel que tienen las isoformas de δ -SG, fueron realizados experimentos utilizando fibras musculares aisladas del FDB de ratones WT y δ -SG KO. Nuestros resultados muestran que en las fluctuaciones de fluorescencia, dadas como resultado de la unión del marcador fluorescente Fluo-3 y Ca^{2+} intracelular, no existen diferencias significativas en protocolos de estimulación de sacudida simple y tétanos simple entre las fibras de los ratones WT y δ -SG KO. Pensamos que en los animales distróficos existe una alteración en SERCA1 que provoca una salida pasiva de Ca^{2+} y a la vez un aumento en la función de la bomba que regresa el ion al RS; en un experimento donde se detecta el calcio en citosol, no se aprecia este mal funcionamiento de la bomba, debido a que la fuga de calcio es compensada por un aumento en la función de SERCA1.

En tétanos repetidos observamos que en el caso de las fibras aisladas de los ratones δ -SG KO la caída de la señal de fluorescencia es mayor en comparación con los WT. Además, el nivel de recuperación con sacudida simple y tétanos es menor en el caso de los animales distróficos. Este comportamiento podría deberse a dos razones: 1) que los reservorios de calcio intracelular después de la actividad prolongada no son abastecidos eficientemente por los canales SOC y 2) a muerte celular (Hack et al., 2000). En este trabajo encontramos que la actividad de SOC se encuentra alterada en los animales δ -SG KO realizando experimentos con

soluciones libres de calcio en el medio extracelular y comprobándolo con un bloqueador específico de los canales SOC. Por lo tanto, también encontramos que los canales SOC de los animales distróficos δ -SG KO tienen un mal funcionamiento, lo cual podría ser otro factor que contribuye a la patología de la enfermedad.

Teniendo resultados a nivel de proteína, membranas purificadas y fibras aisladas, continuamos con el análisis de músculo completo para investigar con más detalle la participación de las isoformas de δ -SG. Para este fin fueron realizados experimentos de propiedades mecánicas utilizando protocolos de contracciones concéntricas con estimulación tetánica. En este caso, después de un protocolo de estimulación de alta frecuencia, la disminución de fuerza hasta un 30% se alcanzó en el mismo periodo de tiempo en ambos músculos. Sin embargo, en el caso del músculo de los ratones δ -SG KO encontramos que la recuperación después de la fatiga es mucho menor que en el caso de los ratones WT, al igual que en los experimentos con fibras aisladas, sugiriendo un mal funcionamiento de los SOC y daño celular.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizó la localización de las isoformas de δ -SG y su participación en la homeostasis de calcio intracelular en músculo esquelético.

Nuestros resultados aportan nueva evidencia que muestra por primera vez la existencia de formas alternas del complejo SG-SSPN en membranas de TT y RS de músculo esquelético. La ausencia primaria de las isoformas de δ -SG provoca la deficiencia secundaria de γ -SG y μ SPN en MRC, un fenómeno comparable a lo que ocurre en sarcolema.

Durante este trabajo se realizaron experimentos de inmunofluorescencia utilizando criosecciones de músculo esquelético completo y fibras aisladas, la extracción de membranas purificadas aisladas del músculo esquelético de 50 ratones WT y 50 ratones δ -SG KO que se utilizaron para estudios de Western blot, captura y salida de calcio, hidrólisis de ATP y calorimetría. Además fueron realizados experimentos utilizando un marcador fluorescente sensible a calcio para observar las fluctuaciones de Ca^{2+} en fibras aisladas. Finalmente, el trabajo se completó con estudios de fisiología analizando las propiedades mecánicas de los músculos completos de ratones WT y δ -SG KO. Con todo lo anterior encontramos:

- 1) Un aumento en la toma y salida de calcio, así como en la actividad hidrolítica de SERCA1 en los ratones δ -SG KO comparados con los WT. Así mismo, encontramos por análisis de calorimetría, un cambio conformacional de SERCA1 aislada del músculo de los animales δ -SG KO.

2) Un mal funcionamiento de los canales SOC de las fibras aisladas de ratones δ -SG KO presentando una deficiencia en el llenado de los reservorios intracelulares de calcio.

3) Un incremento en fuerza, pero con una disminución en recuperación después de fatiga en el músculo completo de los ratones δ -SG KO en comparación con los ratones WT.

Este conocimiento nos abre la posibilidad de entender mejor la fisiopatología de las distrofias musculares y proponer nuevos blancos farmacológicos que restauren la homeostasis de calcio y disminuyan la degeneración muscular.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

En este trabajo hemos analizado la localización de las isoformas de δ -SG en MRC y su participación en la homeostasis de calcio intracelular en músculo esquelético de ratón. Nuestros resultados muestran evidencia que ayuda a entender mejor la patología asociada a la ausencia de las isoformas de δ -SG.

Debido a que la homeostasis de calcio tiene un papel central en el funcionamiento del músculo estriado hemos comenzado a explorar la localización y participación de las isoformas de δ -SG en corazón.

La evidencia presentada en este trabajo hace interesante explorar el papel de las isoformas de δ -SG en tejido cardíaco donde se presenta cardiomiopatía dilatada. Para ello se ha pensado la posibilidad de realizar pruebas de microscopía, bioquímicas y de microarreglos comparando el músculo cardíaco de ratones WT y δ -SG KO.

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS

Adams, ME, Dwyer, TM, Dowler, LL, White, RA, Froehner, SC (1995). Mouse α 1- and β 2-syntrophin gene structure, chromosome localization, and homology with a disc large domain. *J. Biol. Chem.* 270:25859-25865.

Adams, ME, Kramarcy, N, Krall, SP, Possi, SG, Rotundo, RL, Sealock, R, Froehner, SC (2000). Absence of α -syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J. Cell. Biol.* 150:1385-1398.

Ahn AH, Kunkel LM (1995). Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol.* 128:363–371.

Ahn, AH, Freener, CA, Gussoni, E, Yoshida, M, Ozawa, E, Kunkel, LM (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J. Biol. Chem.* 271:2724-2730.

Bakker AJ, Head SI, Williams DA, Stephenson DG (1993). Ca^{2+} levels in myotubes grown from the skeletal muscle of dystrophic (*mdx*) and normal mice. *J. Physiol.* **460**:1–13

Balasubramanian S, Fung ET, Haganir RL (1998). Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. *FEBS Lett.* 432:133-140.

Blake DJ, Nawrotzki R, Peters MF, Froehner SC, Davies KE (1996). Isoform diversity of dystrobrevin, the murine 87k-Da postsynaptic protein. *J. Biol. Chem.* 271:7802-7810.

Brenman JE, Chao DS, Gree SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Brecht DS (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the post-synaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.

Burghes AH, Logan C, Hu X, Belfall B, Worton RG & Ray PN (1987). A cDNA clone from the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene. *Nature (London)* **328**, 434–437.

Bushby KM (1999). The limb-girdle muscular dystrophies: diagnostic guidelines. *Eur J Paediatr Neurol* 3: 53– 58.

Campbell KP (1995). Molecular basis of three muscular dystrophies: disruption of the cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.

Campbell, KP (1995b). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80: 675-679.

Caputo C, Bolaños P (1994). Fluo-3 signals associated with potassium contractures in single amphibian muscle fibres. *J. Physiol.* 481: 119–128.

Carroll SL, Klein MG, Schneider MF (1995). Calcium transients in intact rat skeletal muscle fibers in agarose gel. *Am. J. Physiol.* 269: C28–C34.

- Clarke MS, Khakee R, McNeil PL. (1993). Loss of cytoplasmic basic fibroblast growth factor from physiologically wounded myofibers of normal and dystrophic muscle. *J. Cell Sci.* 106:121–133.
- Collet C, Allard B, Tourneur Y, and Jacquemond V (1999). Intracellular calcium signals measured with indo-1 in isolated skeletal muscle fibres from control and *mdx* mice. *J Physiol* 520: 417–429.
- Comerlato EA, Scola RH, Werneck LC (2005). Limb-girdle muscular dystrophy: an immunohistochemical diagnostic approach. *Arq Neuropsiquiatr* 63: 235– 245.
- Cohn RD, Campbell KP (2000). Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23:1456–1471.
- Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP (1999). Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98:465–474.
- Crosbie RH, Lebakken CS, Holt KH, Venzke DP, Straub V, Lee JC, Grady RM, Chamberlain JS, Sanes JR, Campbell KP (1999). Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol* 145:153–165.
- Culligan K, Banville N, Dowling P, Ohlendieck K (2002). Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic *mdx* muscle. *J Appl Physiol* 92: 435-445.
- Dulhunty AF (2006). Excitation-contraction coupling from the 1950s into the new millennium. [*Clin Exp Pharmacol Physiol*](#). Sep;33(9):763-72.
- Durbeej M, Campbell KP (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 12(3):349-61. Review.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315–319.
- Ervasti JM, Campbell KP (1991). Membrane Organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66, 1121–1131.
- Ervasti JM, Campbell KP (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.* 122: 809-823.
- Estrada FJ, Mornet D, Rosas-Vargas H, Angulo A, Hernández M, Becker V, Rendón A, Ramos-Kuri M, Coral-Vázquez RM (2006). A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(3):865-71.

Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR (1997). Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutate in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.* 272: 32534-32538.

Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Stteinhardt RA (1990). Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 250:673–6.

Franzini-Armstrong C, Protasi F (1997). Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77: 699–729.

Franzini-Armstrong C (2004). The membrane systems of muscle cells, 3rd edn. In: Engel, Franzini-Armstrong, editors. *Miology*. Mc Graw-Hill; pp. 232–256.

Gailly P, Boland B, Himpens B, Casteels R, and Gillis JM (1993). Critical evaluation of cytosolic calcium determination in resting muscle fibres from normal and dystrophic (mdx) mice. *Cell Calcium* 14: 473–483.

Gailly P, Hermans E, Octave JN, Gillis JM (1993b). Specific increase of genetic expression of parvalbumin in fast skeletal muscles of mdx mice. *FEBS Lett.* 326: 272–274.

Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT, Sanes JR (1999). Role of α -dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin dependent muscular dystrophies. *Nat. Cell. Biol.* 1:215-220.

Hack AA, Groh ME, McNally EM (2000a). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech.* 48:167–180.

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

Henry MD, Campbell KP (1999). Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol.* 11:602–607.

Ibraghimov-Beskrovnyaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) *Nature* **355**, 696–702.

Iwata Y, Katanosaka Y, Shijun Z, Kobayashi Y, Hanada H, Shigekawa M, Wakabayashi S (2005). Protective effects of Ca²⁺ handling drugs against abnormal Ca²⁺ homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol.* 70(5):740-51.

Jung D, Duclos F, Apostol B, Straub V, Lee JC, Allamand V, Venzke DP, Sunada Y, Moomaw CR, Leveille CJ, Slaughter CA, Crawford TO, McPherson JD, Campbell KP (1996). Characterization of d sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem* 271:32321–32329.

Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S (1999). α 1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric

oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J. Biol. Chem.* 274:2193-2200.

Kargacin ME, Kargacin GJ (1996). The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered in dystrophic muscle. *Biochim Biophys Acta* 1290: 4–8.

Lacampagne A, Klein MG, Ward CW, Schneider MF (2000). Two mechanisms for termination of individual Ca^{2+} sparks in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 7823–7828.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM (2004). The Dystrophin Glycoprotein Complex Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circ Res.* 94: 1023-1031.

Lepock JR, Rodahl AM, Zhang C, Heynen ML, Waters B, Cheng KH (1990). Thermal denaturation of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains. *Biochemistry* 29: 681-689.

Lim LE, Campbell KP (1998). The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 11:443-452.

Mallouk N, Jacquemond V, Allard B (2000). Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4950–5.

McCarter GC, Steinhardt RA (2000). Increased Activity of Calcium Leak Channels Caused by Proteolysis Near Sarcolemmal Ruptures. *J Membrane Biol* 176, 169-174.

McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bonnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HG, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, and Hoffman EP (1996). Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of γ -sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 5: 1841–1847.

Michalak M, Fu SY, Milner RE, Busaan JL, Hance JE (1996). Phosphorylation of the carboxyl-terminal region of dystrophin. *Biochem. Cell. Biol.* 74:431-437.

Miller G, Peter AK, Espinoza E, Heighway J, Crosbie RH (2006) Over-expression of Microspan, a novel component of the sarcoplasmic reticulum, causes severe muscle pathology with triad abnormalities. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 27, 545–558.

Milner RE, Busaan JL, Holmes CF, Wang JH, Michalak M (1993). Phosphorylation of dystrophin. The carboxyl-terminal region of dystrophin is a substrate for in vitro phosphorylation by p34cdc2 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 268:21901-21905.

Monaco AP, Neve RL, Colletti FC, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature (London)* 323, 646–650.

Newbell BJ, Anderson JT, Jarrett HW (1997). Ca^{2+} -calmodulin binding to mouse $\alpha 1$ syntrophin: syntrophin is also a Ca^{2+} -binding protein. *Biochemistry* 36:1295-1305.

Niebroj-Dobosz I, Kornguth S, Schutta H, Siegel FL, and Hausmanowa-Petrusewicz I (1989). Proteins of muscle subcellular fractions in Duchenne progressive muscular dystrophy stained with “stains-all” cationic carbocyanine dye and with Coomassie Blue. *Muscle Nerve* 12: 273–280.

Nigro V, Piluso G, Belsito A, Politano L, Puca AA, Papparella S, Rossi E, Viglietto G, Esposito MG, Abbondanza C, Medici N, Molinari AM, Nigro G, Puca GA (1996). Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 5:1179–1186.

Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M (2004). Identification and characterization of epsilon-sarcoglycans in the central nervous system. *Mol Brain Res.* 125:1-12.

Ortega A, Alvarez R, Pérez F, Jiménez AM, Gutiérrez JA, Vázquez P (2004). Redox regulation of vicinal dithiol groups of the SERCA1 participates in muscle fatigue. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25: 597-608.

Ozawa E, Mizuno Y, Hagiwara Y, Sasaoka T, Yoshida M (2005). Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve*, 32: 563-576.

Pereon Y, Dettbarn C, Navarro J, Noireaud J, and Palade PT (1997). Dihydropyridine receptor gene expression in skeletal muscle from mdx and control mice. *Biochim Biophys Acta* 1362: 201–207.

Peters MF, Adams ME, Froehner SC (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J. Cell. Biol.* 138:81-93.

Porter KR, Palade GE (1957). Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol* 3:269–300.

Pressmar J, Brinkmeier H, Seewald MJ, Naumann T, and Rudel R (1994). Intracellular Ca²⁺ concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibres. *Pflugers Arch* 426: 499–505.

Rafii MS, Hagiwara H, Mercado ML, Seo NS, Xu T, Dugan T, Owens RT, Hook M, McQuillan DJ, Young MF, Fallon JR (2006). Biglycan binds to alpha- and gamma-sarcoglycan and regulates their expression during development. [*J Cell Physiol.* 209\(2\):439-47.](#)

Rando TA (2001). The dystrophin– glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24: 1575– 1594.

Robert V, Massimino ML, Tosello V, Marsault R, Cantini M, Sorrentino V (2001). Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem* 276:4647–51.

Roseblatt M, Hidalgo C, Vergara C, Ikemoto N (1981) Immunological and biochemical properties of transverse tubules membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 256 (15): 8140-8148.

Rossi D, Barone V, Giacomello E, Cusimano V and Sorrentino V (2008) The Sarcoplasmic Reticulum: An Organized Patchwork of Specialized Domains. *Traffic* 9, 1044-1049. Review.

Rossi AE, Boncompagni S, Dirksen RT (2009). Sarcoplasmic Reticulum/Mitochondrial Symbiosis: Bidirectional Signaling in Skeletal Muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 37(1): 29-35.

Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol.* 150:1209–1214.

Rybakova IN, Patel JR, Davies KE, Yurchenco PD, Ervasti JM (2002). Utrophin binds laterally along actin filaments and can couple costameric actin with sarcolemma when overexpressed in dystrophin-deficient muscle. *Mol Biol Cell.* 13:1512–1521.

Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12413-12418.

Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyo-oka T, Hanaoka 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. U.S.A.* 94: 13873-13878.

Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP (2000). Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of β -dystroglycan: identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 275:38048–38058.

Straub V, Campbell KP (1997). Muscular dystrophies and the dystrophinglycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10:168-175.

Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E (1995). Mammalian α 1- and α 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol.* 128:373–381.

Suzuki S, Nagayoshi H, Ishino K, Hino N, Sugi H (2003). Ultrastructural organization of the transverse tubules and sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle, *J. Electron. Microsc.* 52: 337–347.

Thompson TG, Chan YM, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HG, McNally EM, Watkins S, Kunkel LM (2000). Filamin-2 (FLN2): a muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J. Cell. Biol.* 148:115-126.

Thomas D, Tovey SC, Collins TJ, Bootman MD, Berridge MJ, Lipp P (2000). A comparison of fluorescent Ca^{2+} indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca^{2+} signals. *Cell Calcium* 28: 213–233.

Turner PR, Fong P, Denetclaw WF, Steinhardt RA (1991). Increased calcium influx in dystrophic muscle. *Journal of Cell Biology* 115: 1701–1712.

Turner PR, Schultz R, Ganguly B, Steinhardt RA (1993). Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *Journal of Membrane Biology* 133, 243–251.

Yoshida M, Ozawa E (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* 108:748–752.

Yoshida M, Suzuki A, Yamamoto H, et al. (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl β -D-glucoside. *Eur J Biochem* 222:1055–1061.

Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM (2002). ζ -Sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11:2147–2154.

Intracellular Ca²⁺ transients in δ -Sarcoglycan Knockout Mouse Skeletal Muscle

Alhondra Solares-Pérez^{*,+}, Jorge A. Sánchez⁺⁺, Alejandro Zentella-Dehesa[&],
María C. García^{++,#}, Ramón M. Coral-Vázquez^{*,+,#,#}

*Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI-IMSS, México, D.F.

⁺Present address: Laboratorio Multidisciplinario, Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, I. P. N., México, D.F.

[#]División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D.F.

⁺⁺Departamento de Farmacología, Cinvestav-IPN. Av. IPN 2508. México, D.F.

[&]Departamento de Bioquímica I.N.N.S.Z. and Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico, D.F.

Acknowledgments: This work was supported by CONACyT, grants 60880 (J.S), 82667 (M.C.G), and 55199 (R.M.C.V.). R.M.C.V. was supported by grant 2006/1A/I/078 from IMSS. A.S.P. was supported during the PhD program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (223377), IMSS and Dirección General de Estudios de Postgrado at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

[§]Corresponding authors: Ramón M. Coral-Vázquez, División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, San Lorenzo 502-2º piso, México, D.F., 03100. Tel. (5255) 55755306, Fax. (5255) 55755306, E-mail: rmcoralv@prodigy.net.mx. María C. García, Departamento de Farmacología, Cinvestav-IPN. Av. IPN 2508. México, D.F., 07360. Tel. (5255) 57473800 ext. 5445, Fax (5255) 55777090, E-mail: cgarcia@cinvestav.mx.

Keywords: Muscular dystrophy; sarcoglycan–sarcolemma complex; Ca²⁺ transients; sarcoplasmic reticulum; muscle fibers; intracellular calcium.

ABSTRACT

Background: The δ -sarcoglycan (δ -SG) knockout (KO) mice develop skeletal muscle histopathological alterations similar to those seen in humans with limb muscular dystrophy.

Membrane fragility and increased Ca^{2+} permeability have been linked to muscle degeneration.

However, little is known about the mechanisms by which the genetic defects lead to disease.

Methods: Isolated skeletal muscle fibers of wild type and δ -SG KO mice were used to investigate whether the absence of δ -SG alters the increase in intracellular Ca^{2+} during single twitches and tetani or during repeated stimulation. Immunolabeling, electrical field stimulation and Ca^{2+} transients recording techniques with fluorescent indicators were used.

Results: Ca^{2+} transients during single twitches and tetani, generated by muscle fibers of δ -SG KO mice, are similar to those of wild type mice, but their amplitude is greatly decreased during protracted stimulation in KO compared to wild type fibers. This impairment is independent of extracellular Ca^{2+} and is mimicked in wild type fibers by blocking SOC channels with 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). Also, immunolabeling indicates the localization of a δ -SG isoform in the sarcoplasmic reticulum of the isolated skeletal muscle fibers of wild type animals, which could be related to the functional differences between wild type and KO muscles.

Conclusions: δ -SG has a role on calcium homeostasis in skeletal muscle fibers.

General significance: These results support a possible role of δ -SG on calcium homeostasis.

The alterations caused by the absence of δ -SG may be related to the pathogenesis of muscular dystrophy.

Introduction

In skeletal muscle, the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) provides structural elements essential for the proper association between the extracellular matrix and the cytoskeleton of the muscle fiber. The DGC complex consists of the dystroglycan subcomplex, the sarcoglycan-sarcospan (SG-SSPN) subcomplex, and the cytoplasmic subcomplex [1]. The

SG-SSPN subcomplex is composed of the transmembranal proteins α -, β -, δ -, ϵ -, and γ -sarcoglycan (SG), and sarcospan [2]. Mutations in α -, β -, γ -, and δ -SG cause autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies and lead to either a partial or complete loss of SG proteins [3-5]. The heteromeric SG subcomplex assembles around a β/δ -sarcoglycan core early in the secretory pathway [6]. The δ -SG KO mice show skeletal muscle histopathological alterations similar to those of human limb muscular dystrophy. These animals also show cardiomyopathy due to impairment of sarcolemmal integrity and abnormal coronary vascular constriction [6-7]. Furthermore, δ -SG KO muscle is sensitive to eccentric contraction-induced disruption of the plasma membrane and has undetectable levels of α -, β -, and γ -sarcoglycan, indicating that in the absence of δ -SG, the remaining sarcoglycans cannot assemble properly [6]. Recently, we have identified an isoform of δ -SG (δ -SG3) that originates from alternative splicing of the δ -SG transcript and that could be located in the sarcoplasmic reticulum membrane. In δ -SG KO mice both isoforms are absent [8]. Although the molecular effects of δ -SG deficiency in striated muscle have been studied, there is little information about the physiological consequences of δ -SG deficiency in skeletal muscle at the cellular level. Twitch and tetanic contraction in skeletal muscle fibers develop as a consequence of transient elevations in myoplasmic Ca^{2+} emanating from the stores of the sarcoplasmic reticulum (SR) when fibers generate action potentials [9]. When muscles are used intensively, they show a progressive decline in performance, which largely recovers after a period of rest. This reversible phenomenon is known as muscle fatigue [10]. The aim of the present study was to determine whether the absence of δ -SG alters the intracellular Ca^{2+} increase during single twitches and tetani and during repeated tetani. We found that individual isolated muscle fibers from δ -SG KO mice generate Ca^{2+} transients similar to those of wild type mice during single twitches and tetani, but the decrease in the amplitude of Ca^{2+} signals during repeated stimulation develops more rapidly and more completely than in normal muscle.

Materials and methods

Animals and muscle preparation. Mice B6.129-Sgcd^{tm1Mcⁿ}/J, δ -SG null animals (The Jackson Laboratory, USA) aged ~ 9 weeks were used. Age-matched C57Bl/10 wild-type mice were used as controls. Mice were euthanized by cervical dislocation, after which the *flexor digitorum brevis* (FDB) and *interossei* muscles of the hindlimbs were isolated and incubated at 34°C for 60 min in a Ca²⁺-Mg²⁺-free Tyrode solution plus 10% fetal calf serum (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA) and collagenase (0.5 mg · ml⁻¹, Sigma type IV, St. Louis, MO). The muscles were then rinsed and dissociated by gently triturating the enzyme-treated muscles through a fire-polished Pasteur pipette with collagenase-free Tyrode solution containing (mM): NaCl, 146; KCl, 5; CaCl₂, 2; MgCl₂, 1; glucose, 11; HEPES, 10; at pH=7.4. The experiments were performed according to the guidelines of the local animal care committee.

Immunofluorescence. Quadriceps muscles from adult mice were dissected, frozen in liquid nitrogen-isopentane and cut into 8 μ m cryostat sections. Coverslips with isolated fibers were fixed with methanol at -20°C for 10 minutes. Cryosections and fibers were blocked and permeabilized with 5% fetal bovine serum (FBS), 5% bovine serum albumin (BSA), 0.5% gelatin, and 0.5% Triton X-100 diluted in PBS for 1 h. Primary antibody to δ -SG3 (Invitrogen Co) and β -DG antibody (University of Iowa, Hybridoma Facility) were diluted in 2.5% FBS, 2.5% BSA, 0.25% gelatin, and 0.5% Tween 20 in PBS. Tissues and fibers were incubated for 120 min. After incubation with primary antibody, tissues and fibers were washed three times with 0.5% Tween 20 in PBS. Secondary antibody coupled to either carboxymethyl indocyanine-3 (Cy3) or fluorescein-isothiocyanate (FITC) was used, diluted 1:250 in PBS, 3% NGS, 1% BSA, and 0.5% Tween 20. Then, the tissues and fibers were rinsed three times with PBS, 0.5% Tween 20, and finally they were mounted and cell nuclei were stained using Vectashield-DAPI (Vector Lab). The tissues and fibers were examined with a fluorescence

microscope (Axioplan 2 Imaging Zeiss) under conventional parameters (Apotome Zeiss System).

Stimulation protocol. Muscle fibers were subjected to electrical field stimulation by using parallel platinum electrodes placed on opposite sides of the experimental chamber where a coverslip containing the dissociated muscle fibers was positioned. The chamber was flooded with the extracellular solution. A pulse generator (Digitimer model DS2A, England) provided the electrical stimuli to produce twitches and tetani at different frequencies as indicated. To produce muscle fatigue the following stimulation protocol was applied: First, a single stimulus was delivered to produce a twitch. This was followed by a train of stimuli that produced a tetanus, elicited 200 ms after the twitch. This train had a 300 ms duration and a frequency of 45 Hz. This stimulation pattern was repeated every 3 seconds for 6 min.

Recovery from fatigue was evaluated using the same stimulation protocol (single stimulus plus train) applied every 5 min. Recovery was assessed up to ~15 min after the end of fatigue.

Calcium recordings. We used Fluo-3 AM (1-10 μM) (Molecular Probes) to record Ca^{2+} transients at 22-23 °C. This dye undergoes large fluorescence changes upon Ca^{2+} binding, it has a large dynamic range, low compartmentalization [11], and has been used extensively in muscle [12-14]. Fibers were mounted in a chamber placed on the stage of an Optiphot microscope (Nikon, Tokyo). The fluorescence emitted by a preselected region of a stained muscle fiber, illuminated episcopically with monochromatic light at a wavelength of 485 nm, was filtered with a high-pass barrier filter (cut-on wavelength 535 nm) and detected with a low noise photodiode connected in a photovoltaic configuration. The mean basal fluorescence (F) from the same region of the muscle fiber was measured 300 ms prior to electrical stimulation, and was used to scale Ca^{2+} signals as $\Delta\text{F}/\text{F}$. This procedure minimizes the possible effects of changes in the concentration of the dye on fluorescence signals and it has been used extensively by others [12,15]. No attempts were made to calculate the actual

myoplasmic $[Ca^{2+}]$. Muscle fibers were allowed to rest at the bottom of the chamber on the glass coverslip to which they generally adhered well, making unnecessary the use of other procedures to immobilize the cells in order to prevent mechanical artifacts. In some experiments however, single fibers were suspended in 0.35% agar gel, following a procedure described in [16] with minor changes. The composition of the physiological saline solution was (in mM): 140 NaCl, 6 KCl, 2 CaCl₂, 3 MgCl₂, 5 HEPES, 11 glucose, and 0.025 *d*-tubocurarine chloride, at pH=7.4. 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB), a blocker of store operated channels [17] was used at a concentration of 50 μ M. 2-APB was added from a 50 mM stock solution in dimethyl sulfoxide. The final DMSO concentration was less than 0.01 %.

Results

Ca²⁺ signals in dystrophic muscle fibers

Fig. 1 A shows Ca^{2+} signals produced by single muscle fibers. The fluorescence signal generated during a twitch followed by a high frequency tetanus is illustrated for both a wild type and a KO muscle fiber. The time course and amplitude of Ca^{2+} signals in the δ -SG KO fiber were quite similar to those of the wild type muscle fiber. Fig 1 B summarizes results from similar experiments. No changes in peak $\Delta F/F$ values were observed in response to a single or tetanic stimuli. Similar results were obtained at low frequency tetani (30-45 Hz). As expected, the ratio between single and tetanic peak Ca^{2+} signals were unchanged (Fig. 1 C). Likewise, the full duration at half-maximum amplitude (FDHM) of the Ca^{2+} signal during a single stimulus in KO fibers was similar to that of wild type fibers (Fig. 1 C).

Although Ca^{2+} signals generated by KO muscle fibers during a single twitch or a single tetanus were quite similar to those of wild type muscle fibers, it is conceivable that significant changes in the magnitude of Ca^{2+} signals may be manifested after protracted activity. To examine this possibility, cycles of single and tetanic stimuli were repeated sequentially for 6 min (see Methods). Fig. 2 A (left panel) shows a representative experiment from a wild type muscle fiber. The amplitude of Ca^{2+} signals progressively declined. At the end of the stimulation cycles it decreased to a small fraction of its initial value. In KO muscle fibers, the decrease in $\Delta\text{F}/\text{F}$ values developed more quickly and more completely with the same stimulation pattern, as illustrated in the representative experiment in Fig. 2 A (right panel). The decrease in the magnitude of Ca^{2+} transients during twitches and tetani is illustrated with a larger time resolution in Fig. 2 B, that shows the first and last recordings from Fig. 2 A. Muscle fibers from KO mice not only had smaller twitch and tetanic Ca^{2+} transients at the end of the stimulation cycles, but recovery was also significantly diminished. Fig. 2 C summarizes results from recovery experiments. The average values of the first ($t=-6$) and the last ($t=0$) twitch and tetanic $\Delta\text{F}/\text{F}$ signals produced by the stimulation pattern are also plotted. The dashed line indicates the mean value of peak tetanic $\Delta\text{F}/\text{F}$ from wild-type fibers at the end of the stimulation cycles, which was plotted in both graphs for comparison. Recovery was initiated at the time signaled by the arrow ($t=0$). Consistent with the experiments illustrated in Fig. 2 A, the decrease in $\Delta\text{F}/\text{F}$ values was more striking in KO muscle fibers (right panel) than in wild type fibers (left panel). Furthermore, there was little recovery over time compared to results from muscle fibers of wild type mice.

In Fig. 3, we performed double-labeling with δ -SG3 and β -DG with wild type and KO quadriceps muscles cryosections. While staining of δ -SG3 is present only in the wild type muscle (Fig. 3 A), the β -DG staining of sarcolemma is present in both wild type and KO cryosections as shown in Fig. 3 A-B. The striated pattern perpendicular to sarcolemma of δ -

SG3 was confirmed with the immunolabeling of isolated FDB wild type mouse muscle fibers (Fig. 3 C-D), consistent with its localization at SR. This agrees with previous findings in mouse gastrocnemius muscle [8]. The absence of the δ -SG3 isoform at this critical location suggests that it plays an important role in handling intracellular Ca^{2+} in skeletal muscle. This possibility was further explored in the experiments described below.

Role of extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ on Ca^{2+} transients of KO muscle fibers

The experiments illustrated in Fig. 4 explore the role of external $[\text{Ca}^{2+}]$ on Ca^{2+} signals during protracted stimulation in wild type and KO muscle fibers. Single muscle fibers were stimulated as shown in Fig. 2. Left panels illustrate representative results from wild type fibers and right panels from KO fibers. Consistent with the results shown in Fig. 2 in normal Tyrode solution, the amplitude of Ca^{2+} signals in wild type fibers, associated to both single and tetanic stimuli, significantly declined at the end of the stimulation protocol (Fig. 4 A). When Ca^{2+} was withdrawn from the external solution, the decline in the amplitude of Ca^{2+} signals was more pronounced (Fig. 4 C). These results highlight the importance of extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ in wild type muscle. When the same experiment was performed in muscle fibers from KO mice, the amplitude of Ca^{2+} signals decreased to almost zero in the presence (Fig. 4 B) and in the absence (Fig. 4 D) of extracellular Ca^{2+} . Fig. 4 E-F summarize results of the fall of $\Delta F/F$ values and their recovery from repetitive stimulation in Ca^{2+} -free solutions. Fig. 4 E illustrates average results from wild type mouse muscle fibers as a function of time. Twitch (\circ) and tetanic (\bullet) $\Delta F/F$ values at the end of the stimulation cycles (arrow) decreased to a larger extent than in normal extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$, as indicated by the dashed line that was taken from Fig. 2. In addition, in Ca^{2+} -free solutions, muscle fibers recovered less. Fig. 4 F summarizes results from KO muscle fibers, in this preparation the absence of extracellular Ca^{2+} produced a large decline in twitch and tetanic $\Delta F/F$ values that was not significantly

different from that in normal Tyrode solution (Fig. 2) but there were almost no signs of recovery after the stimulation protocol was terminated.

Effects of 2-APB on Ca^{2+} transients of wild type and KO muscle fibers

The greater decline in Ca^{2+} signals observed in Ca^{2+} -free solutions during repetitive stimulation, described above, suggests that intracellular stores in muscle are being normally refilled from the extracellular space. Store operated channels play a key role in this process in many systems [16], therefore, it is possible that in δ -SG deficient mutant mice this mechanism is not operating properly. To gather further information on this possibility, we tested the action of 2-APB, a pharmacological probe that blocks SOC channels. First, we verified that 2-APB has no effect on twitch or tetanic $\Delta F/F$ signals (data not shown). Then, the action of 2-APB on Ca^{2+} transients during repetitive stimulation was tested. Fig. 5 A, illustrates representative $\Delta F/F$ signals from a wild type muscle fiber incubated in normal Tyrode solution to which 2-APB was added. The decline in the amplitude of twitch and tetanic $\Delta F/F$ signals at the end of the stimulation cycles was more pronounced than in the absence of the blocker (Fig. 2 A and Fig. 2 C), suggesting that blocking SOC activity contributes to the larger decline. Fig. 5 B illustrates the corresponding results from a representative experiment performed on a KO muscle fiber in the presence of 2-APB. The SOC blocker had very little effect on KO muscle fibers. Fig. 5 C, summarizes results from similar experiments as in Fig. 5 A and Fig. 5 B. Bars represent the average peak $\Delta F/F$ values of the last tetanic signal. In wild type muscle fibers (empty bars), the decline at the end of the stimulation was distinctly larger when SOC channels were blocked with 2-APB than in the absence of the blocker, and the level reached in the presence of 2-APB was similar to that observed in KO fibers recorded in normal Tyrode solution (Fig 2 and Fig. 5 C). Finally, when 2-APB was tested on KO fibers (filled bars), no further effect on tetanic decline was seen.

Discussion

The role of δ -SG on contraction has been examined in the BIO14.6 *hamster* KO model [18]. In early work [19], *in vitro* contractility studies showed that peak tension is significantly lower in the dystrophic compared with the control diaphragm, whereas optimal length, contraction time, and half-relaxation time are within control limits. Similar physiological abnormalities are also present in the soleus muscle [19]. The genetic cause for the dystrophic disease in the hamster model has been related to the loss-of-function mutation of the δ -SG gene [18]. In contrast, in the *mouse* dystrophic model, δ -SG deficient EDL muscles do not show significant changes in contraction during a twitch or tetanus, suggesting that the sarcomere and contractile apparatus are intact in the absence of the sarcoglycan complex [6]. This is not the case for other mouse models where different sarcoglycans are absent [20]. Although the contractile machinery appears intact in the δ -SG KO model, no previous information is available regarding Ca^{2+} transients associated with twitch or tetanic activity in the δ -SG null mouse muscle. Our present results are consistent with the findings of Hack et al. [6] since we found that Ca^{2+} transients during single twitches or tetani of δ -SG KO muscle fibers fall within normal limits. In addition, our experiments show for the first time that although Ca^{2+} transients do not change during a single twitch or tetanus, a severe decline in the amplitude of Ca^{2+} transients of KO muscle fibers during intense activity is observed.

During intense exercise or electrical stimulation of skeletal muscle, a gradual decline in performance arises. It is widely recognized that several factors are involved: a decreased Ca^{2+} sensitivity of the contractile proteins and a partial failure of SR to release Ca^{2+} during tetanus, associated with precipitation of calcium phosphate in SR with a contribution from reduced ATP and raised Mg^{2+} [9]. There are also changes in the concentrations of several ions in interstitial, transverse tubular, and intracellular compartments [21] and recent evidence suggests that when the extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ is diminished, a faster decline of force is observed

in soleus and EDL muscles. This suggests that a Ca^{2+} entry contributes to repletion of the stores [22-24].

It is well established that muscle contraction during a single twitch does not depend on the extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ [25]. This is because SR is rich in Ca^{2+} pumps with a large capacity to restore myoplasmic Ca^{2+} into this intracellular organelle after it is released during contraction. However, a significant amount of Ca^{2+} must be replenished due to its loss into the confined space of the T-tubules during repetitive stimulation [26,27]. In eukaryotic cells, the refilling of intracellular stores is mediated by store operated Ca^{2+} (SOC) channels [16]. In recent years, the existence of a SOC influx that it is capable of refilling the depleted SR within several minutes has been demonstrated in skeletal muscle fibers [28]. Furthermore, a functional SOC mechanism has been demonstrated in the T-system of skinned skeletal muscle fibers, a key location to refill the depleted SR [29]. The proper function of SOC requires the integrity of the triad junction; thus, in muscle cells lacking mitsugumin 29 (*mg29* KO mice), a synaptophysin-family related protein located in the junction between the plasma membrane and SR, a severe dysfunction of SOC is observed [22]. Interestingly, the dysfunction of SOC is accompanied by an increase in the susceptibility to fatigue [22] and a lesser recovery from fatigue is observed [30]. In agreement with these observations, a larger decrease in force after repetitive stimulation has been found after blocking SOC [24] and an enhanced activity of SOC decreases its decline [23].

Although our present experiments did not deal directly with the function of SOC in δ -SG KO muscle fibers, it is feasible that an altered SOC entry plays a role in the decline of peak Ca^{2+} transients of muscle fibers during the protracted stimulation that we describe in this paper. This is because low peak $\Delta F/F$ values after repetitive stimulation are observed in the δ -SG KO muscle in spite of a normal extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$, which suggests that internal stores are not being refilled properly. The action of the SOC channel blocker 2-APB on Ca^{2+} transients

described in the present experiments is also clearly consistent with this view. It would be expected that if δ -SG KO muscle fibers exhibit a very small SOC activity, the decline in Ca^{2+} transients by repetitive stimulation would be similar to that observed in wild type muscle fibers when SOC channels are blocked. We found that this is indeed the case. Furthermore, it would be expected that if SOC channels of δ -SG KO fibers are not functional to a large extent, 2-APB would be ineffective on the decline of Ca^{2+} transients in these fibers, as we found in the present experiments. The immunolocalization of δ -SG3 in the SR, as shown in the present experiments and in previous reports [31,8], further supports this idea.

Finally, alterations in SOC performance are not unprecedented in muscle disorders. For example, in Duchenne muscular dystrophy (*mdx*), a disease that results from the lack of dystrophin [18], alterations in the function of SOC have been described [32]. Also, it has been recently demonstrated that Ca^{2+} -release fluxes in *mdx* fibers are uniformly impaired with respect to those of normal fibers, indicating alterations in Ca^{2+} homeostasis at the level of microdomains [33].

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT, grants 60880 (J.S), 82667 (M.C.G), and 55199 (R.M.C.V.). R.M.C.V. was supported by grant 2006/1A/I/078 from IMSS. A.S.P. was supported during the PhD program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (223377), IMSS and Dirección General de Estudios de Postgrado at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. We thank Ascención Hernández for technical support.

Abbreviations

δ -SG, δ -Sarcoglycan; KO, knockout; DGC, dystrophin-glycoprotein complex; SG-SSPN, sarcoglycan-sarcospan; SG, sarcoglycan; SR, sarcoplasmic reticulum; EDL, extensor digitorum longus; SOC, store operated calcium channels.

References

- [1] J.M. Ervasti, K.J. Sonnemann, Biology of the striated muscle dystrophin glycoprotein complex, *Int. Rev. Cytol.* 265 (2008) 191-225.
- [2] K.A. Lavidos, R. Kakkar, E.M. McNally, The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma, *Circ. Res.* 94 (2004) 1023-1031.
- [3] L.E. Lim, K.P. Campbell, The sarcoglycan complex in limb girdle muscular dystrophy, *Curr. Opin. Neurol.* 11 (1998) 443–452.
- [4] A.A. Hack, M.E. Groh, E.M. McNally, Sarcoglycans in muscular dystrophy, *Microsc. Res. Tech.* 48 (2000a) 167–180.
- [5] I. Dalkilic, L.M. Kunkel, Muscular dystrophies: genes to pathogenesis, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13(3) (2003) 231–238.
- [6] A.A. Hack, M.Y. Lam, L. Cordier, D.I. Shoturma, C.T. Ly, M.A. Hadhazy, M.R. Hadhazy, H.L. Sweeney, E.M. McNally, Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex, *J. Cell Sci.* 113 (2000b) 2535-2544.
- [7] R.M. Coral-Vázquez, R.D. Cohn, S.A. Moore, J.A. Hill, R.M. Weiss, R.L. Davisson, V. Straub, R. Barresi, D. Bansal, R.F. Hrstka, R. Williamson, K.P. Campbell, Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy, *Cell* 98 (1999) 465–474.

- [8] 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.* 340(3) (2006) 865-71.
- [9] D.J. Aidley, *The physiology of excitable cells*, fourth ed., Cambridge University Press. UK, 1998.
- [10] D.G. Allen, G.D. Lamb, H. Westerblad, Skeletal Muscle Fatigue: Cellular Mechanisms, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 287-332.
- [11] D. Thomas, S.C. Tovey, T.J. Collins, M.D. Bootman, M.J. Berridge, P. Lipp, A comparison of fluorescent Ca^{2+} indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca^{2+} signals, *Cell Calcium* 28 (2000) 213-233.
- [12] J.L. Vergara, M. Difranco, D. Compagnon, B. Suárez-Isla, Imaging of calcium transients in skeletal muscle fibers, *Biophys. J.* 59 (1991) 12-24.
- [13] C. Caputo, P. Bolaños, Fluo-3 signals associated with potassium contractures in single amphibian muscle fibres, *J. Physiol.* 481 (1994) 119-128.
- [14] A. Lacampagne, M.G. Klein, C.W. Ward, M.F. Schneider, Two mechanisms for termination of individual Ca^{2+} sparks in skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (2000) 7823-7828.
- [15] N. Shirokova, J. García, E. Rios, Local calcium release in mammalian skeletal muscle, *J. Physiol.* 512 (1998) 377-384.
- [16] S.L. Carroll, M.G. Klein, M.F. Schneider, Calcium transients in intact rat skeletal muscle fibers in agarose gel, *Am. J. Physiol.* 269 (1995) C28-C34.
- [17] A.B. Parekh, J.W. Putney Jr, Store-operated calcium channels, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 757–810.

- [18] J.F. Watchko, T.L. O'Day, E.P. Hoffman, Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models, *J. Appl. Physiol.* 93 (2002) 407–417.
- [19] J.A. Burbach, E.H. Schlenker, Morphometry, histochemistry, and contractility of dystrophic hamster diaphragm, *Am. J. Physiol.* 253 (1987) R275-R284.
- [20] M. Sampaolesi, Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D'Antona, M. A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M. G. C. De Angelis, K. P. Campbell, R. Bottinelli, G. Cossu, Cell therapy of α -sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts, *Science* 301 (2003) 487-492.
- [21] A.P. Cairns, M. I. Lindinger, Do multiple ionic interactions contribute to skeletal muscle fatigue?, *J. Physiol.* 586 (2008) 4039–4054.
- [22] Z. Pan, D. Yang, R.Y. Nagaraj, T.A. Nosek, M. Nishi, H. Takeshima, H. Cheng, J. Ma, Dysfunction of store-operated calcium channel in muscle cells lacking *mg29*. *Nat. Cell Biol.* 4 (2002) 379-383.
- [23] X. Zhao, M. Yoshida, L. Brotto, H. Takeshima, N. Weisleder, Y. Hirata, T. M. Nosek, J. Ma, M. Brotto, Enhanced resistance to fatigue and altered calcium handling properties of sarcalumenin knockout mice, *Physiol. Genomics* 23 (2005) 72–78.
- [24] T. Ducret, C. Vandebrouck, M.L Cao, J. Lebacq, P. Gailly, Functional role of store-operated and stretch-activated channels in murine adult skeletal muscle fibres, *J. Physiol.* 575 (2006) 913-924.
- [25] W. Melzer, A. Herrmann-Frank, H.C. Lüttgau, The role of Ca^{2+} ions in excitation-contraction coupling of skeletal muscle fibres, *Biochim. Biophys. Acta.* 1241 (1995) 59-116.
- [26] J. Stiber, A. Hawkins, Z.S. Zhang, S. Wang, J. Burch, V. Graham, C.C. Ward, M. Seth, E. Finch, N. Malouf, R.S. Williams, J.P. Eu, P. Rosenberg, STIM1 signalling controls

- store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 688-697.
- [27] D.M. Shin, S. Muallem, Skeletal muscle dressed in SOCs, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 639-641.
- [28] N. Kurebayashi, Y. Ogawa, Depletion of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum stimulates Ca^{2+} entry into mouse skeletal muscle fibres, *J. Physiol.* 533 (2001) 185–199.
- [29] B.S. Launikonis, M. Barnes, D.G. Stephenson, Identification of the coupling between skeletal muscle store-operated Ca^{2+} entry and the inositol trisphosphate receptor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 2941–2944.
- [30] M.A.P. Brotto, R.Y. Nagaraj, L.S. Brotto, H. Takeshima, J. Ma, T.M. Nosek, Defective maintenance of intracellular Ca^{2+} homeostasis is linked to increased muscle fatigability in the MG29 null mice, *Cell Res.* 14 (2004) 373-378.
- [31] H. Ueda, K. Ueda, T. Baba, S. Ohno, δ - and γ -sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 529–537.
- [32] C. Vandebrouck, D. Martin, M. Colson-Van Schoor, H. Debaix, P. Gailly, Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers, *J. Cell Biol.* 158 (2002) 1089–1096.
- [33] M. DiFranco, C.E. Woods, J. Capote, J.L. Vergara, Dystrophic skeletal muscle fibers display alterations at the level of calcium microdomains, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 14698–14703.

LEGENDS

Fig. 1. Ca^{2+} signals in wild-type and KO muscle fibers. *A*, $\Delta\text{F}/\text{F}$ fluo-3 fluorescence recordings from a wild-type and from a KO single muscle fiber. Tetani at 80 Hz were preceded by a single twitch. Same time scale for both recordings. *B*, peak $\Delta\text{F}/\text{F}$ average values (\pm SE) from wild-type (empty bars) and δ -SG KO fibers (filled bars). *C*, left: average values (\pm SE) of the $(\Delta\text{F}/\text{F} \text{ tetanus})/(\Delta\text{F}/\text{F} \text{ twitch})$ (tet/tw) ratio from wild-type (empty bars) and δ -SG KO fibers (filled bars). Right panel: average values (\pm SE) of FDHM (the full duration at half-maximum amplitude) of twitch Ca^{2+} signal (in ms) from wild-type (empty bars) and δ -SG KO fibers (filled bars). Differences between wild type and δ -SG KO fibers in $\Delta\text{F}/\text{F}$ peak values of twitch or tetanic Ca^{2+} transients (*B*), or in FDHM of twitch Ca^{2+} transients were not significant (*C*). $p > 0.05$, $n = 30$.

Fig. 2. Decline and recovery of Ca^{2+} transients from repetitive stimulation in wild-type and δ -SG KO muscle fibers. *A*, fluo-3 fluorescence signals from wild-type and δ -SG KO single muscle fibers during repetitive stimulation. Segments with no fluorescence were allowed to avoid phototoxicity but electrical stimulation was applied throughout. *B*, recordings of $\Delta\text{F}/\text{F}$ signals of the first and last twitch and tetanic recordings from *A*, in an expanded time scale. *C*, average values (\pm S.E.) of twitch (\circ) and tetanic (\bullet) peak $\Delta\text{F}/\text{F}$ as a function of time from wild-type (left) and KO (right) muscle fibers. The dashed box indicates duration of the stimulation protocol. The arrow signals the beginning of recovery. The dashed line is the mean value of tetanic $\Delta\text{F}/\text{F}$ at the end of stimulation cycles in wild-type fibers. $n = 4$.

Fig. 3. Immunolocalization of δ -SG3 in wild-type and δ -SG KO skeletal muscle cryosections and isolated fibers. Double immunolabeling analysis of δ -SG3 (red) and β -DG (green) in wild-type (*A*) and KO (*B*) skeletal muscle cryosections. Sarcolemma β -DG staining is present

in both wild-type and KO muscle cryosections and δ -SG3 is only present in wild-type muscle. Immunofluorescence of δ -SG3 (red) using isolated FDB wild-type muscle fibers (*C*) confirmed the striated pattern perpendicular to the sarcolemma (*D*). Cell nuclei were stained using Vectashield-DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m.

Fig. 4. The influence of external Ca^{2+} on twitch and tetanic Ca^{2+} transients in wild-type and KO muscle fibers during protracted activity. Each panel (*A-D*) illustrates the first and last fluo-3 Ca^{2+} recordings during the stimulation cycles, from separate experiments. *A* and *C* are from wild-type fibers in the presence (*A*) and absence (*C*) of extracellular Ca^{2+} . *B* and *D* are the corresponding recordings from KO fibers. Time scale is the same for panels *A-D*. *E-F* are plots of average values (\pm S.E.) of twitch (\circ) and tetanic (\bullet) peak $\Delta\text{F}/\text{F}$ as a function of time in Ca^{2+} -free solutions. The dashed box indicates period of application of the stimulation cycles. The arrow signals the beginning of recovery. *E*, results from wild-type fibers. *F*, from KO muscle fibers. The dashed line in *E* and *F* is the mean value of the final decline of tetanic $\Delta\text{F}/\text{F}$ values of wild-type muscle fibers in normal extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ from Fig. 2. $n=4$.

Fig. 5. The influence of 2-APB on twitch and tetanic Ca^{2+} transients in wild-type and KO muscle fibers during protracted activity. *A*, $\Delta\text{F}/\text{F}$ fluo-3 fluorescence recordings from a wild-type single muscle fiber in the presence of 2-APB (50 μ M). Tetani at 80 Hz were preceded by a single twitch. *B*, the corresponding recordings from a KO single muscle fiber. Amplitude and time scale is the same for *A* and *B*. *C*, bars represent peak $\Delta\text{F}/\text{F}$ average values (\pm SE) of the last tetanic signal (\diamond) from experiments performed in the absence (control) or in the presence of 2-APB, as in *A* and *B*. Empty bars are from wild-type fibers and filled bars from KO fibers. $n=7-10$. Differences in $\Delta\text{F}/\text{F}$ peak values between control and 2-APB experiments were significant for wild type fibers only (*), $p>0.05$.

Altered calcium pump and secondary deficiency of γ -sarcoglycan and microspan in sarcoplasmic reticulum membranes isolated from δ -sarcoglycan knockout mice

Alhondra Solares-Pérez^{1,2}, Rocío Álvarez³, Rachele H. Crosbie⁴, Jesús Vega-Moreno³, Joel Medina-Monares³, Francisco J. Estrada⁵, Alicia Ortega^{3,6*} and Ramón Coral-Vazquez^{1,2*}

¹Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, México, D.F., México. ²Present address: Laboratorio Multidisciplinario, Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, DF., México. División de Medicina Genómica, 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., México. ³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, México. ⁴Department of Physiological Science and the Molecular Biology Institute, University of California, Los Angeles, CA 90095. ⁵Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, México. ⁶Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Perinatología, Mexico City 15000, México.

* *Corresponding Authors:* Ramón M. Coral-Vázquez, División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, San Lorenzo No 502-2º piso, Col Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100, México, D.F., México. Tel. (5255) 55755306, Fax. (5255) 55755306, e-mail: rmcoralv@prodigy.net.mx.

Alicia Ortega, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México City AP 70-159, CP 04510, Tel. (5255) 56232511, Fax. (5255) 56162419, e-mail: aortega@unam.mx.

Summary

Sarcoglycans (SGs) and sarcospan (SSPN) are transmembrane proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. Mutations in the genes encoding the SGs cause many inherited forms of muscular dystrophy. In this study, using wild type (WT) and δ -SG knockout (KO) purified membranes, we found the specific localization of the SG-SSPN isoforms in transverse tubules (TT) and sarcoplasmic reticulum (SR) membranes. Immunoblotting revealed that the absence of δ -SG isoforms in TT and SR results in a secondary deficiency of γ -SG and μ SPN. Our results show augmented ATP hydrolytic activity, ATP-dependent calcium uptake and passive calcium release probably through SERCA1 in KO compared to WT mice. Furthermore, we found a conformational change in SERCA1 isolated from KO muscle as demonstrated by calorimetric analysis. Following this alterations with mechanical properties, we found in KO muscle an increment in force with the same rate of fatigue, but a decreased fatigue recovery comparing to WT. Taken together, our observations suggest for the first time that the δ -SG isoforms could stabilize the expression of γ -SG and μ SPN in the TT and SR membranes and that this possible complex might have a role in the maintenance of a stable level of resting cytosolic calcium concentration in skeletal muscle.

Introduction

The dystrophin-glycoprotein complex (DGC) is a multimeric assembly composed of transmembrane and membrane associated proteins that connect the extracellular matrix with the cytoskeleton of the muscle fiber [1]. The function of this complex appears to include protection against contraction induced damage and there is also data to support a possible role in cell signaling pathways [1, 2]. Mutations in genes encoding components of the DGC cause several forms of muscular dystrophy. The pattern of inheritance can be X-linked recessive as in Duchenne or Becker muscular dystrophy or autosomal dominant as in limb-girdle muscular dystrophy type 1 or autosomal recessive as in limb-girdle muscular dystrophy type 2 [3, 4, 5]. The DGC consists of the dystroglycan subcomplex, SG-SSPN subcomplex and the cytoplasmic subcomplex [6, 7]. The SG-SSPN subcomplex is composed of α , β , γ , δ -SGs and SSPN [8]. A fifth member of the sarcoglycan family, ϵ -SG, is closely related to α -SG, and both are co-expressed in striated muscle as part of a biochemically distinct complex [9, 10]. The SG-SSPN subcomplex of sarcolemma is thought to stabilize α - and β -dystroglycan interaction as well as dystrophin and β -dystroglycan interaction [11].

Each of the SGs proteins has a short intracellular domain, a single transmembrane domain and a large extracellular domain with multiple predicted N-glycosylation sites and cysteine residues that are conserved across species [12]. The heteromeric SG subcomplex assembles early in the secretory pathway around a β/δ -sarcoglycan core. Loss of δ -SG leads to the complete absence of α -, β -, γ -, and ϵ -SG, despite normal levels of transcription. In contrast, a mutation in γ -SG reduced but did not eliminate expression of α -, β -, δ - and ϵ -SG [13]. The localization of SGs was thought to be exclusively at the sarcolemma membrane until electron microscopy revealed that δ -SG, δ -SG3 and γ -SG are located at the SR membrane independent of dystrophin expression [14, 15]. We have identified an isoform of δ -SG (δ -SG3) that originates from alternative splicing of the δ -SG transcript and has 10 new amino acids at its C-terminus that replace the last 122 amino acids of δ -SG [15]. Crosbie and colleagues recently reported that alternative splicing of SSPN transcripts produces microspan (μ SPN), which is composed of two transmembrane domains and a novel C-terminal region [16]. Biochemical analysis revealed that μ SPN is not associated with the DGC at the sarcolemma nor is its expression affected by the loss of dystrophin. Rather, μ SPN is localized within SR membranes and forced over-

expression of μ SPN results in morphological abnormalities in SR-TT structures detected by the presence of small triads that were misaligned within the sarcomere as well as an overall decrease in the number of triads in skeletal muscle [16].

In the present study, we purified skeletal muscle membranes from WT and δ -SG KO mice and determined the expression of δ -SG and its isoforms, γ -SG and μ SPN in TT and SR fractions. Furthermore, we examined the functional and structural conformation of the calcium pump (SERCA1) in WT and δ -SG KO mice. We provide evidence for distorted structural conformation and function of SERCA1 in δ -SG KO mice, suggesting that the SGs and μ SPN present in SR may play a role in SERCA1 structure and function in addition to contributing to misregulation of cytosolic calcium in dystrophy. Our results, using complete muscles, demonstrate alterations in the mechanical properties of KO muscle comparing to WT, suggesting that the absence of this alternative complex has consequences in the whole muscle, contributing to the pathogenesis of muscular dystrophy.

Materials and methods

Animals

All procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources of the United States as approved in Mexico by the National Academy of Medicine (<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>). The WT and δ -SG KO (δ -sarcoglycan null B6.129-*Sgcd*^{*tm1Mcⁿ*}/J) mice were purchased from the Jackson Laboratory. The genotype of the δ -sarcoglycan locus was determined using a protocol provided by the Jackson Laboratory to differentiate between the WT and δ -SG KO mice (<http://jaxmice.jax.org/strain/004582.html>).

Isolation of TT and SR membranes

TT and SR membranes were obtained from the fast skeletal muscle (forelimbs, hindlimbs and back muscles) of four-month old WT and δ -SG-KO mice. 50 WT and 50 δ -SG KO mice were used for each preparation. The isolation was performed by differential centrifugation and a discontinuous sucrose gradient as previously described [17]. The membrane isolation was performed in the absence

of any reducing agent in the buffer medium. The microsomal fraction was placed in a first sucrose gradient of 25%, 27.5%, and 35% w/v. The 25/27.5 % interface showed the maximal signal for DHPR as determined immunoblotting, indicating that correspond to TT membranes. When required, isolated TT membranes were incubated in a Ca^{2+} loading solution in the presence of 5 mM potassium oxalate, an additional centrifugation through a 25/45% discontinuous sucrose gradient was done to remove Ca^{2+} -oxalate loaded vesicles [18]. Heavy SR (HSR) and Light SR (LSR) were isolated from the 35% band obtained from the first discontinuous sucrose gradient, essentially as previously described [19]. LSR was detected by the maximum ATPase activity stimulated by Ca^{2+} and HSR was detected by the maximal immunoreactivity with the antibody anti-RyR. Protein concentration was determined using Coomassie Plus Protein Assay Reagent (Pierce, Rockford, IL U.S.A.) with BSA as the standard.

Immunoblotting

Protein samples were subjected to 4-20% SDS PAGE (Pierce) and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore Corp.). Immunoblotting was performed using the following antibodies: NCL-g-SARC (γ -SG) purchased from Novocastra. Antibodies to DHPR (IID5) and SERCA-1 were obtained from Sigma Chemical Co. and Affinity BioReagents, respectively. The β -DG and RyR (C34) antibodies were obtained from the Iowa Hybridoma Facility. The triadin (GE 4.90), calsequestrin (VIID12) and C-terminal delta sarcoglycan (δ -SG) were obtained from Abcam. Antibody to δ -SG3 and μ SPN (R13) described previously [15,16]. All immunoblots were developed using enhanced chemiluminescence (Pierce).

Calcium uptake

Calcium transport was measured at room temperature (25°C) by the filtration method with LSR aliquots in a solution containing (in mM): 100 KCl, 5 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 1 $\mu\text{Ci } ^{45}\text{[CaCl}_2\text{]}$, 20 Tris-Malate (pH 7.0), 5 mM K-oxalate and 4 ATP with 0.15 mg of protein/ml. The reaction was stopped with 0.5 ml of ice-cold quenching solution containing (in mM): 5 MgCl_2 , 4 EGTA, and 20 Tris-Malate (pH 7.0). Membrane vesicles (0.9 ml) were filtered through 0.45 μm Millipore filters,

washed, dried, and then counted by scintillation. Experiments were done in isolated LSR from WT mice muscle and δ -SG-KO mice.

Passive Ca²⁺ efflux from LSR

ATP dependent Ca²⁺-loaded in vesicles was done for 30 minutes with LSR aliquots in a solution containing (in mM): 0.1 CaCl₂, 5 MgCl₂, 100 KCl, 20 Tris-Malate, 1 Mg-ATP, 1 μ Ci [⁴⁵CaCl₂], and pH 7.0 at a concentration of 300 μ g protein/ml in the absence of K-Oxalate. Vesicles were then diluted in a solution containing 2 mM EGTA. The ⁴⁵Ca²⁺ remaining in the LSR vesicles were determined by filtration and its radioactivity was measured with a scintillation counter. For the SERCA1 inhibition experiment was used 2.5 μ M of thapsigargin (Sigma, Corp.).

SERCA1 hydrolytic activity

Total ATPase activity was measured by colorimetric determination of P_i using malachite green as described before [20]. Aliquots of 5 μ g/ml of protein were incubated in a solution containing (in mM): 100 KCl, 5 MgCl₂, 5 NaN₃, 1 ouabain, 0.1 CaCl₂, 0.33 ATP and 20 Tris-Malate, pH 7. The reaction was stopped with a solution containing: 0.045% malachite green hydrochloride, 4.2% ammonium molybdate in 4N HCl, 0.8 ml Triton-X 100 for each 100 ml of solution, and 0.25 ml Na-citrate (34%), absorbance was read at 660 nm. For the Ca²⁺ ATPase (SERCA1) inhibition experiment was used 500nM of thapsigargin (Sigma, Corp.).

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC was used to measure the transition temperature (T_m) of SERCA1 isolated from WT and δ -SG-KO mice muscles. T_m is defined as the temperature at which excess heat capacity is maximal. LSR was dissolved in a buffer containing (in mM): 100 KCl and 20 Tris-Malate (pH 7.0). Excess heat (C_p) versus temperature scans were obtained from about 1mg/ml protein using a high sensitivity differential scanning calorimeter VP-DSC. (MicroCal Inc., MA U.S.A). The samples and reference solutions were carefully degassed under vacuum for 5 min before loading fully the DSC containers with a capacity of 0.56 ml. When equilibrium at 10°C was reached, the temperature was increased to 100°C. Each scan was performed at the rate of 1°C/min. To assess for protein denaturation reversibility, the temperature was cooled down to 10°C and a rescanned up to 100°C. The baseline

was corrected by subtracting the rescan from the scan. In all cases there was no evidence of reversibility. DSC profiles were deconvoluted and the best theoretical fit was calculated assuming irreversible denaturation as previously described for SR [20, 21]. All values are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.).

Muscle preparation

WT and δ -SG KO mice aged ~ 4 to 6 months were euthanized by cervical dislocation, after which the *extensor digitorum longus* (EDL) was isolated at room temperature. The isolated muscle is placed in an acrylic chamber that is equipped with platinum electrodes all along each side of the chamber wall, in order to be in contact with the length of the muscle. We used Krebs solution containing (in mM); 135 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 11 Dextrose, 1 NaPO₄ Dibasic, 15 NaHCO₃ is bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂ to reach pH 7.0. The EDL muscle is fasten by the distal tendon to a forceps and the proximal tendon to a force transducer. The platinum electrodes are connected in parallel to two stimulators (Grass SD9).

Mechanical Protocol

Single electrical pulses of 0.6 msec were used to reach the maximal voltage for the maximal tension. The muscles were stretched to an optimal length at which twitch force was maximal, in order to be in an optimal sarcomeric length. Tetani stimulation of 75 Hz for 5 sec was used, followed by 3 min rest. This protocol was repeated several times with 3-min resting periods to ensure that at least 3 control-tetani forces were repeated. This force will be considered the control maximal tetani-tension. At the end of the protocol, the muscle rested for 10 min before the fatigue protocol began.

Fatigue and fatigue recovery protocols

Fatigue was induced with electrical stimulation cycles of tetani stimulation of 75 Hz, 100V, 0.6 sec during 70 sec, Figure 6A (fatigue). After fatigue protocol, the muscle rest for 5 min and a new protocol of tetanic stimulation of 75 Hz, 100V, 0.6 sec, shows muscle recovery tension, every 5 min the stimulation was repeated for at least 5 times to see fatigue recovery, Figure 6A (recovery). Muscle force (mN) was determined using a calibration mass curve (Figure 5).

RESULTS

Biochemical localization of δ -SG isoforms, γ -SG and μ SPN in TT and SR membranes

Isolated TT, LSR and HSR membranes were prepared from skeletal muscle of WT and δ -SG KO mice and separated by sucrose gradient ultracentrifugation. To demonstrate that isolated vesicles were pure, we performed immunoblot analysis on isolated membranes with the appropriate antibody markers.

We show that 1) β -DG was only detected in a small amount in TT membranes from δ -SG KO mice, and because the loss of δ -SG leads to the complete absence of the other sarcoglycans [13] we didn't detect any sarcoglycan because this contamination, 2) DHPR was enriched in TT fractions and was not detected in the SR membranes, 3) RyR was detected only in the HSR and 4) SERCA1 was detected in both SR fractions although low levels are present in HSR (Figure 1A). Isolated membranes from WT and KO mice were analyzed by immunoblotting with antibodies to δ -SG, γ -SG, δ -SG3 and μ SPN. The TT membranes are fingerlike invaginations of the sarcolemma that are typically located in the boundaries of the A-I bands of each sarcomere in every myofibril. To provide for a uniform contraction, skeletal muscle utilizes the TT system that contains a large number of L-type calcium channels (DHPR) [22]. Figure 1B shows the TT fraction, in which we found that δ -SG and γ -SG are present in WT mice, but absent from TT of dystrophic mice. The TT membranes are structurally and functionally joined with the SR, the intracellular calcium store [23]. The SR is segregated into two functional domains, a longitudinal part (LSR) with SERCA1 enrichment and a junctional part (HSR) composed of terminal cisterneas, which are adjacent to each TT [22] and that contains proteins like RyR, triadin and calsequestrin [23]. Figure 1C shows the purified LSR membranes, and we found that δ -SG, δ -SG3, γ -SG and μ SPN are enriched in WT mice, but absent from LSR of δ -SG KO mice. Figure 1D shows the HSR membranes, in which we found that δ -SG3 is present in WT mice, but absent from HSR of dystrophic mice. μ SPN is present in WT mice, but is severely reduced in δ -SG KO mice. Triadin and calsequestrin appear slightly diminished in δ -SG KO mice compared to WT levels.

Calcium uptake and passive calcium efflux are augmented in LSR of δ -SG KO mice

Using the purified membranes, we performed calcium release and uptake experiments with HSR and LSR vesicles obtained from WT and δ -SG KO skeletal muscle. Differences in Ca^{2+} release were not observed in isolated HSR vesicles from WT and δ -SG KO animals (data not shown). In contrast, passive Ca^{2+} release and uptake is notably affected in LSR vesicles of δ -SG KO mice compared with WT animals. Figure 2A shows that, the LSR ATP-dependent Ca^{2+} transport from δ -SG KO muscles increased 2X-fold relative to WT controls, after a 30 minutes reaction. The Ca^{2+} transport at 30 minutes increased from 84 ± 7 to 160 ± 18 nmol/mg protein (n=3). Figure 2B shows the normalized passive Ca^{2+} -efflux activity. The normalized activities of calcium efflux measured 30 minutes after the beginning of the reaction was 30% and 90% calcium release for WT and δ -SG KO muscles, respectively. To investigate if SERCA1 could be involved in the passive calcium release, we used the SERCA1 specific inhibitor thapsigargin. Thapsigargin inhibits the passive release of calcium in WT by 14%, whereas in the KO there is an inhibition of 83%, leaving the total passive calcium release from LSR equivalent in both muscles in the presence of the inhibitor. This result suggests that SERCA1 is involved in Ca^{2+} release (Figure 2B).

Ca^{2+} pump hydrolytic activity is augmented in LSR of δ -SG KO mice

In skeletal muscle, during muscle activation, Ca^{2+} release from the SR produces actomyosin interaction and contraction. Reuptake of calcium by SERCA1, lowers the intracellular calcium concentration to a resting level, producing relaxation [20]. To compare the SR pump ATP hydrolytic activity of WT and δ -SG KO mice, in figure 3 we measured the activity 30 minutes after the start of the hydrolytic reaction (see Materials and Methods). We found that the ATP hydrolytic activity in LSR vesicles was 7.64 $\mu\text{moles P}_i/\text{mg}$ of protein for WT mice and 12.42 $\mu\text{moles P}_i/\text{mg}$ of protein for δ -SG KO. Hydrolytic activity was 1.6-fold higher in δ -SG KO vesicles relative to WT. Thapsigargin inhibited the time course of the ATP hydrolytic activity of SERCA1 with 75% and 65 % inhibition at 30 min for the WT and KO, respectively (Figure 3).

Differential scanning calorimetry

To investigate whether the deficiency of δ -SG isoforms induced conformational changes in SR membrane proteins, we used DSC to investigate the denaturation profile of LSR membranes from WT and δ -SG KO mice. In our studies, isolated LSR membranes showed important changes in the protein denaturation profile of dystrophic mice compared with control animals. The T_m and enthalpy (heat of transition) of Ca^{2+} pumps indicate that the native structure of the proteins had changed. The denaturation profiles obtained from a heating rate of $1^\circ C/min$ mainly show the denaturation of the Ca^{2+} pump. The protein electrophoretic pattern of LSR used in these experiments reveals an 80-90% composition of Ca^{2+} pump. Lepock et al. 1990 demonstrated that, in the presence of 1 mM $CaCl_2$, two different transitions, *A* and *B*, appear in the DSC. *Transition A* corresponded to the denaturation of the nucleotide binding domain (NBD), and *transition B* corresponds to the denaturation of the transmembrane Ca^{2+} -binding domain (CBD) [21, 24]. Several pieces of evidence demonstrate that conformational changes in SERCA1 induced by the presence of SERCA1 inhibitors like the calcium channel blocker D-600 [24] or redox modification through SERCA1 vicinal thiols oxidation [25] and biological conditions that modify SERCA1 activity such as changes during muscle fatigue or muscle adaptation to exercise [25, 26] are reflected by changes in the SERCA1 conformations revealed by modification on the SERCA1 thermodynamic parameters obtained from thermal denaturation (DSC). Figure 4 shows the DSC profile of LSR membranes isolated from muscles of control (*A*) and δ -SG KO (*B*) mice. In the control mice profile, we detected two transitions, T_m (NBD) $49 \pm 1.3^\circ C$ ($n = 3$), and T_m (CBD) $61.7^\circ C \pm 1.02^\circ C$ ($n = 3$) (Figure 4A). In the δ -SG KO mice profile, we detected four transitions, T_m (NBD) $50.5 \pm 1.03^\circ C$ ($n = 3$), T_m (CDB) $66.6 \pm 0.58^\circ C$ ($n = 3$), and two new transitions that we have called undetermined domains (UD) with T_m (UD1) $40 \pm 0.33^\circ C$ ($n = 3$) and T_m (UD2) 56.6 ± 0.33 that are only present in the profile of the dystrophic mice (Figure 4B).

Mechanical properties of WT and δ -SG KO muscles

Isolated EDL muscles from WT and δ -SG KO mice were examined with the mechanical protocol as described previously in Materials and Methods. Figure 5 shows the stimulation of three consecutive tetanic stimulations. Figure 5A correspond to the WT and Figure 5B to the δ -SG KO muscle

stimulations. Using the recordings, we calculated for the WT and the δ -SG KO an initial force of 259 mN and 236 mN, respectively. In the case of WT, we found a decrement in force in each tetanus that in average is 27 mN and a decrement in tension between the first and the third tetanus that is 112 mN, this represents a 40% lost of force of the original tension, which is reverted after a period of rest. In the δ -SG KO muscle, in each tetanus there was an increment in force of 54.5 mN in average and the tension between the first and the third tetanus was 14 mN that represents a decrement in force of 9.5%. In Figure 6A, we show a representative experiment of fatigue obtained after tetanic stimulation to produce up to 30% of the original force (protocol of fatigue) and the recovery of force after rest. Figure 6B, shows the normalized force in the fatigue experiment for WT and the δ -SG KO (n=3). The lost of 70% of force in both muscles was achieved at the same time (70 sec), being of 77 mN for the WT and 67 mN for the δ -SG KO; which has not a significant difference. Figure 6C, is the representation of the percentage of recovery after the fatigue protocol, at 5 min the WT recover 70% and the KO 55%, where the maximal recovery force was at 20 min with 89% recovery for the WT, while in the KO at the same time there is a decrease in force of recovery with only 46 %. In WT we observe an increment in force during recovery that provides evidence of the fatigue phenomenon. In the δ -SG KO, there is a partial recovery with a significant drop of force after consecutive stimulation, probing the irreversible damage of muscle cells.

Discussion

Localization of δ -SG isoforms, γ -SG and μ SPN in calcium regulatory membranes

Muscle fibers have specialized protein complexes in the plasma membrane that protect against contraction induced damage and may additionally play a role in cell signaling pathways [1, 2]. The SG-SSPN subcomplex forms part of the DGC in sarcolemma and defects in the genes encoding the components of this subcomplex produce many forms of limb-girdle muscular dystrophy and in some cases dilated cardiomyopathy [4, 27]. The SG complex is assembled from a core composed of β and δ -SG. The loss of δ -SG leads to the complete absence of the other sarcoglycans. In contrast, a mutation in γ -SG reduced, but did not eliminate, expression of α , β -, δ - and ϵ -SG [13, 11]. Interestingly, the

SGs are not only located in the sarcolemma of the muscle fibers. We previously reported the identification of δ -SG3 [15] and other research groups have reported the localization of δ -SG, γ -SG [14] and μ SPN [16] in SR membranes.

In this study, immunoblot analysis of purified membranes from WT mice revealed that δ -SG and γ -SG are enriched in TT membranes. We also show that δ -SG, γ -SG, δ -SG3 and μ SPN are present at low levels in purified LSR fractions while δ -SG3 and μ SPN are predominantly found in HSR preparations. Recently, Ueda and colleagues (2001) reported that δ -SG was localized in the terminal cisternae of the SR and that γ -SG was found in the longitudinal part and cisternae of the SR [14]. The authors proposed this localization based in microscopy experiments, in which is difficult to resolve specific locations of the proteins due to the short distances between TT and the SR cisternae membranes, which range from 20 and 50 η m as determined by electron microscopy [28]. The evidence presented in this paper is based on biochemical analysis of purified membranes, which reveals that δ -SG and γ -SG are present in TT and not in SR cisternae of the muscle fiber. Furthermore, we distinguished between δ -SG isoforms, showing that δ -SG3 is located in the SR cisternae along with μ SPN. Interestingly, the TT and SR membranes isolated from skeletal muscle of δ -SG KO mice exhibit a secondary deficiency of γ -SG and μ SPN. This phenomenon is similar to that which occurs at sarcolemma in cases of sarcoglycan deficiency [13], suggesting that δ -SG isoforms may serve a similar function as the core protein for the assembly of a homologue SG-SSPN complex in TT and SR. Muscle activation is controlled by the close interactions of two separate membrane systems, the TT, which are invaginations of the sarcolemma, and the SR, the intracellular calcium store [23]. The TT and SR are structurally and functionally joined at Ca^{2+} release units (CRUs). The CRUs are the sites at which Ca^{2+} is rapidly released from the SR via the RyRs, under control of the DHPR voltage sensor located in the TT [29]. The calcium pump (SERCA1) functions to restore calcium to the SR compartment thereby terminating muscle contraction [20]. Because these membranes are involved in the regulation of calcium concentration within skeletal muscle, we are going to refer to them like calcium regulatory membranes (CRM). Our results demonstrate that a homologous SG-SSPN complex exists within the CRM, which we will denote as the CRM SG-SSPN

(CRMSS) complex. Until now, this complex is composed by δ -SG isoforms, γ -SG and μ SPN and the combination depends of the specific membrane, the TT, the LSR or HSR. For that reason we propose subtypes of this complex (CRMSS_{TT}, CRMSS_{LSR} and CRMSS_{HSR}) (Figure 7).

Effect of the absence of δ -SG isoforms, γ -SG and μ SPN in the Sarcoplasmic reticulum activity

To explore the function of this alternative complex in the CRM, we performed experiments comparing the SR vesicles of δ -SG KO mice with SR vesicles of WT mice. The results described in this paper show that the SR Ca²⁺ pump of dystrophic animals exhibit the following characteristics compared with WT animals: 1) a considerable increase in passive Ca²⁺ release, ATP-dependent calcium uptake and in SERCA1 ATP hydrolytic activity in LSR vesicles compared with controls; 2) a modification in thermal stability and enthalpy of the SR Ca²⁺ pump caused by changes in the Ca²⁺-binding domain, nucleotide-binding domain and the presence of two new undetermined transitions that are only present in the profile of the dystrophic animals.

The range of passive Ca²⁺ release from liposome of different composition or from the phospholipids extracted from SR, varies from 10⁻¹⁵ to 10⁻¹⁸ mol .cm² .s⁻¹ which is several orders of magnitude lower than the passive Ca²⁺ release from isolated SR [30], therefore, membrane lipids represent the principal permeability barrier to the SR Ca²⁺ release. The principal pathway for SR passive Ca²⁺ release has been proposed to be through SERCA1 and several evidences have shown that the pump-mediated calcium release is Mg²⁺ dependent, requires high intravesicular and low extravesicular [Ca²⁺], and is inhibited by saturation with Ca²⁺ of the high-affinity Ca²⁺-binding site of SERCA1 [30, 31]. The important calcium efflux from SR in KO muscles uncouples the function of SERCA1 resulting in an increase energy waste to maintain KO muscle at rest. The direct effect of the presence of δ -SG on SERCA1 conformation is under present investigation. Abnormal Ca²⁺-handling has been described in frequent disorders of skeletal and heart muscle cells [32, 33, 34]. In the case of muscular dystrophy, altered calcium homeostasis is a hallmark of muscle dysfunction [35] that has been proposed as an early process initiating activation of Ca²⁺ dependent proteases [36, 37]. Elevation in cytosolic Ca²⁺ concentration beneath the sarcolemma, or within other cell compartments in skeletal muscle fibers from dystrophin-deficient Duchenne muscular dystrophy patients and *mdx* mice have

been reported [38, 39]. Conflicting reports have been published regarding the key Ca^{2+} regulatory membrane proteins in dystrophic skeletal muscle membranes. Previous studies of dystrophin-deficient muscle have shown that the SR Ca^{2+} -ATPase, calsequestrin, the DHPR, and the cytoplasmic Ca^{2+} binding protein parvalbumin might be affected in the disease process [40-43]. However, Culligan and coworkers (2001) presented evidence that did not reveal any drastic changes in the immunoblotting profile of calsequestrin and DHPR in *mdx* muscle preparations compared with controls. These authors proposed a drastic decline in calsequestrin-like proteins of 150–220 kDa and by analogy, overall Ca^{2+} binding reduction in the SR of dystrophic muscle [44]. In the case of SERCA1, Ca^{2+} pump, previous biochemical analysis suggests that the maximum velocity of Ca^{2+} uptake is impaired in dystrophic *mdx* fibers. The Hill coefficient and the Ca^{2+} sensitivity of the Ca^{2+} -ATPase were the same in the SR vesicles derived from skeletal muscle of normal and *mdx* mice. The maximum velocity of Ca^{2+} uptake, however, was less for *mdx* muscle [41]. In contrast, other results showed that neither the relative abundance nor the total enzyme activity of this Ca^{2+} pump protein is altered [44]. Additional abnormalities in the store operated Ca^{2+} (SOC) channels have been described in *mdx* fibers [45].

In the case of other dystrophic animal models, abnormal Ca^{2+} homeostasis has been reported and studied in cultured myotubes from muscles of BIO 14.6 hamsters, which are deficient in δ -SG. No apparent differences in the levels of expression of various Ca^{2+} handling proteins (DHPR, RyR, SR- Ca^{2+} ATPase, and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger), muscle-specific proteins (contractile actin and acetylcholine receptor), or DGC member proteins except SGs and SSPN have been reported [46]. Furthermore, SOC channels abnormalities have been described in the δ -SG KO mouse model [47].

In order to explore if the absence of the CRMSS complexes has an impact in the whole muscle, we analyzed the mechanical properties of WT and δ -SG KO muscle [13] using concentric contraction protocols with tetanic stimulation to achieve fatigue. As previously was shown, the twitch and tetanic force generation obtained by eccentric contraction was similar for the control and the dystrophic muscle [13], indicating that the sarcomere and contractile apparatus were intact in the absence of the sarcoglycan complex. Under our experimental conditions, using a concentric contraction protocol, we found an increment in force in δ -SG KO muscle, presumably by an extra

calcium release from the SR. After a protocol of tetanic stimulation of high frequency, both muscles decrease the force up to 30% at the same period of time, suggesting that there is no damage contribution in the myofilaments of δ -SG KO as was previously shown with eccentric contraction [13]. However, to demonstrate that the decrease in force is certainly due to fatigue, considering fatigue as a reversible physiological process, we found that recovery of the mechanical properties after fatigue is not achieved in the KO muscle, indicating cell damage or cell death. The increment in force in the δ -SG KO in concentric tetanic contraction as well in twitch reported previously [13] indicate an extra availability of calcium in the myofilament space.

In summary, our study provides evidence to support the existence of a novel complex of SGs and μ SPN proteins within the in CRMs, which we have named the CRMSS complexes. Absence of δ -SG isoforms perturbs the Ca^{2+} pump function and structure, causes altered calcium homeostasis and abnormal mechanical properties after a fatigue protocol in δ -SG KO mice, contributing to the pathogenesis of muscular dystrophy (Figure 7). Thus, future pharmacological therapeutic approaches will need to be directed to restore calcium homeostasis to suppress muscle degeneration.

Acknowledgments

R.M.C.V. was supported by grants from Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) grant 2006/1A/I/078 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through the grant # 55199 (R.M.C.V.). A.O. was supported by grants DGAPA-IN227106, (Dirección General del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant # 24792. A.S.P. was supported during the PhD program (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México) by scholarships from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (223377), IMSS and Dirección General de Estudios de Postgrado at Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

References

- [1] R.D. Cohn, K.P. Campbell, Molecular basis of muscular dystrophies, *Muscle Nerve* 23 (2000) 1456–1471.
- [2] T.A. Rando, The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies, *Muscle Nerve* 24 (2001) 1575–1594.
- [3] E. Ozawa, M. Yoshida, A. Suzuki, Y. Mizuno, Y. Hagiwara, S. Noguchi, Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 4 (1995) 1711–1716.
- [4] V. Straub, K.P. Campbell, Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex, *Curr. Opin. Neurol.* 10 (1997) 168–175.
- [5] M. Durbeej, K.P. Campbell, Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002) 349–61.
- [6] M. Yoshida, A. Suzuki, H. Yamamoto, S. Noguchi, Y. Mizuno, E. Ozawa, Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta -D-glucoside, *Eur. J. Biochem.* 222 (1994) 1055–1061.
- [7] J.M. Ervasti, K.J. Sonnemann, Biology of the striated muscle dystrophin-glycoprotein complex, *Int. Rev. Cytol.* 265 (2008) 191–225.
- [8] R.H. Crosbie, C.S. Lebakken, K.H. Holt, et al., Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 153–165.
- [9] E.M. McNally, C.T. Ly, L.M. Kunkel, Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene, *FEBS Lett.* 422 (1998) 27–32.
- [10] V. Straub, A.J. Ettinger, M. Durbeej, et al., Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 27989–27996.
- [11] E. Ozawa, Y. Mizuno, Y. Hagiwara, T. Sasaoka, M. Yoshida, Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex, *Muscle Nerve* 32 (2005) 563–576.
- [12] E.M. McNally, D. Duggan, J.R. Gorospe, et al., Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 1841–1847.

- [13] A.A. Hack, M.Y. Lam, L. Cordier, et al., Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex, *J. Cell Sci.* 113 (2000) 2535-2544.
- [14] H. Ueda, K. Ueda, T. Baba, S. Ohno, delta- and gamma-Sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 529–538.
- [15] F.J. Estrada, D. Mornet, H. Rosas-Vargas, et al., A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2006) 865-71.
- [16] G. Miller, A.K. Peter, E. Espinoza, J. Heighway, R.H. Crosbie, Over-expression of Microspan, a novel component of the sarcoplasmic reticulum, causes severe muscle pathology with triad abnormalities, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 27 (2006) 545–558.
- [17] M. Roseblatt, C. Hidalgo, C. Vergara, N. Ikemoto, Immunological and biochemical properties of transverse tubules membranes isolated from rabbit skeletal muscle, *J Biol Chem* 256 (1981): 8140-8148.
- [18] R.A. Sabbadini, V.R. Okamoto, The distribution of ATPase activities in purified transverse tubular membranes, *Arch Biochem Biophys* 223 (1983) 107-119.
- [19] K.P. Campbell, C. Franzini-Armstrong, A.E. Shamo, Further characterization of light and heavy sarcoplasmic reticulum vesicles. Identification of the 'sarcoplasmic reticulum feet' associated with heavy sarcoplasmic reticulum vesicles, *Biochim. Biophys Acta* 602 (1980) 97-105.
- [20] A. Ortega, R. Alvarez, F. Pérez, A.M. Jiménez, J.A. Gutiérrez, P. Vázquez, Redox regulation of vicinal dithiol groups of the SERCA1 participates in muscle fatigue, *J. Muscle Res. Cell Motil.* **25** (2004) 597-608.
- [21] J.R. Lepock, A.M. Rodahl, C. Zhang, M.L. Heynen, B. Waters, K.H. Cheng, Thermal denaturation of the Ca²⁺(+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum reveals two thermodynamically independent domains, *Biochemistry* 29 (1990) 681-689.
- [22] L.C. Junqueira, J. Carneiro, *Basic Histology, Text and atlas*, 11th Ed., New York, McGraw Hill, Prentice-Hall, 2005: pp. 191-194.

- [23] H. Takekura, B.E. Flucher, C. Franzini-Armstrong, Sequential docking, molecular differentiation, and positioning of T-tubule/SR junctions in developing mouse skeletal muscle, *Develop. Biol.* 239 (2001) 204-214.
- [24] A. Ortega, V.M. Becker, R. Alvarez, J.R. Lepock, H. Gonzalez-Serratos, Interaction of D-600 with the transmembrane domain of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) 166-172.
- [25] R. Alvarez, P. Vazquez, F. Perez, A. Jimenez, A. Tirado, C. Irlles, H. Gonzalez-Serratos, A. Ortega, Regulation of fast skeletal muscle activity by SERCA1 vicinal-cysteines, *J. Muscle Res. Cell Motil.* 30 (2009) 5-16.
- [26] V. Becker, H. Gonzalez-Serratos, R. Alvarez, M. Baermann, C. Irlles, A. Ortega, Effect of endurance exercise on the Ca²⁺ pumps from transverse tubule and sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.* 97 (2004) 467-474.
- [27] R. Coral-Vazquez, R.D. Cohn, S.A. Moore, et al., Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy, *Cell* 98 (1999) 465-474.
- [28] S. Suzuki, H. Nagayoshi, K. Ishino, N. Hino, H. Sugi, Ultrastructural organization of the transverse tubules and sarcoplasmic reticulum in a fish sound-producing muscle, *J. Electron. Microsc.* 52 (2003) 337-347.
- [29] C. Franzini-Armstrong, F. Protasi, Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions, *Physiol. Rev.* 77 (1997) 699-729.
- [30] A.N. Martonosi, Mechanisms of Ca²⁺ release from Sarcoplasmic Reticulum of Skeletal Muscle, *Physiol. Rev.* 64 (1984) 1240-1320.
- [31] W. Hasselbach, The reversibility of the sarcoplasmic reticulum pump, *Biochim. Biophys. Acta* 515 (1978) 23-53.
- [32] V.R. Preedy, V.B. Patel, M.E. Reilly, P.J. Richardson, G. Falkous, D. Mantle, Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle, *Front Biosci.* 4 (1999) E58-E66.

- [33] A.G. Engel, M. Yamamoto, K.H. Fischbeck, Dystrophinopathies. In: Myology, Basic and Clinical (2nd Ed.), edited by Engel AG, Yamamoto M, and Fischbeck KM. New York: McGraw-Hill, 1994: pp. 1133–1187.
- [34] N.J. Lennon, K. Ohlendieck, Impaired Ca²⁺-sequestration in dilated cardiomyopathy, *Int. J. Mol. Med.* **7** (2001) 131–141.
- [35] Y. Iwata, Y. Katanosaka, Y. Arai, M. Shigekawa, S. Wakabayashi, Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animals models, *Human Mol. Genet.* **18** (2009) 824-834.
- [36] P.R. Turner, P.Y. Fong, W.F. Denetclaw, R.A. Steinhardt, Increased calcium influx in dystrophic muscle, *J. Cell. Biol.* **115** (1991) 1701–1712.
- [37] P.R. Turner, R. Schultz, B. Ganguly, R.A. Steinhardt, Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle, *J. Membr. Biol.* **133** (1993) 243–251.
- [38] N. Mallouk, V. Jacquemond, B. Allard, Elevated subsarcolemmal Ca²⁺ in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca²⁺-activated K⁺ channels, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (2000) 4950–5.
- [39] V. Robert, M.L. Massimino, V. Tosello, et al., Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdxmyotubes, *J. Biol. Chem.* **276** (2001) 4647–51.
- [40] P. Gailly, E. Hermans, J.N. Octave, J.M. Gillis, Specific increase of genetic expression of parvalbumin in fast skeletal muscles of mdx mice, *FEBS Lett.* **326** (1993) 272–274.
- [41] M.E. Kargacin, G.J. Kargacin, The sarcoplasmic reticulum calcium pump is functionally altered dystrophic muscle, *Biochim. Biophys. Acta* **1290** (1996) 4–8.
- [42] I. Niebroj-Dobosz, S. Kornguth, H. Schutta, F.L. Siegel, I. Hausmanowa-Petrusewicz, Proteins of muscle subcellular fractions in Duchenne progressive muscular dystrophy stained with “stains-all” cationic carbocyanine dye and coomassie blue, *Muscle Nerve* **12** (1989) 273–280.
- [43] Y. Pereon, C. Dettbarn, J. Navarro, J. Noireaud, P.T. Palade, Dihydropyridine receptor gene expression in skeletal muscle from mdx and control mice, *Biochim. Biophys. Acta* **1362** (1997) 201–207.

- [44] K. Culligan, N. Banville, P. Dowling, K. Ohlendieck, Drastic reduction of calsequestrin-like proteins and impaired calcium binding in dystrophic mdx muscle, *J. Appl. Physiol.* 92 (2001) 435-445.
- [45] C. Vandebrouck, D. Martin, M. Colson-Van Schoor, H. Debaix, P. Gailly, Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers, *J. Cell Biol.* 158 (2002) 1089–1096.
- [46] Y. Iwata, Y. Katanosaka, Z. Shijun, Y. Kobayashi, H. Hanada, M. Shigekawa, S. Wakabayashi, Protective effects of Ca²⁺ handling drugs against abnormal Ca²⁺ homeostasis and cell damage in myopathic skeletal muscle cells, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 740-751.
- [47] A. Solares-Pérez, J.A. Sánchez, A. Zentella-Dehesa, M.C. García, R.M. Coral-Vázquez, Intracellular Ca²⁺ transients in delta-sarcoglycan knockout mouse skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta* (2010) [Epub ahead of print].

Figure legends

Figure 1. Analysis of δ -SG, δ -SG3, γ -SG and μ SPN in isolated TT and SR membranes. TT and SR were prepared from skeletal muscle of control and δ -SG KO mice. A) Immunolabeling of DHPR, SERCA1 and RyR in different fractions of muscle microsomes after a sucrose gradient preparation. B) Purified TT were analyzed by immunoblotting with antibodies to DHPR, δ -SG, γ -SG, δ -SG3 and μ SPN. The DHPR is a marker of TT. δ -SG and γ -SG are present in TT of control mice, but absent from TT of dystrophic mice. C) LSR vesicles were analyzed by immunoblotting to SERCA1, δ -SG, γ -SG, δ -SG3 and μ SPN. SERCA1 is enriched in LSR. All the sarcoglycans and μ SPN are present in LSR of control mice, but absent from LSR of δ -SG KO mice. D) HSR vesicles were analyzed by immunoblotting to RyR, triadin, calsequestrin, δ -SG, γ -SG, δ -SG3 and μ SPN. RyR, triadin and calsequestrin are found in HSR. Triadin and calsequestrin seem a little diminished in δ -SG KO mice. δ -SG3 and μ SPN are present in HSR of control mice, but absent from HSR of dystrophic mice.

Figure 2. ATP-dependent Ca^{2+} transport and Ca^{2+} -release activity in LSR vesicles obtained from control and δ -SG KO mice as a function of time. Experiments performed with vesicles isolated from control (●) and δ -SG KO (○) animals, respectively. A) ATP-dependent Ca^{2+} transport from 0.15 mg/ml LSR vesicle aliquots was measured in a solution containing (in mM) 100 KCl, 5 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 1 μM Ca^{2+} , 5 mM K-Oxalate and 4 ATP, 20 Tris-malate (pH 7.0). B) For Ca^{2+} -release activity Ca^{2+} transport was determined in the absence of K-Oxalate. Aliquots of LSR of 0.3 mg/ml vesicles were incubated in a solution containing (in mM) 0.1 CaCl_2 , 5 MgCl_2 , 100 KCl, 20 Tris-malate, 1 Mg-ATP, 1 μCi [$^{45}\text{CaCl}_2$], (pH 7.0) and 2.5 μM in the presence of thapsigargin (▲) for control and (△) δ -SG KO mice Ca^{2+} release activity was normalized to the maximum transport activity measured 30 minutes before the beginning of the reaction. Continuous line, best fitting to the experimental points.

Figure 3. Ca^{2+} pump hydrolytic activity of isolated LSR vesicles from control and δ -SG KO mice as a function of time. Experiments performed with vesicles isolated from control (●) and δ -SG KO (○) animals, respectively. Ca^{2+} pump activities were measured from 0.005 mg/ml in a solution containing (in mM) 100 KCl, 5 MgCl_2 , 0.1 CaCl_2 , 5 NaN_3 , 0.33 ATP, and 20 Tris-malate (pH 7.0) and in the presence of 0.5 μM of thapsigargin (▲) for control and (△) δ -SG KO mice. Hydrolytic activity at 30 min was 7.64 and 12.42 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ from control and dystrophic animals, respectively. Continuous line, best fit to the experimental points.

Figure 4. Differential scanning calorimetric profiles (C_p vs. temperature) of A) LSR isolated from control animals and B) LSR membranes isolated from dystrophic animals. LSR membranes (0.5 mg/ml) were scanned with temperature increasing at a rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ in a solution containing 10% sucrose, 1 mM DTT, 20 mM Tris-malate, and 1 mM CaCl_2 , pH 7.0. Solid line represents the experimental data, and the best theoretical fit is represented by the dotted line. *Peak NBD* is the nucleotide-binding domain, *peak CBD* is the Ca^{2+} -binding domain and *peak labeled with asterisk* are undetermined structural domains.

Figure 5. Mechanical properties of δ -SG KO *extensor digitorum longus* (EDL). Tetanic stimulation with a protocol of three consecutive electrical stimulation cycles of 75 Hz, 100V and 5 sec with a rest period of 7 sec on A) WT EDL muscle and B) δ -SG KO EDL muscle. The contractile machinery functions normally and force generation is 259 mN in WT and 295 mN in δ -SG KO EDL.

Figure 6. Fatigue development and recovery in the δ -SG KO *extensor digitorum longus* (EDL). A) Representative experiment of fatigue obtained after tetanic stimulation of 75 Hz, 100V and 0.6 sec to produce up to 30% of the original force and the recovery of force after rest with the same protocol of stimulation. B) Normalized force obtained from the fatigue experiment for WT (●) and for δ -SG KO (○) (n=3). The loss of 70% of force in both muscles was achieved at the same time (70 sec), with

a final force of 77 mN for WT and 67 mN for δ -SG KO. C) Percentage recovery after the fatigue protocol, with 5 min rest intervals between stimulations, for WT (●) and δ -SG KO (○) (n=3).

Figure 7. Model of the possible involvement of the CRM SG-SSPN (CRMSS) complex in the pathogenesis of the muscular dystrophy. The schematic diagram illustrates differences in Ca^{2+} handling within WT (A) and dystrophic (B) skeletal muscle fibers. The primary deficiency of δ -SG leads to the absence of the SG-SSPN subcomplex (SG-SSPN) in sarcolemma (SL), which stabilizes the dystrophin-glycoprotein complex (DGC) that protects against contraction induced damage. Influx of calcium ions leads to elevated cytosolic Ca^{2+} beneath the sarcolemma causing increased Ca^{2+} -dependent proteolysis. Based on the evidence presented in this report, we found that also in the case of the CRMs (transverse tubules, TT and sarcoplasmic reticulum, SR) the primary deficiency of δ -SG leads to the absence of CRMSS complex. The CRMSS complex is composed of δ -SG isoforms, γ -SG and μ SPN but the combination varies with distinct membrane subfractions and, for this reason, we propose subtypes of the complex (CRMSS_{TT}, CRMSS_{LSR} and CRMSS_{HSR}). In the case of the dystrophic animals the absence of the CRMSS_{LSR} complex affects the structure and function of SERCA1 suggesting that this could be another source that causes Ca^{2+} mishandling and contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy. Triadin (TR) and calsequestrin (CSQ) appear slightly diminished in δ -SG KO mice compared to control levels. Also indicated in the model: Extracellular matrix (EM), dystrophin (Dys), actin cytoskeleton (Act), dihydropyridine receptor (DHPR) and ryanodine receptor (RyR).

Figures

Figure 1

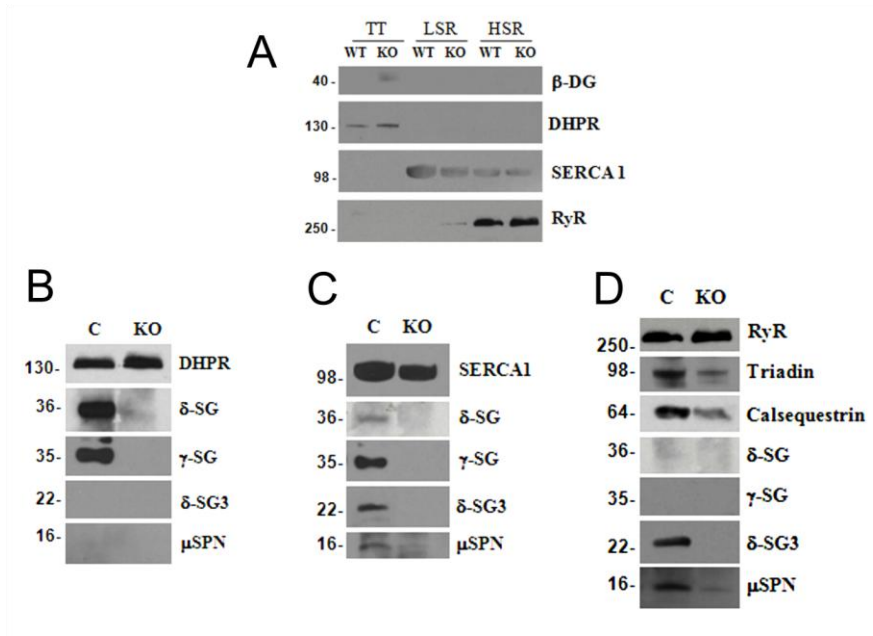


Figure 2

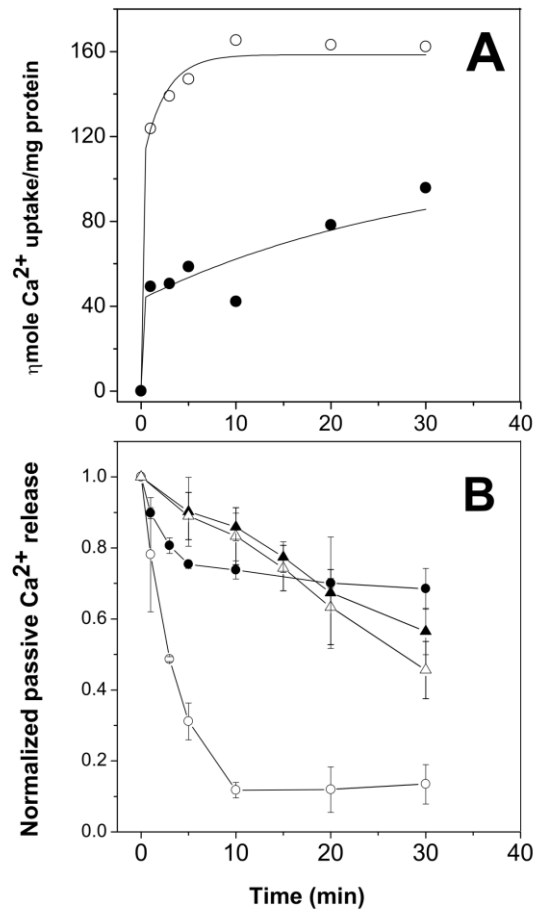


Figure 3

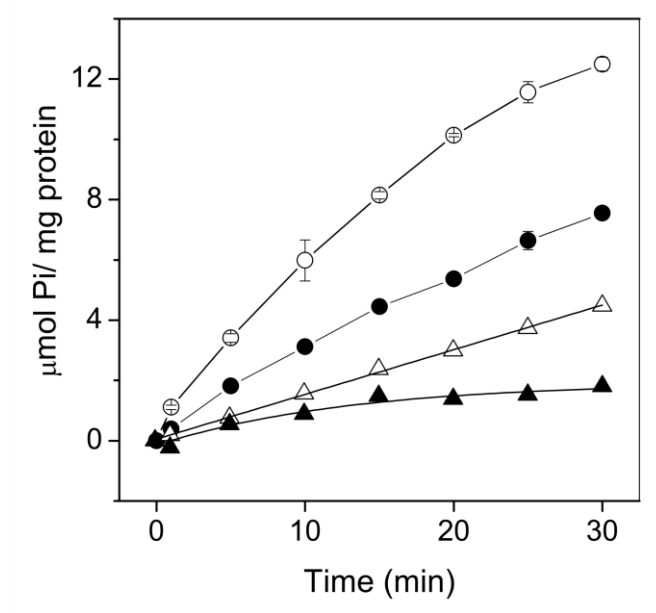


Figure 4

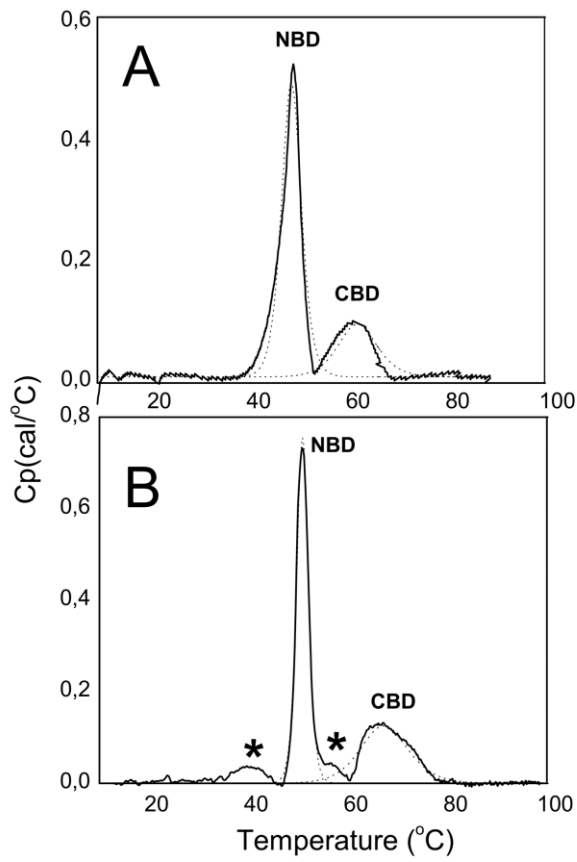


Figure 5

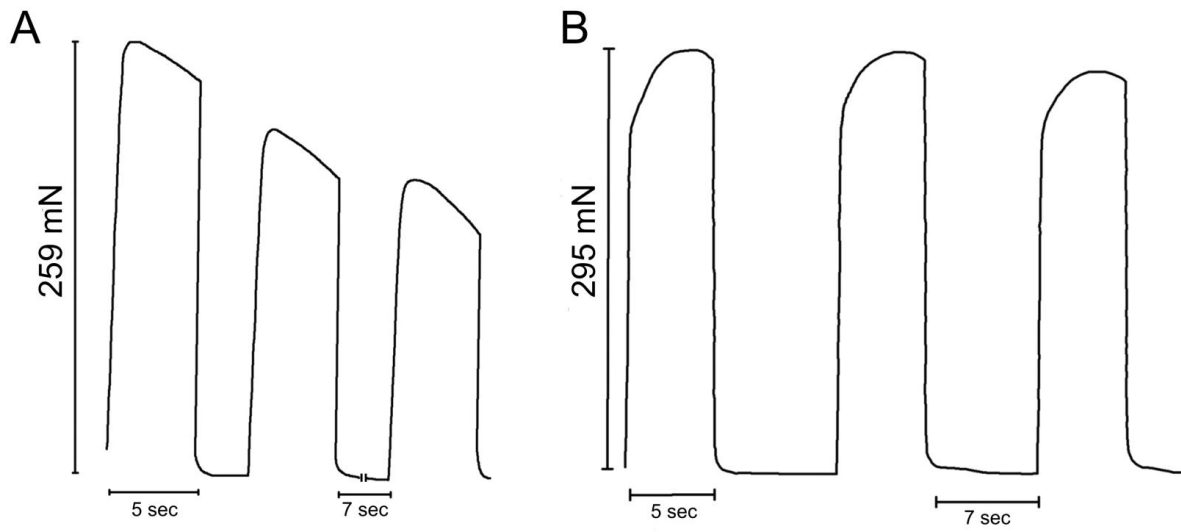


Figure 6

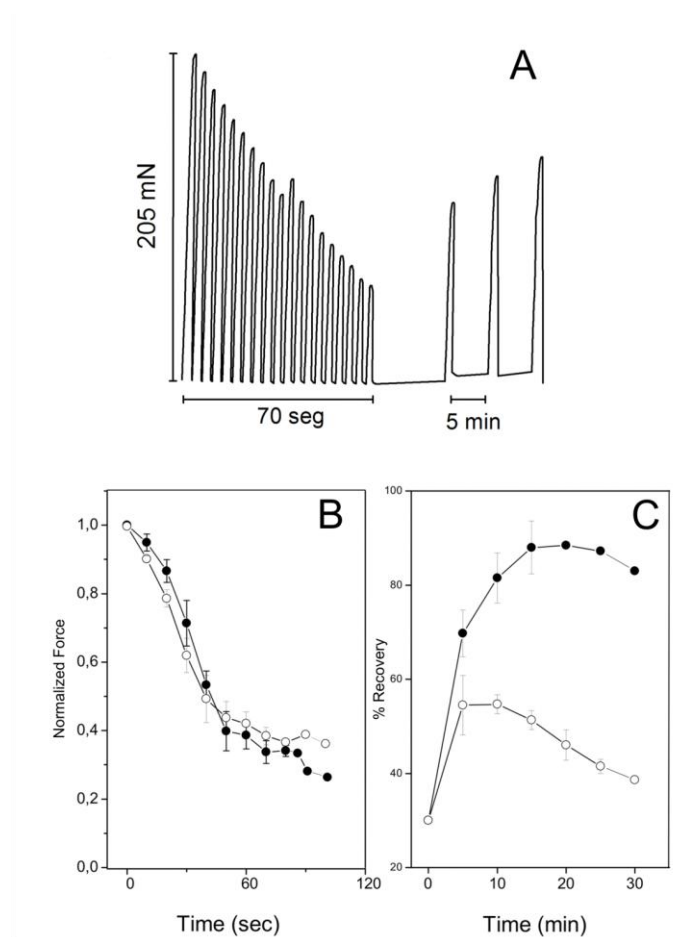


Figure 7

