



11281

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DEL
SARCOGLICANO α**

Tesis

que para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

presenta

Biol. Paul Demian Delgado Olguín

Director de Tesis: Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez

Ciudad Universitaria

2005

m343384



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, del Hospital de Pediatría del CMN S. XXI IMSS. Bajo la tutoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez.

Una parte sustancialmente importante de este trabajo fue realizada en el laboratorio 122 Norte del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con la invaluable orientación del Dr. Félix Recillas Targa.

Los estudios de Doctorado fueron apoyados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT México) mediante la beca 158524, por la Dirección General de Estudio de Postgrado de la UNAM y por el IMSS mediante el programa de apoyo a Becarios de Investigación. El trabajo fue apoyado por la Asociación Francesa contra las Miopatías mediante el donativo MNM2000 Grupo 2.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Coral por su amistad y sus valiosas enseñanzas en la dirección de este trabajo.

Al Dr. Félix Recillas Targa por su amistad, por abrirme las puertas de su laboratorio, su confianza, y el apoyo en la planeación y ejecución de experimentos centrales del trabajo de esta tesis.

Al Dr. Alejandro Zentella por su amistad, por facilitarme su laboratorio, sus enseñanzas y el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutorial Dr. Fabio Salamanca Gómez y Dr. Alejandro García Carrancá por su contribución a este trabajo y a mi formación académica.

A los integrantes de los laboratorios de los Drs. Félix Recillas Targa y Ramón Coral por sus críticas, y por contribuir en forma muy importante a mi formación académica y personal.

A los revisores de esta tesis por sus críticas y el tiempo dedicado en la revisión de este escrito.

A mi esposa Koroboshka y a mi hija Melanie por compartir conmigo su grandeza.

CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	12
Estructura y función del complejo sarcoglicano	12
Expresión de los genes sarcoglicano	15
El descubrimiento de MyoD y los factores reguladores miogénicos (MRFs)	19
Funciones generales de los MRFs	20
Estructura y funciones de MyoD en la regulación de la miogénesis	22
Estructura y funciones de los factores NFI	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
Tamizaje de biblioteca genómica de ratón λ FIXII (Stratagene)	30
Generación de sonda de hibridación	30
Aislamiento de DNA	30
Amplificación de la sonda	30
Clonación y marcaje de la sonda	32
Titulación de la biblioteca genómica	33
Tamizaje de biblioteca genómica	33
Caracterización de clonas positivas	35
Generación de construcciones	36
Propagación y diferenciación de células C2C12	47
Transfección de células C2C12	47
Western-blot	48
Obtención y cuantificación de extractos proteínicos	45
Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia de proteínas	49
Preparación de gel concentrador y de resolución	49

Electroforesis y transferencia de proteínas	49
Revelado de señales (blot)	50
Obtención de extractos nucleares	50
Obtención de extractos de transcripción/traducción <i>in vitro</i>	51
Ensayos de movilidad electroforética	51
Marcaje y purificación de sondas	51
Marcaje y alineamiento de oligonucleótidos	51
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)	52
Ensayos de retardo y súper-retardo	53
Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	53
Co-inmunoprecipitación	59
Inmunofluorescencias	60
RESULTADOS	61
Actividad de la región promotora del gen α-SG en células C2C12	61
Identificación de sitios putativos de unión a factores transcripcionales en el promotor α-SG	62
Análisis funcional del promotor α-SG	
Análisis del efecto de los factores NFI sobre la actividad del promotor α-SG durante la diferenciación de células C2C12	66
Análisis de actividad de E-box1 y E-box2 sobre el promotor SV40 y el promotor basal α-SG	70
Modulación del potencial de <i>trans</i>-activación de MyoD sobre el promotor basal α-SG a través de E-box1 y E-box2	73
Participación individual de E-box1 y E-box2 en la modulación del potencial de <i>trans</i>-activación de MyoD sobre el promotor basal α-SG	74
Interacción de MyoD con el modulador en extractos nucleares de mioblastos y miotubos C2C12	77
Interacción de MyoD y miogenina con el modulador y con	

E-box1 y E-box2 individualmente en extractos de transcripción/traducción <i>in vitro</i>	78
Función de los nucleótidos conservados hacia 5' y 3', así como de los centrales del sitio E-box2 en su interacción con MyoD y en el efecto modulador	82
Interacción <i>in vivo</i> de MyoD, TFIID y TFIIB en el modulador y el promotor basal α -SG en el contexto de la cromatina de mioblastos y miotubos C2C12	86
Interacción física de MyoD, TFIID y TFIIB <i>in vivo</i> en mioblastos y miotubos C2C12	89
Co-localización de MyoD y TFIID en mioblastos C2C12	90
La modulación del potencial de <i>trans</i> -activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG depende del contexto muscular	94
DISCUSIÓN	97
PERSPECTIVAS	104
Caracterización de la actividad de los factores NFI y Sp1 sobre el promotor α -SG	104
Estudio de la influencia de la(s) vía(s) de transducción reguladas por Calcio en la actividad del promotor α -SG	105
Utilización del promotor α -SG en la expresión de transgenes	106
Estudio de la influencia de la afinidad de MyoD por la maquinaria basal de la transcripción en la modulación del potencial de <i>trans</i> -activación de MyoD	107
Búsqueda de elementos de regulación a distancia en el promotor α -SG	108
Análisis de la influencia de la estructura de la cromatina en la actividad del promotor α -SG	109
Análisis de la actividad del promotor α -SG <i>in vivo</i>	112
REFERENCIAS	113

RESUMEN

El complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (cuya deficiencia ocasiona la distrofia muscular de Duchenne o Becker), o DGC, se compone por los complejos: sarcoglicano, distroglicano y las sintrofinas. La función de dicho complejo radica en el establecimiento de un puente *trans*-membranal que contacta citoesqueleto y matriz extracelular, confiriendo estabilidad al sarcolema. La deficiencia de los componentes del complejo sarcoglicano α , β , γ ó δ sarcoglicanos (SGs) ocasiona las distrofias musculares 2D, 2E, 2C y 2F, respectivamente. La expresión del gen músculo-específico α -sarcoglicano (α -SG) aumenta durante la diferenciación miogénica, lo que sugiere que la regulación de su expresión se da a nivel transcripcional. El proceso de la miogénesis es regulado por la familia de factores transcripcionales MyoD, compuesta por MyoD, Myf5, miogenina y MRF4 que activan la expresión de genes musculares. MyoD afecta tanto positiva como negativamente la expresión genética durante la miogénesis, lo que implica que su potencial de *trans*-activación debe modularse ó que este factor regula la actividad de otros factores transcripcionales para conferir una respuesta específica. En este trabajo se estudió la regulación transcripcional de α -SG mediante el análisis funcional de su promotor. Se identificó una región de regulación negativa, compuesta por dos sitios de unión en el DNA a los factores MyoD (E-box1 y E-box2), que modula negativamente el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG, así como por sitios de unión a los factores NFI, que funcionan como reguladores negativos (NFI-C2 y NFI-X2) y Sp1. Mediante ensayos de movilidad electroforética se determinó que únicamente E-box2, cuya secuencia se conserva en las regiones 5' del gen α -SG de ratón y humano, es reconocido por MyoD y miogenina. La mutación de E-box1 y E-box2 abate el efecto modulador del potencial de *trans*-activación de MyoD. Así mismo, se identificaron nucleótidos conservados que flanquean la secuencia consenso de E-box2, además, se conservan los nucleótidos centrales de dicho sitio de reconocimiento. Mediante ensayos de retardo se determinó que los nucleótidos centrales así como la secuencia CCC, localizada hacia 3' de E-box2, son críticos

en el reconocimiento de MyoD, así como en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG. Un dato relevante muestra que *In vivo*, MyoD junto con TFIID y TFIIB, que interaccionan en un complejo, se localiza en el modulador en mioblastos C2C12, mientras que en miotubos el complejo se encuentra asociado tanto al modulador como al promotor basal α -SG. Los resultados apoyan un modelo sin precedentes en el cual, la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD, implica el control de la localización de factores transcripcionales basales por dicho factor hacia la región moduladora del promotor α -SG.

ABSTRACT

The dystrophin associated glycoprotein complex (DGC) is composed by the protein sub-complexes: sarcoglycan, dystroglycan and the sintrophins. The DGC function lies on the establishment of a *trans*-sarcolemmal bridge that contacts cytoskeleton and extra cellular matrix, conferring sarcolemmal stability. Deficiency of each of the components of the sarcoglycan complex: α , β , γ or δ sarcoglycans (SGs) causes the muscular dystrophies 2D, 2E, 2C and 2F, respectively. The α -sarcoglycan (α -SG) muscle-specific gene expression increments during myogenic differentiation, suggesting that it is regulated at the transcriptional level. Myogenesis is regulated by the MyoD family of transcription factors, composed by MyoD, Myf5, myogenin and MRF4 that positively regulate the expression of muscle genes. MyoD positively and negatively affects gene expression during myogenesis, implying that its *trans*-activation potential must be modulated or that MyoD regulates other transcription factors activity in order to establish a specific response. In this investigation, the α -SG gene transcriptional regulation was assessed through the functional analysis of its promoter. A negative regulatory region composed by two MyoD binding sites (E-box1 and E-box2), that negatively modulates the MyoD *trans*-activation potential over the α -SG core promoter, besides NFI and Sp1 binding sites was identified. The negative influence of the NFI family members NFI-C2 and NFI-X2, as also Sp1, over the α -SG promoter was demonstrated. Only E-box2 sequence, conserved in mouse and human, binds MyoD and myogenin as shown through electrophoretic mobility shift assays. Disruption of E-box1 and E-box2 sequences abolishes the MyoD *trans*-activation modulation effect. The central and flanking E-box2 nucleotides were found to be conserved in mouse and human. The central E-box2 nucleotides and the CCC nucleotides located downstream from E-box2 are critical for the recognition by MyoD, and for the modulation effect over the α -SG core promoter, as shown through band shift experiments and transient transfections. A relevant result shows that *In vivo*, MyoD, with TFIID and TFIIB that interact in a protein complex, is located only at the modulator in C2C12 myoblasts, whereas in myotubes, the

complex locates at both the modulator and the α -SG core promoter. The results presented in this work support a novel mechanistic model for the MyoD *trans*-activation potential modulation, which implicates the tethering of basal transcription factors to the α -SG promoter modulator element by the myogenic master regulator MyoD.

INTRODUCCIÓN

Estructura y función del complejo sarcoglicano

El complejo sarcoglicano forma parte del macro-complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC por sus siglas en inglés) y fue descubierto en células de origen muscular (Ervasti et al, 1990; Yoshida y Ozawa, 1990). El DGC está compuesto básicamente por la proteína distrofina y los subcomplejos: distroglicano, sarcoglicano y sintrofinas (Campbell, 1995; Lim y Campbell, 1999; Matsumura et al, 1997; Ozawa et al, 1995, 1998) (Fig. 1). La distrofina, cuya deficiencia ocasiona la distrofia muscular de Duchenne o Becker (Hoffman y Kunkel, 1989), se asocia en su extremo amino con la actina filamentosa de citoesqueleto, y en su extremo carboxilo por distroglicano β (miembro del complejo distroglicano) y por las sintrofinas. El complejo distroglicano se compone por las proteínas α y β distroglicano (Ibrahimov-Breskrovnaya et al, 1992), que atraviesan el sarcolema o membrana de la fibra muscular. La proteína β distroglicano se asocia con distrofina (Jung et al, 1995), mientras que α distroglicano, localizada en la porción extracelular del complejo, contacta a la proteína laminina en la matriz extracelular (Ervasti y Campbell, 1993; Montanaro et al, 1999). Debido a esta estructura del complejo, se postula que su función consiste en establecer un puente *trans*-membranal mediante la interacción de matriz extracelular con el citoesqueleto. De esta manera, el complejo confiere estabilidad al sarcolema (Ervasti et al, 1990; Yoshida y Ozawa, 1990; Ervasti y Campbell, 1991; Matsumura et al, 1999), lo que resulta importante para la integridad del tejido muscular, dado que éste está sujeto a procesos repetitivos de contracción y relajación. Por otra parte, existen diversas evidencias que sugieren que el DGC participa en la transducción de señales mecánicas hacia el núcleo (Rando, 2001). Los SGs γ , β y δ poseen una secuencia similar a un dominio de un factor de crecimiento epidermal en su extremo carboxilo, que pudiera corresponder a un sitio de reconocimiento a un ligando (McNally et al, 1996). Otra evidencia que sugiere la participación del complejo SG en la transducción de señales, se basa en su interacción con la integrina $\alpha 5\beta 1$. El estimular la señalización mediada por

integrinas, se ha observado un incremento en la fosforilación de serinas y treoninas de los SGs, así mismo, el tratamiento de cultivos celulares con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra α y γ SG redujo la presencia de proteínas de adhesión focal, lo que sugiere que los SGs participan en la señalización bidireccional y en la regulación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Yoshida et al 1998). El SG α tiene actividad de ecto-ATPasa (Betto et al, 1999; Sandona et al, 2004), y regula la concentración extracelular de ATP, lo que podría resultar en la regulación de receptores purinérgicos en músculo (Hack et al, 2000).

El complejo sarcoglicano se expresa durante la diferenciación muscular (Radojevic et al, 2000), y esta compuesto por los sarcoglicanos (SG) α , β , γ , δ , ϵ , ζ (Roberds et al, 1993; Jung et al, 1996; Nigro et al, 1996; Ettinger et al, 1997; Yoshida et al, 1997; Wheeler et al, 2002) y sarcospan (Crosbie et al 1997). El complejo SG se asocia al complejo distroglicano a través de δ -SG (Chan et al, 1998). Aunque no se hayan definido las funciones específicas de los SGs, estos son importantes en la fisiología muscular, pues la deficiencia en la expresión de los genes α , β , γ , δ -SG ocasiona las distrofias musculares de cintura tipo 2D, 2E, 2C y 2F, respectivamente, también llamadas sarcoglicanopatías (Roberds et al, 1994; Durbeej y Campbell, 2002; Hack et al, 2000; Durbeej et al, 2000; Duclos et al, 1998; Araishi et al, 1999; Noguchi et al, 1995; Nowak et al, 2000; Holt et al, 1998; McNally et al, 1996; Tsubata et al, 2000). En dichos padecimientos, la deficiencia de algún SG ocasiona la disminución o pérdida del complejo (Fig. 1), como se ha demostrado mediante ensayos de inmunohistoquímica en pacientes así como en ratones modificados genéticamente que son deficientes en la expresión de los SG involucrados (Allamand y Campbell, 2000). Por otra parte, la deficiencia en la expresión del gen ϵ -SG ocasiona la muerte durante la embriogénesis en ratones "knock out" (Comunicación personal, Kobayashi Y.) así mismo, este gen es regulado epigenéticamente mediante metilación del alelo materno en etapas tempranas de la embriogénesis, lo que sugiere su importancia en el desarrollo (Piras et al, 2000). La relevancia del complejo SG se acentúa por el hecho de que en algunas ocasiones las sarcoglicanopatías cursan con cardiomiopatías (Sakamoto et al, 1997; Towbin, 1998). Estos antecedentes

muestran la importancia del complejo DGC y en particular del complejo SG en la fisiología muscular, lo que ha propiciado en fechas recientes su estudio con el fin de comprender los procesos involucrados en las distrofias musculares.

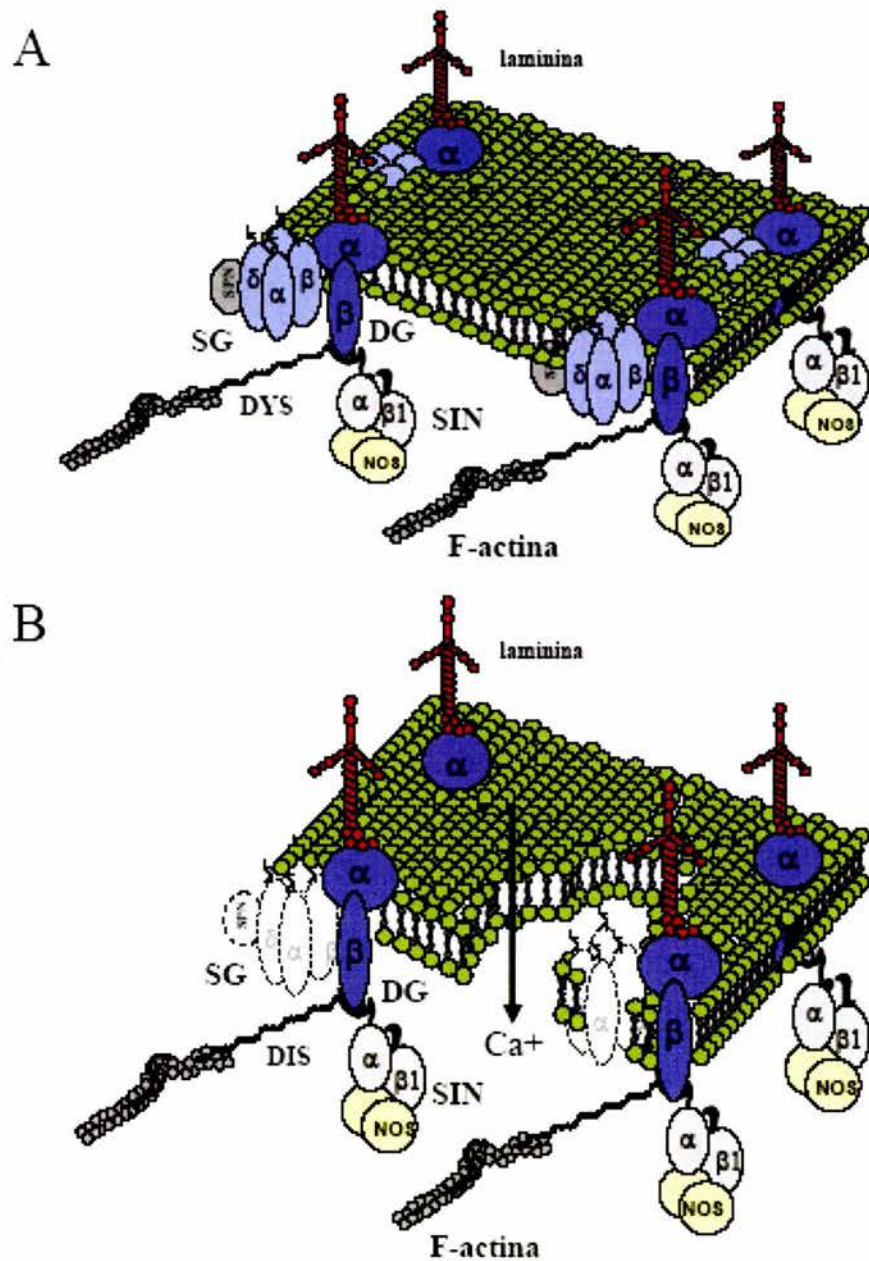


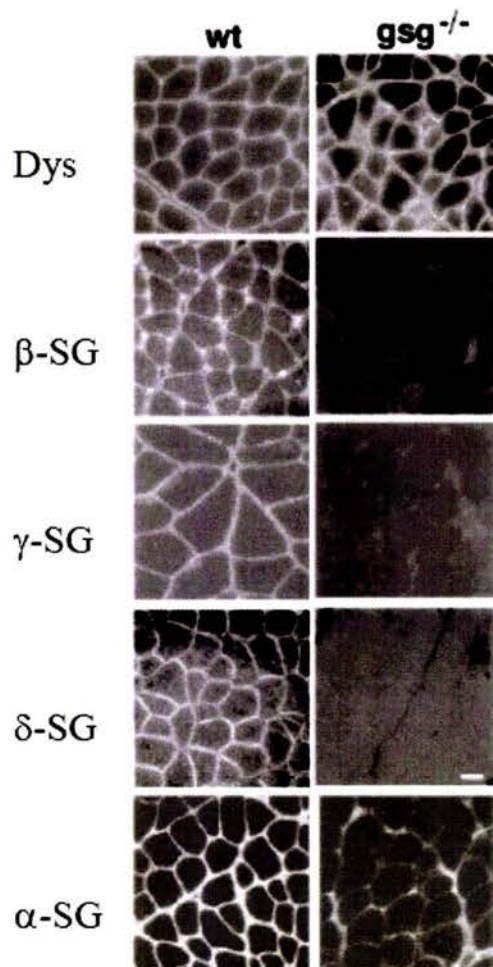
Fig. 1. **Composición del complejo DGC y efecto de la deficiencia de los sarcoglicanos.** (A) El complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina DGC se compone básicamente por los complejos: distroglicano (DG), sarcoglicano (SG) y sintrofinas (SIN) α y β 1, que se asocian a la óxido nítrico sintasa (NOS). El DGC establece un puente *trans*-membranal que contacta a laminina a través de α -distroglicano y a la actina de citoesqueleto mediante β -distroglicano, que se asocia a la proteína distrofina. (B) La deficiencia de alguno de los sarcoglicanos (SGs en línea punteada) ocasiona la deficiencia de la totalidad del complejo, originando una disolución de la continuidad del sarcolema y por ende desregulación del flujo de iones como calcio, lo que provoca necrosis del tejido muscular mediante la activación de proteasas como μ -calpaína (Ruegg y Gillis, 1999). SPN: sarcospan (Tomado de Campbell, 1995).

Expresión de los genes sarcoglicano

Los SGs β , δ , ϵ , y ζ , se expresan en tejidos musculares y no musculares (Jung et al, 1996; Nigro et al, 1996; Ettinger et al, 1997; Yoshida et al, 1997; Wheeler et al, 2002), mientras que α y γ -SG se han detectado únicamente en tejido muscular estriado (Roberds et al, 1993; Noguchi et al, 1995; Liu, et al, 1997), aunque recientemente se ha reportado la expresión de la proteína γ -SG en músculo liso (Barresi et al, 2000). Así mismo, se ha detectado la expresión del mensajero α -SG en endotelio vascular de cordón umbilical (Ramírez-Sánchez et al, 2004), aunque no se ha confirmado la expresión de la proteína. Debido a estos hechos, α -SG es considerado como un gen de expresión músculo-específica (Liu et al, 1997). Los mensajeros de α y γ -SG aumentan su expresión 20 y 50 veces, respectivamente en estadios terminales de la diferenciación de células de origen muscular estriado C2/4, por lo que se ha sugerido que la regulación de su expresión se realiza a nivel transcripcional (Noguchi et al, 1999). Interesantemente la sobre-expresión del gen γ -SG también es causa de distrofia muscular, como se ha demostrado en un ratón transgénico (Zhu et al, 2001). Este hecho es de suma importancia, pues indica que no solo la deficiencia en la expresión del gen γ -SG es causa de distrofia muscular (Fig. 2A y B). Los hechos mencionados resaltan la importancia del estudio de la regulación transcripcional de los genes SG, pues indican que además de la activación, la regulación negativa podría jugar un papel crítico en la fisiología muscular. La relevancia de la regulación transcripcional de los sarcoglicanos se basa también en el hecho de que para el correcto ensamble del complejo sarcoglicano, así como para que éste se localice correctamente en el sarcolema, se requiere de que la expresión de los SGs se realice diferencialmente con el fin de favorecer la unión secuencial y ordenada dichas proteínas (Hack et al, 2000) (Fig. 3). A pesar de la relevancia del estudio de la regulación transcripcional de los sarcoglicanos, este rubro se ha abordado someramente. En un estudio reportado con anterioridad, se aislaron y clonaron dos regiones de control transcripcional localizadas en la región 5' de las secuencias codificantes de los genes α y γ -SG. En este estudio se identificaron dos transcritos para el gen α -

SG, cuya expresión es promovida por dos promotores independientes, uno localizado hacia 5' del exón 1 y otro hacia 5' del exón 2. Mediante el análisis de la actividad de construcciones con un gen reportero se observó que únicamente el promotor localizado río arriba del exón 2 es funcional (cabe señalar que el artículo aquí referido fue publicado durante el proceso de aislamiento y clonación del promotor funcional α -SG en el laboratorio del Dr. Ramón Coral Vázquez). Por otra parte, se demostró que los promotores de ambos genes regulan positivamente la expresión de los reporteros *GFP* y Luciferasa (*LUC*) en forma progresiva conforme avanza el proceso de diferenciación de células musculares (Wakabayashi-Takai et al, 2001; Noguchi et al, 2001), lo que correlaciona con el aumento en la cantidad del transcrito del gen γ -SG durante la diferenciación de células musculares (Noguchi et al, 1999). Así mismo, se demostró que la región de control γ -SG es estimulada positivamente por el factor MyoD (Wakabayashi-Takai et al, 2001). Este factor transcripcional pertenece a la familia de factores MyoD, (también llamados factores reguladores miogénicos o MRFs por sus siglas en inglés), y cuya función es el establecimiento y diferenciación del linaje miogénico mediante la regulación de la expresión de genes músculo-específicos (Weintraub et al, 1991). Los antecedentes presentados apoyan la idea de que los promotores α - y γ -SG son regulados durante la diferenciación del músculo. En este respecto es importante mencionar que se desconocen, a excepción de MyoD, los factores transcripcionales encargados de la regulación de la expresión de los genes SG. Este fundamentó el estudio del efecto de los factores de la familia NFI sobre la actividad del promotor α -SG, en cuya secuencia se identificaron 6 sitios de unión para dichos factores (Delgado-Olguín P et al, 2004).

A



B

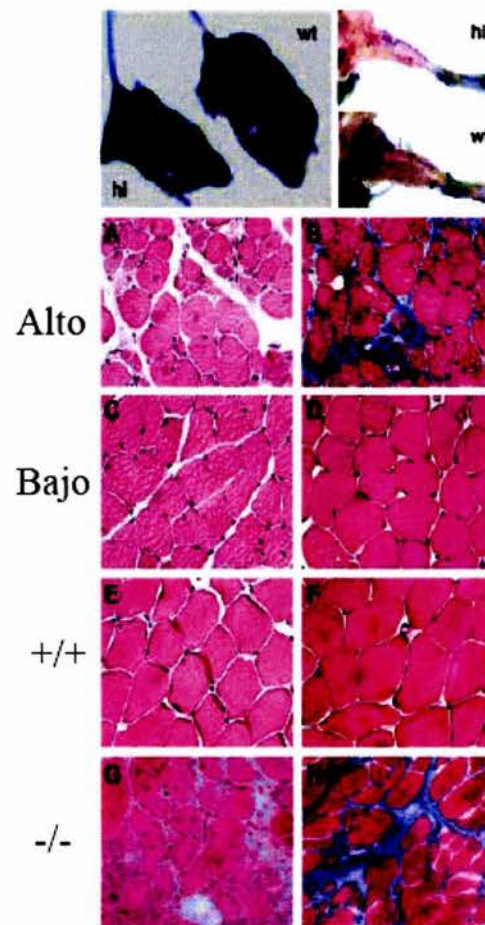


Fig. 2. **La regulación positiva y negativa de la expresión del gen γ -SG es crítica en la fisiología muscular.** (A) Micrografías de Inmunofluorescencias de cortes de tejido muscular de un ratón silvestre (wt) y uno deficiente en γ -SG $gsg^{-/-}$. Se observa que la deficiencia de γ -SG ocasiona la pérdida o disminución en la detección de los componentes del complejo SG, mientras que el ratón silvestre presenta expresión de los SGs en el sarcolema (Tomado de Hacket al, 1998). (B) Micrografía de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, provenientes de músculo de ratón silvestre (+/+), deficiente en γ -SG (-/-), y un transgénico que expresa un bajo y alto número de copias del cDNA de γ -SG, respectivamente. Se observa que el ratón deficiente en γ -SG y el que sobre-expresa un alto número de copias de dicho gen presentan fenotipos similares característicos de distrofia muscular. Dys: distrofina. (Tomado de Zhu et al, 2000).

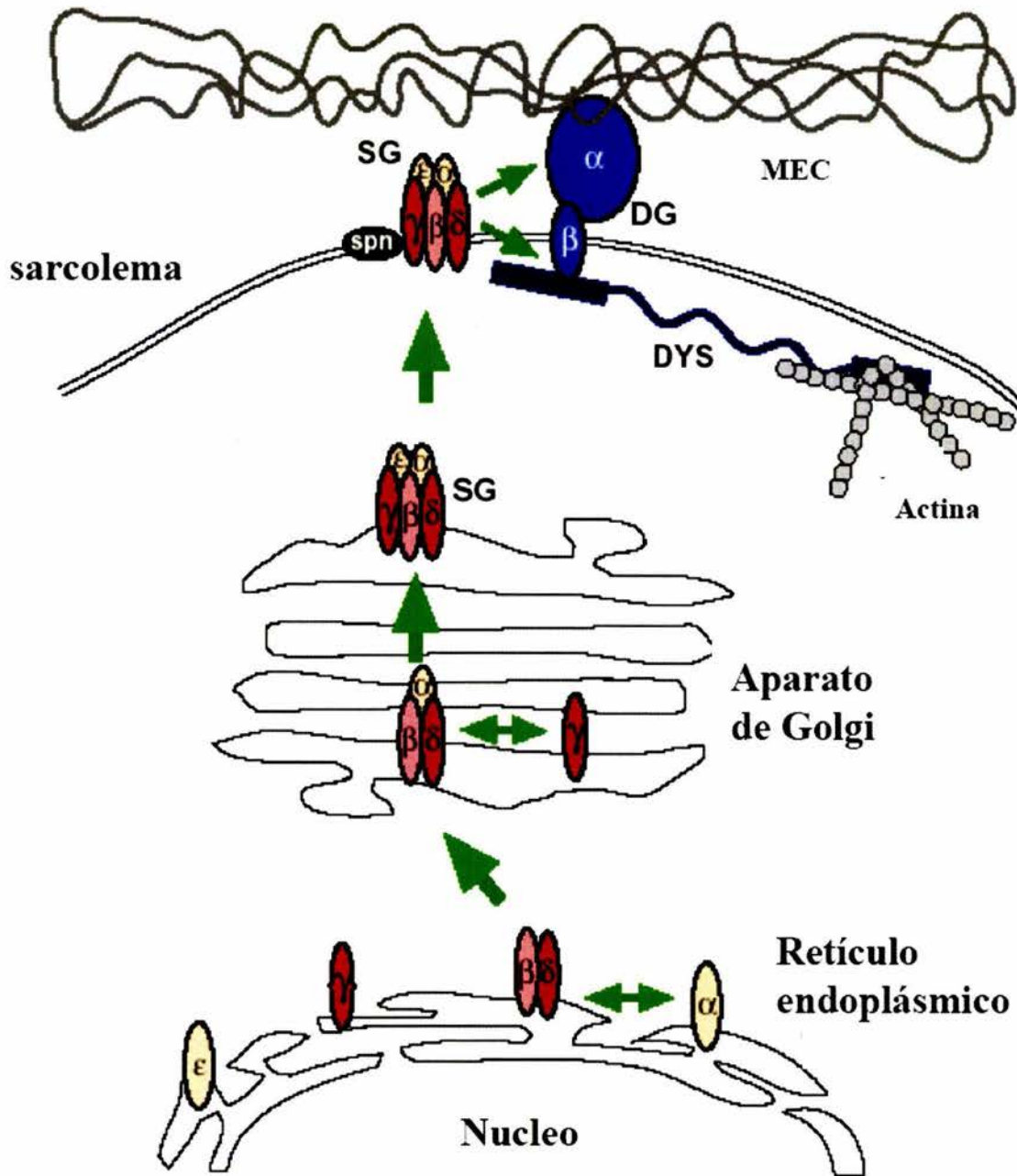


Fig. 3. **El ensamble del complejo sarcoglicano se realiza ordenadamente.** Después de la traducción, se unen δ y β sarcoglicanos (SG). A este heterodímero se une α -SG. Este complejo es transportado hacia sarcolema a través de aparato de Golgi, proceso durante el cual se unen γ y ϵ -SG. Finalmente en el sarcolema se establecen contactos con sarcospan (spn) y el resto del DGC. DYS: distrofina, MEC: matriz extracelular, DG: complejo distroglicano. (Tomado de Hackett et al, 2000).

El descubrimiento de MyoD

Los MRFs o miembros de la familia MyoD controlan el programa miogénico (Olson y Klein, 1994; Rudnicki et al, 1995; Weintraub et al, 1991; Davis et al, 1987; Braun et al, 1989). Dicha familia se compone por MyoD, (también llamado Myf3), Myf5, miogenina y MRF4 (Myf6), también conocido como herculina (Edmonson y Olson, 1989; Braun et al, 1990; Miner et al, 1990; Rhodes et al, 1989). Estos factores forman parte de la súper familia de factores bHLH, que se caracterizan por poseer un dominio básico y dos α -hélices separadas por una asa (Emerson, 1993).

Las primeras observaciones que sugirieron la presencia de uno o varios reguladores miogénicos surgieron de experimentos que consistieron en el tratamiento de líneas celulares fibroblásticas de ratón 3T3 y C3H/10T1/2CL8 con 5-azacitidina o 5-aza-2'-deoxicitidina (Taylor y Jones, 1979). Estos son análogos de citosina que no pueden metilarse. Al tratar las líneas celulares con dichos compuestos, éstos se incorporan al DNA durante varias rondas de replicación, de tal forma que las regiones de regulación de la expresión genética pierden la capacidad de reprimirse por metilación, lo que ocasiona la desregulación genética (Jones et al, 1983). Los fibroblastos tratados con los análogos mencionados, se comprometieron hacia tres fenotipos mesenquimatosos, entre ellos, uno caracterizado como muscular estriado (Taylor y Jones, 1979). Estos ensayos sugirieron la existencia de uno o varios factores miogénicos cuya expresión es reprimida en los fibroblastos, y es inducida al metilar su región reguladora. Posteriormente se realizaron experimentos que confirmaron dicha hipótesis. Para ello, se indujo un fenotipo muscular en fibroblastos 10T1/2 mediante tratamiento con 5-azacitidina y posteriormente se transfectaron células de la misma estirpe sin tratar, con DNA de los mioblastos inducidos. Se observó que las células transfectadas sufren conversión miogénica en 1 de cada 15,000 colonias transfectadas (Lassar et al, 1986). De esta manera, se indujo la presencia de un factor o factores proteínicos miogénicos. Con el fin de identificar el factor responsable de la inducción del fenotipo muscular, se tamizó en forma subtractiva una biblioteca de DNA complementario (cDNA) de miocitos utilizando como sonda,

cDNA derivado de mioblastos. A partir del tamizaje, se seleccionaron 3 clonas, se aislaron los cDNAs correspondientes a dichas clonas y posteriormente se demostró que la transfección de uno de estos en fibroblastos y otras líneas celulares, confiere un fenotipo muscular estable, es decir, que no es revertido posteriormente a la inducción. El cDNA identificado fue nombrado MyoD por sus siglas en inglés: "Myoblast determination gene number one", y su expresión a nivel de transcrito se detecta únicamente en tejido muscular estriado (Davis et al, 1987). La propiedad de inducir el fenotipo muscular en una serie de líneas celulares comprometidas en linajes ajenos a músculo mediante transfección, ha sido motivo para considerar al factor MyoD como un regulador maestro de la miogénesis (Weintraub et al, 1991).

Posteriormente, a través de ensayos similares de tamizaje subtractivo de bibliotecas de cDNA se identificaron los otros factores miogénicos (Braun et al, 1989; Edmonson y Olson, 1989; Wright et al, 1989; Rhodes y Konieczni, 1989; Braun et al, 1990; Miner y Wold, 1990).

Funciones generales de la familia de factores transcripcionales MyoD (MRFs)

Los genes de la familia MyoD se expresan diferencialmente durante la determinación y diferenciación del linaje miogénico en embriones de ratón (Buckingham, 1996; Buckingham y Cossu, 1997; Ott et al, 1991; Sassoon et al, 1989). Este patrón de expresión correlaciona con las funciones particulares que realizan durante la miogénesis como se ha demostrado mediante el desarrollo de ratones carentes de los MRFs. Ratones deficientes en MyoD o Myf5 muestran un fenotipo muscular aparentemente normal (Rudnicki et al, 1992), lo que sugiere que estos factores realizan funciones redundantes, sin embargo la deficiencia de Myf5 causa muerte perinatal asociada a defectos en costillas (Braun et al, 1992). Estas alteraciones son rescatadas parcialmente mediante la introducción del gen miogenina en el locus Myf5 (Wang et al 1997, Wang et al, 1996), lo que sugiere que miogenina es capaz de suplir algunas funciones de Myf5. Mediante el análisis de la expresión de un transgén que codifica una proteína de fusión MyoD-LacZ en ratones deficientes en Myf-5 y MyoD se determinó que Myf-5 participa en el

desarrollo de músculo epaxial (Músculos de la espalda y músculos intercostales), mientras que MyoD funciona en el desarrollo de músculos de las extremidades, lengua, arcos branquiales y diafragma, tejidos que se originan de células precursoras diferentes a las que forman la musculatura epaxial, lo que indica que ambas proteínas desempeñan funciones únicas (Kablar et al, 1997). Las funciones individuales de ambas proteínas se confirman con el hecho de que células derivadas de músculo de ratones MyoD^{-/-} pierden potencial de diferenciación, pues expresan tardíamente marcadores de diferenciación (Sabourin et al, 1999), lo que sugiere que MyoD además de participar en la determinación del linaje miogénico, desempeña una función en la diferenciación. Esto es apoyado por el hecho de que células deficientes en Myf5 se diferencian precozmente, mientras que las deficientes en MyoD lo hacen pobremente y muestran defectos en el crecimiento, lo que además sugiere que ambos factores participan en la proliferación de células musculares (Montarras et al, 2000). Otra evidencia de las funciones únicas de MyoD y Myf5 fue aportada por Megeney et al (1996), quien mostró que un ratón deficiente para MyoD y distrofina desarrolla una miopatía además de tener baja capacidad de regeneración después de inducción de daño muscular, lo que sugiere que MyoD participa en la regeneración de dicho tejido (Megeney, et al 1996). Estos hechos confirman que MyoD y Myf5 desempeñan funciones particulares.

La deficiencia de MyoD y Myf5 en ratones doble mutantes, ocasiona un fenotipo más severo, caracterizado por la carencia de células miogénicas y fibras musculares (Rudnicki et al, 1993). Cuando se inactiva el gen miogenina en ratones, éstos mueren al nacimiento a causa de ausencia de miofibras (Hasty et al, 1993; Nabeshima et al, 1993), en contraste, ratones carentes en la expresión de MRF4 son aparentemente normales (Braun y Arnold, 1995; Patapoutian et al, 1995; Zhang et al, 1995). Estos experimentos permitieron establecer la función de MyoD y Myf5 en la regulación de la determinación del linaje miogénico (Kablar et al, 1998), mientras que miogenina y MRF4 regulan el proceso de la diferenciación (Sabourin y Rudnicki, 2000; Pownall et al, 2002) (Fig. 4). Sin embargo,

recientemente se ha descubierto la participación de MRF4 en la determinación de células miogénicas en algunos tipos celulares (Kassar-Duchossoy et al, 2004).

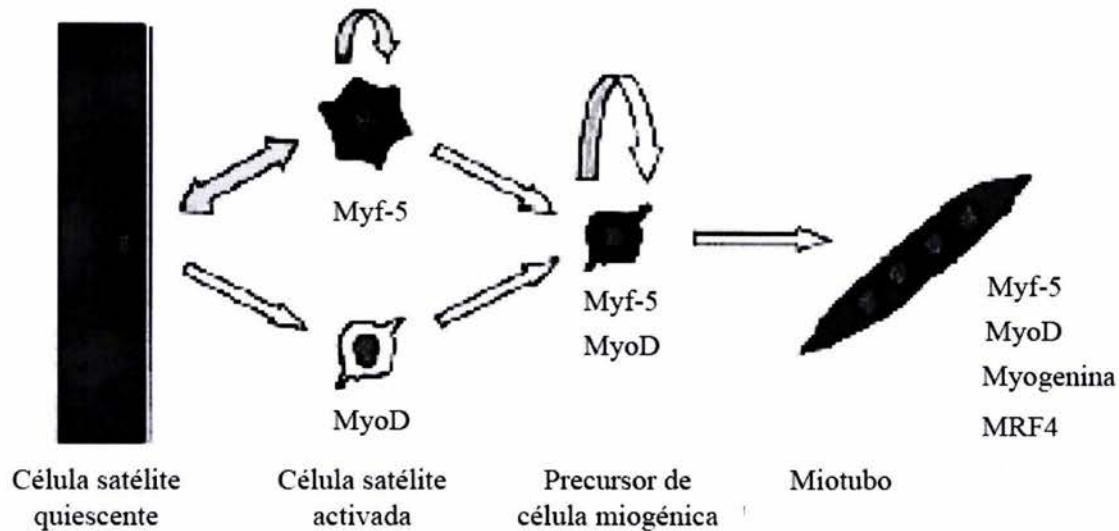


Fig. 4. **Funciones de los factores reguladores miogénicos (MRFs).** Las células satélite multipotenciales quiescentes musculares, encargadas de la regeneración muscular, expresan el marcador c-met. Dichas células, al activarse expresan los genes Myf5 y posteriormente MyoD, que determinan el linaje miogénico. En este estadio de diferenciación, las células son capaces de dividirse. Las células que expresan Myf5 son capaces de regresar al estado multipotencial, y al expresar MyoD se comprometen irreversiblemente hacia el linaje miogénico. Posteriormente, al inducirse la diferenciación, se expresan los genes MRF4 y miogenina, que regulan la formación de fibras musculares (Tomado de Sabourin y Rudnicki, 2000).

Estructura y funciones de MyoD en la regulación de la miogénesis

La proteína MyoD está compuesta por 318 aminoácidos (aa) que forman distintos dominios. Los aa 1 a 60 constituyen un dominio ácido correspondiente al extremo amino (Fig. 5), cuya función radica en la interacción con diversos co-factores, lo que confiere a MyoD su capacidad *trans*-activadora (Black et al, 1998).

Entre los aa 62 a 101 se encuentra una secuencia rica en residuos de cisteína e histidina, que participan en forma indirecta, en remodelaje de cromatina (Gerber et al, 1997). Hacia el extremo carboxilo, entre los aa 102 a 124 se encuentra la región básica, que es crítica en el reconocimiento del DNA y en la activación transcripcional músculo-específica (Tapscott et al, 1988). El reconocimiento del DNA se lleva a cabo en secuencias llamadas cajas E (E box). Estas secuencias, cuyo consenso es CANNTG (N representa cualquier nucleótido)

(Lassar et al, 1989), fueron identificadas *in vivo* como sitios de reconocimiento de proteínas en potenciadores o “enhancers” de inmunoglobulinas (Church et al, 1985; Ephrussi et al, 1985) y se encuentran presentes en regiones reguladoras de genes músculo-específicos (Lassar et al, 1989).

Entre los aa 143 a 162 está codificada una secuencia homóloga a una región conservada en los factores transcripcionales de la familia Myc (dominio HLH) que actúa como mediador de oligomerización (Lee, 1989; Davis et al, 1987; Zhuang et al, 1992) (Fig. 5). Esta región también existe en factores transcripcionales de *Drosophila*, y realizan funciones en especificación celular y determinación sexual. Dichos factores incluyen a *achaetescute* (Villares y Cabrera, 1987), *daughterless* (Caudy et al, 1988) y *twist* (Thisse et al, 1988). El extremo carboxilo de la proteína se encuentra entre los aa 163 a 318 (Tapscott et al, 1988) y al igual que la región rica en cisteínas e histidinas, participa indirectamente en remodelaje de cromatina en regiones reprimidas transcripcionalmente (Gerber et al, 1997).

Muchas de las funciones de MyoD han sido explicadas en base a la estructura tridimensional del cristal del dímero bHLH de MyoD, que permitió determinar dicha estructura a una resolución de 2.8 Angstroms (Ma et al, 1994) (Fig. 6). El análisis del cristal reveló que cada monómero del dominio bHLH, que incluye los residuos 102 a 166 forma dos alfa hélices conectadas por un asa de 8 residuos. La primera hélice contiene a la región básica y la hélice 1(H1), y la segunda hélice corresponde a la región H2. Las regiones H1 y H2 participan en la formación de un “racimo” de 4 hélices paralelas de giro hacia la izquierda (Fig. 6) (op cit, 1994).

Como se ha mencionado, MyoD tiene capacidad de inducir el fenotipo miogénico en varias líneas celulares, esto implica que dicho factor es capaz de reprogramar un patrón de expresión genética determinado, lo que a su vez implica que MyoD realiza funciones específicas sobre sus promotores blanco. Este hecho ha sido comprobado en fibroblastos de ratones deficientes en MyoD y Myf5 transducidos con cDNA de MyoD, y por ende son inducidos al linaje miogénico. En un estudio global de expresión génica, mediante hibridación de microarreglos de

cDNA utilizando RNA mensajero (mRNA) de los fibroblastos transducidos se identificaron grupos de genes que son regulados positiva y negativamente, lo que indica que MyoD regula en forma específica diferentes genes durante la miogénesis (Bergstrom et al, 2002), sin embargo, los mecanismos mediante los cuales MyoD regula diferencialmente la activación de sus promotores blanco son conocidos parcialmente. El hecho de que MyoD realice funciones específicas implica que su potencial de *trans*-activación debe ser modulado de alguna manera. Dicha modulación puede llevarse a cabo mediante varios mecanismos: 1) Del co-factor (co-represor o co-activador) que heterodimerize con MyoD (Lassar et al, 1991; Molkenin y Olson, 1996; Black y Olson, 1988; revisado ampliamente en Puri y Sartorelli, 2000); 2) de la afinidad de los sitios de unión al factor en el DNA (Blackwell et al, 1993; Walhout et al, 1998); y 3) de las modificaciones post-traduccionales de MyoD como fosforilación, ubiquitinación y acetilación (Batonnet et al, 2004; Poleskaya et al 2001; Tintignac et al, 2004).

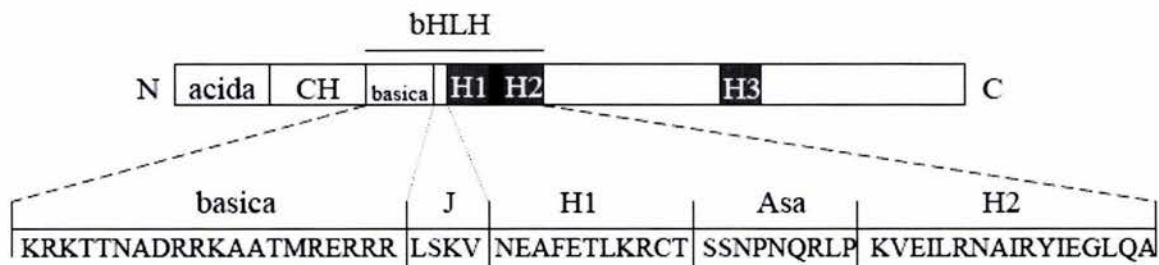


Fig. 5. **Estructura de la proteína MyoD.** El extremo amino (N) contiene una región ácida. Hacia el extremo carboxilo se localiza una región rica en cisteínas e histidinas (CH), que continúa con la región básica. Una secuencia de cuatro aminoácidos (J) une la región básica con el dominio bHLH, compuesto por las hélices 1 (H1) y 2 (H2), que se encuentran separadas por una asa. En el dominio carboxilo se localiza una secuencia predicha para formar una hélice (H3). Se muestra la secuencia del dominio bHLH.

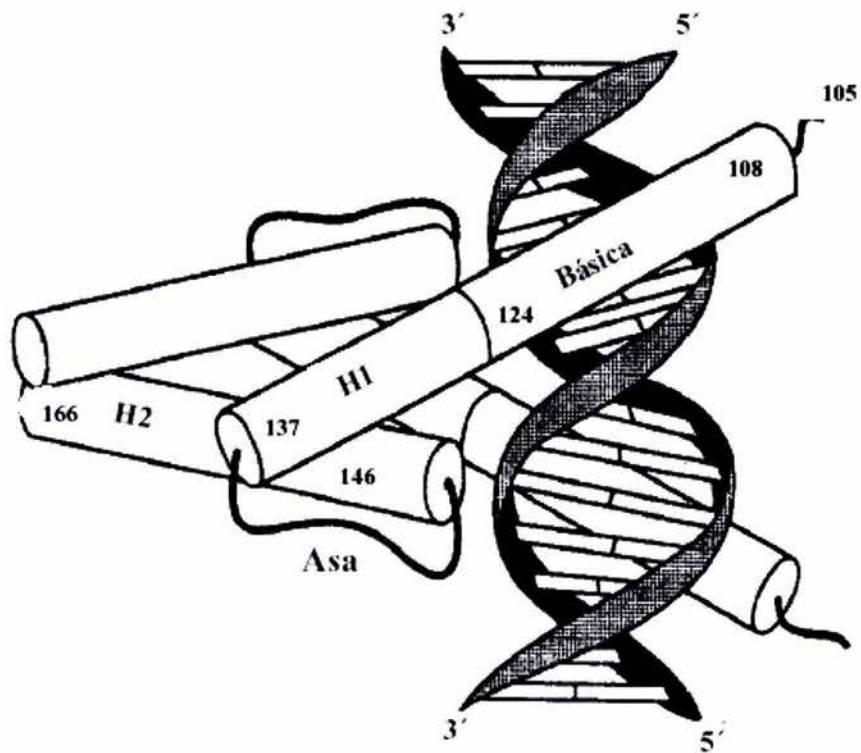


Fig. 6. Estructura tri-dimensional del dímero del dominio bHLH de MyoD unido a su secuencia de reconocimiento. Los contactos DNA-proteína se establecen en el surco mayor del DNA mediante el dominio básico, que forma una hélice α que se continúa con la hélice 1 (H1). Se muestra la estructura del asa, que une a la hélice H1 (H1) con la hélice 2 (H2) (tomado de Ma et al, 1994).

Estructura y funciones de los factores NFI

La familia de factores NFI esta compuesta por las proteínas NFI-A, NFI-B, NFI-C y NFI-X, que se conservan desde pollo hasta el humano. Los factores NFI interaccionan con el DNA en forma específica en la secuencia TGC(N5)GCCAA (Goyal et al, 1990; Kruse y Sippel, 1994) a través del dominio amino, compuesto por 220 aa, y que se encarga además de mediar homo y hetero-dimerización, así como la iniciación de la replicación adenoviral (Mermod et al, 1988; Gounari et al, 1990; Bandyopadhyay y Gronostajski, 1994). La alta conservación del extremo amino de los factores NFI contrasta con el extremo carboxilo terminal, puesto que existen variaciones en dicha región que codifican para distintos dominios de modulación transcripcional. Variación adicional en dicha región es inducida por empalme (splicing) diferencial de transcritos para cada uno de los factores NFI (Gronostajski, 2000). Este hecho explica la variabilidad en la función de dichos factores, que depende del promotor blanco así como del contexto celular específico (Chaundry et al, 1998; Gao y Kunos, 1998). De tal manera, que los factores NFI funcionan tanto como activadores como represores de diversos promotores (Gronostajski, 2000).

Se ha detectado la expresión de los miembros de NFI a nivel de transcrito en varios tejidos del ratón, y particularmente relevante para este trabajo resulta el hecho de que los factores NFI-C y NFI-X se encuentran con mayor abundancia en tejido muscular estriado (Chaundry et al, 1997). A pesar de esto, no se ha estudiado su función en dicho tejido. Sin embargo, se ha demostrado a través de ratones deficientes para dichos factores, que éstos participan en el desarrollo embrionario de ratón. Entre las funciones de esta familia de factores se ha descrito su participación en la maduración pulmonar así como en el desarrollo cerebral (Steele-Perkins G, 2005; Shu T, 2003), desarrollo de glándula mamaria (Murtagh J, 2003), así como de raíces dentarias (Steele-Perkins G, 2003) y tejido neuroepitelial (Behrens M, 2000). Es importante señalar que en los modelos estudiados, no se han observado alteraciones en tejido muscular, sin embargo, se ha postulado que esto se debe a funciones sobre lapadas de los factores NFI. Así mismo se ha propuesto que en los ratones deficientes para más de uno de estos

factores podría observarse algún efecto sobre el tejido muscular (Gronostajski, 2000). Hasta este momento no se conocen los mecanismos mediante los cuales los factores NFI participan en los eventos embrionarios descritos, sin embargo, se sabe que dichos factores interaccionan con co-activadores y/o co-represores, que determinan la actividad de las proteínas NFI sobre promotores regulados durante la embriogénesis. A pesar de esto, los modelos propuestos para explicar las funciones de los factores NFI son muy generales, y no resuelven cuestiones sobre la actividad específica de esta familia de factores sobre promotores específicos durante la embriogénesis (Fig. 7).

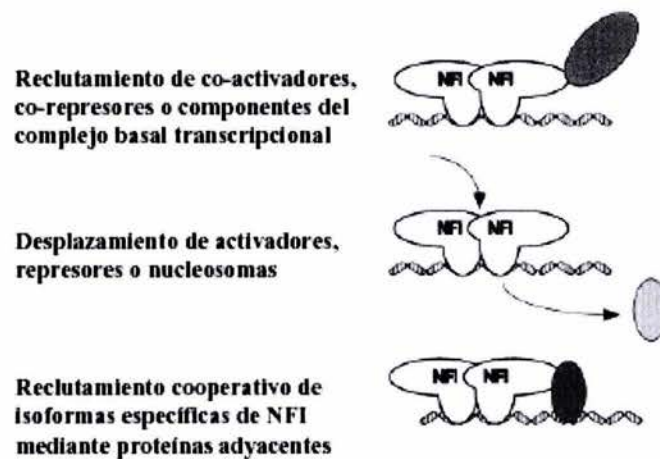


Fig. 7. **Modelos de la función de NFI *in vivo*.** El Homo o heterodímero de NFI podrían regular la transcripción mediante interacción con miembros de la maquinaria basal transcripcional, con co-activadores o co-represores (elipse gris) y reclutarlos a promotores específicos. Otro mecanismo para la función de NFI podría realizarse a través del desplazamiento de otros factores transcripcionales, nucleosomas, u otras moléculas (elipse gris) de regiones promotoras. Dicho desplazamiento. Se ha propuesto que las variantes de los factores NFI podrían favorecer el reconocimiento de promotores específicos mediante uniones cooperativas de estas proteínas con otros factores (elipse gris) (Tomado de Gronostajski, 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La deficiencia en la expresión de los genes SG ocasiona distrofias musculares (Durbeej et al, 2002; Hack et al, 2000), y la sobre-expresión del gen γ -SG también causa este padecimiento (Zhu et al, 2001), lo que subraya la relevancia de los procesos de regulación transcripcional de dichos genes en la fisiología muscular. El gen α -SG tiene un patrón de expresión músculo-específico (Liu et al, 1997), lo que sugiere que su promotor es regulado por la familia de factores MyoD. Por su parte, el factor MyoD realiza funciones diferenciales sobre sus promotores blanco (Bergstrom et al, 2002), lo que indica que el potencial de *trans*-activación de MyoD debe ser modulado ó que MyoD influencia la actividad de otros factores transcripcionales con el fin de regular promotores musculares en forma específica (Delgado-Olguín et al, en preparación). Con base en estos antecedentes, en este trabajo se abordó el estudio de la regulación transcripcional del gen α -SG mediante la caracterización funcional de su promotor. Así mismo, se estudio la acción del factor MyoD sobre la actividad de dicho promotor, además, los resultados nos permitieron abordar el mecanismo de modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG durante la diferenciación de la línea celular de origen muscular C2C12.

Adicionalmente, con base en el hecho de que se desconocen los factores transcripcionales que regulan el promotor α -SG, en este trabajo se estudió la función de los factores NFI sobre la actividad de dicho promotor durante la diferenciación de la línea celular C2C12. Esto resulta relevante desde la perspectiva de que los factores NFI-C y NFI-X se expresan en forma predominante sobre los factores NFI-A y NFI-B en tejido muscular de ratón.

OBJETIVOS

- 1.- Clonar la región de regulación transcripcional del gen α -SG.
- 2.- Identificar los elementos de regulación que componen al promotor α -SG.
- 3.- Caracterizar la actividad del factor MyoD sobre el promotor basal α -SG.
- 4.- Estudiar el mecanismo de modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG durante el proceso de diferenciación de células de origen miogénico.
- 5.- Caracterizar la actividad de la familia de factores NFI sobre la actividad del promotor α -SG durante la diferenciación de la línea celular C2C12.

MATERIAL Y METODOS

Tamizaje de biblioteca genómica de ratón λ FIXII (Stratagene)

Generación de sonda de hibridación.

Aislamiento y purificación de DNA

Se aisló DNA de sangre periférica de ratón Balbc por el método de alta concentración de sal. Aproximadamente 1 ml de sangre fue suspendido en 10 ml de solución de lisis (ver anexo), y agitada suavemente durante 3 min, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 3000 rpm en una centrifuga clínica, se desechó el sobrenadante y se repitió el proceso 2 veces más. Una vez obtenida la pastilla de núcleos de glóbulos blancos, ésta fue resuspendida en 59 μ l de NaCl 5mM y 30.6 μ l de SDS 10%. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 205 μ l de solución saturada de NaCl y se centrifugó durante 15 min a 13 krpm en una micro-centrifuga. Se recuperó el sobrenadante y se realizó una extracción con 500 μ l fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (24, 25 y 1 %, respectivamente) y se centrifugó en las condiciones mencionadas. Se recuperó la fracción acuosa, se agregó 1 ml de etanol absoluto y se centrifugó en las mismas condiciones. Una vez precipitado el DNA, se realizaron dos lavados utilizando 1 ml de etanol al 70% y posterior a la centrifugación se dejó secar la pastilla antes de resuspender en 100 μ l de agua estéril.

Amplificación de la sonda

Se diseñó un par de oligonucleótidos con el fin de amplificar mediante PCR la secuencia correspondiente al extremo 5' del gen α -SG. Dichos oligonucleótidos flanquean una secuencia de 906 pb que incluye parte de los exones 2 y 3, así como el intrón 2 del gen α -SG (Fig. 8A). Las secuencias de los oligos utilizados son las siguientes: Mae1F: 5'-ATGGCAGCAGTAACTTGGATAC-3' y Mae1R: 5'-ACAAACACACGACCCACAAGTAGGT-3'. Estas secuencias fueron obtenidas en base a la secuencia con número de acceso AF064081. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C, 30 ciclos de: 1 min a 94°C, 1 min a 58°C y 3 min a 72°C; y un ciclo de 7 min a 72°C.

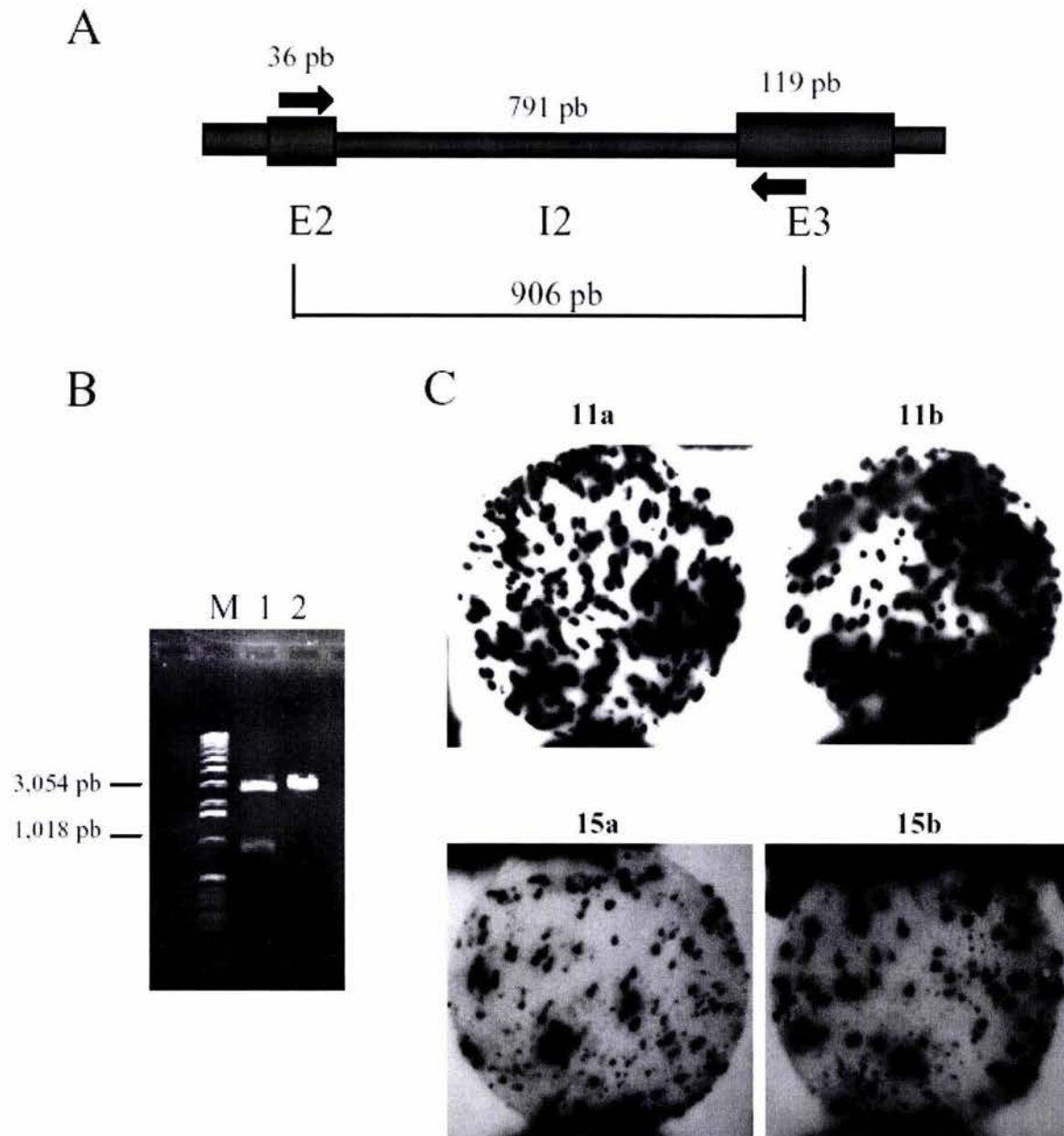


Fig. 8. Aislamiento de clonas positivas para el promotor α -SG mediante el tamizaje de una biblioteca genómica de ratón. (A) Localización de la secuencia empleada como sonda en el tamizaje de una biblioteca genómica de ratón (Stratagene) correspondiente al extremo 5' del gen α -SG. La secuencia incluye los exones 2 y 3 (E2 y E3) y el intrón 2 (I2). Se indica la longitud de dichas secuencias. Se indica la posición de los oligonucleótidos utilizados como primers (flechas) en la amplificación de la sonda empleada en el tamizaje. (B) El plásmido con el inserto correspondiente a la secuencia empleada como sonda fue restringido con la enzima NotI. La restricción libera el inserto correspondiente de 906 pb. M: marcador de tamaño. 1: plásmido recombinante. 2: pGEMT-Easy. (C) Después de dos rondas de purificación de se aislaron dos clonas positivas para la secuencia 5' del gen α -SG (11 y 15). Se muestran autoradiografías de las membranas hibridadas con la sonda marcada por duplicado (a y b).

Clonación y marcaje de la sonda

El fragmento de PCR que incluye los exones 2 y 3, así como el intrón 2 del gen α -SG, fue purificado a partir de un gel de agarosa al 1% utilizando el kit "Rapid gel extraction kit" (Quiagen), cuantificado y clonado en el vector pGEMT-Easy (Promega) en las siguientes condiciones:

Ligation Buffer:	5 μ l
PGEM T-Easy (50 ng/ μ l):	1 μ l
Producto de PCR:	0.44 μ l (16.6 ng)
H ₂ O:	2.56 μ l
T4 DNA ligasa:	1.0 μ l

La reacción se incubó toda la noche a 4°C. La totalidad de la reacción se utilizó para transformar 50 μ l de células JM109 competentes por choque térmico, que fueron plaqueadas en cajas con X-Gal e IPTG (20 μ l de una solución con 50 mg/ml de X-Gal y 0.5 mM de IPTG). Dado que el vector de clonación utilizado contiene el sitio de inserción en el marco de lectura del gen *LacZ*, 12 hrs después se seleccionaron clonas positivas (blancas), que no producen la proteína β -galactosidasa. Se tomó cada una de dichas colonias con una asa de siembra, las cuales se resuspendieron en reacciones de PCR con el fin de detectar el inserto en las clonas positivas. Dichas reacciones de PCR se prepararon de la siguiente manera:

Buffer 10X:	2.5 μ l
MgCl ₂ 50 mM:	1.5 μ l
dNTPs 10 mM:	0.5 μ l
Mae1F:	1.0 μ l
Mae1R:	1.0 μ l
Taq polimerasa (Invitrogen):	0.2 μ l
H ₂ O:	17.3 μ l

Se tomó una clona positiva para preparar un miniprep del plásmido recombinante. Dicho miniprep se utilizó para analizar el plásmido mediante restricción con la enzima NotI, cuyos sitios de restricción flanquean el sitio de inserción (Fig. 8B). A partir de la clona utilizada se preparó un midiprep para liberar el inserto y usarlo como sonda en el tamizaje de una biblioteca genómica de ratón.

Se purificó el inserto como se describió anteriormente y se marcó con [α - 32 P] dCTP utilizando el "Kit Rediprime II" (Amersham Pharmacia Biotech) de acuerdo a las instrucciones del manual técnico.

Titulación de la biblioteca genómica

Se inocularon 50 ml de medio LB broth (ver anexo) con maltosa 2% y MgSO_4 10 mM con una colonia de la cepa XL1 Blue MRA (P2) y se incubó a 37°C durante 7 hrs. El cultivo se centrifugó durante 10 min a 2000 rpm en un rotor Sorval SS-34 y desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 15 ml de MgSO_4 10 mM, y esta mezcla se diluyó con MgSO_4 de tal forma que quedara a una densidad óptica (600 nm) de 0.5. Se tomaron 200 μl de bacterias y se vertieron en tubos de ensayo, se prepararon cuatro tubos.

Por otra parte, se realizaron diluciones (10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6) del fago de la biblioteca λ FIX II Library (Stratagene) en solución amortiguadora SM (ver anexo). De cada dilución se tomó 1 μl y se agregó a cada uno de los tubos con bacterias. Las mezclas se incubaron durante 15 min a 37°C y posteriormente se agregaron a cada tubo 3 ml de NZY top agar (ver anexo) a 48°C, y la mezcla se plaqueó sobre cajas de cultivo de 10 cm con NZY agar (ver anexo). Las cajas se incubaron durante toda la noche a 37°C. En las cajas correspondientes a las diluciones 10^3 , 10^4 , 10^5 se observó confluencia de presencia de placas, y en la caja correspondiente a la dilución 10^6 se pudieron contar placas (370). Con el número de placas y la dilución utilizada se determinaron las unidades formadoras de placa por ml (pfu/ml). El resultado del título fue de 3.7^{11} pfu/ml.

Tamizaje de biblioteca genómica

Se inocularon 50 ml de medio LB con 0.2% de maltosa con una colonia de bacterias KL1-Blue MRA (P2) a 37°C durante 7 hrs. La pastilla de bacterias se resuspendió en 15 ml de MgSO_4 10 mM. Esta mezcla se diluyó con MgSO_4 10 mM para obtener una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm. Se realizaron las siguientes diluciones del fago recombinante en solución amortiguadora SM (ver anexo).

Dilución 10^3 : 1 μ l de fago en 999 de solución SM

Dilución 10^4 : 100 μ l de la dilución 10^3 en 900 μ l de SM

Dilución 10^5 : 100 μ l de la dilución 10^4 en 900 μ l de SM

De la dilución 10^4 se tomaron 162 μ l y se agregaron a 9 ml de las células diluidas en $MgSO_4$ 10 mM con el fin de obtener un total de 9.8×10^5 unidades formadoras de placa. La mezcla se incubó a 37°C durante 15 min. Se mantuvo una solución de SM con agarosa al 0.7% a 48°C. En cada tubo (de un total de 15) se vertieron 8 ml de SM-agarosa y 762.5 μ l de la mezcla de las células con el fago (600 μ l de células más 162.5 μ l de la dilución 10^4) para obtener 70,000 placas por caja. Los tubos se mantuvieron a 48°C hasta plaquear su contenido. Después del plaqueo, una vez solidificada la agarosa, las cajas se voltearon y se mantuvieron a 37°C durante toda la noche. Las cajas se enfriaron durante una hora y posteriormente se realizó la transferencia de las placas a membranas de nitrocelulosa por duplicado. Una vez secas, las membranas se sumergieron en solución desnaturalizante (ver anexo) durante dos min, posteriormente en solución neutralizante (ver anexo) durante 5 min en agitación y finalmente se remojaron brevemente en solución SSC 2X (ver anexo). Una vez secas, las membranas se trataron con 120,000 μ J de luz UV en un "crosslinker". Las membranas se sumergieron en solución de pre-hibridación (ver anexo 1) durante 4 hrs. Posteriormente se colocaron en bolsas selladas con 25 ml de solución de hibridación (ver anexo) con la sonda marcada, con una actividad de aproximadamente un millón de cpm, durante 16 hrs a 42°C en agitación. Se realizaron lavados de las membranas en 250 ml de SSC 2X durante 15 min, se reemplazó la solución por SSC 2X fresca, y se agitó durante 15 min a 42°C. Los lavados se repitieron con SSC 1X y 0.5X. Las membranas se acomodaron en cartones, se cubrieron con plástico (Klenn pack) y se expusieron a placas radiográficas durante 24 hrs. Se cortó la agarosa correspondiente a las señales positivas identificadas utilizando una punta azul cortada en la punta y se colocaron en tubos con 200 μ l de solución SM. Los tubos se agitaron durante 2 hr para eluir el fago. A partir de dicha elusión se realizó amplificación mediante PCR de la región empleada como sonda utilizando los oligonucleótidos correspondientes

(resultados no mostrados). Se realizaron diluciones 1/100, 1/1000 y 1/10,000. De la última dilución se tomaron 4 μ l, que se agregaron a 7 ml de células. El proceso siguió como se describe con el fin de obtener placas separadas a partir de las cuales poder purificar las clonas. Para purificar las clonas 11 y 15, se emplearon 20 μ l de una dilución 1/10 del producto de la elusión del fragmento de agarosa con una placa positiva en 200 μ l de SM. Este volumen se utilizó para infectar 600 μ l de células. A partir de eluciones de las placas obtenidas se purificaron las clonas (Fig. 8C).

Caracterización de clonas positivas

Con el fin de caracterizar parcialmente los insertos de las clonas aisladas se realizó amplificación mediante PCR utilizando combinaciones de los oligonucleótidos empleados en la amplificación del fragmento de DNA utilizado como sonda y los correspondientes a las secuencias del vector que flanquean el sitio de inserción (Fig. 9). Al emplear los oligonucleótidos Mae2R y T3 utilizando como templado DNA de la clona 11 se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 6 kb. Esto implica que dicha clona incluye 5 kb hacia 5' a partir de la posición del oligonucleótido Mae2R (Fig. 9). Al emplear los oligonucleótidos Mae2F y T3 utilizando como templado DNA de la clona 15 se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 4 kb (Fig. 9). Dado que el promedio del tamaño de inserto en la biblioteca genómica tamizada es de 13 kb, se estimó que el fragmento hacia 5' de la secuencia correspondiente al oligonucleótido Mae2F contenido en la clona es de 9 kb (Fig. 9).

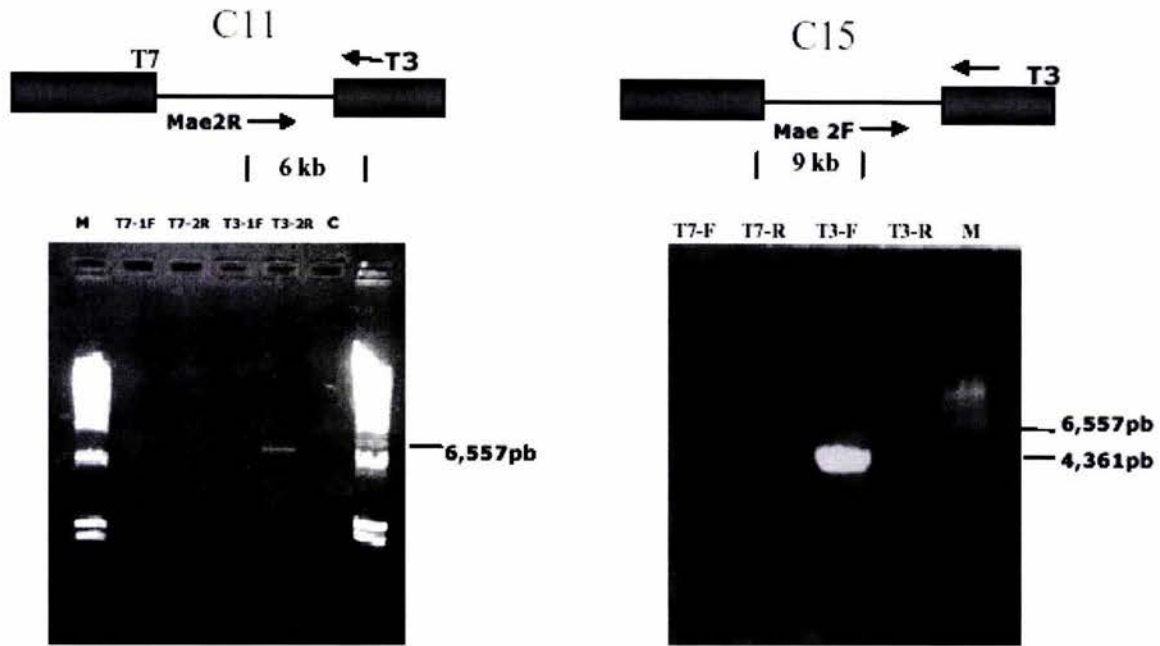


Fig. 9. **Caracterización de clonas positivas para la región 5' del gen α -SG mediante PCR.** Se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos correspondientes a la secuencia empleada como sonda en el tamizaje y a las secuencias que flanquean el sitio de inserción en el fago. Se muestran esquemas de las clonas 11 y 15 así como la localización de los oligonucleótidos con los que se obtuvo amplificación. La clonas 11 y 15 contienen fragmentos de DNA de 9 y 4 Kb hacia 5' de la región correspondiente a la sonda, respectivamente. Se muestra la ubicación y longitud de los fragmentos amplificados. En la parte superior de los geles se indica la combinación de oligonucleótidos empleada. Mae1F: 1F, Mae2R: 2R. Como escalera de DNA se empleó DNA del fago λ digerido con la enzima HindIII (M). C: control negativo.

Generación de construcciones

La construcción pGlow-TOPO F1B2609 fue generada mediante la amplificación de un fragmento de DNA de 2609 pb que contiene al promotor α -SG a partir de las clonas aisladas mediante el tamizaje de la biblioteca genómica. Para la amplificación se emplearon los oligonucleótidos: pALFAB2A: 5'-GGTGAAGCACTGTTTCTTCC-3'; pALFAB1A: 5'-GCCTAGCCAGTGAGTGACAG-3'. Este fragmento fue clonado en el vector pGlow-TOPO (Invitrogen) que contiene a *GFP* como gen reportero. La construcción pGL3F1B2609 (construcción 1) fue generada mediante la escisión del fragmento de 2609 pb a partir de pGlow-TOPO F1B2609 con la enzima de restricción BglII y la clonación de dicho fragmento en el sitio correspondiente en el vector pGI3-Basic Vector (Promega), que contiene a luciferasa como gen reportero.

Los insertos de las construcciones con deleciones del promotor α -SG (construcciones 2-13) fueron generados mediante amplificaci3n por PCR utilizando oligonucle3tidos flanqueados por secuencias de reconocimiento para la enzima de restricci3n BamHI empleando la polimerasa Taq Gold de Invitrogen, que posee la capacidad de corregir la introducci3n de nucle3tidos incorrectos durante la s3ntesis (proofreading activity). Como templado se emple3 DNA de las clonas aisladas a trav3s del tamizaje de la biblioteca gen3mica. Las secuencias de los oligonucle3tidos empleados se muestran en la tabla 1. Los oligonucle3tidos fueron dise1ados a partir de la secuencia con n3mero de acceso AB044625.

Tabla 1. Oligonucle3tidos empleados para la generaci3n de fragmentos deletados del promotor α -SG.

Oligonucle3tido	Secuencia
DEL α B1	5'-GCATCAGCATGGCTTTGTAG-3'
DEL α B2	5'-CGCGGATCCATAGGTGGCTGAACATGTGC-3'
DEL α B3	5'-GTGAGCTGGAGAGAGCCCTCT-3'
DEL α B4	5'-CGCGGATCCTGTTAAGGCCAGTTGTCAGC-3'
DEL α B5	5'-CGCGGACTGTTAAGGCCAGTTGTCAGC-3'
DEL α B6	5'-ATAGAGGAAGGGCCAGAAAG-3'
DEL α B7	5'-CGCGGATCCCTGGCTGGGATAATTCTCCT-3'
DEL α B8	5'-CGCGGATCCATACACCTGTCATCCCAGCA-3'
DEL α B9	5'-GTTTAAGAGCCCTGGTTGCT-3'
DEL α B10	5'-GTCCGATTCCCTCTTCTAGC-3'
DEL α B11	5'-CACAGACGCCAGATAAAACC-3'
DEL α B12	5'-CGCGGATCCCAGTGCTCACTCTGGGAATG-3'
DEL α B13R	5'-CGCGGATCCTTGCCTAGCCAGTGAGTGAC-3'

Las condiciones de amplificaci3n fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C, 1 min a 72°C y 1 ciclo de 7 min a 72°C.

Los productos de amplificaci3n fueron purificados a partir de geles de agarosa (Fig. 10) y restringidos con la enzima BamHI, con el fin de generar extremos

cohesivos. Los productos de dicha restricción fueron purificados a partir de geles de agarosa para clonarse en el vector pGL3-Basic Vector (Promega). Para ello, el vector fue restringido con la enzima BglII e igualmente, el producto de esta restricción fue purificado a partir de un gel de agarosa al 1%. Para clonar los fragmentos del promotor α -SG en el sitio BglII de pGL3-Basic Vector se realizaron ligaciones para cada uno de los insertos en las siguientes condiciones:

Ligase Buffer:	4 μ l
H ₂ O:	9 μ l
Inserto (producto purificado 250 ng):	5 μ l
Vector (producto purificado 50 ng):	1 μ l
T4 DNA ligase (Invitrogen) (1 unidad):	1 μ l

Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 4°C. Dichos productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes DH5 α . Cinco colonias de cada ligación fueron disueltas en reacciones de PCR como se describió anteriormente con el fin de identificar la dirección del inserto. Las PCRs se realizaron en las mismas condiciones empleadas para sintetizar los fragmentos del promotor α -SG, empleando el oligonucleótido GL2 como primer reverso, que es complementario a la secuencia río debajo de la región de clonación del vector pGL3-Basic vector. La secuencia del primer GL2 es la siguiente: 5'-CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA-3' Se seleccionaron clonas con el inserto en orientación 5'-3' para preparar midipreps, a partir de los cuales se realizaron restricciones empleando las enzimas HindIII y XhoI con el fin de liberar los insertos (Fig. 11).

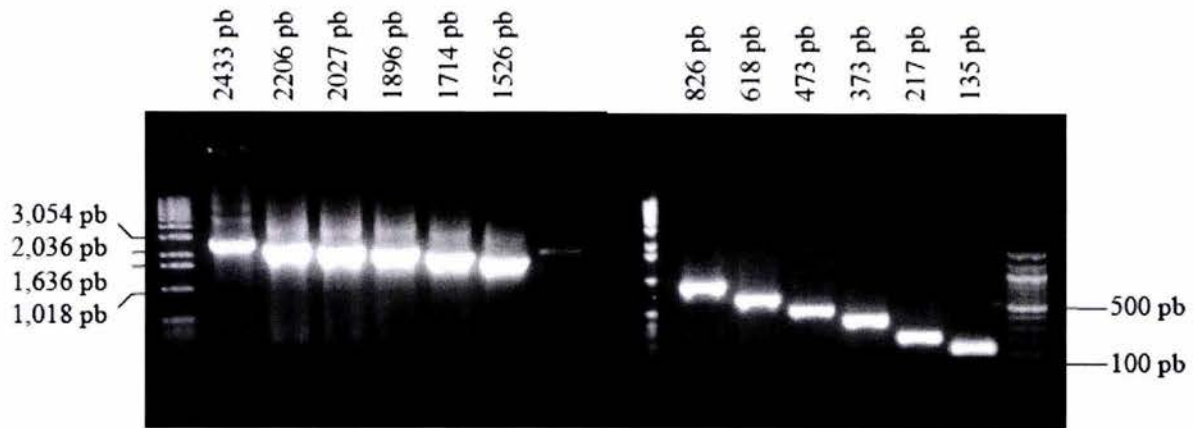


Fig. 10. **Amplificación de los fragmentos deletados del promotor α -SG.** Los productos fueron amplificados a partir del DNA de las clonas 11 y 15. En la parte superior se indican los números de nucleótidos abarcados por cada fragmento. En los extremos se muestran escaleras de DNA de 1 kb y de 100 pb.

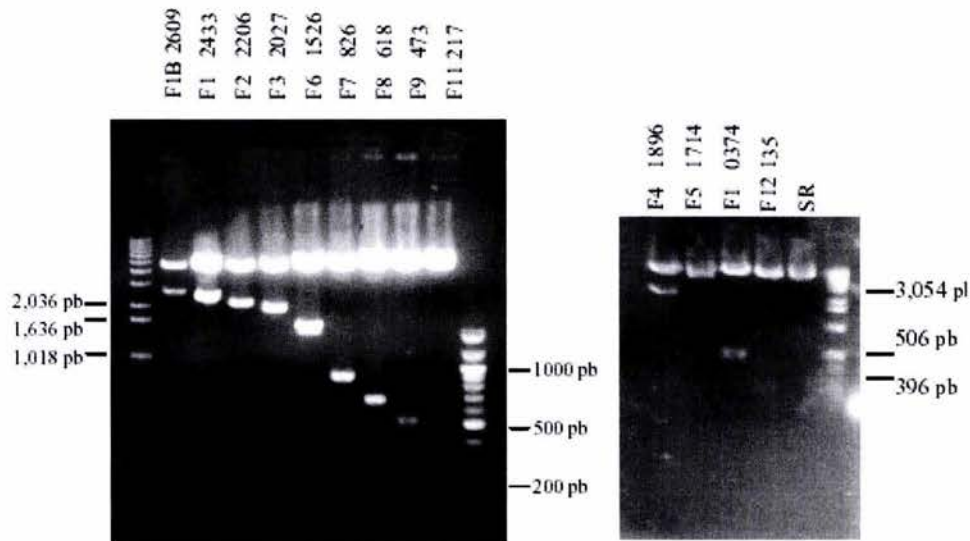


Fig. 11. **Restricción de las construcciones con deleciones progresivas del promotor α -SG con las enzimas HindIII y XhoI.** Se observan los fragmentos liberados correspondientes al tamaño esperado. La construcción F5 no es restringida por estas enzimas, sin embargo, mediante amplificación por PCR se obtiene el fragmento correspondiente al inserto. Esto podría deberse a que mediante la amplificación se suprimió alguno de los sitios de reconocimiento a las enzimas empleadas, o a que la estructura del plásmido impida el acceso de éstas a sus secuencias. Se indican las construcciones restringidas. SR: pGL3-Basic Vector sin restringir. En los extremos se corrieron escaleras de DNA de 1 kb y 100 pb

La construcción 15, que corresponde al fragmento 2, de 2433 pb con una delección de 190 pb que incluye la región del promotor basal fue generada mediante restricción de la construcción 2 con las enzimas HindIII y BstEI. Los extremos de cadena sencilla generados por los cortes de dichas enzimas fueron rasurados utilizando la enzima Mung Bean (Promega), y el producto resultante fue religado. Esta construcción fue caracterizada mediante PCR utilizando los oligonucleótidos pALFAB1 y GL2 (Fig. 12).

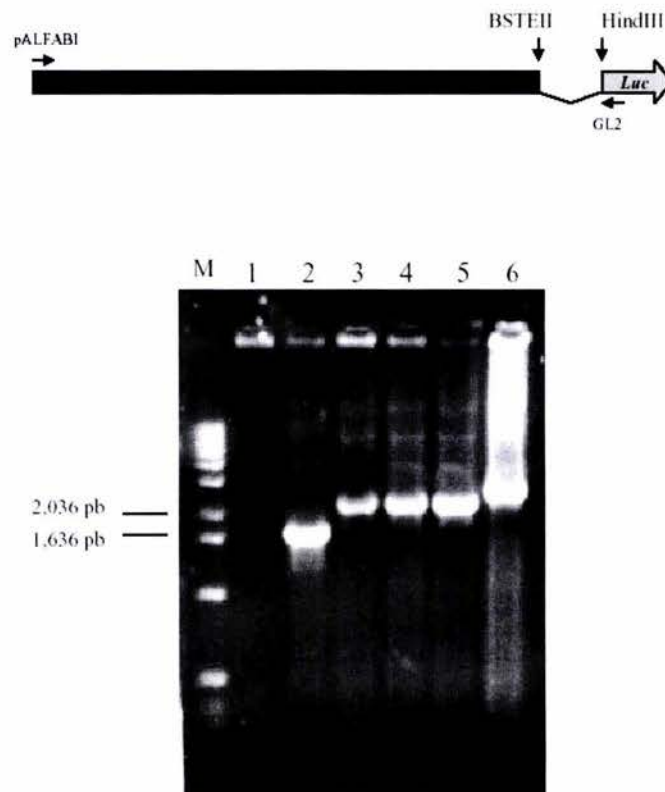


Fig. 12. **Construcción F12020 Δ +29-161 (construcción 15)**. La construcción 2, fue restringida con las enzimas indicadas en el esquema. La identificación de las clonas deletadas se realizó mediante amplificación por PCR. Se muestra la localización de los oligonucleótidos empleados pALFAB1 y GL2 (flechas). En los carriles 1, 2 y 3 se muestran los productos de amplificación correspondientes al fragmento deletado. Se muestra el producto obtenido a partir de la restricción de la construcción 2. Como escalera de fragmentos de DNA se empleó λ restringido con HindIII.

La construcción pGL3CP que contiene un fragmento de DNA de 81 pb correspondiente al promotor basal α -SG, fue generada mediante restricción de la construcción 13 con las enzimas PvuII y SmaI (generan extremos romos) y el plásmido fue religado. La caracterización de esta construcción se realizó mediante restricción con las enzimas NcoI y MluI (Fig. 13A).

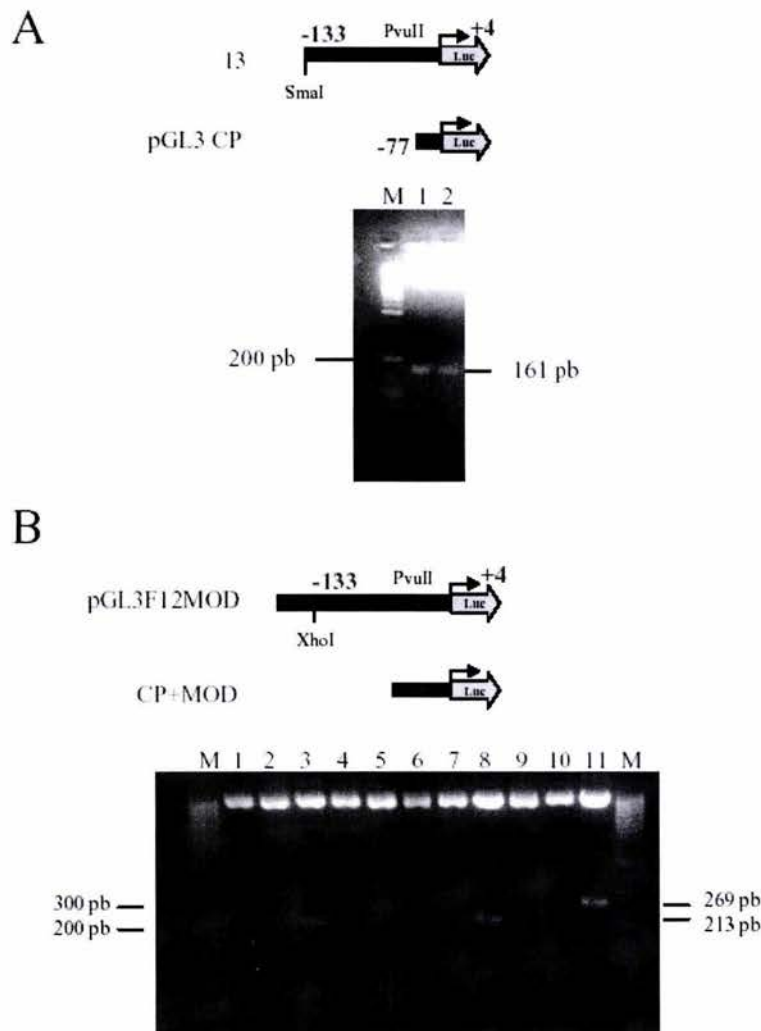


Fig. 13. **Generación de construcciones pGL3+4/-77 (pGL3CP) y +4/-77 MOD (pGL3CP-MOD).** (A) En los esquemas se muestran los nucleótidos abarcados por las construcciones así como los sitios de las enzimas empleadas en la generación de la construcción. La identificación de clonas deletadas se realizó mediante restricción con las enzimas NcoI y MluI, cuyos sitios se localizan en la región de clonación del vector. Se muestra el tamaño del fragmento obtenido por la digestión de clonas positivas (carriles 1 y 2). Como marcador se empleó una escalera de 100pb (M). (B) La construcción pGL3 CP+MOD fue generada mediante restricción de la construcción pGL3F12-MOD con las enzimas PvuII y XhoI. El modulador se muestra como un recuadro gris río arriba del sitio XhoI. La identificación de clonas deletadas se realizó con las mismas enzimas que en (A). En los esquemas se muestran los nucleótidos abarcados por las construcciones así como los sitios de las enzimas empleadas en la generación de la construcción. En los carriles 3 y 8 se encuentran los fragmentos generados por la restricción de clonas positivas. En el carril 11 se muestra el fragmento liberado a partir de la construcción pGL3F12MOD. M: marcador de 100 pb. A la derecha se muestra el tamaño de los fragmentos liberados.

El elemento modulador fue clonado en el sitio SmaI de la construcción 13 para generar la construcción pGL3F12-MOD. La construcción 13 fue digerida con dicha enzima. El plásmido linearizado fue purificado a partir de un gel de agarosa al 1% y posteriormente se ligaron secuencias de reconocimiento (linkers) para la enzima BglII en ambos extremos del plásmido linearizado. El producto de la ligación fue purificado y restringido con la enzima BglII durante 5 hrs para eliminar los sitios de reconocimiento sobrantes. Después de purificar el producto de la restricción, se utilizaron 50 ng para realizar una ligación con 10 ng del modulador. Dicho elemento esta formado por un par de oligonucleótidos complementarios alineados cuya secuencia incluye las dos E-boxes flanqueadas por secuencias de reconocimiento para la enzima BamHI. Dichos oligonucleótidos fueron alineados y restringidos con BamHI durante 12 hrs, purificados y utilizados en la ligación. La caracterización de las clonas positivas fue realizada mediante restricción con las enzimas NcoI y MluI (Fig. 14).

La construcción pGL3CP-MOD fue generada mediante restricción de la construcción pGL3F12-MOD con las enzimas PvuII y XhoI. El extremo cohesivo generado por el corte por XhoI fue rasurado utilizando la enzima Mung Bean y el producto fue religado (Fig. 13B).

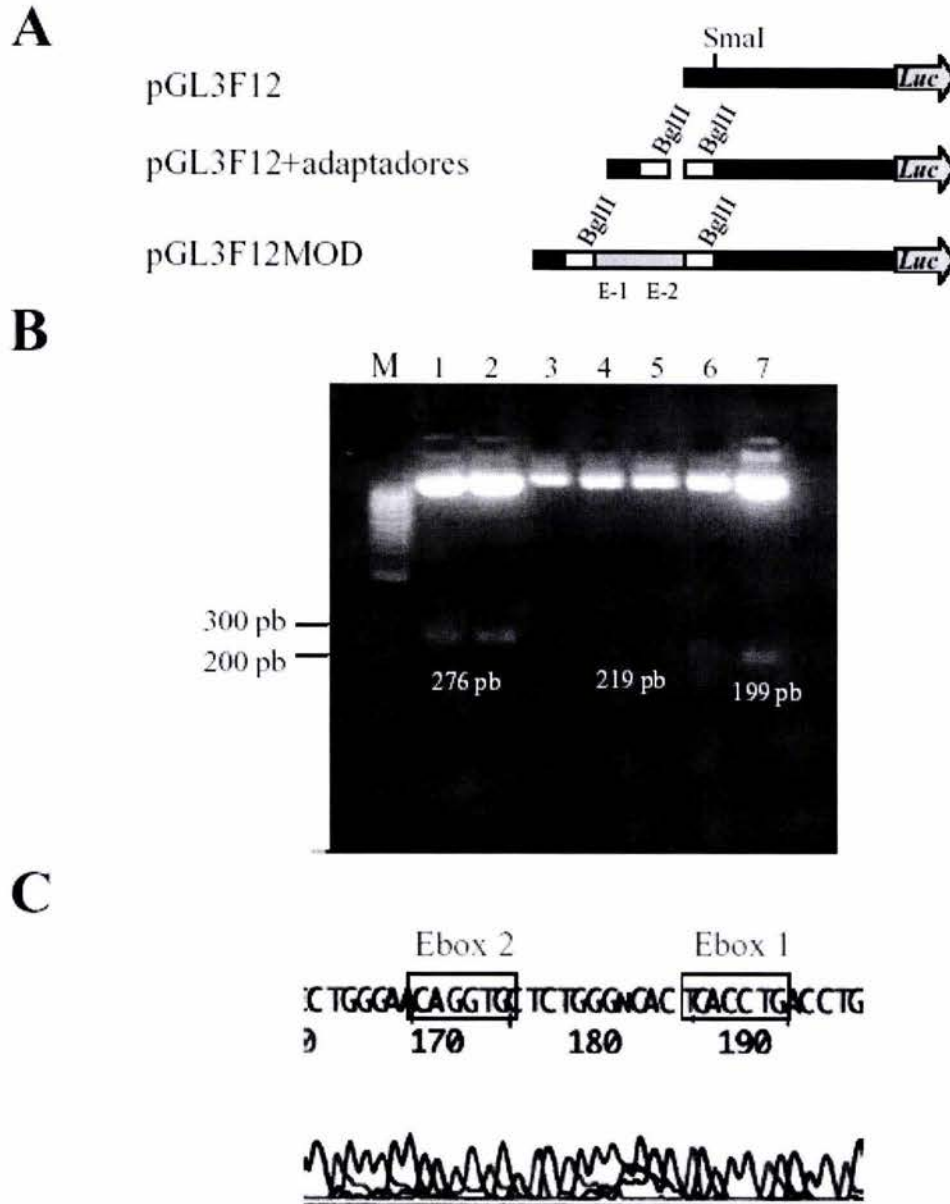


Fig. 14. **Generación de la construcción pGL3F12MOD**, que contiene al promotor basal α -SG y el elemento modulador. (A) Se insertaron secuencias BglII en el sitio Smal de la construcción pGL3F12 (que contiene un fragmento de 135 pb del promotor α -SG) como adaptadores. Dichos adaptadores se emplearon para ligar la secuencia correspondiente a E-box1 y E-box2 (E-1 E-2). (B) La identificación de clonas positivas se realizó mediante restricción con las enzimas NcoI y MluI. Se restringieron plásmidos en los que se clonaron los adaptadores (carriles 3-6), de los que se liberaron fragmentos de 219 pb, con el modulador (carriles 1 y 2), cuya restricción produjo fragmentos de 276 pb, así como la construcción pGL3F12 (carril 7), cuya restricción produjo un fragmento de 199 pb. Como marcador se empleó una escalera de 100 pb (M). (C) Se confirmó la presencia del modulador en algunas construcciones mediante secuenciación. Se muestran las secuencias de los sitios E-box1 y E-box2 en la cadena 3'-5'.

Las construcciones pGL3-Promoter-MOD (1 copia) y pGL3-Promoter-MOD (2 copias), que poseen el gen luciferasa regulado por el promotor viral SV40 y una y dos copias del modulador (E-box1 y E-box2), respectivamente fueron generadas mediante la clonación de dicho elemento en el sitio BamHI, río abajo del promotor SV40. La caracterización de estas construcciones se realizó mediante restricción con las enzimas XbaI y Sall (Fig. 15), cuyos sitios de reconocimiento flanquean el sitio BamHI.

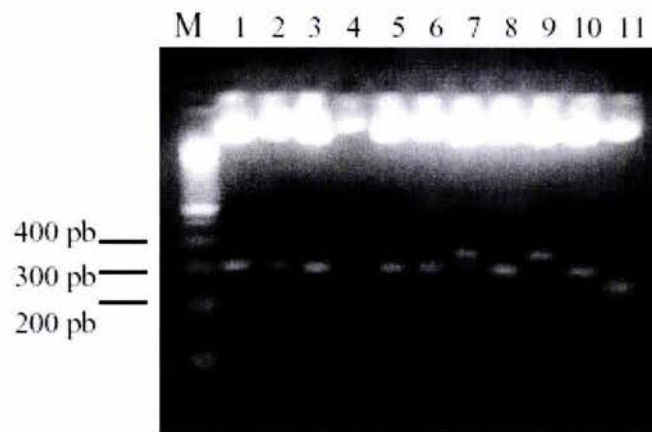


Fig. 15. **Generación de la construcción pGL3-Promoter-MOD**, que contiene el modulador en el sitio BamHI del vector pGL3promoter (Promega). La identificación de clonas positivas se realizó mediante restricción con las enzimas XbaI y Sall. Se muestran los fragmentos obtenidos correspondientes a 1 (325 pb, carril 10) y 2 copias del modulador (382 pb, carril 9). En el carril 11 se encuentra el fragmento de 268 pb liberado por la restricción del vector pGL3 promoter sin inserto.

Las construcciones CP+E1MUT, CP+E2MUT y CP+E1-2MUT, que contienen el promotor basal α -SG y al modulador con mutaciones diseñadas sobre las secuencias de E-box1, E-box2 y ambas, fueron generadas utilizando el sistema "QuickChange site directed Mutagenesis kit" (Stratagene). Las secuencias de los oligonucleótidos complementarios utilizados son las siguientes: E-1MUT, 5'-ACCCAGGTGAATTCAGTGGCCCAG-3' y E-2MUT, 5'-GGCCCAGAGCCGCGTTCCCACAC-3'. Solo se muestran las cadenas 5'-3'.

Las mutaciones inducidas en estos oligonucleótidos generan sitios de restricción para las enzimas EcoRI y SacII, respectivamente, que son únicos en el contexto de la construcción pGL3CP y que permitieron corroborar la incorporación de dichas mutaciones. La caracterización de estas construcciones fue realizada utilizando las enzimas correspondientes además de NarI (Fig. 16), cuyo sitio de reconocimiento se ubica río abajo del modulador.

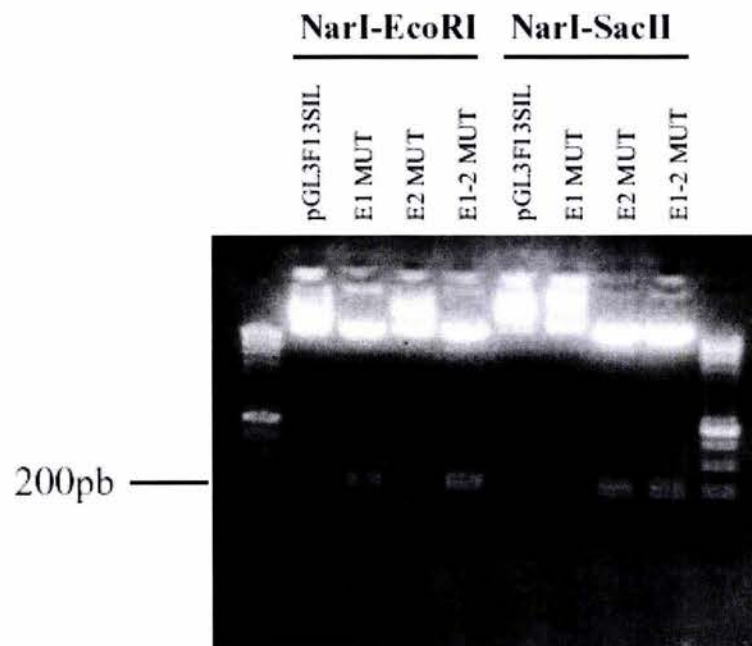


Fig. 16. **Generación de construcciones CP+E1MUT, CP+E1MUT y CP+E1-2MUT**, que contienen mutaciones en los sitios E-box1 (E1 MUT), E-box2(E2 MUT) y en ambas (E1-2 MUT), respectivamente. La identificación de construcciones mutantes se realizó mediante restricción con la enzima NarI, en combinación con EcoRI o SacII.

Se generaron las construcciones CP+E-1MUTGGCC, CP+E-1MUTCC y CP+E-1MUTCCC que contienen el modulador con la secuencia de E-box1 mutada, además de sustituciones de las secuencias de nucleótidos GGCC, CC y CCC del consenso E-box2. Dichas construcciones fueron generadas utilizando la construcción CP+E1MUT como templado. Las sustituciones de nucleótidos fueron insertadas como se describió anteriormente. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para generar dichas mutaciones se muestran en la tabla 2. Las mutaciones introducidas se muestran en la figura 29. La introducción de las mutaciones fue confirmada mediante secuenciación.

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en la introducción de mutaciones puntuales en la construcción pGL3+E1MUT.

Oligonucleótido	Secuencia
GGCCME2f	5'-GGTGAGTTCAGCAGAGCACCTGTTCCCAGGATCTTCGG-3'
GGME2F	5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCAGGTGTTCCCAGGATCTTCGG-3'
CCCME2F	5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCACCTGTTAGTAGGATCTTCGG-3'.
*E2CCCGGCCMf	5'-GGTGAGTTCAGCAGAGCACCTGTTAGTAGGATCTTCGG-3'
*E2CCCGGMf	5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCAGGTGTTAGTAGGATCTTCGG-3'
*E23CGGGGCCMf	5'-GGTGAGTTCAGCAGAGCAGGTGTTAGTAGGATCTTCGG-3'
* Estos oligonucleótidos se emplearon en la sustitución de los nucleótidos conservados en diferentes combinatorias	

Los plásmidos pcDNA3-N-myc, pcMyoD-N-myc y pcMyogenin-N-myc, que codifican un "tag" correspondiente a un péptido de la proteína N-Myc, MyoD y Miogenina fusionadas a un fragmento Myc, respectivamente fueron donados por Robin Meech, (Department of Neurobiology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California. E.U.A.). Estos plásmidos fueron utilizados en los ensayos de *trans*-activación. Los plásmidos pCHNFI-A2, pCHNFI-B-2, pCHNFI-C1.2, pCHNFI-X2, que codifican para los factores NFI-A1.2, NFI-B2, NFI-C2 y NFI-X2, respectivamente, así como el vector pCH, que no contiene cDNA, fueron donados por el Dr. Richard Gronostajski.

Propagación y diferenciación de células C2C12

La línea celular C2C12, que corresponde a mioblastos murinos, fue mantenida en condiciones de crecimiento y en estado indiferenciado (mioblastos) en medio DMEM (Gibco), suplementado con suero fetal bovino (Gibco) al 10%. Para inducir diferenciación, el medio de crecimiento fue sustituido por medio de diferenciación (DMEM 1% de suero de caballo) cuando las células alcanzaron crecimiento confluyente en las cajas de cultivo. Los cultivos fueron mantenidos en incubadoras a 37°C en presencia de CO₂ al 5%. Los pases de esta línea celular se realizaron antes de que las células alcanzaran crecimiento confluyente con el fin de mantener el estado indiferenciado de la línea, pues el contacto es un factor de inducción a diferenciación (Cole et al, 2004).

Transfección de células C2C12

24 hrs antes de la transfección, se sembraron 384,000 células en cada pozo de 3 cm de diámetro (cajas multipozo 6), lo que corresponde aproximadamente a un 40% de confluencia, y se mantuvieron en condiciones de crecimiento. Los mioblastos se transfectaron utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para normalizar la actividad de luciferasa de las construcciones problema (luciferasa de *P. pirallis*), los cultivos se co-transfectaron con 50 ng del plásmido pRL/CMV (Promega) que tiene el gen luciferasa de *Renilla reniformis*. De esta forma se normaliza tomando en cuenta la actividad de ambas luciferasas. El DNA (construcción problema + plásmido control) se suspendió en 20 µl de H₂O, se agregaron 4 µl de lipofectamina y 100 µl de DMEM (sin suero fetal bovino). Esta mezcla se preparó para cada transfección. La mezcla se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Durante este lapso, se sustituyó el medio de crecimiento de los cultivos por 800 µl de medio DMEM (sin suero fetal bovino) y se goteó la mezcla (124 µl) sobre los cultivos celulares. Después de 5 horas, el medio DMEM con la mezcla de transfección fue retirado de los cultivos y sustituido por medio de crecimiento. 24 hrs después, se cosecharon los mioblastos transfectados para realizar ensayos de actividad de luciferasa, y los cultivos transfectados en réplica

fueron inducidos a diferenciación. Cuatro días después, se cosecharon los miotubos para realizar el mismo ensayo.

Para generar transfectantes estables, se co-transfectaron mioblastos C2C12 con 3 μ g de los vectores pcMyoD-N-myc o pcDNA3-N-myc, que codifican para MyoD fusionado a un "tag" y únicamente el "tag", respectivamente, con 800 ng del vector pEGFP-1 (Clontech), que codifica el gen de resistencia a neomicina, utilizado como marcador de selección. Después de la transfección, los cultivos se mantuvieron en medio DMEM con geneticina (0.6 mg/ml). Posteriormente se emplearon cultivos de estas líneas para inducirse a diferenciación.

Western-blot

Obtención y cuantificación de extractos proteínicos

Mioblastos y miotubos C2C12, así como transfectantes estables para MyoD-N-myc y N-myc fueron lisadas en buffer RIPA modificado (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 % NP-40, 0.25% de deoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF y 1 μ g/ml de aprotinina y leupeptina. Estos tres últimos componentes, que funcionan como inhibidores de proteasas se agregan antes de usar. Se emplearon 100 μ l de RIPA por cada 10 millones de células. La mezcla se incubó durante 15 min en hielo, se centrifugó a 13 krpm en una microcentrífuga a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Para cuantificar proteínas de los extractos se utilizó el reactivo de Bradford (Bio-Rad). Para ello, se realizó dilución de los extractos (1/10) y se colocaron 2 μ l de dicha dilución en pozos de placas de ELISA (96 pozos). Posteriormente se agregaron 200 μ l de reactivo de Bradford en una dilución 1/5. Después de incubar por 5 min, se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 537 nm en un lector de ELISA. Empleando las lecturas de las muestras problema así como las provenientes de muestras con concentraciones conocidas, se realizó regresión lineal para determinar las concentraciones de proteína.

Electroforesis en gel de acrilamida y transferencia de proteínas

Preparación de gel concentrador y de resolución

El gel concentrador (3% de acrilamida) se preparó de la siguiente manera: se agregaron 1.25 ml de "Spacer Buffer" (5.98 g de TRIS base pH 6.7, aforar a 100 ml), 0.75 ml de acrilamida al 40% (39 g de acrilamida, 1 g de bis-acrilamida y aforar a 100 ml), 100 μ l de SDS 10%, 7.8 ml de H₂O, 100 μ l de Persulfato de Amonio al 10% y 10 μ l de TEMED.

El gel separador (10% de acrilamida) se preparó de la siguiente manera: se agregaron 1.25 ml de "Resolving Buffer" (48 ml de HCl 1M, 36.3 g de TRIS base pH 6.7 y aforar a 100 ml), 2.5 ml, de acrilamida al 10% y 10 μ l de TEMED. En la preparación de los dos geles, el Persulfato de amonio y el TEMED se agregaron antes de fue las soluciones entre los cristales contenedores. Primero se vertió la solución de resolución, llenando aproximadamente 2 tercios del espacio entre los cristales, una vez polimerizado el gel, se vertió la solución correspondiente al gel concentrador, e inmediatamente se colocó el peine.

Electroforesis y transferencia de proteínas

Se tomó el volumen necesario para contener la concentración apropiada de proteínas (50 μ g) y se diluyó en un volumen igual de solución amortiguadora de cargado (5 ml de "Spacer Buffer", 10 ml de SDS al 10%, 4 ml de glicerol, 0.4 ml de azul de bromofenol al 0.5% y 0.6 ml de H₂O). La mezcla se calentó a 90°C durante 5 min, y se colocó en hielo antes de cargarse en los pozos del gel concentrador. En forma alterna a las muestras, se corrieron 8 μ l de un marcador de peso molecular pre-teñido (Benchmark, Invitrogen). Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis a 20 mAmp durante 35 min en "Electrode Buffer" (12 g de TRIS base, 57.6 g de glicina, 40 ml de SDS al 10% y aforar a 4 lt). Las proteínas resueltas fueron transferidas a membranas de polivinilideno (PVDF) en un "sandwich" de transferencia preparado de la siguiente manera: (del polo negativo hacia el positivo) se colocó la esponja de transferencia, dos capas de papel filtro, el gel de transferencia, la membrana (previamente enjuagada en metanol durante 5 min y 10 min en buffer de transferencia), dos capas de papel

filtro y la otra esponja de transferencia. Las proteínas se transfirieron a la membrana por electro-transferencia a 500 mAmp durante 2 hrs a 4°C en agitación (colocando una mosca dentro de la cámara, que a su vez se coloca sobre un agitador magnético), en "Transfer Buffer" (25 mM de TRIS HCl, 192 mM de glicina, 20% de metanol, ajustar pH a 8.3, desgasificar y guardar frío).

Revelado de señales (blot)

La membrana se enjuagó en H₂O y se bloqueó durante 2 hrs con 10 ml de solución de bloqueo (TBS (0.05 % de TRIS, 0.25 M de NaCl, pH 7.5), Tween 0.1%) con 5% de leche en polvo sin grasa y 1% de BSA) en agitación. Posteriormente se agregó el anticuerpo primario en una dilución 1/1000 y se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se retiró la solución de bloqueo con el anticuerpo y se realizaron 5 lavados de la membrana de 5 min cada uno en agitación con el fin de eliminar el residuo del anticuerpo. Dichos lavados se realizaron con TBS con Tween al 1 %. Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Zymed) diluido 1/3000 en TBS, Tween 0.1%, 5% de leche en polvo sin grasa y 1% de BSA. Se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 1 hr. Se realizaron 4 lavados en las mismas condiciones mencionadas y se hizo un quinto lavado con TBS sin Tween. Posteriormente se agregaron los reactivos con el sustrato para la peroxidasa (Pierce) (1.5 ml de cada reactivo). Después de incubar durante 5 min en agitación, las bandas se revelaron por autoradiografía.

Obtención de extractos nucleares

La obtención de extractos nucleares se realizó mediante un método descrito con anterioridad con algunas modificaciones (Muller et al, 1989). Se cosecharon mioblastos y miotubos C2C12, se utilizaron aproximadamente 500,000 células por ensayo. Las células se centrifugaron durante 1 min a 12 krpm a 4°C en una microcentrífuga, la pastilla se resuspendió en 1 ml de PBS y se centrifugó en las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 400 µl de "Buffer" A (10 mM de HEPES pH 7.9, 10 mM de KCl, 0.1 mM de EDTA,

0.1 mM de EGTA, 1 mM de DTT y 0.5 mM de PMSF) frío. La mezcla se incubó en hielo durante 15 min. Se agregaron 25 μ l de NP-40 (Fluka) y los tubos se agitaron en un "vortex" durante 10 s, se centrifugó en las condiciones mencionadas durante 30 s. Se desechó el sobrenadante y la pastilla de núcleos fue resuspendida en 50 μ l de buffer C (20 mM de HEPES pH 7.5, 0.4 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF) frío y los tubos se agitaron durante 15 min a 4°C en una rueda giratoria. Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 8 krpm en una microcentrífuga a 4°C y el sobrenadante (extracto de proteínas nucleares) se traspasó a tubos nuevos, que fueron almacenados a -70°C.

Obtención de extractos de transcripción/traducción *in vitro*

Dichos extractos fueron obtenidos utilizando el sistema TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Se utilizó 1 μ g de los vectores circularizados que codifican para N-myc-MyoD y N-Myc-myogenin. Del producto de la transcripción/traducción *in vitro* se utilizaron 5 μ l para los ensayos de retardo.

Ensayos de movilidad electroforética

Marcaje y purificación de sondas

Marcaje y alineamiento de oligonucleótidos

Se colocaron en un tubo Eppendorf: 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos complementarios correspondientes a cada sonda, 2 μ l de "Buffer Forward" (Fermentas), 1 μ l de [γ -³²P] ATP, 0.5 μ l de cinasa y se completó a un volumen de 10 μ l con H₂O. El tubo se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente el tubo se incubó a 60°C para inactivar a la cinasa.

Se agregaron 10 μ l de solución amortiguadora de alineamiento (20 mM de TRIS HCl pH 8, 100 mM de NaCl y 1 mM de EDTA) y se incubó a 60°C durante 30 min y 10 min a temperatura ambiente.

Las secuencias de los oligonucleótidos empleados como sondas son las siguientes: EBOX1.F (que incluye la secuencia de E-box1) 5'-

ACCCCAGGTCAGGTGAGTGGCCCAG-3', EBOX2.F (que incluye la secuencia de E-box2) 5'-GGCCCAGAGCACCTGTTCCCACAC-3' y E2WTf (que contiene la secuencia de E-box2 así como las secuencias de nucleótidos conservados que la flanquean), 5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCACCTGTTCCCAGGATCTTCGG-3'. Solo se muestran las cadenas sentido. Las versiones mutantes de estas sondas se muestran en la sección de construcciones y plásmidos. El oligonucleótido empleado en los ensayos de retardo y super-retardo para la secuencia 1NFI son los siguientes: 1NFIF 5'-CCGTTCAAATTGGCCACAAACATAGAGGAAGG-3'. Solo se muestra la cadena sentido. El oligonucleótido con mutaciones en el sitio 1NFI es el siguiente: 1NFIMUT 5'-CCGTTCAAATTAACACAAAAAATAGAGGAAGG-3'.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

El contenido de la reacción de marcaje y alineamiento de oligonucleótidos se mezcló con 10 µl de solución amortiguadora de cargado (5 ml de "spacer buffer" (ver sección de "Preparación de gel concentrador y de resolución"), 10 ml de SDS al 10%, 4 ml de glicerol, 0.4 ml de azul de bromophenol al 0.5% y 0.6 ml de H₂O) y fueron corridas en geles de acrilamida al 10% y urea al 8% a 150 VIts durante 1 hr en TBE al 0.5 X. Previamente el gel fue pre-corrido durante 1 hr en las mismas condiciones. Dichos geles fueron preparados de la siguiente manera. Se agregaron: 4 g de urea, 16.62 ml de acrilamida al 30%, 28 ml de H₂O, 5 ml de TBE al 5 %, 350 µl de Persulfato de amonio al 10 % y 15 µl de TEMED. El gel fue expuesto a una placa radiográfica durante 5 min, la placa fue revelada para evidenciar la posición de los oligonucleótidos marcados y alineados en el gel. Las bandas fueron cortadas de la placa y éste se colocó sobre el gel. Se cortaron del gel los trozos localizados en los orificios de la placa y colocados en tubos Eppendorf con 400 µl de solución amortiguadora de elusión (0.5 M de acetato de amonio, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM de EDTA y 0.1 % de SDS). Los tubos fueron incubados a 37°C durante toda la noche. Se agregaron 40 µl de acetato de amonio 3 M, 1 µg de glicógeno y 1 ml de etanol absoluto. Los tubos se almacenaron a -20°C durante toda la noche, posteriormente se centrifugaron a 13

krpm durante 30 min en una microcentrífuga. La pastilla obtenida se secó en una centrífuga de vacío, y se midió la actividad de la sonda en CPM empleando un contador de centelleo (Perkin Elmer). La pastilla fue diluida en H₂O en un volumen dependiente de la actividad de la sonda, de tal forma que quedara a 10,000 CPM por μ l.

Ensayos de retardo y súper-retardo

Se colocaron 8 μ l de extractos nucleares de mioblastos o miotubos C2C12 ó 5 μ l de los extractos obtenidos mediante transcripción/traducción *in vitro* por cada ensayo. Los extractos se mezclaron con: 12 μ l de "Gel-shift Buffer" (20 mM de HEPES pH 7.9, 50 mM de KCl, 50 mM de MgCl, 5 % de glicerol, 0.5 mM de DTT, 1 μ g de poly-dIdC y 1 μ l de DTT 1 M) (los dos últimos reactivos se agregan antes de usar), 2 μ l de sonda (20,000 CPM), y el volumen se llevó a 20 μ l con H₂O. Para competir la unión de las proteínas con el DNA, se añadieron 1, 2 ó 3 μ l (100, 200 ó 300 ng) de sonda sin marcar como competidor y la cantidad de agua añadida se ajustó para obtener el volumen final de 20 μ l. Las competiciones se incubaron durante 15 min en hielo y 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se agregó la sonda marcada y los tubos se incubaron nuevamente en las mismas condiciones. Los tubos sin competidor se incubaron en dichas condiciones solo una vez. Para ensayos de retardo, los extractos nucleares fueron incubados durante 12 hrs con 1 μ g del anticuerpo anti-MyoD (Santa Cruz Biotechnology) y posteriormente tratado en las condiciones establecidas para los ensayos de retardo. Posterior a las incubaciones, las muestras se cargaron en geles de acrilamida al 5 % (sin urea), y los productos se resolvieron por electroforesis a 150 VltS durante 2 ½ hrs en TBE 0.25 X. El gel fue secado y expuesto a una placa radiográfica durante 12 hrs, que posteriormente fue revelada.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

El protocolo se describió originalmente por Weinman y colaboradores (2002), y fue modificado por Valadéz-Graham et al (2004).

Día 1

Se tripsinizaron 2×10^7 mioblastos o mioblastos inducidos a diferenciación durante 4 días por cada ensayo (por cada anticuerpo), se centrifugaron y resuspendieron en 10 ml de medio de cultivo DMEM con 10 % de suero fetal bovino. Se agregaron 270 μ l de formaldehído al 37 % (queda a una concentración final de 1 %) y se agito el tubo suavemente cada minuto durante 10 min. Posteriormente se añadieron 0.039 g de glicina (queda a una concentración final de 125 mM) para detener la reacción y el tubo se agitó suavemente cada min durante 5 min. Posteriormente se junta el contenido todos los tubos en tubos Falcon de 50 ml para realizar los lavados. Las células se lavaron dos veces con PBS frío (40 ml), y en el segundo lavado se añaden 400 μ l de PMSF a 10 mg/ml. Se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm a 4°C. La pastilla de células se resuspendió en solución amortiguadora de lisis (ver anexo 1) frío con 100 μ l de PMSF y 0.5 ml de NP-40 al 10 %, y el tubo se incubó durante 30 min en hielo con agitaciones cada 5 min. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 2000 rpm a 4°C para obtener los núcleos. La pastilla de núcleos se resuspendió en 1 ml de solución amortiguadora de lisis de núcleos fría con 100 μ l de PMSF + leupentina + aprotinina por ensayo y el tubo se incubó durante 10 min en hielo. El producto de la lisis se dividió en tubos (Falcon de 15 ml) con 1 ml (por ensayo) y se tomó una alícuota de dicho producto (100 μ l) para utilizarse como control sin sonicar. Las muestras fueron sonicadas con el fin de obtener fragmentos de cromatina de entre 100 y 500 pb. Las condiciones de sonicación fueron las siguientes: 30 pulsos de 30 segundos en el nivel de salida 5 de un sonicador Branson modelo 250 con una punta de 3 mm. Dichas condiciones fueron establecidas previamente (Fig. 17). Posteriormente se centrifugó dos veces durante 30 segundos en ambas recuperando el sobrenadante. De este producto se tomaron 100 μ l de cada muestra como control positivo (Input). Al sobrenadante recuperado se agregaron 500 μ l de solución amortiguadora IP (0.01 % de SDS, 1.1 % de Tritón X100, 1.2 mM de EDTA, 17.7 mM de TRIS HCl pH 8 y 167 mM de NaCl) y 1 μ g del anticuerpo indicado. La mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C en un agitador giratorio.

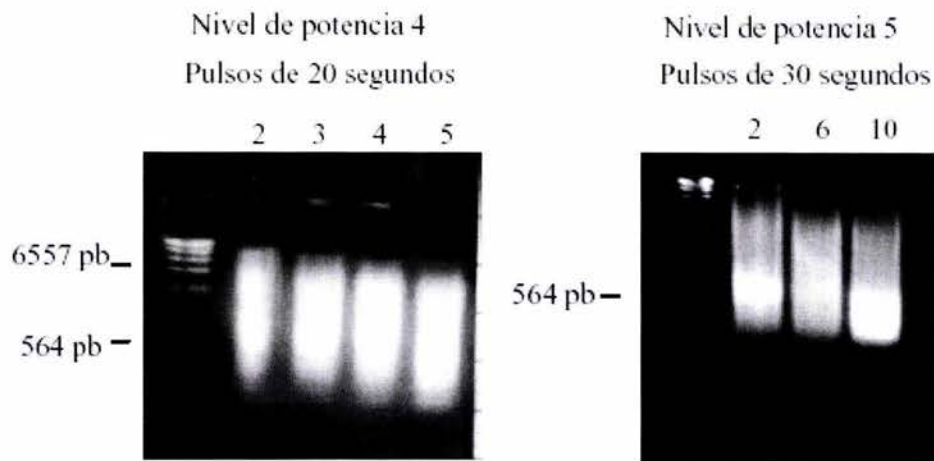


Fig. 17. **Estandarización de condiciones de sonicación de cromatina aislada a partir de células C2C12.**

Al aplicar 10 pulsos de 30 segundos en el nivel de salida 5 se obtuvo la mayoría de la cromatina en fragmentos de aproximadamente 500 pb. Como escalera de DNA se empleó λ digerido con la enzima HindIII.

Día 2

Se colocó el agitador giratorio con las muestras durante 5 a 6 hrs a temperatura ambiente. Se añadieron 20 μ l de perlas (A+G plus Agarose Santa Cruz Biotechnology) y los tubos se incubaron en agitación durante toda la noche a 4°C.

Día 3

Se colocó el rotor con las muestras a temperatura ambiente durante 1 hr. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm en una microcentrífuga durante 1 min y el sobrenadante se guardó como la fracción no unida. Las perlitas se lavaron en las siguientes condiciones: 1 vez con 1.5 ml de solución amortiguadora RIPA (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5 % deoxycholato, 1% NP-40 y 1 mM EDTA), 2 veces con 1.5 ml de solución amortiguadora de alta sal (50 mM de tris pH 8, 500 mM de NaCl, 0.1% de SDS, 0.5% de deoxycholato, 1% de NP-40 y 1 mM de EDTA), 1 vez con solución de LiCl (50 mM de Tris pH 8, 1 mM de EDTA, 250 mM de LiCl, 1% de NP-40 y 0.5% de deoxycholato) y 2 veces con solución amortiguadora TE. Estos lavados en frío, con incubaciones de 10 min cada uno en un agitador giratorio. Posteriormente se añadieron a cada muestra 100 μ l de TE y

1 μ l de Rnasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C durante 30 min y se añadieron 400 μ l de H₂O (a la fracción almacenada para usarse como fracción no unida no se le agrega H₂O, y al input se le agregan 300 μ l). De la fracción no unida se toma el 25% del volumen total y se le agrega Rnasa A y TE). Las muestras se incubaron durante toda la noche a 67°C con el fin de revertir el entrecruzamiento originado por el tratamiento de las células con formaldehído.

Día 4

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm en una microcentrífuga durante 2 min, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 60 μ g de Proteinasa K (Invitrogen) y se incubó durante a 45°C durante 2 hrs. Posteriormente se agregaron 200 μ l de TE y se realizaron dos extracciones con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y una con cloroformo. Al producto de dicha extracción se agregaron 30 μ l de NaCl 5 M, 5 μ g de glicógeno (Roche) como acarreador y 2 volúmenes de etanol absoluto. Los tubos se incubaron durante toda la noche a -20°C.

Día 5

Los tubos se centrifugaron a máxima velocidad durante 20 min a 4°C. La pastilla se lavó con etanol al 70%, posteriormente se eliminó el sobrenadante y finalmente la pastilla se secó en una centrífuga de vacío. La pastilla se resuspendió en 30 μ l de H₂O.

Para la PCR se realiza una dilución 1/10 y de ésta se ocupa 1 μ l para la reacción de amplificación.

En la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos marcados como se describe en ensayos de movilidad electroforética con algunas variaciones. Para el ChIP se marcan los oligonucleótidos en forma individual, y no hay necesidad de precipitar el material.

La reacción de marcaje se preparó de la siguiente manera:

H ₂ O:	~20 μ l
Oligo:	500 ng
Cinasa (Fermentas):	1.0 μ l
Buffer Forward:	2.0

[γ -³²P] ATP: 1.0 μ l

El producto del marcaje (20 μ l) se diluyó 1/10 y de esta dilución se toman 2 μ l de cada oligo para cada reacción.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos para las inmunoprecipitaciones:

MyoD (M-318) (Santa Cruz Biotechnology)

myogenin (M225) (Santa Cruz Biotechnology)

TFIID (TBP) (SI-1) (Santa Cruz Biotechnology)

TFIIB (SI-1) (Santa Cruz Biotechnology)

c-myc (9E10) (Santa Cruz Biotechnology), utilizado como anticuerpo inespecífico.

En los ensayos realizados se amplificaron dos regiones de DNA del promotor α -SG, correspondientes al promotor basal y al modulador, así como una región correspondiente al exón 4 del gen. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 3

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en la amplificación de las regiones del promotor α -SG analizadas mediante inmunoprecipitación de cromatina.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto	Tamaño
alphanF	5'-TCACTCTGGCAATGGAAAGA-3'	promotor basal α -SG	155 pb
alphanR,	5'-TACTGCTGCTGCCATAGTTG-3'		
E-boxChIPR	5'-TGTTAAGGCCAGTTGTCAGC-3'	modulador	203 pb
SILR	5'-TGTGTTCCGTCCTCTCTGAA-3'.		
α -SGE4F	5'-ACTGTCCGACTCACCTACCA-3'	exón 4	139 pb
α -SGE4R	5'-TGACTTGGTACCCACGATCT-3'		

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron las siguientes para los fragmentos correspondientes al promotor basal y al modulador: 1 ciclo de 1 min a 95°C, 30 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55.7 °C por 1 min, 72 °C por 45 s y 1 ciclo a 72 °C por 7 min. Para amplificar el exón 4 las condiciones fueron las mismas, a excepción de la temperatura de alineamiento, que fue de 61°C. Las temperaturas de alineamiento fueron establecidas mediante ensayos de amplificación en un gradiente (Fig. 18).

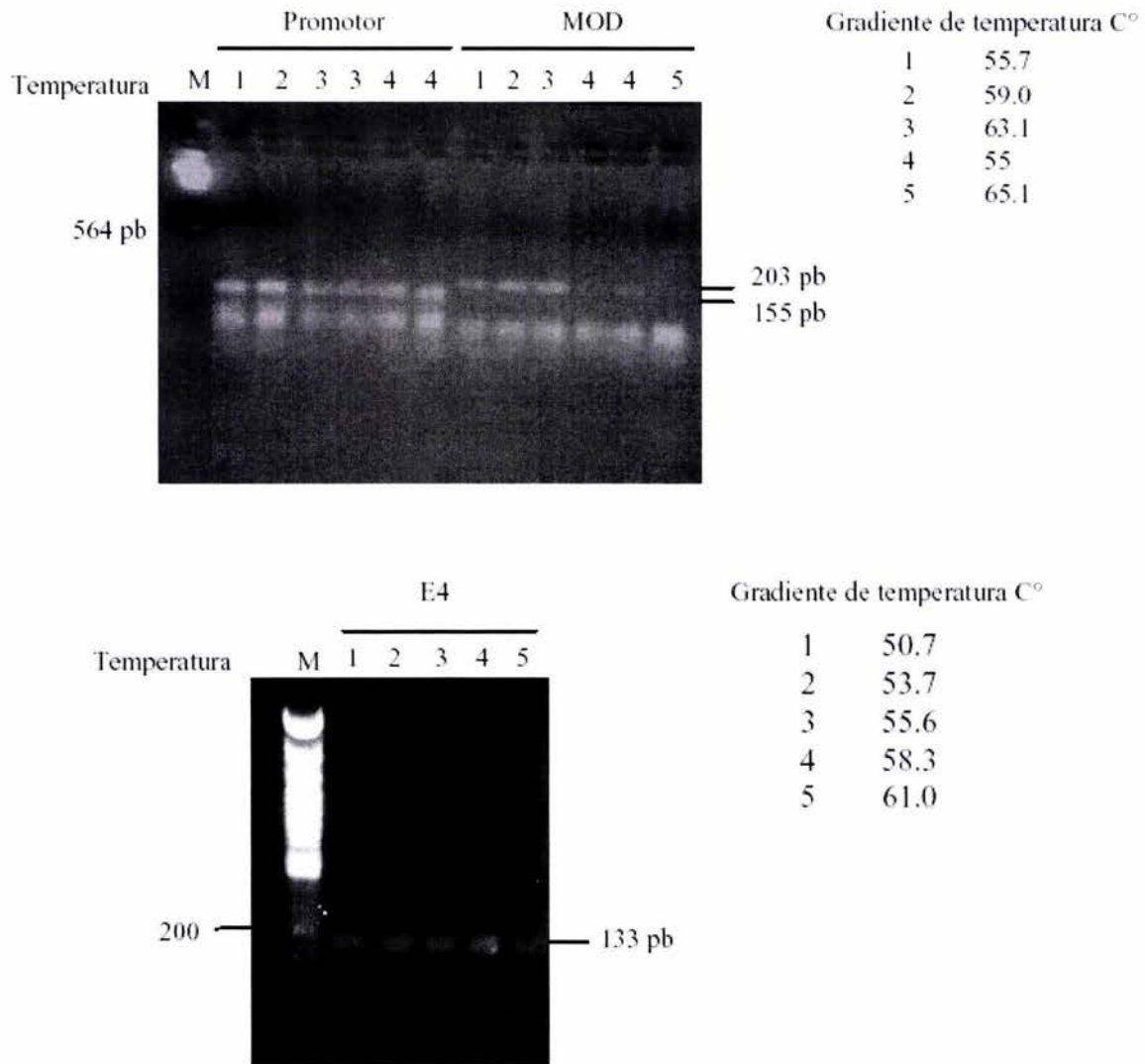


FIG. 18. Estandarización de condiciones de amplificación de la región del modulador (MOD), del promotor basal y el exón 4 (E4) del gen α -SG. Las amplificaciones se realizaron empleando como templado DNA genómico obtenido de la sonicación de cromatina aislada a partir de mioblastos C2C12. Se probaron las temperaturas indicadas en un gradiente. Se muestran los tamaños de los fragmentos obtenidos. Como marcador de tamaño (M) se empleó DNA del fago λ restringido con HindIII (panel superior), así como escalera de fragmentos de 100 pb (panel inferior).

Las reacciones de PCR fueron corridas en geles de acrilamida al 10%, preparado como se describe en ensayos de movilidad electroforética, ajustando los volúmenes de acrilamida (40%) y H₂O. En los mismos geles se corrieron alícuotas de escalera de 100 pb (Invitrogen), marcadas con [γ -³²P]ATP. Dicho marcaje se realizó de la misma forma como se marcaron los oligonucleótidos, pero utilizando "Exchange buffer" (Invitrogen) y 4 μ l de polietilenglicol, agregando 7 μ l de la escalera (500 ng) y ajustando el volumen de H₂O. De la reacción de marcaje se cargó 1 μ l en el gel. Las muestras fueron corridas a 150 Vltts durante 2 hrs, los geles se secaron y fueron expuestos a placas autoradiográficas durante 12 hrs.

Co-inmunoprecipitación

Los extractos proteicos se obtuvieron como se describe en la sección de Western-blot. Se cosecharon células de cajas de cultivo de 15 cm de diámetro a una confluencia de crecimiento cercana al 100%. Las células fueron lisadas en 100 μ l de RIPA. El extracto obtenido se dividió en cuatro tubos Eppendorf para cada inmunoprecipitación. Se agregó 1 μ g de anticuerpo anti-MyoD, TFIID, TFIIB y c-myc, respectivamente y los tubos se incubaron a 4°C durante toda la noche en una rueda giratoria. Se agregaron 20 μ l de perlitas "Protein A/G PLUS-Agarose" (Santa Cruz Biotechnology) a cada tubo se incubaron en las mismas condiciones durante 4 hrs. Posteriormente se centrifugó durante 3 min a 3 krpm en una microcentrífuga a 4°C con el fin de recuperar las perlitas. Después de desechar el sobrenadante, las perlitas se lavaron dos veces en 1.5 ml de RIPA y dos veces con solución amortiguadora PBS. Después de desechar el sobrenadante, las perlitas se resuspendieron en solución de cargado (ver sección de Western-Blot) y los tubos se incubaron a 95°C durante 5 min. Posteriormente se centrifugaron durante 3 min a 3krpm en una microcentrífuga y el sobrenadante (en donde se encuentran las proteínas inmunoprecipitadas) se cargó en un gel de acrilamida al 15%, el cual fue procesado como se describe en la sección de "Western blot".

Inmunofluorescencias

Se sembraron 50,000 células C2C12 en cubreobjetos de aproximadamente 1 cm² y 24 hrs después se procesaron o se indujeron a diferenciación. Los cubreobjetos fueron lavados en PBS. Posteriormente las células se permeabilizaron con 1% de Tritón X-100 durante 1 hr. Se realizaron dos lavados con PBS durante 10 min cada una. Se bloquearon sitios de unión inespecífica incubando en una solución de PBS con 5% de albúmina bovina durante 30 min. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario (1 en 200) durante toda la noche a 4°C en atmósfera humedecida. Se realizaron dos lavados en las mismas condiciones y se incubó con el anticuerpo secundario (1 en 200) durante 2 hr. Para la incubación de las muestras con los anticuerpos, estos, se diluyeron en una solución de albúmina bovina al 0.3% y Tritón X-100 al 0.1 %. Posteriormente se realizaron lavados. El proceso se repitió para incubar con el segundo anticuerpo primario. Finalmente las muestras fueron secadas (no por completo) y montadas en medio Vectashield (Vector) y analizadas utilizando un microscopio Axiovision (Zeiss) equipado con el sistema Apotome a un aumento de 100X. El medio de montaje utilizado contiene DAPI, que fue utilizado para evidenciar núcleos. Los anticuerpos primarios corresponden a los mencionados con anterioridad. Los anticuerpos secundarios están acoplados a FICT (anti-conejo) y a Cy3 (anti-ratón) (Zymed).

RESULTADOS

Actividad de la región promotora del gen α -SG en células C2C12

Mediante el tamizaje de una biblioteca de ratón se aislaron dos clonas que contienen la región 5' del gen α -SG. A partir de estas clonas se amplificó y clonó un fragmento de DNA de 2609 pb correspondiente al intrón 1 de dicho gen, donde presumiblemente se encuentra el promotor α -SG. Con el fin de saber si este fragmento posee actividad promotora, se generó la construcción pGlow-TOPO F1B2609, que contiene al gen reportero *GFP* río abajo del fragmento de DNA probado. Esta construcción se transfectó en forma transitoria en células C2C12, los cultivos transfectados fueron inducidos a diferenciación y observados mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 19). Como control positivo, se transfectó el vector pQBI25, que tiene el mismo reportero regulado por un promotor viral, y como control negativo, se empleó una construcción con el mismo reportero clonado río fue la secuencia codificante del gen *LacZ* (Fig. 19). Los cultivos fueron observados a los días 1, 3 y 7 después de inducir la diferenciación. Se detectó un aumento progresivo en la fluorescencia de las células transfectadas con la construcción pGlow-TOPO F1B2609 conforme avanzó el proceso de diferenciación, mientras que la fluorescencia de las transfectadas con pQBI25 disminuyó, por otra parte no se observó fluorescencia en el control negativo. Estos resultados confirman que la región clonada corresponde a la región promotora del gen α -SG y apoya datos previamente publicados que indican que el gen α -SG se expresa en mayor medida durante la diferenciación de células musculares (Wakabayashi-Takai et al, 2001; Noguchi et al, 2001). Estos resultados sugieren a su vez, que la expresión del gen α -SG sarcoglicano es regulada transcripcionalmente durante dicho proceso.

Con base en estos resultados se decidió realizar un estudio teórico para predecir la presencia de secuencias de unión a factores transcripcionales que pudieran ser responsables de la actividad observada.

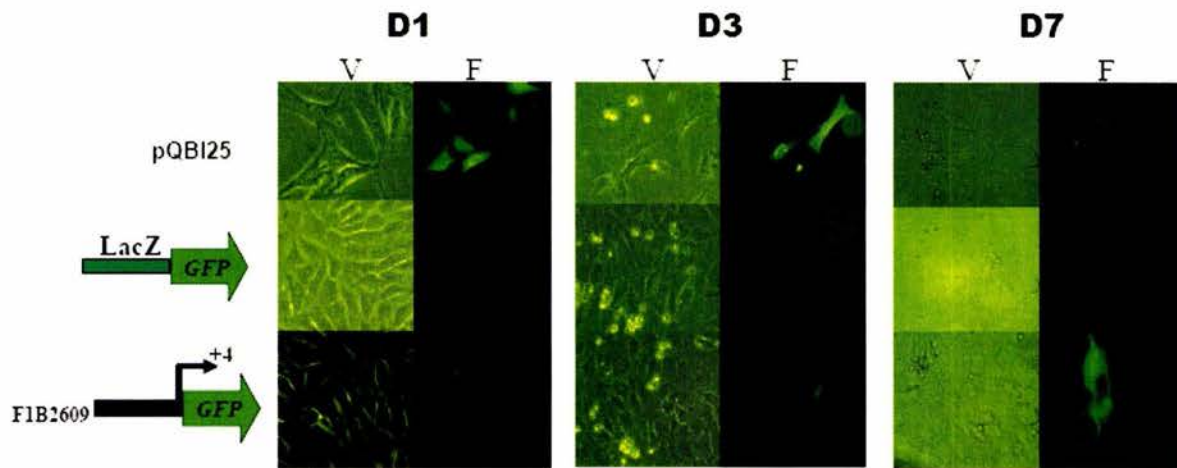


Fig. 19. El promotor α -SG es activado durante la diferenciación de células C2C12. Micrografías de células transfectadas con la construcción pGlow-TOPO F1B2609, que tiene al gen *GFP* regulado por el promotor α -SG. Como controles se transfectaron los vectores pQBI25, que expresa el gen *GFP* regulado por un promotor viral, y una construcción que contiene al gen *GFP* clonado río fue la secuencia codificante del gen *LacZ*. Se realizaron observaciones mediante microscopía de fluorescencia en los días 1, 3 y 7 (D1, D3 y D7) después de inducir los cultivos a diferenciación. V: luz visible. F: luz fluorescente.

Identificación de sitios putativos de unión a factores transcripcionales en el promotor α -SG

Con el fin de identificar sitios consenso de unión a factores de transcripción en la secuencia correspondiente al promotor α -SG se secuenció el fragmento de 2609 pb clonado previamente. La secuencia obtenida fue comparada con la base de datos del programa MatInspector 7.2.2 (Quandt et al, 1995). El programa identificó sitios de unión para factores transcripcionales como GATA, Oct, NFI, CREB, Sp1, MyoD y Mef2 entre otros (Fig. 20). Los factores transcripcionales mencionados regulan una gran variedad de promotores y particularmente relevante resulta el hecho de que el promotor α -SG presenta sitios putativos de unión a la familia de factores MyoD. Este hecho apoya el resultado presentado previamente que muestra que el promotor es regulado positivamente durante la diferenciación de células de origen muscular.

Análisis funcional del promotor α -SG

Con el fin de estudiar la función de los sitios identificados por el programa MatInspector en la secuencia del promotor α -SG, se generó una serie de construcciones en las que fueron deletadas regiones de dicho promotor en forma progresiva (Fig. 21). La actividad de estas construcciones fue probada mediante ensayos de transfección transitoria en células C2C12, y la actividad del gen reportero luciferasa fue medida en mioblastos y miotubos (Fig. 22). Se observó que la actividad de la construcción 1, que contiene el fragmento de 2609 pb del promotor α -SG completo fue 6 veces mayor en miotubos en comparación con mioblastos (Fig. 22). Este dato apoya resultados presentados con anterioridad que muestran que el promotor es más activo en miotubos (Fig. 19), confirmando que el promotor es estimulado durante el proceso de diferenciación muscular. Por otra parte, observamos que las construcciones 1-12 fueron más activas en miotubos, mientras que en particular, la actividad de la construcción 13 fue muy similar en ambos estadios de diferenciación, lo que sugiere que la región encargada de mediar la estimulación del promotor durante la diferenciación es eliminada en dicha construcción. Cuando se deletó un fragmento de 188 pb del extremo 5' de la construcción 6 que incluye 2 sitios de unión para el factor Sp1 y un sitio para el factor NFI (construcción 7), se observó un incremento notable en la actividad de luciferasa en miotubos (Fig. 22). Este hecho sugiere que la región deletada corresponde a un elemento de regulación positiva. En contraste, al deletar 182 pb de la construcción 5 que incluye dos cajas E (E-box1 y E-box2), un sitio de unión a NFI y uno para el factor general Sp1, se observó un incremento de dos veces en la actividad del reportero en la construcción 6 con respecto a la observada en la construcción 5 (Fig. 22). Este hallazgo sugiere que el fragmento deletado corresponde a una región de regulación negativa.

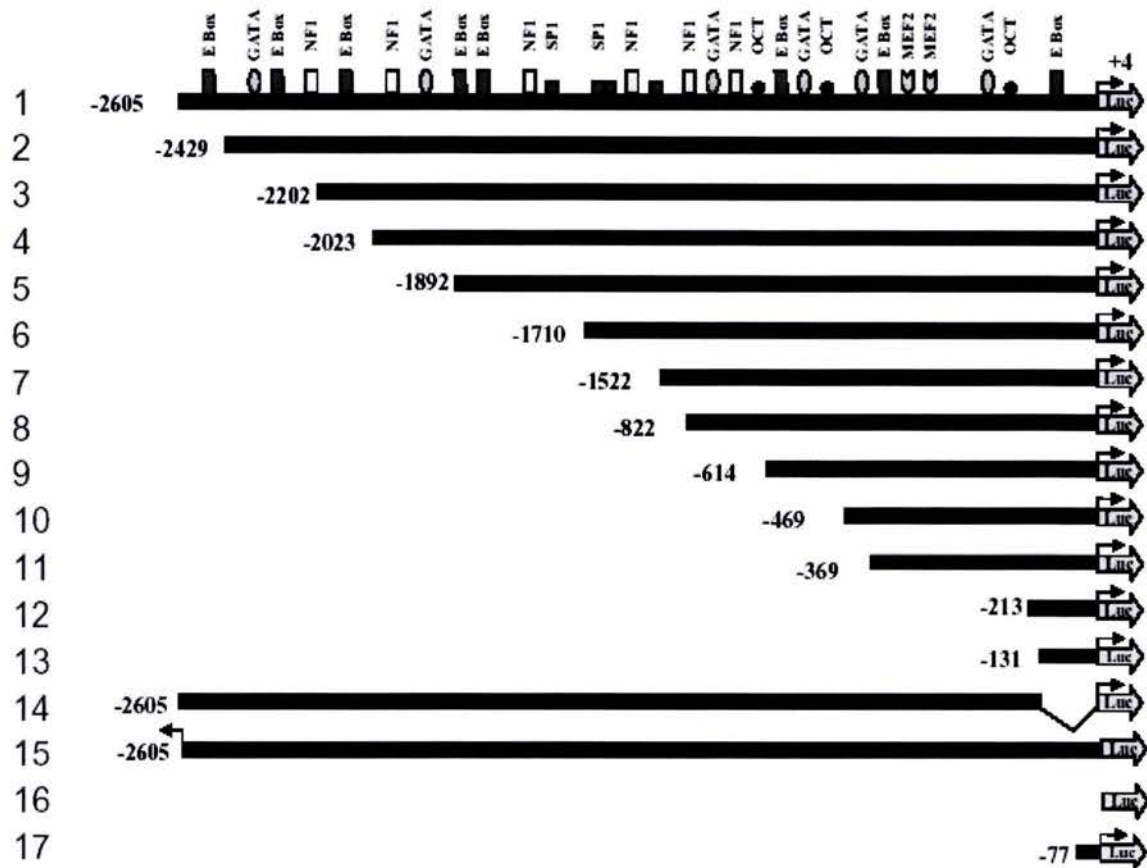


Fig. 21. **Generación de construcciones con deleciones progresivas del promotor α -SG.** El número de cada construcción se muestra a la izquierda. Se muestran algunos de los sitios de unión a factores transcripcionales identificados en la secuencia del promotor. Se señalan los nucleótidos abarcados por cada construcción con respecto al sitio de inicio de la transcripción (flecha) del gen luciferasa (*LUC*). La construcción 14 posee una deleción del promotor basal α -SG. La construcción 15 posee el promotor completo del gen α -SG en dirección 3'-5'. La construcción 16 corresponde al vector pGL3-Basic. La construcción 17 corresponde a un fragmento de 81 pb carece de cajas E y que incluye al promotor basal α -SG.

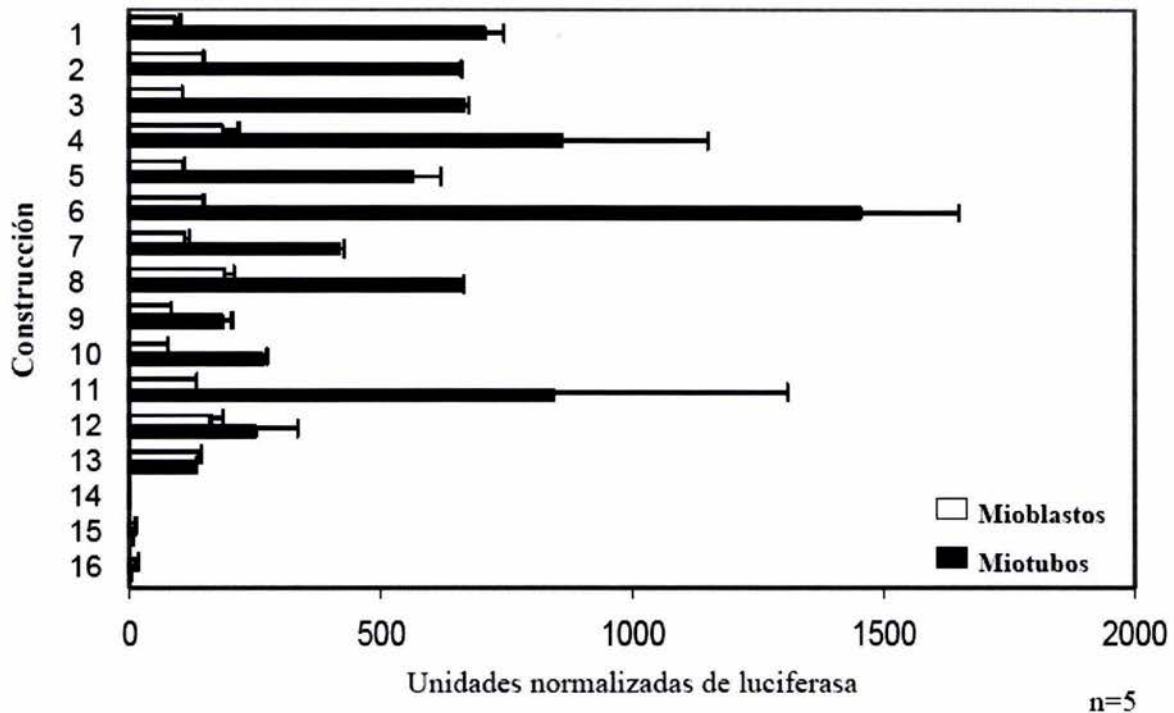


Fig. 22. **Actividad de Luciferasa de construcciones del promotor α -SG en mioblastos y miotubos C2C12.** 1 μ g de cada construcción fue transfectado, y su actividad se midió en mioblastos (barras blancas) y miotubos (barras negras). La actividad del gen reportero se muestra en unidades normalizadas de luciferasa. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se muestran las barras del error estándar en este y en los experimentos subsecuentes. En este experimento no fue incluida la construcción 17.

Análisis del efecto de los factores NFI sobre la actividad del promotor α -SG durante la diferenciación de células C2C12.

El análisis de la secuencia del promotor α -SG reveló la presencia de sitios de unión a factores transcripcionales de la familia NFI, lo que sugiere que dichos factores podrían reconocer y afectar funcionalmente al promotor en estudio. Con el fin de probar dicha hipótesis, se realizaron ensayos de co-transfección de la construcción 1, que contiene 2.6 kb del promotor α -SG con plásmidos que codifican para los factores NFI-A1.1, NFI-B2, NFI-C2 y NFI-X2. La nomenclatura de estas formas de los factores NFI corresponde a las proteínas de ratón. La actividad del gen reportero luciferasa se midió en mioblastos y miotubos. Como resultado se observó que los factores NFI-A1.1 y NFI-B2 tuvieron un discreto efecto positivo sobre la expresión del reportero en mioblastos, mientras que los factores NFI-C2 y NFI-X2 actuaron como reguladores negativos del promotor α -

SG, ocasionando una disminución en la actividad del reportero. En miotubos, se observó que todos los factores NFI actuaron como reguladores positivos del promotor (Fig. 23). Estos resultados sugieren que los factores NFI regulan diferencialmente la actividad del promotor α -SG en forma dependiente del estado de diferenciación de las células transfectadas. Debido a que existen evidencias que sugieren la relevancia de la regulación negativa en la expresión de los genes sarcoglicano en la fisiología muscular, se decidió identificar el sitio de respuesta al factor NFI-C2, que afecta negativamente la actividad del promotor α -SG en forma más evidente que los otros factores de la familia NFI. Para ello se realizaron ensayos de co-transfección de las construcciones 1, 3, 5, 6, 8 y 9, que corresponden a fragmentos deletados del promotor α -SG, en las que fueron eliminados selectivamente los sitios de unión a factores de la familia NFI identificados en dicho promotor. Se observó que la capacidad de NFI-C2 de regular negativamente al promotor α -SG se pierde en las construcciones 8 y 9, en cuyas secuencias fueron eliminados los sitios de unión a los factores NFI denominados 1NFI, 2NFI y 3NFI (Fig. 24A; construcciones 5 y 6). El hecho de que el efecto del factor NFI-C2 se pierda en la construcción 8, indica que la secuencia de respuesta a dicho factor corresponde al sitio 1NFI. Con el fin de confirmar este resultado, se introdujeron mutaciones puntuales en dicho sitio en la construcción 6. La construcción resultante se co-transfectó con el cDNA de NFI-C2, y la actividad del reportero se midió en mioblastos y miotubos C2C12. Como resultado se observó que la mutación del sitio 1NFI causa un aumento en la actividad de luciferasa, además de abatir el efecto negativo de NFI-C2 sobre la región del promotor α -SG clonada en la construcción 6 (Fig. 24B). Este resultado confirma el hecho de que el efecto negativo de NFI-C2 sobre el promotor α -SG se realiza a través del sitio llamado 1NFI. Como un acercamiento a la probable función del factor NFI-C2 en la regulación del promotor α -SG en el contexto de la cromatina de células C2C12, se realizó un análisis de inmunoprecipitación de cromatina empleando un anticuerpo anti NFI (Santa Cruz Biotechnology). Empleando como templado la cromatina inmunoprecipitada se analizó una secuencia del promotor α -SG que incluye al sitio 1NFI. Como resultado se observó un producto de

amplificación correspondiente al sitio 1NFI, mientras que al emplear cromatina inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-myc (Santa Cruz Biotechnology) empleado como anticuerpo inespecífico, no se detectó dicho producto de amplificación. Así mismo, no se detectó amplificación de un fragmento del exón cuatro del gen α -SG al emplear cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-NFI. Tampoco se identificó dicho producto al utilizar cromatina inmunoprecipitada con el anticuerpo inespecífico (Fig. 25). En conjunto los resultados muestran que la actividad del factor NFI-C2 sobre el promotor α -SG se realiza a través del sitio denominado 1NFI, y que dicho sitio es contactado por el factor NFI-C2 en el contexto de la cromatina de células C2C12, lo que sugiere que NFI-C2 participa en la regulación del promotor en estudio *in vivo*.

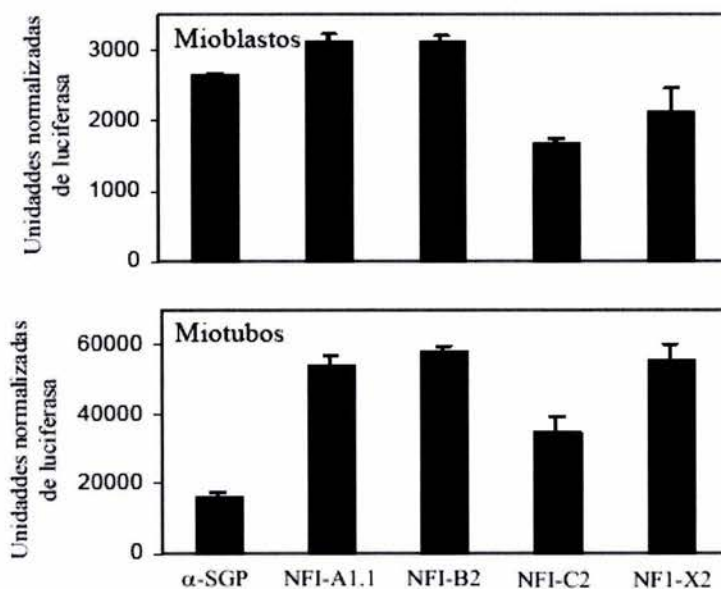


Fig. 23. **Actividad de los factores transcripcionales NFI sobre el promotor α -SG.** Se transfectaron células C2C12 con la construcción 1, que contiene al promotor α -SG (α -SGP), que fue co-transfectada con vectores que codifican para los factores NFI-A1.1, NFI-B2, NFI-C2 y NFI-X2, respectivamente. Los datos se representan como unidades normalizadas de luciferasa. Los datos muestran un experimento representativo de tres realizados por duplicado. Se muestran las barras de error estándar.

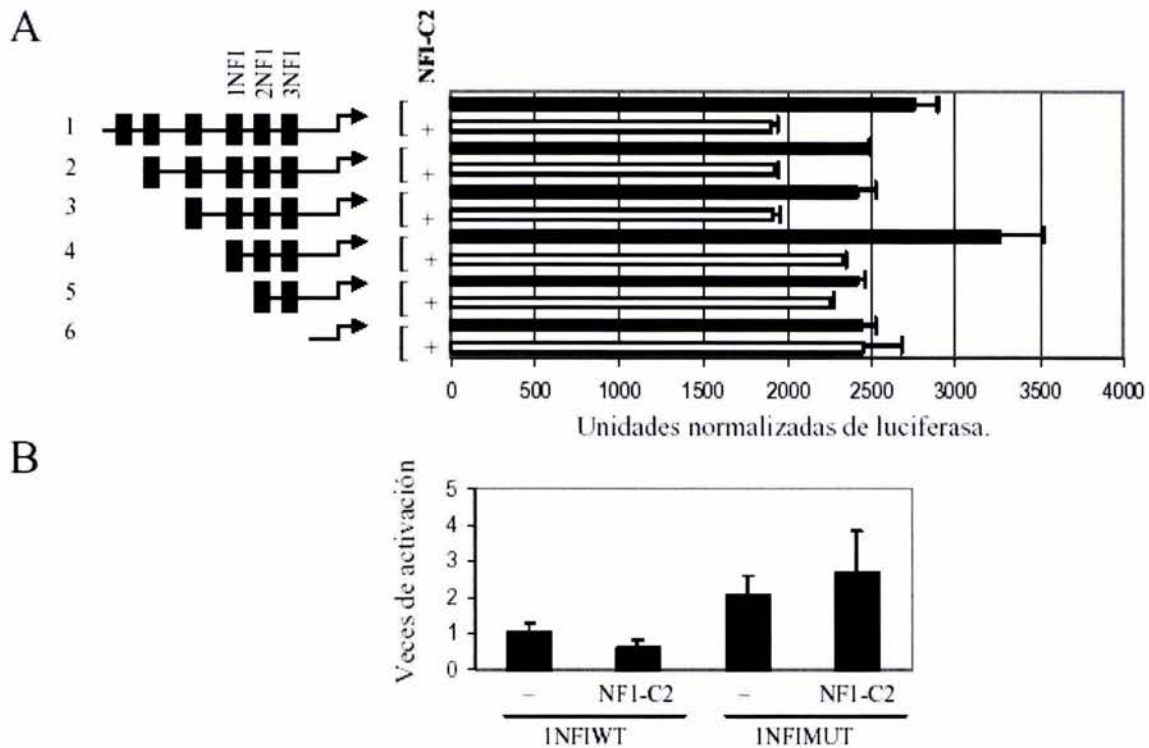


Fig. 24. **NFI-C2 regula al promotor α -SG a través del sitio 1NFI.** (A) se co-transfectaron las construcciones, 1, 3, 5, 6, 8 y 9, que corresponden a deleciones del promotor α -SG con el cDNA del factor NFI-C2. La actividad de luciferasa se midió en mioblastos. Los sitios 1NFI, 2NFI y 3NFI se muestran como cajas negras sobre los esquemas de las construcciones transfectadas. (B) Se co-transfectaron las construcciones 1NFIWT, que corresponde a la construcción 5 y 1NFI-MUT, que corresponde a la construcción 5 con el sitio 1NFI mutado, con el cDNA de NFI-C2 o con el vector vacío (-). Los valores se muestran como veces de activación sobre la actividad de la construcción 1 (α -SG). Los valores representan el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

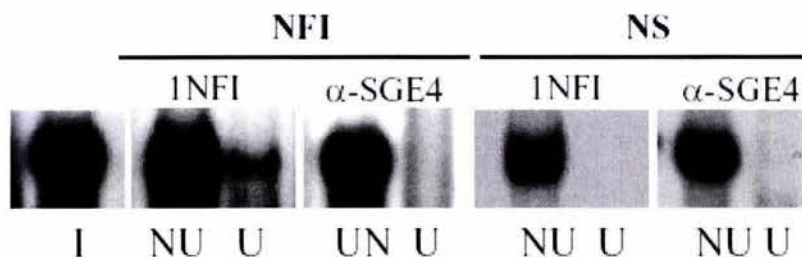


Fig. 25. **NFI-C2 se une al sitio 1NFI *in vivo*.** Se empleó cromatina inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-NFI (NFI), así como uno inespecífico (NS) como templado para amplificar una región que incluye al sitio 1NFI, así como una región del exón 4 del gen α -SG. Se emplearon las fracciones de cromatina unida (U) y no unida (NU) al anticuerpo empleado en la inmunoprecipitación. (I) "input" (corresponde a cromatina sonicada sin inmunoprecipitar empleada como control positivo). Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

Análisis de la actividad de E-box1 y E-box2 sobre el promotor SV40 y el promotor basal α -SG

Los experimentos anteriores muestran que los factores NFI-X2 y en particular el factor NFI-C2 actúan como reguladores negativos del promotor α -SG en mioblastos. Sin embargo, la región de regulación negativa identificada mediante el análisis de la actividad de construcciones con deleciones del promotor α -SG, incluye además sitios de unión a los factores Sp1 y MyoD, o cajas E (E-box) (Figs. 21 y 22). Las secuencias E-box, son sitios de reconocimiento para la familia de factores transcripcionales MyoD, que generalmente actúan como activadores de promotores y/o enhancers músculo-específicos (Xiao et al., 2003; Chang et al, 2004). En forma interesante, el elemento de regulación negativa identificado (Fig. 22), contiene dos sitios de unión al factor MyoD, llamados E-box1 y E-box2 (Fig. 20), que afectan la actividad del promotor α -SG en mioblastos y miotubos C2C12 (Fig. 22). Este hecho sugiere la interesante posibilidad de que estas secuencias participan en la actividad negativa identificada mediante el análisis funcional. Con el fin de probar la influencia de las secuencias E-box1 y E-box2 sobre la actividad del promotor heterólogo de SV40 en mioblastos y miotubos C2C12, se transfectó en forma transitoria la construcción pGL3-Promoter-MOD, que contiene el gen reportero luciferasa controlado por el promotor SV40 y las secuencias E-box1 y E-box2 (Fig. 26). Se comparó la actividad de esta construcción contra la del plásmido pGL3-Promoter que contiene únicamente al promotor SV40 regulando el gen luciferasa en ambos estadios de diferenciación. No se observó ningún efecto de E-box1 y E-box2 sobre la actividad del promotor SV40, aún en presencia de dos copias de la secuencia que incluye a dichos sitios. La ausencia de actividad de dichas secuencias sobre el promotor viral sugiere que su actividad puede ejercerse en forma promotor-específica. Para probar esta hipótesis, se estudió la actividad de E-box1 y E-box2 sobre el promotor basal α -SG. Para ello, las construcciones pGL3CP, que contiene 81 pb que incluyen al promotor basal α -SG, y la construcción pGL3CP-MOD, que contiene además las secuencias E-box1 y E-box2 clonadas río arriba del promotor basal (Fig. 27), fueron transfectadas, y su actividad se analizó en mioblastos y miotubos. Se observó que el elemento que

contiene las secuencias E-box1 y E-box2 afecta negativamente al promotor basal α -SG, reduciendo la actividad del gen reportero a 0.4 y 0.65 veces la actividad del promotor basal en mioblastos y miotubos, respectivamente. Estos resultados muestran que E-box1 y E-box2 constituyen un elemento de regulación negativa que actúa específicamente sobre el promotor α -SG, pues no afectó la actividad del promotor SV40 (Fig. 26), y que su efecto persiste durante la diferenciación de células C2C12. A su vez, Estos hechos sugieren que E-box1 y E-box2 juegan un papel importante en la regulación negativa del promotor α -SG durante el proceso de diferenciación miogénica..

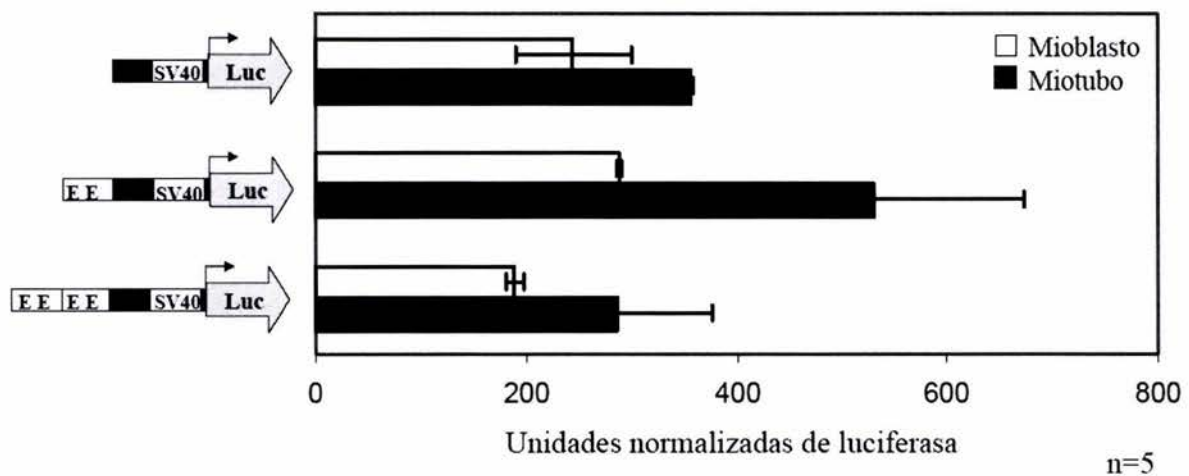


Fig. 26. **Análisis funcional de la región -1393/-1428 sobre el promotor SV40.** Se transfectaron las construcciones pGL3-Promoter, que contiene al gen luciferasa (*LUC*) regulado por el promotor SV40, y pGL3-Promoter-MOD, que además incluye los sitios E-box1 y E-box2 (E) en una y dos copias. La actividad de dichas construcciones se determinó en mioblastos y miotubos C2C12. Los datos representan el promedio de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

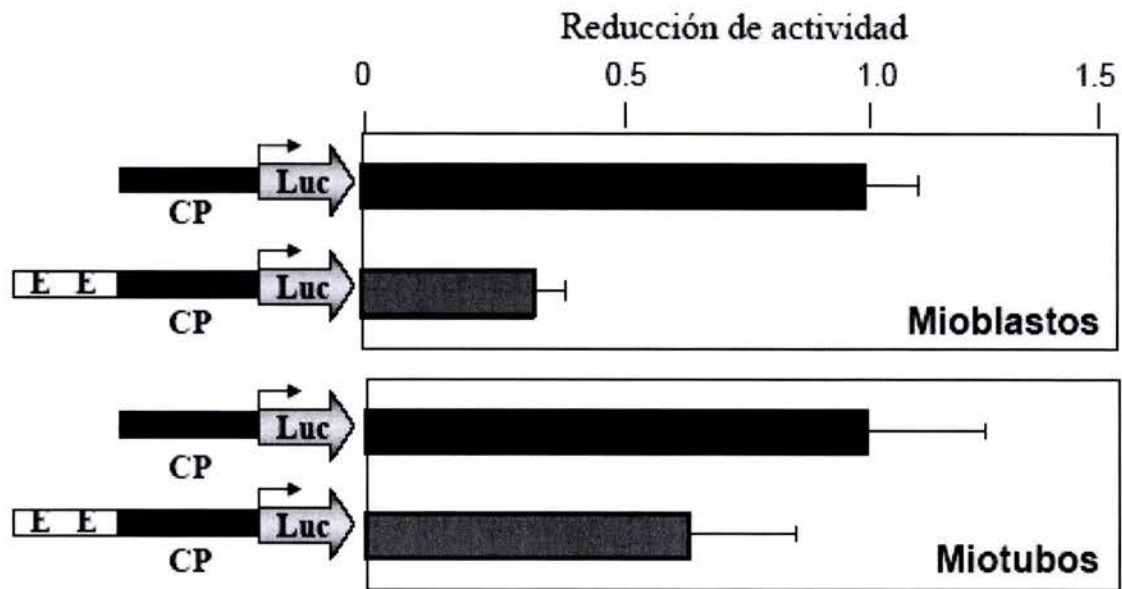


Fig. 27. **Actividad de las secuencias E-box1 y Ebox-2 sobre el promotor basal α -SG.** Se transfectaron las construcciones pGL3CP, que contiene al promotor basal α -SG (CP, construcción 17), y pGL3CP-MOD, que contiene dicho promotor y los sitios E-box1 y E-box2 (E1 y E2). La actividad del reportero se determinó en mioblastos y miotubos C2C12. Se muestra la reducción de la actividad de las construcciones con respecto a la construcción pGL3CP. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los datos se analizaron mediante T de Student. Los datos de mioblastos fueron significativos, sin embargo en miotubos no lo fueron. A pesar de ello, la reproducibilidad de dato apoya el efecto negativo de las secuencias E-box1 y E-box2 sobre el promotor α -SG.

Modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG a través de E-box1 y E-box2

MyoD es el único MRF que afecta negativamente la actividad de promotores musculares, específicamente en mioblastos (Mal y Harter, 2003). Debido a que se identificó un elemento regulador negativo compuesto por secuencias E-box, que afecta la expresión del promotor α -SG en mioblastos y miotubos, se generó la hipótesis de que probablemente MyoD sería responsable de mediar dicho efecto. Esta hipótesis fue probada mediante ensayos de sobre expresión con cantidades crecientes del cDNA del factor MyoD, en los que se co-transfectaron construcciones pGL3CP, que incluye al promotor basal α -SG, y pGL3CP-MOD, que contiene además al elemento de regulación negativo (E-box1 y E-box2) (Fig. 28). Como control se co-transfectó un plásmido que codifica el factor miogenina. Inesperadamente, el promotor basal α -SG fue fuertemente *trans*-activado (38 veces) por MyoD, y no por miogenina. Es importante señalar que mediante el análisis de la secuencia correspondiente al promotor basal con el programa MatInspector 7.2.2, no se identificaron sitios de unión a factores transcripcionales de la familia MyoD. Estos resultados sugieren que el efecto estimulador de MyoD sobre el promotor es independiente de la unión al DNA debido a que dicha región reguladora carece de sitios de unión a este factor, y además, que dicho efecto es específico de MyoD, pues miogenina no afecta al promotor basal (Fig. 28). Cuando se co-transfectó el promotor basal con el elemento de regulación negativa (E-box1 y E-box2), utilizando el cDNA de MyoD, también se observó que el promotor es *trans*-activado, sin embargo, la actividad solo aumentó entre 8 a 15 veces en mioblastos y entre 20 y 25 veces en miotubos, lo cual contrasta con el aumento en la actividad del reportero inducido por MyoD sobre el promotor basal solo (38 veces) (Fig. 28). Los resultados sugieren que el elemento de regulación negativa (E-box1 y E-box2) actúa mediante la modulación del efecto positivo de MyoD sobre el promotor basal α -SG. Debido a que este elemento funciona como un modulador de la actividad de *trans*-activación de MyoD, se decidió llamarlo elemento modulador.

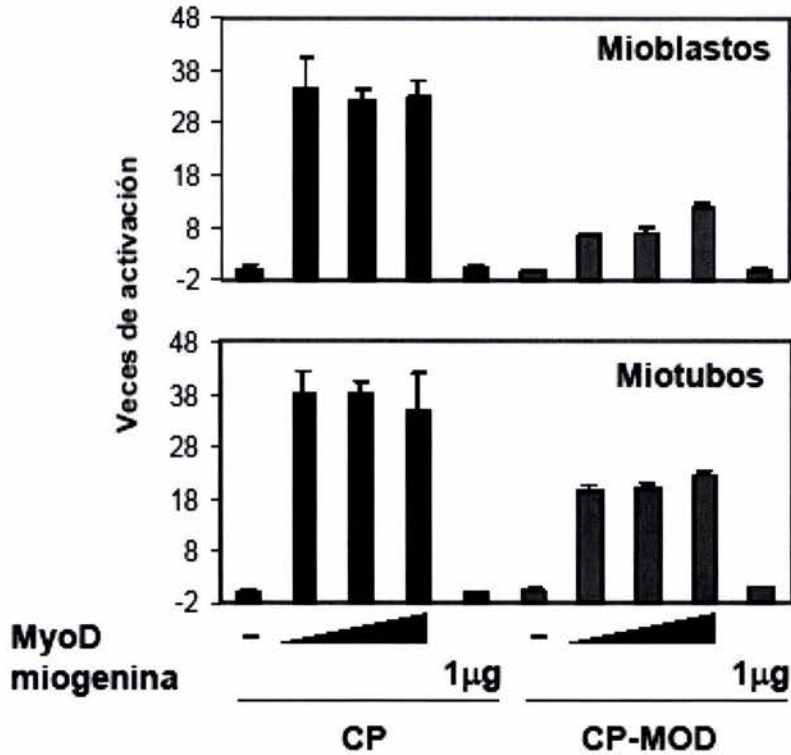


Fig. 28. Efecto de E-box1 y E-box2 sobre el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG. Se co-transfectó el cDNA de MyoD en cantidades crecientes (50 ng, 100 ng, y 200 ng) con las construcciones pGL3CP, que contiene al promotor basal (CP, construcción 17), y pGL3CP-MOD, que incluye los sitios E-box1 y E-box2 (MOD). Como control se co-transfectó el cDNA de miogenina. Se muestran las veces de activación con respecto a la actividad de la construcción pGL3CP. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Participación individual de E-box1 y E-box2 en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG

Los experimentos de sobre expresión muestran que el elemento modulador regula negativamente el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG. Esto sugiere que las secuencias E-box no siempre estimulan positivamente la actividad de promotores musculares. Para probar el papel de E-box1 y E-box2 en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG se co-transfectó el cDNA de MyoD con las construcciones pGL3CP, que contiene al promotor basal α -SG, pGL3CP-MOD que incluye al promotor basal α -SG y el modulador, y las construcciones CP+E1MUT, CP+E2MUT y CP+E1-2MUT que incluyen dicho promotor más el modulador con mutaciones puntuales en los

sitios E-box1, E-box2 y E-box1 y E-box2, respectivamente (Fig. 29). En forma consistente con los experimentos previos, se observó que el promotor basal es *trans*-activado por MyoD, y en menor medida cuando el elemento modulador está localizado río arriba del promotor. Cuando la secuencia E-box1 está mutada, el efecto de modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD se abate en mioblastos, mientras que en miotubos, el efecto persiste. La actividad del promotor se incrementó más de dos veces en ausencia de sobre expresión de MyoD. Interesantemente, cuando la secuencia E-box2 se encuentra mutada, la modulación del potencial de *trans*-activación se abatió en ambos estadios de diferenciación. Dicha mutación provocó un incremento de 5 veces en la actividad del promotor (Fig. 29). De manera consistente con los resultados anteriores, la mutación de ambas secuencias E-box abatió completamente la modulación del potencial de *trans*-activación. Estos resultados demuestran claramente que E-box2 es suficiente y necesario en la mediación de la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal del gen α -SG en miotubos, mientras que E-box1 actúa solamente en mioblastos, pues la mutación de este elemento no abate el efecto de modulación en miotubos. En mioblastos, ambas secuencias parecen ser relevantes, puesto que mutaciones que alteran sus secuencias abatieron el efecto de modulación. Estos hechos implican que E-box1 y E-box2 juegan papeles diferentes en el efecto de modulación dependiendo del estadio de diferenciación de las células C2C12. Estas observaciones sugieren que E-box1 y E-box2, en ausencia de cada una de ellas, estimulan positivamente la actividad del promotor basal, y confirman claramente la participación de E-box1 y E-box2 en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG.

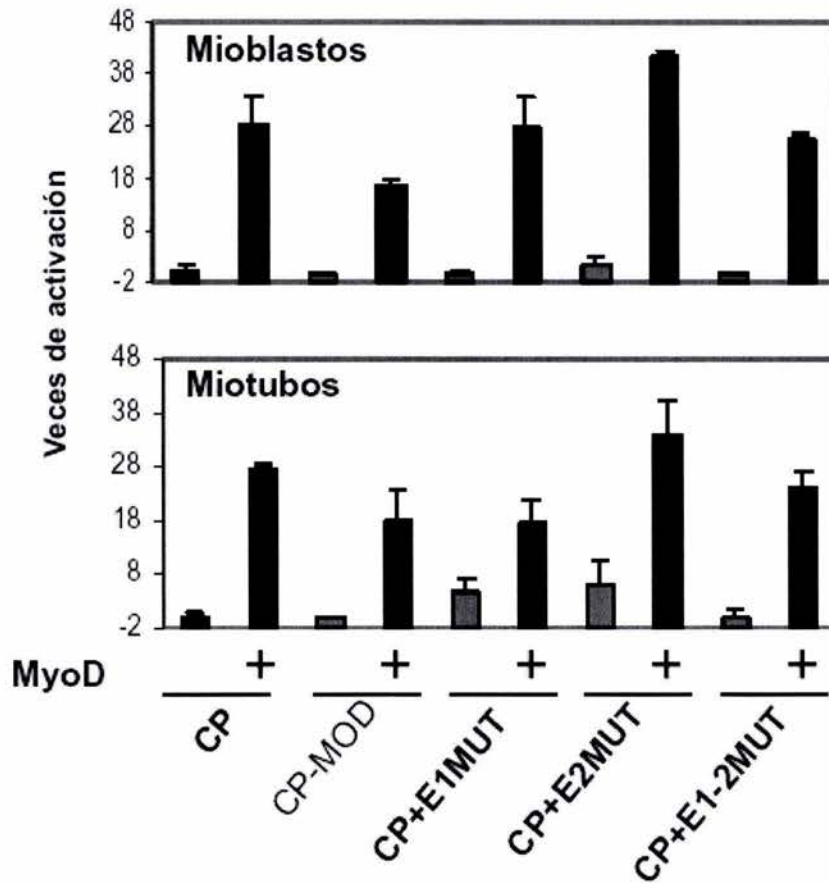


Fig. 29. Efecto de la mutación de los sitios E-box1 y E-box2 en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG. Se co-transfectó el cDNA de MyoD con las construcciones pGL3CP, que contiene al promotor basal α -SG (construcción 17), pGL3CP-MOD, que incluyen al promotor basal más el modulador, y las construcciones CP+E1MUT, CP+E2MUT y CP+E1-2MUT que incluyen dicho promotor más el modulador con mutaciones puntuales en los sitios E-box1, E-box2 y E-box1 y E-box2, respectivamente. La actividad fue estimada en mioblastos y miotubos. Se muestran las veces de activación con respecto a la construcción pGL3CP. Los datos representan el promedio de tres experimentos realizados por duplicado.

Interacción de MyoD con el modulador en extractos nucleares de mioblastos y miotubos C2C12

Debido a que observamos que E-box1 y E-box2 participan en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG (Figs. 28 y 29), probamos la capacidad de dicho factor para interactuar *in vitro* con la secuencia correspondiente E-box1 y E-box2, en presencia de extractos nucleares de mioblastos y miotubos C2C12 (Fig. 30). Para ello, se realizaron ensayos de retardo y súper-retardo empleando como sonda un par de oligonucleótidos complementarios correspondientes al modulador. Para el ensayo de súper-retardo, los extractos proteínicos se incubaron previamente con un anticuerpo anti-MyoD. Al incubar extractos de mioblastos y miotubos se detectaron bandas con una migración retardada correspondientes a complejos de DNA-proteína. Es importante señalar que se detectaron bandas con migración diferente en extractos de mioblastos con respecto a miotubos, lo que sugiere que existen distintas interacciones diferenciales dependientes del estado de diferenciación miogénica con el modulador. Al incubar los extractos nucleares de células en ambos estadios de diferenciación con el anticuerpo anti-MyoD, y resolver los complejos, se detectaron bandas súper-retardadas, lo que indica que el factor MyoD forma parte de los complejos revelados, y por ende que interactúa con el modulador. Al competir las uniones utilizando una sonda no marcada, no se evidenciaron los complejos, lo que indica que las interacciones son secuencia-específicas. El hecho de que MyoD sea capaz de interactuar con el modulador en presencia de extractos de mioblastos como en miotubos, correlaciona con los resultados que muestran que el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG es modulado por E-box1 y E-box-2 en ambos estadios de diferenciación.



Fig. 30. **Interacción de MyoD con el modulador en extractos nucleares de mioblastos y miotubos C2C12.** Se emplearon extractos nucleares (EN) de mioblastos (MB) y miotubos (MT). Como sonda se empleó la secuencia correspondiente al modulador. Se identificaron interacciones del modulador con proteínas presentes en los extractos (flechas). Al incubar los extractos nucleares con un anticuerpo anti-MyoD (a-MyoD) se identificaron bandas super-retardadas (SR). Como competidor (Comp) se utilizó la sonda sin marcar.

Interacción de MyoD y miogenina con el modulador y con E-box1 y E-box2 individualmente en extractos de transcripción/traducción *in vitro*

Para confirmar la unión de MyoD al modulador, y en particular a E-box1 (E-1) y E-box2 (E-2), así como saber si otro factor miogénico como miogenina se une a dichas secuencias, se utilizaron extractos de transcripción/traducción *in vitro* (TNT) en ensayos de movilidad electroforética (Figs. 31 y 32). La incubación de la sonda correspondiente a la secuencia del modulador (MOD) con extractos de MyoD y miogenina reveló la formación de complejos retardados específicos (Fig. 31), lo que indica que ambos factores interactúan *in vitro* con la secuencia del modulador. Al emplear la sonda sin marcar en ensayos de competencia, se

impidió la formación de los complejos. Por otra parte, al incubar las sondas que incluyen las secuencias correspondientes a E-1 y E-2 con extractos TNT sin cDNA se detectaron dos y una banda retardada, respectivamente, que corresponden a uniones de proteínas ajenas a MyoD y miogenina con el modulador (Fig. 32). Al incubar extractos TNT con MyoD y miogenina con la sonda E-1, se observaron únicamente las bandas identificadas con el extracto sin cDNA, lo que indica que E-1 es incapaz de unirse *in vitro* a MyoD y miogenina. Al competir las reacciones con la sonda sin marcar, no se detectaron bandas, y al incubar con una sonda con la secuencia E-1 mutada, las interacciones no se abaten, lo que indica que las interacciones de las proteínas del extracto TNT sin DNAc son específicas para la secuencia de E-1. La incubación de la sonda E-2 con extractos TNT MyoD y miogenina produjo la formación de bandas específicas (Fig. 32). Las bandas formadas por la interacción de miogenina con E-2 presentaron un patrón de migración ligeramente más rápido que las correspondientes a la sonda E-box1 incubada con extractos sin cDNA. Los complejos se abatieron al competir las reacciones con la sonda sin marcar, mientras que al emplear como competidor la sonda E-box2 mutada, dichos complejos fueron detectados. Estos resultados muestran que E-box2 *in vitro* se une a MyoD y miogenina, mientras que E-box1 es incapaz de unirse a cualquiera de ellos.

En conjunto, los resultados presentados muestran que MyoD se une al elemento modulador en el contexto de mioblastos y miotubos C2C12 (Fig. 30). Que MyoD y miogenina interaccionan con la secuencia del modulador (Fig. 31) y que individualmente, solo E-box2 se une *in vitro* a MyoD y miogenina (Fig. 32). Estos hallazgos son consistentes con las observaciones previas que muestran que E-box2 es suficiente para mediar el efecto de modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor α -SG en mioblastos y miotubos C2C12, y apoyan la función crítica de E-box2 en la regulación de este promotor.

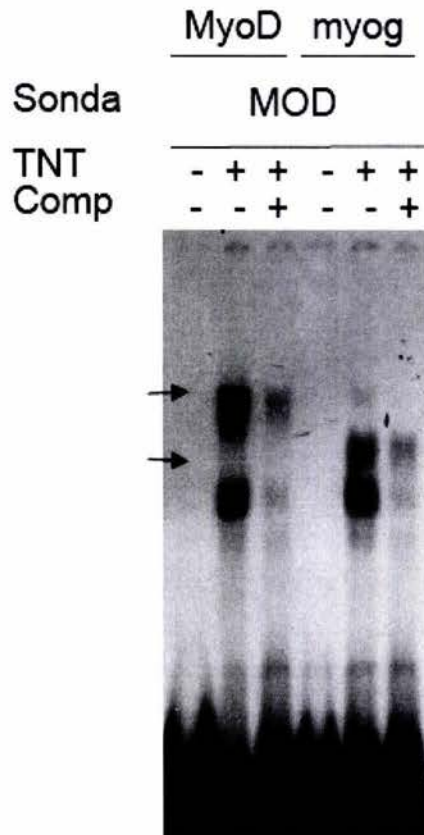


Fig. 31. **Interacción de MyoD y miogenina con el modulador α -SG.** Una sonda que incluye al modulador (MOD) se incubó con extractos de transcripción/traducción *in vitro* (TNT) con MyoD y miogenina (myog). Los complejos específicos formados se indican con flechas. Se realizaron competiciones de las interacciones empleando la sonda correspondiente al modulador sin marcar (comp). Este es un resultado representativo de al menos tres experimentos independientes.

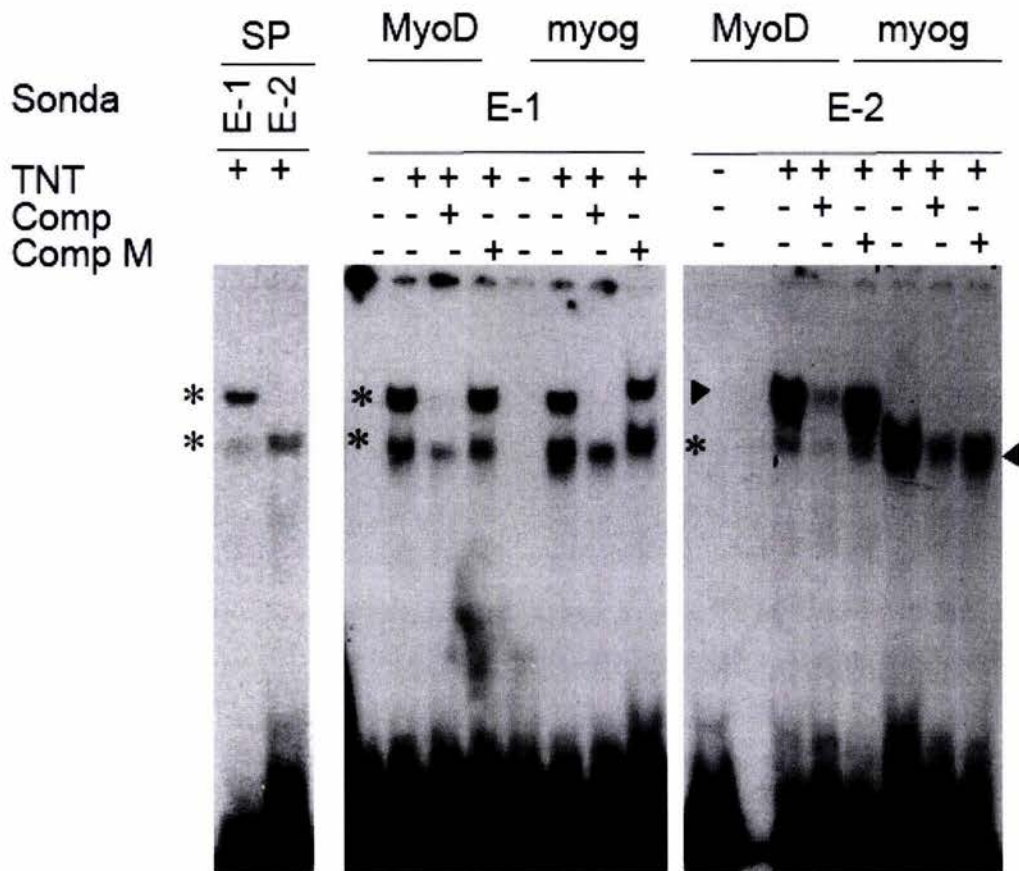


Fig. 32. **Interacción de MyoD y miogenina con los sitios E-box1 y E-box2.** Se realizaron ensayos de retardo utilizando sondas que incluyen los sitios E-box1 (E-1) y E-box2 (E-2), que se incubaron con extractos de transcripción/traducción *in vitro* (TNT) con MyoD y miogenina (myog). Se realizaron competiciones de las interacciones empleando las mismas sondas sin marcar (Comp) con mutaciones puntuales en los sitios E-1 y E-2 (CompM). Se obtuvieron resultados similares al menos en tres experimentos independientes.

Función de los nucleótidos conservados en ratón y humano, del sitio E-box2 en su interacción con MyoD y en el efecto modulador.

Los resultados presentados hasta el momento muestran que el elemento modulador, afecta negativamente la actividad del promotor basal α -SG y que en particular E-box2 participa en la modulación del potencial de *trans*-activación del factor MyoD. Con el fin de indagar sobre la posible relevancia del elemento modulador en una función conservada, se realizó un alineamiento de la secuencia de la región 5' del gen α -SG de ratón y humano con el fin de saber si este elemento regulador negativo se conserva en ambas especies (Fig. 33A). En forma interesante, se encontró que las secuencias E-box están conservadas y que en particular, E-box2 tienen un notable 100% de identidad. Además de la secuencia consenso, se identificaron dos grupos de nucleótidos conservados flanqueando dicho consenso. El elemento conservado GGCC se localiza hacia el extremo 5' de E-box2, y la secuencia CCC se identificó hacia el extremo 3'. Además, se observó que los nucleótidos centrales variables del consenso también se conservan en E-box2, mientras que en E-box1, no se encuentran conservados (Fig. 33A). Se ha demostrado en este trabajo que únicamente E-box2 es capaz de ser reconocido por MyoD y miogenina (Fig. 32), y que es necesario para la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG (Fig. 29). Debido a esto, se decidió analizar la contribución de los elementos conservados de E-box2 en el reconocimiento de dicha secuencia por el factor MyoD, así como en el efecto de modulación del mismo. Para ello, se realizaron ensayos de retardo utilizando extractos de MyoD de transcripción/traducción *in vitro* y como sondas, oligonucleótidos complementarios correspondientes a E-box2 con mutaciones en los elementos conservados (Fig. 33B). Se observó que la sustitución del elemento GGCC no afectó la interacción de MyoD por la sonda, mientras que la sustitución de la secuencia CC, correspondiente a los nucleótidos centrales del consenso de E-box2 afectó dicha interacción significativamente. Por otra parte, la mutación de las bases CCC, localizadas hacia 3' del consenso impidió la interacción de MyoD con la sonda. Las sondas con combinatorias de mutaciones fueron capaces de interactuar con MyoD, aunque con menor afinidad en comparación con la sonda

sin mutar. Estos resultados muestran que los nucleótidos centrales, pero sobre todo las bases CCC de la secuencia de E-box2, son críticas en la interacción de MyoD (Fig. 33B). Con el fin de representar gráficamente los resultados obtenidos en los ensayos de retardo descritos, se cuantificaron las bandas correspondientes a los retardos obtenidos mediante el programa ImageQuant. Los datos obtenidos se graficaron como % de intensidad, tomando como 100% el valor correspondiente al retardo revelado al emplear la sonda E-box2 sin competir. Los resultados obtenidos son muy relevantes, pues sugieren que los nucleótidos aledaños a las secuencias E-box2 son críticos en la afinidad del reconocimiento por factores transcripcionales de la familia bHLH. Dichos resultados a su vez, sugieren que dichos nucleótidos desempeñan alguna función en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG. Con el fin de probar esta hipótesis se co-transfectó el cDNA de MyoD con las construcciones CP+E-1MUTGGCC, CP+E-1MUTCC y CP+E-1MUTCCC que contienen el modulador con la secuencia de E-box1 mutada, además de sustituciones de las secuencias de nucleótidos GGCC, CC y CCC del consenso E-box2. Además se transfectaron las construcciones pGL3CP, pGL3CP-MOD y CP+E1MUT, que contienen al promotor basal, con el promotor y el modulador, y el promotor con el sitio E-box1 del modulador mutado. La actividad del reportero se midió en miotubos (Fig. 33C), dado que únicamente en este estadio E-box1 funciona en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD. Se observó que la sustitución de los nucleótidos centrales, así como de los que flanquean el sitio E-box2 libera el efecto de modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG. Estos resultados confirman la importancia de E-box2 y en particular de los nucleótidos centrales y los que flanquean la secuencia correspondiente a este sitio en la modulación de la actividad del factor MyoD.

A

		E-box 1				E-box 2				
Ratón	CAGGT	CAGGT	GAGT	GGCC	CAGAG	CACCTG	TT	CCC	ACA	
	**	**	**	****	*	*	*****	***	*	
Humano	CACCC	CATCTG	CA	GGCC	A	A	CACCTG	TG	CCCTTA	

B

Sonda	—	X —	— X	— X	X — X	— X X	X — X X
Comp	- - + E1	- - + E1	- - + E1	- - + E1	- - + E1	- - + E1	- - + E1
TNT	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +	- + + +

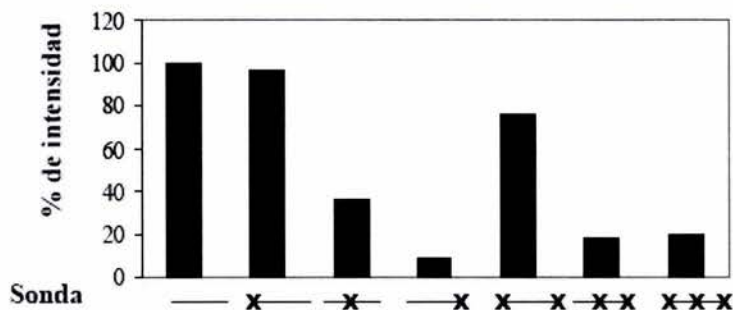


Fig. 33. **Participación de los nucleótidos centrales y flanqueadores conservados de E-box2 en la unión de MyoD y en la modulación de su potencial de *trans*-activación.** (A) Mediante alineamiento de las secuencias del extremo 5' del gen α -GS de ratón y humano se observó que el modulador se conserva en ambas especies, y que en particular E-box2 se conserva con 100% de identidad. Así mismo, se observó que los nucleótidos centrales, así como los que flanquean a E-box2, también se conservan completamente. Dichos grupos de nucleótidos se indican en recuadros. * indica los nucleótidos conservados. Se introdujeron "gaps" en la secuencia de humano con el fin de obtener el mejor alineamiento. (B) Ensayos de retardo en los que se emplearon sondas que incluyen a E-box2 (línea), y E-box2 con mutaciones en los grupos de nucleótidos conservados. Las mutaciones se muestran como X en las posiciones correspondientes. Dichas sondas se incubaron con extractos de transcripción/traducción *in vitro* (TNT) con MyoD. Se realizaron ensayos de competición de las interacciones con las sondas correspondientes sin marcar (Comp), y con la sonda correspondiente al sitio E-box1 (E1). Se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a los retardos sin competir. Los valores se graficaron como % de intensidad con respecto al valor obtenido al cuantificar el retardo formado por la sonda E-box2.

C

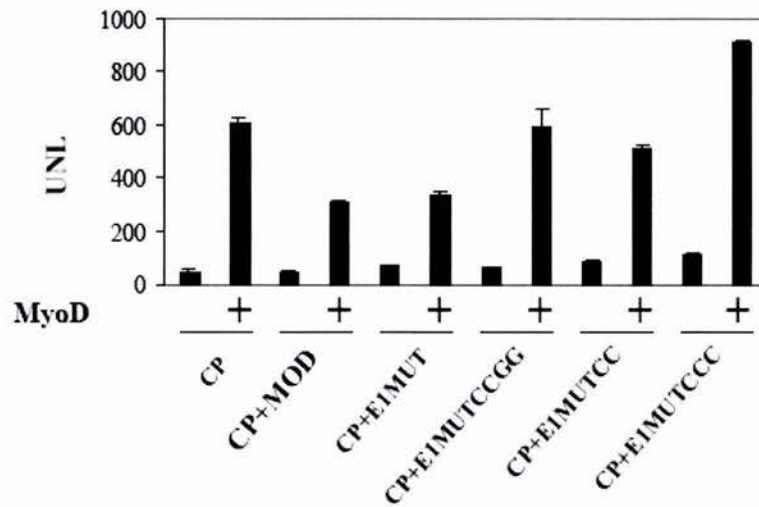


Fig. 33. (C) Se transfectaron las construcciones CP+E-1MUTGGCC, CP+E-1MUTCC y CP+E-1MUTCCC que contienen al promotor basal α -SG (construcción 17), el modulador con la secuencia de E-box1 mutada, y sustituciones de las secuencias de nucleótidos GGCC, CC y CCC de E-box2. También se transfectaron las construcciones pGL3CP, pGL3CP-MOD y CP+E1MUT, que contienen al promotor basal, el promotor y el modulador, y el promotor con el sitio E-box1 del modulador mutado, respectivamente. Dichas construcciones se co-transfectaron con el cDNA de MyoD. La actividad se midió en miotubos, y se graficó como unidades normalizadas de luciferasa (UNL). Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

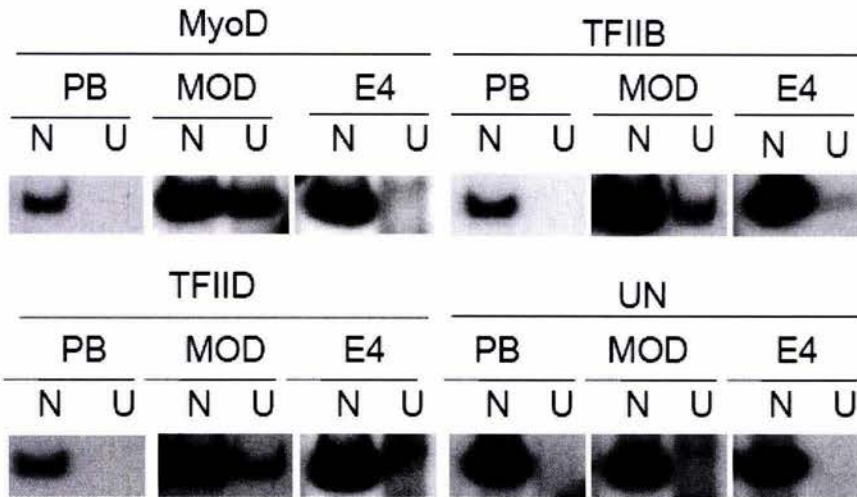
Interacción *in vivo* de MyoD, TFIID y TFIIB con el modulador y el promotor basal α -SG en el contexto de la cromatina de mioblastos y miotubos C2C12

Al ser expresado mediante transfección transitoria, MyoD participa en la diferenciación de una amplia variedad de células hacia el linaje miogénico (Weintraub et al, 1989), esto implica que este factor participa en varios eventos de regulación transcripcional y que realiza actividades diferenciales específicas sobre sus promotores blanco. Estos hechos fundamentan preguntas sobre cómo se modula el potencial de *trans*-activación del regulador maestro MyoD, o cómo este regula a otros factores transcripcionales para realizar sus funciones específicas. En experimentos anteriores se demostró que el elemento regulador compuesto por E-box1 y E-box2 funciona como un modulador del potencial de *trans*-activación de MyoD en mioblastos y miotubos C2C12 (Figs. 28 y 29), lo que fundamenta el abordaje del estudio del mecanismo mediante el cual este modulador afecta la actividad del promotor basal α -SG. MyoD se une a la maquinaria basal a través de TFIID, estabilizando el ensamble del complejo de preiniciación transcripcional favoreciendo la unión de TFIIB al complejo (Heller y Bengal, 1998). Esto nos sugiere que la unión de MyoD, así como la *trans*-activación del promotor α -SG, que carece de cajas E, podría realizarse a través de estos factores transcripcionales basales. Con el fin de estudiar dichas interacciones, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en mioblastos y miotubos C2C12 utilizando anticuerpos anti-MyoD, TFIID y TFIIB (Fig. 34). A partir de la cromatina inmunoprecipitada se amplificaron fragmentos de DNA correspondientes al modulador, el promotor basal así como un fragmento del exón 4 del gen α -SG, empleado como control negativo. No se detectaron productos de amplificación correspondientes a la región de promotor basal, y se detectaron los correspondientes al elemento modulador al utilizar como templado las fracciones unidas de cromatina de mioblastos inmunoprecipitada con anticuerpos anti-MyoD, TFIID y TFIIB (Fig. 34). En contraste, se detectaron productos de amplificación correspondientes a las regiones del modulador y el promotor basal cuando se utilizaron como templados las fracciones unidas de cromatina inmunoprecipitada con los mismos anticuerpos a partir de miotubos C2C12. No se detectaron

productos de amplificación correspondientes al modulador ni al promotor basal α -SG productos de amplificación usando como templado las fracciones unidas de cromatina inmunoprecipitada utilizando un anticuerpo inespecífico (anti-c-myc) a partir de mioblastos y miotubos. El producto de amplificación correspondiente al exón 4 del gen α -SG no fue detectado al emplear como templado las fracciones unidas de cromatina inmunoprecipitada con los anticuerpos correspondientes.



Mioblastos



Miotubos

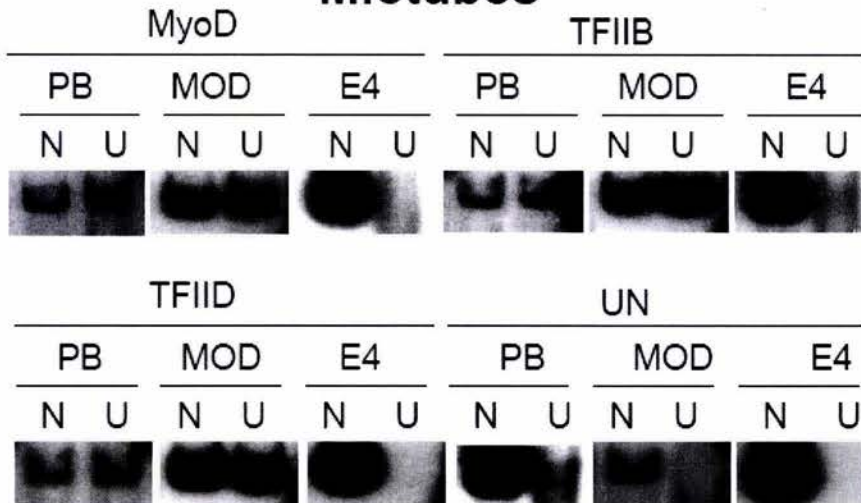


Fig. 34. Interacción de MyoD, TFIID y TFIIB con el modulador y el promotor basal α -SG. Se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados (flechas) para amplificar la región correspondiente al modulador (MOD), que incluye los sitios E-box1 y E-box2 (E1 y E2), el promotor basal (PB) y el exón4 (E4). Como templado se emplearon las fracciones unida (U) y no unida (N) de cromatina inmunoprecipitada con anticuerpos anti-MyoD, TFIID, TFIIB y un anticuerpo inespecífico (UN), aislada a partir de mioblastos y miotubos C2C12.

Interacción física entre MyoD, TFIID y TFIIB *in vivo* en mioblastos y miotubos C2C12

El hecho de que se encontrara a MyoD y miembros de la maquinaria basal de la transcripción localizados en el modulador y en el promotor basal α -SG en miotubos C2C12 es muy relevante, e implica que probablemente estos factores interactúan en complejos proteínicos. Con el fin de confirmar dichas interacciones y apoyar nuestras observaciones anteriores, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando anticuerpos anti-MyoD, anti-TFIID y anti-TFIIB en lisados de mioblastos y miotubos C2C12 (Fig. 35). Mediante western blot, se detectó a TFIID en material inmunoprecipitado a partir de mioblastos y miotubos, utilizando el anticuerpo anti-MyoD. Al inmunoprecipitar empleando anticuerpos anti-TFIID y anti-TFIIB a partir de mioblastos y miotubos, se detectó, mediante western blot, la presencia de MyoD en el material inmunoprecipitado (Fig. 35). No se observaron las bandas correspondientes a MyoD, TFIID y TFIIB al inmunoprecipitar con un anticuerpo anti-c-myc, utilizado como anticuerpo inespecífico. En forma consistente con nuestros experimentos previos, los ensayos de co-inmunoprecipitación muestran que MyoD interactúa con los miembros de la maquinaria basal TFIID y TFIIB en mioblastos y miotubos C2C12.

Con el fin de confirmar estos resultados, se realizaron los mismos ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo anti-myc en lisados de dos líneas celulares que expresan en forma estable a MyoD fusionado a un fragmento de la proteína myc (MyoD-myc) y a myc sin MyoD, respectivamente (Fig. 36). Para confirmar la expresión de MyoD-myc en dichas líneas celulares, se realizaron ensayos de western blot en extractos proteínicos utilizando el anticuerpo anti-MyoD (Fig. 36). En dichos ensayos se observó que MyoD es más abundante en extractos proteínicos de las células que expresan a MyoD-myc que en los extractos de células que expresan únicamente al fragmento myc. Las bandas inespecíficas fueron utilizadas como control de cargado. Esto confirma la expresión de MyoD-myc en la línea C2C12 transfectada en forma estable con el plásmido codificante para dicha proteína quimérica. Al inmunoprecipitar a MyoD-myc con un anticuerpo anti-myc a partir de mioblastos y realizar un western blot,

se detectaron bandas correspondiente a MyoD, TFIID y TFIIB (Fig. 36), y no detectamos dichas señales al inmunoprecipitar a partir de células que expresan únicamente el fragmento myc. En extractos de miotubos que expresan a MyoD-myc, se detectaron interacciones con TFIIB y no con TFIID, probablemente debido a que en este contexto, el fragmento myc interfirió con la inmunoprecipitación o la detección, puesto que en el contexto de miotubos C2C12 sin transfectar, no se detectó dicha interacción (Fig. 36). No detectamos señales en los productos de inmunoprecipitación provenientes de células que expresan el fragmento myc. Estos resultados en conjunto muestran que MyoD interactúa físicamente con la maquinaria basal de la transcripción en el contexto de mioblastos y miotubos C2C12, y apoyan nuestros resultados previos que muestran que estos factores interactúan con el elemento modulador α -SG en mioblastos, mientras que en miotubos, dichos factores se localizan tanto en el modulador como en el promotor basal (Fig. 34).

Co-localización de MyoD y TFIID en mioblastos C2C12

Para reafirmar estos resultados que muestran la interacción de MyoD con el aparato basal de la transcripción a través de TFIID y TFIIB se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta sobre mioblastos C2C12 utilizando anticuerpos dirigidos contra dichos factores (Fig. 37). En un ensayo preeliminar se observó sobrelapamiento de las señales correspondientes a MyoD (verde) y TFIID (rojo) en ambos estadios de diferenciación. El sobrelapamiento de las señales se evidenció con el color amarillo. Así mismo, dichas señales se identificaron únicamente en núcleo, como se evidenció mediante la tinción con DAPI (Fig. 37). Como control negativo se realizó una doble inmunofluorescencia contra MyoD y α -SG, que se localiza principalmente en la membrana de células musculares. Se identificó la señal correspondiente a MyoD (verde) únicamente en la región correspondiente al núcleo, mientras que la correspondiente a α -SG (rojo) se encontró ausente en dicha región. Es importante señalar que en los experimentos preliminares realizados, se obtuvieron señales inespecíficas, por lo que dichas inmunofluorescencias deben realizarse con mayor detenimiento. Sin embargo, los

resultados obtenidos apoyan las evidencias mostradas en este trabajo que muestran que existe interacción *in vivo* entre los factores MyoD y miembros de aparato basal de la transcripción.

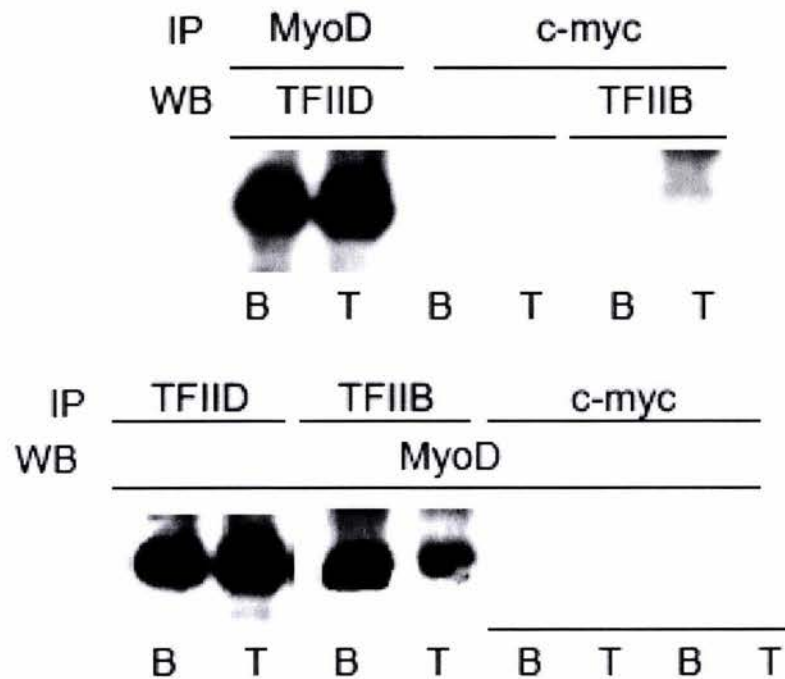


Fig. 35. **Interacción de MyoD con los factores TFIID y TFIIB.** Se utilizaron anticuerpos anti-MyoD, -TFIID, TFIIB y c-myc para realizar inmunoprecipitaciones (IP) a partir de lisados celulares de mioblastos (B) y miotubos (T) C2C12. Las fracciones inmunoprecipitadas se analizaron mediante Western-blot (WB) utilizando anticuerpos anti-MyoD, TFIID y TFIIB.

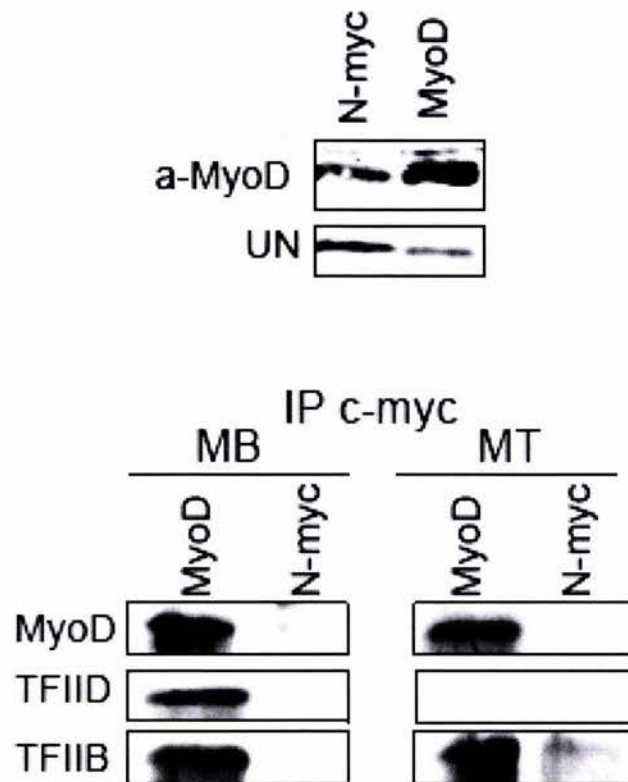


Fig. 36. **Confirmación de interacciones entre MyoD, TFIID y TFIIB.** Se seleccionaron líneas transfectantes estables para MyoD fusionada a un "tag" (MyoD) y un fragmento de la proteína N-myc, respectivamente. A partir de lisados celulares de dichas líneas se realizaron ensayos de Western-blot con un anticuerpo anti-MyoD (a-MyoD). Como control de cargado se muestra una banda inespecífica (UN). Se realizaron inmunoprecipitaciones empleando un anticuerpo anti-c-myc (IP c-myc) en lisados celulares de mioblastos (MB) y miotubos (MT) de las líneas que sobre-expresan a MyoD fusionada a un tag (MyoD), y el tag N-myc, respectivamente. Los productos inmunoprecipitados se analizaron mediante Western-blot utilizando anticuerpos dirigidos a MyoD, TFIID y TFIIB.

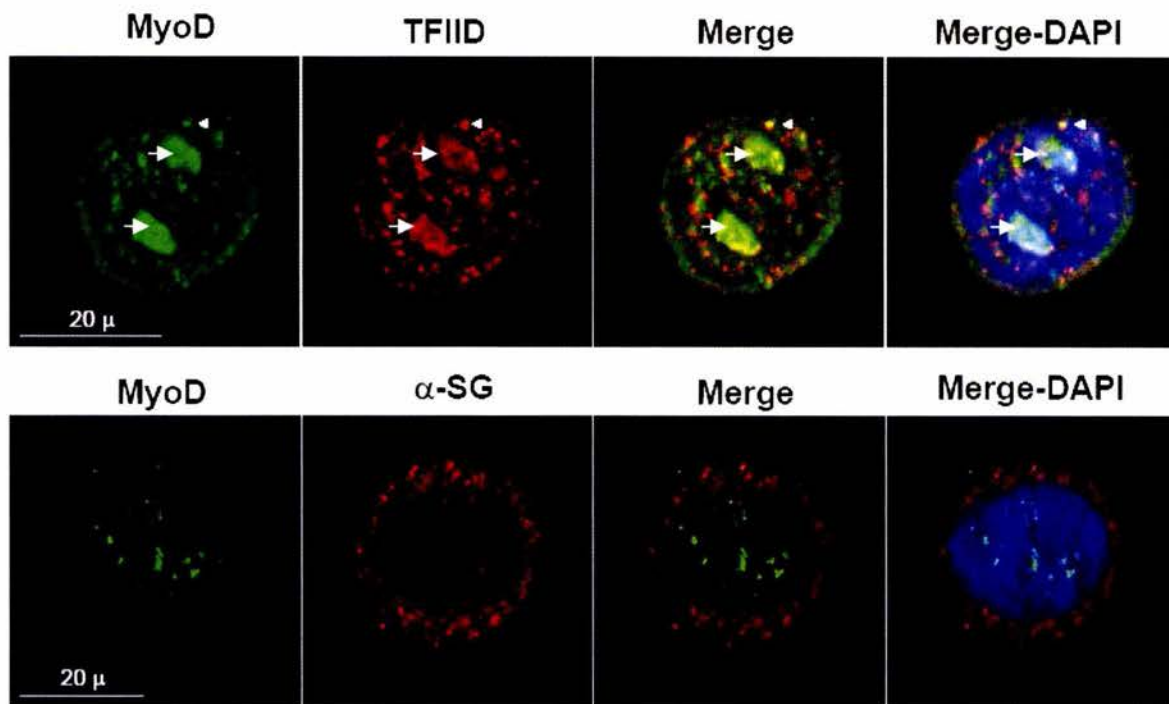


Fig. 37. **Inmunofluorescencias contra MyoD y TFIID.** Se detectó MyoD (verde) y TFIID (rojo) en núcleos de mioblastos C2C12 (panel superior). Se muestra el solapamiento de las señales correspondientes a ambas inmunodetecciones (Merge) y dicho solapamiento con la tinción con DAPI. En el panel inferior se muestra la detección de MyoD (verde) y α -SG (rojo). Se observa en el Merge que no existe solapamiento de las señales correspondientes a cada anticuerpo. Las puntas de flecha denotan la señal solapada para ambas tinciones. Las flechas blancas podrían corresponder a señales inespecíficas.

La modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG depende del contexto muscular.

Dado que se identificó y caracterizó un elemento modulador del potencial de *trans*-activación de MyoD que incluye a E-box2, que se conserva en humano y ratón, y cuya integridad es crítica en el efecto modulador. Se decidió preguntar sobre el requerimiento de un factor muscular en la modulación de la actividad de MyoD sobre el promotor basal α -SG (Fig. 38). Para ello, en la línea celular fibroblástica de origen murino 3T3, que no expresa MyoD, se co-transfectaron las construcciones CP y CP+MOD que contienen al promotor basal α -SG y a dicho promotor, además del modulador, respectivamente con el cDNA de MyoD (Fig. 38). Por otra parte, con el fin de saber si el efecto modulador es específico del promotor basal α -SG, como lo sugieren datos presentados en este trabajo (Figs. 26 y 27), se clonó el modulador río arriba de la caja TATA del gen de la timidin kinasa TK (Construcción TATA-MOD). Dicha construcción se co-transfectó en células 3T3, así como en células C2C12, con el cDNA de MyoD, (Fig. 38A). La actividad del gen reportero fue medida 24 hrs después de la transfección. Como resultado se observó que MyoD en células 3T3, activa el promotor de TK y que el elemento modulador en este contexto potencia la actividad del promotor basal probado (Fig. 38A). Por otra parte, en mioblastos y miotubos se observó que E-box1 y E-box2 afectan positivamente la actividad de la caja TATA (Fig. 38B). La actividad de las construcciones que contienen al promotor basal α -SG y el modulador, que fueron transfectadas en la línea 3T3, reveló que E-box1 y E-box2 no modulan el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG (Fig. 38C). Estos resultados sugieren por un lado, que un factor bHLH no miogénico es capaz de interactuar con el modulador y de activar los promotores utilizados en estos ensayos. Por otra parte, dichos resultados indican que para que se lleve a cabo la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD se requiere de un factor muscular ausente en los fibroblastos 3T3, que actúe en forma selectiva sobre el promotor basal α -SG, puesto que las secuencias E-box1 y E-box2 en este contexto no regulan negativamente la actividad de los promotores probados y no modulan la actividad de *trans*-activación de MyoD sobre dichas

regiones de regulación. Los resultados apoyan la importancia de la estructura de los promotores musculares para que se establezca un patrón de expresión regulado en forma tejido específica. Esta noción es apoyada por resultados que muestran que la estructura de los promotores basales es crítica en el ensamblaje del complejo de pre-iniciación y de la RNA polimerasa II (Aso et al, 1994). Dado lo anterior, resultaría sumamente novedoso el hecho de identificar un co-factor muscular de MyoD que contribuya en la modulación de éste en el contexto específico del promotor basal del gen α -SG.

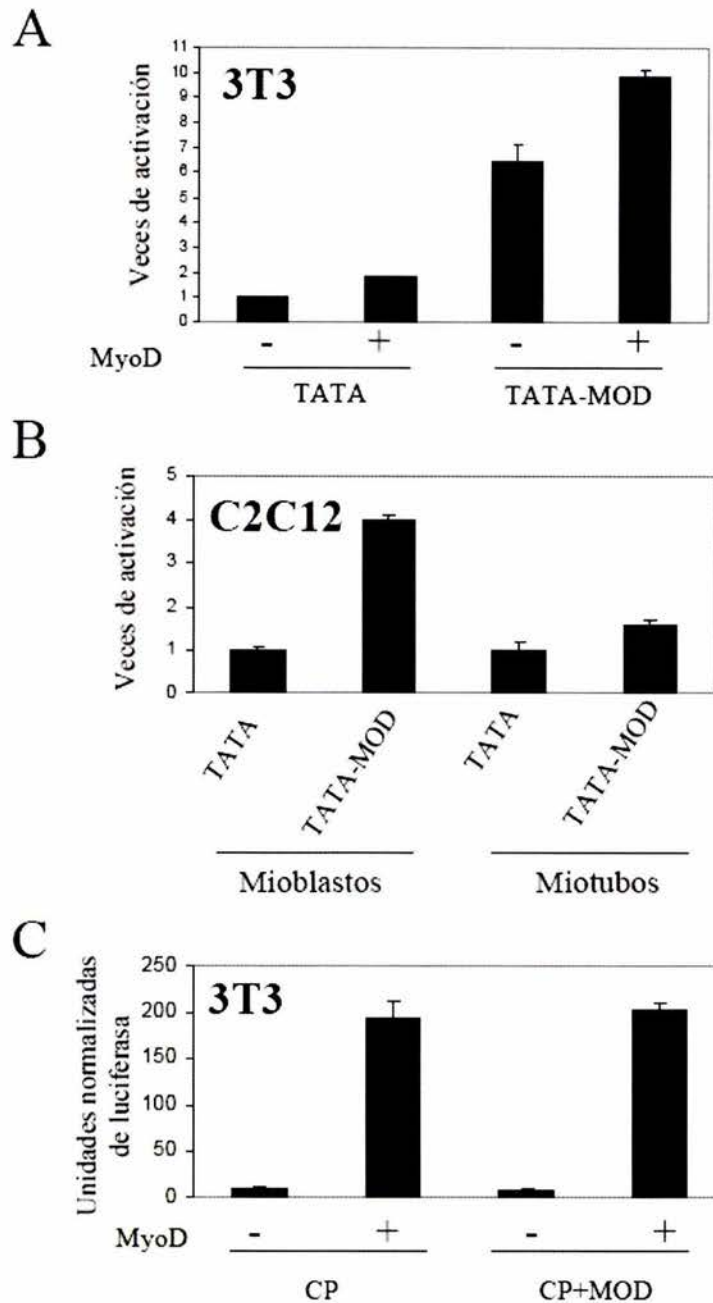


Fig. 38. **Actividad de E-box1 y E-box2 sobre la caja TATA del promotor de TK y sobre el promotor α -SG en fibroblastos.** (A) Se co-transfectaron las construcciones TATA y TATA-MOD, que contienen a la caja TATA del promotor de TK, y dicho elemento más el modulador (E-box1 y E-box2), respectivamente, en fibroblastos de ratón 3T3 con un vector que codifica para el factor MyoD. (B) Se transfectaron las construcciones TATA y TATA-MOD en células C2C12, la actividad de luciferasa se midió en mioblastos y miotubos. Los datos se representan como veces de activación sobre la actividad de la construcción TATA. (C) Las construcciones CP y CP+MOD, que contienen al promotor basal α -SG, y éste más el modulador, respectivamente, fueron co-transfectadas con el cDNA de MyoD. Los datos se representan como unidades normalizadas de luciferasa. Los datos representan un experimento realizado por duplicado.

DISCUSIÓN

La expresión génica en procariontes y eucariontes es regulada mediante diversos y muy complejos procesos, como la transcripción. (Lee y Young, 2000; Bohm y Smale y Kadonaga, 2003; Ogata et al, 2003; Bohm y Boos, 2004), las modificaciones post-transcripcionales y pos-traduccionales (Puri y Sartorelli, 2000), incluidas dentro de los mecanismos epigenéticos. El proceso transcripcional es influido por la participación de factores transcripcionales y de elementos de regulación en *cis*, así como de moléculas mediadoras de interacciones entre éstos. La combinatoria de actividades de dichos elementos en contextos celulares específicos da como resultado un sin fin de posibilidades de estrategias de regulación de la expresión génica (Remenyi et al, 2004). Dichas posibilidades incluyen desde la unión de activadores o represores en promotores específicos (Gaston y Jayaraman, 2003) hasta la re-estructuración de la cromatina a través de modificaciones en el DNA (Robertson, 2002) y las histonas (Berger, 2002), que a su vez afectan incluso la expresión espacio-temporal de dominios de genes a través de elementos como los LCRs (Locus Control Region) (Li et al, 2002) y los delimitadores o aisladores (insulators) (Geyer y Clark, 2002; Burgess et al, 2002; Razin et al, 2003). La complejidad de nuestra visión sobre la regulación de la expresión por la acción de los elementos de regulación en *cis* y *trans*, se acentúa con la participación del arreglo de los genes en dominios, así como de la estructura tridimensional del compartimento nuclear en la localización específica de diversos factores reguladores (Dundr y Misteli, 2001; Misteli, 2001; Kosak y Groudine, 2004). Las particularidades de cada región reguladora (promotores), es decir, su composición nucleotídica, la influencia de potenciadores (enhancers), silenciadores, "insulators" y LCRs sobre su actividad, su localización cromosómica y por ende su localización nuclear, nos dejan un panorama que se diversifica a tal grado que podría afirmar que existen tantas estrategias de control transcripcional como regiones de regulación. El estudio de las particularidades de estas estrategias de regulación en promotores específicos nos han permitido comprender la importancia de algunas de las funciones del genoma e integrarlas en un contexto conceptual tan amplio como lo es un proceso biológico. En el

trabajo aquí presentado se propone un mecanismo de regulación de la expresión del gen α -SG con base en los resultados del análisis funcional de su región promotora. Se identificó una región de regulación negativa compuesta por dos sitios de unión al factor MyoD. Dicho elemento de regulación funciona modulando negativamente la capacidad *trans*-activadora del factor MyoD sobre el promotor basal del gen en estudio, que carece de sitios de unión para dicho factor. Observamos que esta región, definida en este trabajo como modulador, es contactada *in vitro* por MyoD y miogenina, y que el reconocimiento DNA-proteína es mediado por nucleótidos conservados en la región 5' del gen α -SG de ratón y humano que flanquean la secuencia consenso. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina se observó que MyoD, así como TFIID y TFIIB se localizan en el modulador y no en la región correspondiente al promotor basal α -SG en mioblastos C2C12. En miotubos, MyoD y el aparato basal transcripcional se localizan en ambas regiones reguladoras. La interacción de los factores transcripcionales basales TFIID, TFIIB con MyoD fueron confirmadas mediante co-inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencias. Los resultados de este trabajo sustentan un modelo mecanístico que sugiere que la actividad del promotor α -SG es regulada mediante la localización de la maquinaria basal a través del activador MyoD hacia la región moduladora (Fig. 39). El modelo implica por primera vez la participación de un regulador maestro de la miogénesis en la regulación de la transcripción basal mediante el control de la localización de factores generales hacia secuencias reguladoras específicas de promotores musculares.

El gen α -SG, cuya deficiencia es causa de la distrofia muscular de cintura 2D se expresa progresivamente durante la diferenciación de células musculares (Ettinger et al, 1997; Noguchi et al, 2000; Wheeler et al, 2002), localizándose en el sarcolema en etapas terminales de la diferenciación (Noguchi et al, 2000). Este patrón de expresión es regulado a nivel transcripcional, en este trabajo demostramos que el promotor es mas activo conforme avanza la diferenciación de la línea celular de origen muscular C2C12, resultado que concuerda con resultados reportados con anterioridad que muestran que dicha región promotora

promueve la expresión de GFP en una línea celular del mismo origen (Wakabayashi-Takai et al, 2001).

Mediante el análisis de la secuencia del promotor α -SG se identificaron sitios consenso de unión a factores transcripcionales con actividades múltiples sobre diversas regiones de regulación. Este hecho sugiere que el patrón de expresión del gen reportero *GFP* dirigido por el promotor del gen α -SG es regulado por la combinatoria de actividades de los factores que contactan dicha región reguladora. Esta hipótesis es apoyada por los resultados del análisis de la actividad de construcciones con deleciones del promotor α -SG. Dichos resultados muestran que el promotor α -SG se compone por diversas regiones de regulación con actividades tanto positivas como negativas que actúan simultáneamente para regular el patrón de expresión del promotor observado durante la diferenciación de células musculares. Este hecho resulta muy relevante pues indica que el promotor en estudio es muy complejo y que es regulado por múltiples mecanismos, de los que solo una pequeña parte fue abordada en este trabajo. Un ejemplo de dicha complejidad es constituido por pruebas realizadas que apoyan el hecho de que el promotor es regulado por actividad combinatoria de factores transcripcionales durante la diferenciación miogénica. Dichas pruebas abordaron la regulación diferencial del promotor mediante la acción de otros factores transcripcionales. Sabemos que los factores NFI-C y NFI-X regulan negativamente la actividad del promotor en estudio en mioblastos C2C12, mientras que en miotubos los factores NFI-A, NFI-B, NFI-C y NFI-X funcionan como activadores del promotor (Delgado-Olguín et al, 2004). A su vez, estos resultados sugieren que la familia de factores transcripcionales NFI, podrían participar en la regulación positiva de que es objeto el promotor α -SG durante la diferenciación miogénica. Por otra parte, el factor Sp1 actúa como regulador negativo del promotor en mioblastos C2C12 (ver perspectivas). Estos hallazgos sugieren que el promotor α -SG, a pesar de expresarse fuertemente en células musculares diferenciadas es sujeto a regulación negativa, o es modulado negativamente por varios factores transcripcionales. Este hecho resulta relevante, dado que ratones que sobre-expresan el gen γ -SG desarrollan una distrofia muscular semejante a la

desarrollada por ratones deficientes en dicho gen (Zhu et al, 2001), lo que resalta la importancia de la modulación de la actividad transcripcional de los genes sarcoglicano. En este contexto, resulta interesante la identificación de un elemento de regulación negativa en el promotor del gen α -SG compuesto por sitios de unión a factores de la familia MyoD, que funcionan como activadores de genes musculares en miotubos (Mal y Harter, 2003).

El elemento de regulación negativa identificado en este estudio, modula negativamente el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG. Esto es muy relevante pues sugiere que la capacidad de activación de dicho factor es regulada en forma dependiente de la estructura específica de sus promotores blanco. La relevancia de esto se evidencia por la demostración de que MyoD desempeña múltiples funciones durante la miogénesis (Bergstrom et al, 2002). En este contexto resulta muy interesante el hecho de que la unión de MyoD, así como la modulación de su potencial de *trans*-activación sea mediada por nucleótidos conservados en humano y ratón que no forman parte de la secuencia consenso de E-box2, cuya mutación abate el efecto de modulación. Esto demuestra la relevancia de la estructura de los promotores blanco de MyoD en la determinación de un patrón de expresión específico, hecho apoyado por trabajos previos que muestran que los nucleótidos que flanquean cajas E son críticos en la determinación del factor que reconoce dicho consenso (Blackwell et al, 1993; Walhout et al, 1998). Dado que existen factores bHLH no miogénicos capaces de reconocer cajas E (Lassar et al, 1991), la especificidad en la interacción de los factores MyoD en sus sitios de reconocimiento en promotores músculo específico debe realizarse en forma regulada, lo que podría explicar la conservación de nucleótidos aledaños al sitio E-box2.

En este trabajo de tesis se demostró que el factor MyoD activa el promotor basal α -SG a pesar de que carece de sitios de reconocimiento para dicho factor. Además se demuestra que MyoD interacciona con factores de transcripción basales en el promotor α -SG, lo que constituye una explicación a la capacidad de activación del promotor en forma independiente del reconocimiento directo del DNA por MyoD (Fig. 39). La interacción de MyoD con el promotor basal

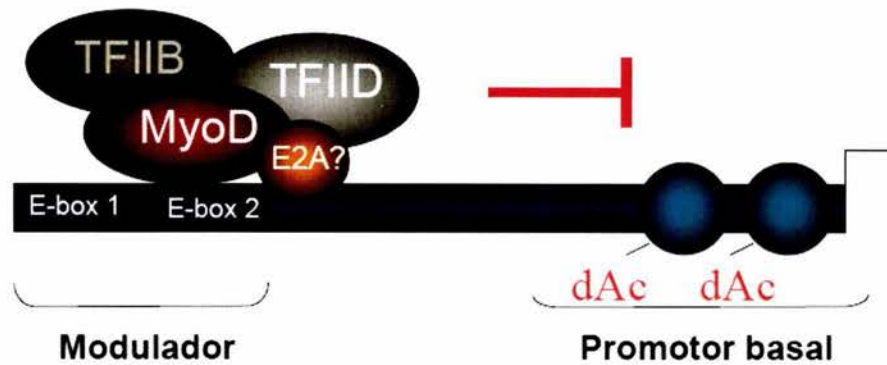
α -SG podría llevarse a cabo a través de TAlIF₁₅₀, que es requerida en la activación de promotores basales (Kaufmann et al, 1996; 1998). El reconocimiento también podría realizarse a través de TAFII₂₅₀, dado que un complejo que incluye esta proteína además de TAlIF₁₅₀ y TBP activa un promotor basal (Verrijzer et al, 1995). Otro complejo proteínico que podría estar involucrado en la unión de MyoD al promotor basal α -SG es el Mediador, el cual es reconocido por factores transcripcionales específicos (Myers y Kornberg, 2000), sin embargo la interacción de MyoD con el complejo Mediador no ha sido sometida a experimentación. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan el hecho de que MyoD contacta y *trans*-activa al promotor basal α -SG.

In vivo, MyoD interacciona con la maquinaria basal de la transcripción únicamente en el modulador en mioblastos, y en el modulador y el promotor basal en miotubos. Este hallazgo, aunado a la totalidad de los resultados de este trabajo apoya un modelo que explica la actividad de E-box1 y E-box2 en la modulación de la capacidad *trans*-activadora de MyoD sobre el promotor basal α -SG (Fig. 39). El modulador podría regular negativamente al promotor α -SG en mioblastos a través de controlar el estado de la cromatina, esto se sustenta en el hecho de que MyoD recluta a HDAC1 al promotor del gen miogenina (Mal y Harter, 2003) en dicho estado de diferenciación, lo que resultaría en represión. Esto explicaría el por qué MyoD en conjunción con los factores basales transcripcionales se encuentra ausente en el promotor basal α -SG, lo que a su vez correlaciona con la baja actividad del promotor en mioblastos. En miotubos, el promotor es activo, lo que correlaciona con la presencia de MyoD y de miembros de la maquinaria basal de la transcripción en el promotor basal. Este hecho podría responder al cambio de cofactor de MyoD en miotubos, pues, se sabe que MyoD recluta a la acetiltransferasa de histonas p300/CBP (Eckner et al, 1996; Puri et al, 1997; McKinsey et al, 2001) y a PCAF a promotores musculares (Mal y Harter, 2003), activando su expresión. Más aún, se sabe que MyoD regula la diferenciación muscular mediante la acción del complejo de enzimas remodeladoras de cromatina SWI/SNF (de la Serna et al, 2001). Esto sugiere que el modulador, en miotubos podría promover la acetilación de la cromatina mediante p300/CBP, permitiendo

un remodelaje de la cromatina que facilite la interacción de MyoD con el promotor basal y promueva su expresión. En este estado de diferenciación, los sitios E-box1 y E-box2 podrían modular el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG mediante la unión preferencial de MyoD junto con la maquinaria basal de la transcripción en el modulador sobre el promotor basal. Esta hipótesis encuentra un fundamento teórico en el hecho de que existen nucleótidos conservados flanqueando a E-box2, que son críticos en el reconocimiento de MyoD y en la modulación de la actividad de dicho factor. Esto a su vez sugiere que la secuencia de E-box2 constituye un sitio de unión de alta afinidad para el reconocimiento de factores reguladores miogénicos.

La actividad transcripcional de MyoD es regulada mediante la interacción con co-represores o co-activadores (Lassar et al, 1991; Molkenin y Olson, 1996; Black y Olson, 1988; Mal y Harter, 2003), así como por modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación y ubiquitinación (Batonnet et al, 2004; Polesskaya et al 2001; Tintignac et al, 2004). Los resultados de este trabajo sugieren que además de estas modificaciones, el potencial de *trans*-activación de MyoD es regulado mediante su unión, junto con miembros de la maquinaria basal transcripcional, en una región de regulación específica del promotor α -SG. Por otra parte los resultados sugieren que el factor maestro de la miogénesis MyoD, controla la transcripción basal mediante el reclutamiento de factores transcripciones hacia el elemento modulador, lo que constituye una explicación a la especificidad de las funciones de MyoD sobre sus promotores blanco durante la miogénesis.

Mioblastos



Miotubos

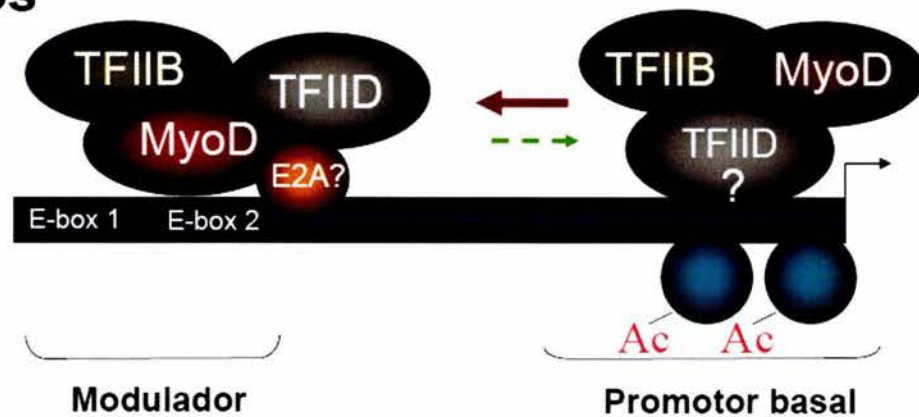


Fig. 39. **Modelo de acción del modulador sobre el promotor α -SG.** MyoD contacta la maquinaria basal de la transcripción a través de TFIID y TFIIB, reclutándolos hacia el modulador en mioblastos, estadio en el cual, estos factores no pueden acceder al promotor basal (línea truncada) debido a que dicha región podría ser inaccesible por compactación de cromatina. Dicha compactación podría ser ocasionada por desacetilasas de histonas (los círculos azules representan nucleosomas, (histonas des acetiladas (dAC)), que a su vez podrían ser reclutadas por MyoD hacia el modulador. Así, este modelo explicaría la inactividad transcripcional del promotor α -SG en células indiferenciadas. En miotubos, MyoD y la maquinaria basal de la transcripción contactan tanto el modulador como el promotor basal. Esta región puede ser reconocida por el complejo debido a que probablemente MyoD recluta acetilasas de histonas (histonas acetiladas (Ac)) que favorecen el establecimiento de cromatina transcripcionalmente permisiva, lo que correlaciona con la actividad del promotor en este estadio de diferenciación. Debido a que el promotor basal carece de sitios de unión al factor MyoD, probablemente algún factor de transcripción basal actúe como intermediario entre el DNA y dicho factor. En miotubos, E-box1 y E-box2 podrían modular el potencial de *trans*-activación de MyoD sobre el promotor basal α -SG mediante la unión preferencial de este factor, que contacta a TFIID y TFIIB, hacia el modulador sobre el promotor basal (esquemático como una flecha sólida y una interrumpida). Este hecho se fundamenta en que E-box2 está flanqueado por nucleótidos conservados que influyen sobre la unión de MyoD, así como la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD, lo que sugiere que esta secuencia constituye un sitio de alta afinidad por factores miogénicos. La modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD podría requerir la participación de un factor de la familia E2A, que heterodimerizan con factores reguladores miogénicos.

PERSPECTIVAS

Caracterización de la actividad de los factores NFI y Sp1 sobre el promotor α -SG

Mediante el análisis funcional del promotor α -SG se identificó una región con actividad positiva (Fig. 22, comparar actividad de construcciones 6 y 7). Dicha región incluye sitios de unión para los factores Sp1 y NFI. Este hecho es interesante debido a que sabemos que el promotor es estimulado negativamente por el factor Sp1 (Fig. 40) y por NFI-C y NFI-X en mioblastos, y que en miotubos la familia de factores NFI activan el promotor α -SG (Delgado-Olguín et al, 2004) (Fig. 23). Se ha propuesto con anterioridad que el factor Sp1 interfiere con la unión de NFI con sus sitios blanco debido a la proximidad de sus correspondientes secuencias de reconocimiento (Nehls et al, 1991; Nehls et al, 1992). En este contexto, sería importante comprobar si este mecanismo ocurre en el promotor en estudio, pues en dicha región activadora, existen sitios de unión para ambos factores. Por otra parte, la identificación de los sitios de respuesta a los factores NFI del promotor α -SG en células musculares diferenciadas aún no se ha abordado.

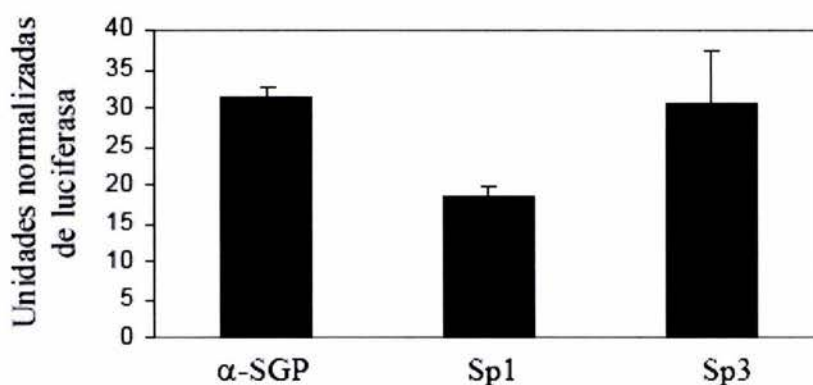


Fig. 40. **Actividad de los factores Sp1 y Sp3 sobre el promotor α -SG.** Se transfectaron células C2C12 con la construcción 1, que contiene al promotor α -SG (α -SGP), que fue co-transfectada con vectores que codifican para los factores Sp1 y Sp3. La actividad de luciferasa fue medida en mioblastos C2C12. Los datos se representan como unidades normalizadas de luciferasa. Los datos representan un experimento realizado por duplicado.

Estudio de la influencia de la vía(s) de transducción reguladas por Calcio en la actividad del promotor α -SG

La presencia de un sitio de unión al factor CREB (cAMP-responsive element binding protein 1) (Fig. 1), en la secuencia del promotor α -SG sugiere que su actividad es regulada mediante una vía de señalización que involucra cinasas dependientes de calcio y calmodulina. Con el fin de probar esta posibilidad se transfectó el promotor α -SG en células C2C12, las cuales fueron estimuladas con thapsygargina, un inductor de liberación de calcio intracelular (Fig. 41). Se midió la actividad de luciferasa a las 2, 4 y 6 hrs después de la transfección. Se observó que la actividad del gen reportero presentó un aumento a las 2 horas de incubación con thapsygargina con respecto a la presentada por las células transfectadas sin estímulo. Se observó un aumento progresivo en la actividad de luciferasa a las 4 y 6 hrs en las células sin estímulo, mientras que en las células estimuladas, la actividad del reportero se mantuvo sin cambio (Fig. 41). Estos resultados sugieren que en efecto, alguna vía de señalización regulada por calcio afecta la actividad del promotor α -SG, por lo que otra vertiente de estudio derivada de este trabajo consistiría en analizar la funcionalidad del sitio de unión al factor CREB, así como identificar la vía de señalización implicada en la regulación del promotor α -SG.

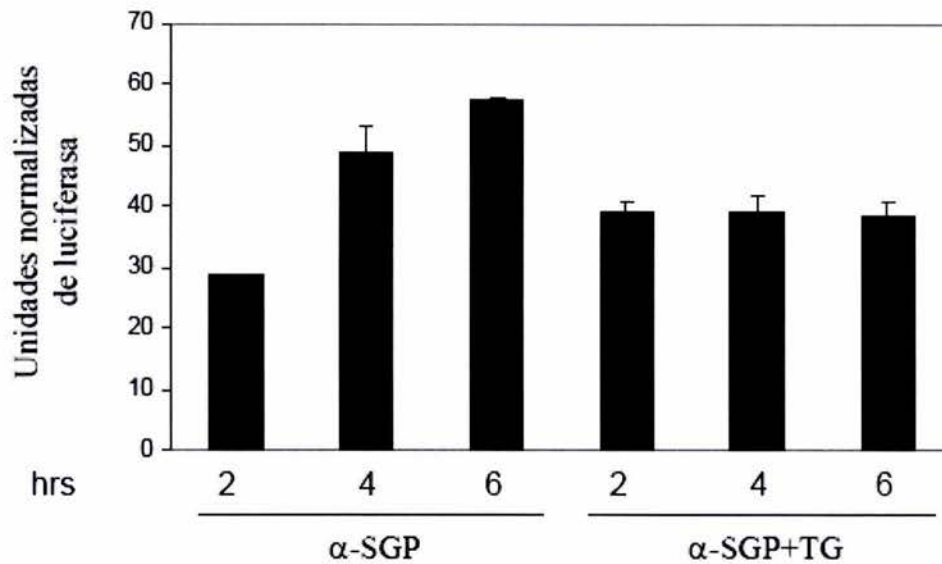


Fig. 41. **Efecto de la liberación de calcio intracelular sobre la actividad del promotor α -SG.** Se transflectaron dos grupos de células C2C12 con el promotor α -SG (α -SGP). Un grupo fue estimulado con thapsygargina (TG). La actividad del gen reportero fue medida 2, 4 y 6 hrs después de la transfección. Los datos se representan como unidades normalizadas de luciferasa. Los datos representan un experimento realizado por duplicado.

Utilización del promotor α -SG en la expresión de transgenes

Mediante transferencia génica se ha logrado la restitución del complejo sarcoglicano, en modelos murinos deficientes en los sarcoglicanos, a través de la utilización de vectores virales que codifican cDNAs de los transcritos correspondientes (Xiao et al, 2000). Con la finalidad de dilucidar la importancia del uso de promotores específicos en dichos ensayos, se han empleado dos vectores, en los que la expresión de los cDNAs es regulada por el promotor viral CMV y el promotor de la creatinina cinasa muscular (MCK) específico de músculo, respectivamente. Mediante el análisis de músculos de ratones infectados con dichos vectores, se observó que el vector dirigido por el promotor viral confiere niveles de expresión bajos en comparación con el vector regulado por el promotor muscular. Así mismo, se determinó que la transferencia del vector regulado por el promotor viral ocasiona una respuesta humoral, que afecta la expresión del gen transferido. En base a estas observaciones, se ha sugerido que el uso de promotores músculo-específicos podría constituir una herramienta necesaria en el tratamiento de distrofias musculares mediante la transferencia génica a través del

uso de vectores virales (Xiao et al, 2000, Cordier et al, 2001). En este contexto, resulta importante el contar con un promotor de expresión específica de músculo, que podría ser utilizado en ensayos de transferencia génica en protocolos terapéuticos.

Estudio de la influencia de la afinidad de MyoD por la maquinaria basal de la transcripción en la modulación del potencial de trans-activación de MyoD

En este trabajo se propone que el potencial de *trans*-activación de MyoD, que interacciona con los factores generales TFIIB y TFIID, es modulado negativamente mediante la regulación de su localización hacia el modulador, de tal forma, que el acceso de MyoD y la maquinaria basal de la transcripción hacia el promotor basal α -SG es regulada mediante la participación de las secuencias E-box1 y E-box2. Un rubro interesante derivado de los resultados que fundamentan esta forma de regulación, consiste en la investigación sobre la participación de la afinidad de MyoD por los factores TFIID y TFIIB en la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD. De acuerdo al modelo propuesto en este trabajo, si disminuyera la afinidad de MyoD por los factores basales, se perdería la modulación del potencial de *trans*-activación de MyoD, pues dichos factores no serían retenidos en el modulador a través de MyoD. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, se podrían generar diversas mutaciones en los cDNAs de los factores MyoD, TFIID y TFIIB con el fin de identificar mutaciones que alteren su afinidad. La identificación de estas mutantes podría realizarse mediante ensayos de co-inmunoprecipitación o mediante ensayos de retardo empleando como sonda la secuencia correspondiente a E-box2 en presencia de extractos de transcripción/traducción *in vitro* para los factores correspondientes. Una vez obtenidas las mutantes, se podrían realizar ensayos de transfección transitoria en presencia de la construcción con el promotor basal α -SG así como el modulador, y los cDNAs correspondientes. De esta forma se podría probar la influencia de la afinidad entre los factores probados, así como la contribución de cada uno de ellos en el efecto modulador y en la regulación de la actividad del promotor basal α -SG.

Búsqueda de elementos de regulación a distancia en el promotor α -SG

El gen α -SG produce dos transcritos a partir de dos promotores independientes, sin embargo, mediante ensayos de transfección transitoria, se observó que el promotor localizado hacia 5' del exón 1 es inactivo en células musculares (Wakabayashi-Takai et al, 2001). Este hecho sugiere que la secuencia del promotor probado requiere de otros elementos como un "enhancer" o potenciador para ser funcional, como se ha demostrado para el gen MyoD, cuyo promotor requiere de un potenciador localizado 5 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción para activarse (Goldhamer et al, 1992). Dado que el promotor α -SG, compuesto de 2609 pb, es muy complejo, no se descarta la presencia de un potenciador que estimule la expresión a partir del promotor localizado hacia 5' del exón 1 del gen. Con el fin de localizar algún elemento de regulación en el promotor estudiado en este trabajo, se pueden buscar sitios de hipersensibilidad al corte por DNasaI. Una vez identificadas, las regiones hipersensibles pueden ser clonadas en el contexto del promotor inactivo y transfectadas con el fin de saber si las regiones en estudio estimulan la actividad de dicho promotor. Una alternativa a esta estrategia consiste en clonar los fragmentos deletados del promotor α -SG localizado en el intrón 1, empleadas en el análisis funcional de dicha región reguladora, en el contexto del promotor inactivo. Si se identificase un elemento que estimule el promotor inactivo, sería muy interesante realizar pruebas con el fin de definir si la región identificada constituye un "enhancer" o potenciador, o solo un elemento de regulación positiva. Para ello, se podrían realizar ensayos de transfección transitoria o estable con construcciones que contengan el elemento en cuestión clonado en diversas posiciones con respecto a un promotor, así como en orientación 5'-3' y 3'-5', con el fin de establecer si la región identificada potencia la actividad del promotor en forma independiente de su localización y dirección, lo que sería indicativo de que la secuencia en estudio corresponde a un potenciador. Una vez identificado un "enhancer", se podría realizar un análisis funcional del promotor α -SG localizado hacia 5' del exón 1, además de abordar el mecanismo mediante el cual el potenciador estimula la expresión de dicho promotor.

Análisis de la influencia de la estructura de la cromatina sobre la actividad del promotor α -SG.

A través del análisis de la secuencia del promotor α -SG se identificaron sitios de unión a factores transcripcionales de la familia Sp1, GATA, NFI y MyoD entre otros. Notablemente, dichos factores se han asociado a la regulación de la estructura de la cromatina mediante su interacción con diversos co-factores (Blobel et al, 1998; Leahy et al, 1999; Thomas y Seto, 1999; Mal y Harter, 2003; Letting et al, 2003). Así mismo los factores NFI (Delgado-Olguín et al, 2004) y MyoD afectan la actividad del promotor. Los antecedentes mencionados, además del hecho de que el promotor se regula diferencialmente durante la diferenciación de células musculares, sugieren que existen cambios en la estructura del promotor a nivel de cromatina que influyen el patrón de expresión del gen α -SG. Tal es el caso para el promotor del gen miogenina, cuya estructura de la cromatina se remodela durante la diferenciación. Los hechos mencionados, aunados a la complejidad del promotor α -SG, fundamentan el abordaje de la influencia de la estructura de la cromatina en la actividad del promotor durante la diferenciación miogénica. Este complejo problema puede abordarse mediante diversas estrategias.

La búsqueda de regiones remodeladas en forma dependiente del proceso de la diferenciación muscular puede realizarse mediante el análisis de los fragmentos del promotor generados por el corte por la MNasal mediante "southern blot". Dado que dicha enzima corta en el DNA internucleosomal, el resultado del "southern blot" arrojaría datos sobre el posicionamiento nucleosomal a lo largo del promotor α -SG. En caso de que el análisis permitiera la identificación de una región remodelada diferencialmente, se abriría la posibilidad de identificar sitios de unión a factores transcripcionales en dichas zonas, que podrían ser responsables de regular la actividad del promotor. Si este fuera el caso, podrían buscarse sitios de corte por enzimas de restricción cuya secuencia sobrelape con las secuencias identificadas, lo que permitiría realizar un análisis de accesibilidad a enzimas de restricción sobre la región de interés. Estas estrategias podrían ser de utilidad para

discernir si en mioblastos, el promotor basal α -SG se encuentra en un estado de cromatina altamente estructurada, lo que correlacionaría con la baja actividad del promotor, así como la ausencia de MyoD y de la maquinaria basal de la transcripción en dicha región del promotor en este estado de la diferenciación. Si esta hipótesis resultara cierta, se esperaría que el mismo análisis revelara que en miotubos, el promotor basal α -SG presentara un patrón de corte por la MNasal correspondiente a nucleosomas localizados en posiciones múltiples a lo largo de dicha región de regulación. Un análisis de este tipo podría complementarse con la búsqueda de proteínas involucradas en el remodelaje de la cromatina que interactúan con las regiones correspondientes mediante inmunoprecipitación de cromatina, así como ensayos de *trans*-activación de dichos factores con el fin de analizar su función sobre el promotor.

Dado que las modificaciones de histonas están implicadas en el remodelaje de la cromatina y por ende en la regulación de la expresión génica (Wyce et al, 2004; Berger, 2004; Stallcup, 2001; Schotta et al, 2004; Peterson y Laniel, 2004; Berger, 2001), una vertiente del estudio de la regulación de la actividad del promotor α -SG recae en el análisis de dichas modificaciones en zonas específicas de esta región de regulación. En el modelo propuesto en este trabajo de tesis, se postula que MyoD, forma un complejo con la maquinaria basal de transcripción, que se localiza en forma constitutiva en el modulador, mientras que el complejo se localiza en el promotor basal α -SG únicamente en miotubos. En la explicación teórica del modelo se especula que el acceso de MyoD y los factores basales de la transcripción hacia el promotor basal en miotubos es dependiente de acetilación de histonas. Para poner a prueba esta hipótesis, se podría analizar el estado de las histonas en el promotor basal en mioblastos y miotubos C2C12. En el caso de mioblastos, como resultado se esperaría encontrar preferentemente histonas desacetiladas, así como H3 metilada en la lisina 9, modificaciones que corresponden a marcas asociadas a cromatina represora transcripcionalmente (Loidl, 1994). Por otra parte, en miotubos, se esperaría encontrar enriquecimiento de señales correspondientes a histonas acetiladas así como H3 metilada en lisina 4, modificaciones correspondientes a cromatina permisiva al proceso

transcripcional (Loidl, 1994). Se esperaría encontrar este patrón de modificaciones de histonas en la región correspondiente al modulador en mioblastos y miotubos, dado que MyoD y los factores TFIID y TFIIB se localizan constitutivamente en dicha región (Figs. 30 y 34).

En los últimos años se han descrito diversas modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación y metilación en posiciones múltiples de las histonas (Berger, 2001), sin embargo, a la fecha no es clara la participación de la combinatoria de dichas modificaciones en la regulación de la transcripción. En este contexto, el promotor α -SG, que se activa durante la diferenciación miogénica, podría ser empleado como un modelo experimental en la búsqueda de modificaciones de histonas asociadas a regiones de regulación transcripcional responsables del control de la expresión durante la diferenciación miogénica. Para abordar esta pregunta, se tendría que identificar la región o regiones responsables de la regulación diferencial del promotor mediante el análisis de actividad de construcciones con mutaciones en dicha región reguladora. Una vez identificada la secuencia de respuesta a la diferenciación, se podría realizar un mapeo de modificaciones de histonas a lo largo de la región promotora mediante inmunoprecipitación de cromatina empleando una amplia gama de anticuerpos dirigidos específicamente para cada una de las modificaciones de histonas que se deseen mapear. De esta manera se podría identificar la combinatoria de modificaciones de las histonas correspondiente a la región de respuesta a la diferenciación miogénica identificada mediante análisis funcionales de la región promotora del gen α -SG.

Análisis de la actividad del promotor α -SG *in vivo*.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el promotor α -SG es regulado positivamente durante el proceso de diferenciación muscular, y que además, la actividad del factor MyoD sobre dicho promotor es modulada por los sitios E-box1 y E-box2. Sin embargo la totalidad de los ensayos funcionales se realizaron en sistemas *in vitro*, por lo que una aportación más significativa en el campo de estudio consistiría en el análisis del patrón de expresión del promotor en un contexto *in vivo*. Para realizar un análisis de esta índole, se podría generar un ratón transgénico para un gen reportero cuya expresión sea dirigida por el promotor α -SG. Mediante esta estrategia se generó un ratón que expresa un transgén que consiste en *GFP* regulado por el promotor γ -SG, lo que permitió realizar un análisis espacio-temporal de la expresión del transgén (Noguchi S et al, 2001). Así mismo, la observación del reportero en forma simultánea a las señales fluorescentes generadas por anticuerpos dirigidos contra factores transcripcionales MyoD, permitió correlacionar la expresión del reportero con factores reguladores de la diferenciación (Noguchi S et al, 2001).

En este trabajo se observó que el elemento modulador, compuesto por los sitios E-box1 y E-box2 se conserva en ratón y humano, lo que sugiere que este elemento juega un papel en la regulación del promotor α -SG *in vivo*. Con el fin de poner a prueba esta hipótesis, se podrían generar líneas de ratones con mutaciones, ya sean deleciones o mutaciones puntuales, en la región del modulador mediante el método de "hit and run" (Hasty et al, 1991). Una vez obtenidas dichas líneas, sería posible analizar la expresión endógena del transcrito α -SG durante la embriogénesis mediante ensayos de northern blot *in situ*, y en membranas, así como durante el desarrollo postnatal. De esta manera, mediante la comparación de las cantidades de transcrito entre el ratón modificado para el modulador, y un ratón de una cepa sin modificar (wild type), se puede saber si la ausencia del modulador ocasiona cambios en la expresión del transcrito, y por ende si participa en la regulación del promotor α -SG.

REFERENCIAS

- Allamand V, Campbell KP. (2000). Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet.* 9:2459-2467.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E. (1999). Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet.* 8:1589-1598.
- Aso T, Conaway JW, Conaway RC. (1994). Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. *J Biol Chem.* 269:26575-26583.
- Barresi R, Moore SA, Stolle CA, Mendell JR, Campbell KP. (2000). Expression of gamma -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Biol Chem.* 275:38554-38560.
- Batonnet, S., Leibovitch MP, Tintignac L, Leibovitch SA. (2004). Critical role for lysine 133 in the nuclear ubiquitin-mediated degradation of MyoD. *J Biol Chem.* 279:5413-5420.
- Behrens M, Venkatraman G, Gronostajski RM, Reed RR, Margolis FL. (2000). NFI in the development of the olfactory neuroepithelium and the regulation of olfactory marker protein gene expression. *Eur J Neurosci.* 12:1372-1384.
- Berger SL. (2001). An embarrassment of niches: the many covalent modifications of histones in transcriptional regulation. *Oncogene.* 20:3007-3013.
- Berger SL. (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 12:142-8.

- Berger SL. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 12:142-8.
- Bergstrom DA, Penn BH, Strand A, Perry RL, Rudnicki MA, Tapscott SJ. (2002). Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol Cell.* 9:587-600.
- Betto R, Senter L, Ceoldo S, Tarricone E, Biral D, Salviati G. (1999). Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhelin). *J Biol Chem.* 274:7907-7912.
- Black BL, Molkentin JD, Olson EN. (1998). Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol.* 18:69-77.
- Black BL, Olson EN. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 14:167-196.
- Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, and Weintraub H. (1993). Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol.* 13: 5216-5224.
- Blobel GA, Kakajima T, Eckne R, Montminy R, Orkin SH. (1998). CREB-binding protein (CBP) cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:2061-2066.
- Bohm A, Boos W. (2004). Gene regulation in prokaryotes by subcellular relocalization of transcription factors. *Curr Opin Microbiol.* 7:151-6.
- Braun T, Arnold HH. (1995). Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO J.* 14:1176-1186.
- Braun T, Bober E, Buschhausen-Denker G, Kohtz S, Grzeschik KH, Arnold HH, Kotz S. (1989) Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *EMBO J.* 8:3617-3625.

- Braun T, Bober E, Winter B, Rosenthal N, Arnold HH. (1990) Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. *EMBO J.* 9:821-831.
- Braun t, Buschhausen-Denker G, Bober E, Tannich E, Arnold HH. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 8:701-9.
- Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH, Jaenisch R. (1992). Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell.* 71:369-82.
- Buckingham M, Cossu G. (1997). Myogenesis in the mouse embryo. *Methods Cell Biol.* 52:29-52.
- Buckingham M. (1996). Skeletal muscle development and the role of the myogenic regulatory factors. *Biochem Soc Trans.* 24:506-9.
- Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A, Felsenfeld G. (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:16433-16437.
- Campbell KP. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell.* 80:675-9.
- Caudy M, Vassin H, Brand M, Tuma R, Jan LY, Jan YN. (1988). daughterless, a Drosophila gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the achaete-scute complex. *Cell.* 55:1061-1067.
- Chan YM, Bonnemann CG, Lidov HG, Kunkel LM. (1998). Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol.* 143:2033-44.
- Chang TH, Primig M, Hadchouel J, Tajbakhsh S, Rocancourt D, Fernandez A, Kappler R, Scherthan H, Buckingham M. (2004). An enhancer directs differential expression of the linked Mrf4 and Myf5 myogenic regulatory genes in the mouse. *Dev Biol.* 269: 595-608.

- Chaudhry AZ, Lyons GE, Gronostajski RM. (1997). Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. *Dev Dyn.* 208:313-325.
- Chaudhry AZ, Vitullo AD, Gronostajski RM. (1998). Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters. *J Biol Chem.* 273:18538-18546.
- Church GM, Ephrussi A, Gilbert W, Tonegawa S. (1985). Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature.* 313:798-801.
- Cordier L, Gao GP, Hack AA, McNally EM, Wilson JM, Chirmule N, Sweeney HL. (2001). Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther.* 12:205-15.
- Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem.* 272:31221-4.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 51:987-1000.
- de la Serna IL, Carlson KA, Imbalzano AN. (2001). Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet.* 27:187-190.
- Delgado-Olguin P, Recillas-Targa F, Coral-Vazquez R. MyoD: a multifunctional myogenic master regulator. (en preparación)
- Delgado-Olguin P, Rosas-Vargas H, Recillas-Targa F, Zentella-Dehesa A, Bermudez de Leon M, Cisneros B, Salamanca F, Coral-Vazquez R. (2004). NFI-C2 negatively regulates α -sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 319:1032-1039.
- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP. (1998). Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol.* 142:1461-71.

- Dundr M, Misteli T. (2001). Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 356:297-310.
- Durbeej M, Campbell KP. (2002). Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev.* 12: 349-361.
- Durbeej M, Cohn RD, Hrstka RF, Moore SA, Allamand V, Davidson BL, Williamson RA, Campbell KP. (2000). Disruption of the beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol Cell.* 5:141-51.
- Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM. (1996). Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev.* 10:2478-90.
- Edmondson DG, Olson EN. (1990). A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev.* 4:1450.
- Emerson CP Jr. (1993). Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore. *Curr Opin Genet Dev.* 3:265-74.
- Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W. (1985). B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science.* 227:134-40.
- Ervasti JM, Campbell KP. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 66:1121-1131.
- Ervasti JM, Campbell KP. (1993). Dystrophin-associated glycoproteins: their possible roles in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy. *Mol Cell Biol Hum Dis.* 3:139-166.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature.* 345:315-9.
- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. (1997). Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem.* 272:32534-32538.

- Gao B, Kunos G. (1998). Cell type-specific transcriptional activation and suppression of the alpha1B adrenergic receptor gene middle promoter by nuclear factor 1. *J Biol Chem.* 273:31784-31787.
- Gaston K, Jayaraman PS. (2003). Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 60:721-41.
- Gerber AN, Klesert TR, Bergstrom DA, Tapscott SJ. (1997). Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev.* 11(4):436-50.
- Geyer PK, Clark I. (2002). Protecting against promiscuity: the regulatory role of insulators. *Cell Mol Life Sci.* 59:2112-27.
- Goldhamer DJ, Faerman A, Shani M, Emerson CP Jr. (1992). Regulatory elements that control the lineage-specific expression of myoD. *Science.* 256:538-542.
- Gronostajski RM. (2000). Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene.* 249:31-45.
- Hack AA, Groh ME, McNally EM. (2000). 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. (2000). Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci.* 113:2535-44.
- Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature.* 364:501-6.
- Hasty P, Ramirez-Solis R, Krumlauf R, Bradley A. (1991). Introduction of a subtle mutation into the Hox-2.6 locus in embryonic stem cells. *Nature.* 350:243-246.
- Heller H, Bengal E. (1998). TFIID (TBP) stabilizes the binding of MyoD to its DNA site at the promoter and MyoD facilitates the association of TFIIB with the preinitiation complex. *Nucleic Acids Res.* 26:2112-2119.

- Hoffman EP, Kunkel LM. (1989). Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron*. 2:1019-29.
- Holt KH, Lim LE, Straub V, Venzke DP, Duclos F, Anderson RD, Davidson BL, Campbell KP. (1998). Functional rescue of the sarcoglycan complex in the BIO 14.6 hamster using delta-sarcoglycan gene transfer. *Mol Cell*. 1:841-8.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*. 355:696-702.
- Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. (1983). Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res*. 84:202-211.
- 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 delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem*. Dec 271:32321-9.
- Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem*. 270:27305-310
- Kablar B, Asakura A, Krastel K, Ying C, May LL, Goldhamer DJ, Rudnicki MA. (1998). MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. *Biochem Cell Biol*. 76:1079-1091.
- Kablar B, Krastel K, Ying C, Asakura A, Tapscott SJ, Rudnicki MA. (1997). MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. *Development*. 124:4729-38.
- Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature*. 431:466-471.

- Kaufmann J, Ahrens K, Koop R, Smale ST, Muller R. (1998). CIF150, a human cofactor for transcription factor IID-dependent initiator function. *Mol Cell Biol.* 18:233-239.
- Kaufmann J, Verrijzer CP, Shao J, Smale ST. (1996). CIF, an essential cofactor for TFIID-dependent initiator function. *Genes Dev.* 10:873-886.
- Kosak ST, Groudine M. (2004). Gene order and dynamic domains. *Science.* 306:644-647.
- Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell.* 58:823-31.
- Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 66:305-315.
- Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell.* 66:305-15.
- Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H. (1986). Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 47:649-56.
- Leahy P, Crawford DR, Grossman G, Gronostajski RM, Hanson RW. (1999). CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)gene transcription. *J. Biol.Chem.*274:8813-8822.
- Lee TI, Young RA. (2000). Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet.* 34:77-137.
- Lee WM. (1989). The myc family of nuclear proto-oncogenes. *Cancer Treat Res.* 47:37-71.

- Letting DL, Rakowski C, Weiss MJ, Blobel GA. (2003). Formation a tissue-specific histone acetylation pattern by the hematopoietic transcription factor GATA-1. *Mol Cell Biol.* 23:1334-1340.
- Li Q, Peterson KR, Fang X, Stamatoyannopoulos G. (2002). Locus control regions. *Blood.* 100:3077-86.
- Lim LE, Campbell KP. (1998). The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol.* 11:443-52.
- Liu L, Vachon PH, Kuang W, Xu H, Wewer UM, Kylsten P, Engvall E. (1997). Mouse adhalin: primary structure and expression during late stages of muscle differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 235:227-235.
- Loidl P. (1994). Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma.* 103:441-449.
- Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell.* 77:451-9.
- Mal A, Harter ML. (2003). MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1735-1739.
- Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T. (1999). Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay?. *Cell Mol Biol* 45:751-62.
- Matsumura K, Yamada H, Saito F, Sunada Y, Shimizu T. (1997). The role of dystroglycan, a novel receptor of laminin and agrin, in cell differentiation. *Histol Histopathol.* 12:195-203.
- McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:497-504.
- 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, Hoffman EP. (1996). Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of

gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* (11):1841-1847.

- 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, Hoffman EP. (1996). Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 5:1841-1847.
- Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE, Rudnicki MA. (1996). MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* 10:1173-1183.
- Miner JH, Wold B. (1990) Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1089-1093.
- Misteli T. (2000). Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci.* 113:1841-9.
- Misteli T. 2001Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* 291:843-7.
- Molkentin JD, Olson EN. (1996). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:9366-73
- Montanaro F, Lindenbaum M, Carbonetto S. (1999). α -Dystroglycan is a laminin receptor involved in extracellular matrix assembly on myotubes and muscle cell viability. *J Cell Biol.* 145:1325-40.
- Montarras D, Lindon C, Pinset C, Domeyne P. (2000). Cultured myf5 null and myoD null muscle precursor cells display distinct growth defects. *Biol Cell.* 92:565-72.
- Muller MM, Schreiber E, Schaffner W, Matthias P. (1989) Rapid test for in vivo stability and DNA binding of mutated octamer binding proteins with mini-extracts prepared from transfected cells, *Nucleic Acids Res.*17:6420.
- Murtagh J, Martin F, Gronostajski RM. (2003). The Nuclear Factor I (NFI) gene family in mammary gland development and function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 8:241-254.

- Myers LC, Kornberg RD. (2000). Mediator of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem.* 69:729-749.
- Nabeshima Y, Hanaoka K, Hayasaka M, Esumi E, Li S, Nonaka I, Nabeshima Y. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature.* 364:532-5.
- Nehls MC, Grapillon ML, Brenner DA. (1992). NF- κ B/Sp1 switch elements regulate collagen alpha 1(I) gene expression. *DNA Cell Biol.* 11:443-452.
- Nehls MC, Rippe RA, Veloz L, Brenner DA. (1991). Transcription factors nuclear factor κ B and Sp1 interact with the murine collagen alpha 1 (I) promoter. *Mol Cell Biol.* 11:4065-4073.
- 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.* 5:1179-86.
- Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemann CG, Gussoni E, Denton PH, et al. (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science.* 270:819-22.
- Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E. (1999). Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 262:88-93.
- Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E. (2000). Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur J Biochem.* 267:640-648.
- Noguchi S, Wakabayashi-Takai E, Sasaoka T, Ozawa E. (2001). Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of gamma-sarcoglycan gene using a transgenic mouse. *FEBS Lett.* 495:77-81.
- Noguchi S, Wakabayashi-Takai E, Sasaoka T, Ozawa E. (2001). Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of gamma-sarcoglycan gene using a transgenic mouse. *FEBS Lett.* 495:77-81.

- Nowak KJ, Walsh P, Jacob RL, Johnsen RD, Peverall J, McNally EM, SD, Kakulas BA, Laing NG. (2000). Severe gamma-sarcoglycanopathy caused by a novel missense mutation and a large deletion. *Neuromuscul Disord.* 10:100-7.
- Ogata K, Sato K, Tahirov TH. (2003). Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr Opin Struct Biol.* 13:40-8.
- Olson EN, Klein WH. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 1994 8:1-8.
- Ott MO, Bober E, Lyons G, Arnold H, Buckingham M. (1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development.* 111:1097-107.
- Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. (1998). From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve.* 21:421-38.
- Ozawa E, Yoshida M, Suzuki A, Mizuno Y, Hagiwara Y, Noguchi S. (1995). Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 4:1711-6.
- Patapoutian A, Yoon JK, Miner JH, Wang S, Stark K, Wold B. (1995). Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development.* 121:3347-58.
- Peterson CL, Laniel MA. (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol.* 14:546-551.
- Piras G, El Kharroubi A, Kozlov S, Escalante-Alcalde D, Hernandez L, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Stewart CL. (2000). Zac1 (Lot1), a potential tumor suppressor gene, and the gene for epsilon-sarcoglycan are maternally imprinted genes: identification by a subtractive screen of novel uniparental fibroblast lines. *Mol Cell Biol.* 20:3308-15.
- Polesskaya A, Harel-Bellan A. (2001). Acetylation of MyoD by p300 requires more than its histone acetyltransferase domain. *J Biol Chem.* 276:44502-44513.

- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:747-83.
- Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero M. (1997). p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* 16:369-83.
- Puri PL, Sartorelli V. (2000). Regulation of Muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J Cell Physiol.* 185:155-173.
- Radojevic V, Lin S, Burgunder JM. (2000). Differential expression of dystrophin, utrophin, and dystrophin-associated proteins in human muscle culture. *Cell Tissue Res.* 300:447-57.
- Ramirez-Sanchez I, Rosas-Vargas H, Ceballos-Reyes G, Salamanca F, Coral-Vazquez RM. (2004). Expression Analysis of the SG-SSPN Complex in Smooth Muscle and Endothelial Cells of Human Umbilical Cord Vessels. *J Vasc Res.* 42:1-7.
- Rando TA. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve.* 24:1575-94.
- Razin SV, Farrell CM, Recillas-Targa F. (2003). Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level. *Int Rev Cytol.* 226:63-125.
- Remenyi A, Scholer HR, Wilmanns M. (2004). Combinatorial control of gene expression. *Nat Struct Mol Biol.* 11:812-5.
- Rhodes SJ, Konieczny SF. (1989) Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* (12B):2050-61.
- Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP. (1993). Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhelin). *J Biol Chem.* 268:23739-42.
- Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tome FM, Romero NB, et al. (1994). Missense mutations in

the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*. 78:625-33.

- Robertson KD. (2002). DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene*. 21:5361-79.
- Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S, Jaenisch R. (1992). Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development. *Cell*. 71:383-90.
- Rudnicki MA, Jaenisch R. (1995). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *Bioessays*. 17:203-9.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stead RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. (1993). MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell*. 75:1351-9.
- Ruegg UT, Gillis JM. (1999). Calcium homeostasis in dystrophic muscle. *Trends Pharmacol Sci*. 20:351-352.
- Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Seale P, Asakura A, Rudnicki MA. (1999). Reduced differentiation potential of primary MyoD^{-/-} myogenic cells derived from adult skeletal muscle. *J Cell Biol*. 144:631-643.
- Sabourin LA, Rudnicki MA. (2000). The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. 57:16-25.
- Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka 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*. 94:13873-8.
- Sandona D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R. (2004). Characterization of the ATP-hydrolysing activity of alpha-sarcoglycan. *Biochem J*. 381:105-12.
- Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*. 341:303-7.
- Schotta G, Lachner M, Peters AH, Jenuwein T. (2004). The indexing potential of histone lysine methylation. *Novartis Found Symp*. 259:22-37.

- Shu T, Butz KG, Plachez C, Gronostajski RM, Richards LJ. (2003). Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in *Nfia* knock-out mice. *J Neurosci*. 23:203-212.
- Smale ST, Kadonaga JT. (2003). The RNA polymerase II core promoter. *Annu Rev Biochem*. 72:449-79.
- Stallcup MR. (2001). Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation. *Oncogene*. 20:3014-3020.
- Steele-Perkins G, Butz KG, Lyons GE, Zeichner-David M, Kim HJ, Cho MI, Gronostajski RM. (2003). Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. *Mol Cell Biol*. 23:1075-1084.
- Steele-Perkins G, Plachez C, Butz KG, Yang G, Bachurski CJ, Kinsman SL, Litwack ED, Richards LJ, Gronostajski RM. (2005). The transcription factor gene *Nfib* is essential for both lung maturation and brain development. *Mol Cell Biol*. 25:685-698.
- Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science*. 242:405-411.
- Taylor SM, Jones PA. (1979). Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 17:771-779.
- Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, Perrin-Schmitt F. (1988). Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J*. 7:2175-2183.
- Thomas MJ, Seto E. (1999). Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?. *Gene*. 236:197-208.
- Tintignac LA, Sirri V, Leibovitch MP, Lecluse Y, Castedo M, Metivier D, Kroemer G, Leibovitch SA. (2004). Mutant MyoD lacking Cdc2 phosphorylation sites delays M-phase entry. *Mol Cell Biol*. 24:1809-1821.
- Towbin JA. (1998). The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol*. 10:131-9.

- Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA. (2000). Mutations in the human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 106:655-62.
- Valadez-Graham V, Razin SV, Recillas-Targa F. (2004). CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α -globin gene domain. *Nucleic Acids Res.* 32:1354-1362.
- Verrijzer CP, Chen JL, Yokomori K, Tjian R. (1995). Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell* 81:1115-1125.
- Villares R, Cabrera CV. (1987). The achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell.* 50:415-24.
- Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Ozawa E. (2001). Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene. *Eur J Biochem.* 268:948-957.
- Walhout AJ, van der Vliet PC, Timmers HT. (1998). Sequences flanking the E-box contribute to cooperative binding by c-Myc/Max heterodimers to adjacent binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1397:189-201.
- Wang Y, Jaenisch R. (1997). Myogenin can substitute for Myf5 in promoting myogenesis but less efficiently. *Development.* 124:2507-13.
- Wang Y, Schnegelsberg PN, Dausman J, Jaenisch R. (1996). Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature.* 379:823-5.
- Weinmann AS, Yan PS, Oberley MJ, Huang TH, Farnham PJ. (2002). Isolating human transcription factor targets by coupling chromatin immunoprecipitation and CpG island microarray analysis. *Genes Dev.* 16:235-244.
- Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benezra R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al. (1991). The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science.* 251:761-6.

- Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A, Tapscott SJ. (1991). Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev.* 5:1377-1386.
- Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM. (2002). Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 11:2147-2154.
- Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. (1989). Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell.* 56(4):607-17.
- Wyce A, Henry KW, Berger SL. (2004). H2B ubiquitylation and de-ubiquitylation in gene activation. *Novartis Found Symp.* 259:63-73.
- Xiao J, Jethanandani P, Ziober BL, Kramer RH. (2003). Regulation of alpha7 integrin expression during muscle differentiation. *J Biol Chem.* 278:49780-4978.
- Xiao X, Li J, Tsao YP, Dressman D, Hoffman EP, Watchko JF. (2000). Full functional rescue of a complete muscle (TA) in dystrophic hamsters by adeno-associated virus vector-directed gene therapy. *J Virol.* 74:1436-42.
- Yoshida M, Noguchi S, Wakabayashi E, Piluso G, Belsito A, Nigro V, Ozawa E. (1997). The fourth component of the sarcoglycan complex. *FEBS Lett.* 403:143-8.
- Yoshida M, Ozawa E. (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo).* 108:748-52.
- Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M. (1998). Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem.* 273:1583-1590.
- Zhang W, Behringer RR, Olson EN. (1995). Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes Dev.* 9:1388-99.
- Zhu X, Hadhazy M, Groh ME, Wheeler MT, Wollmann R, McNally EM. (2001). Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of sarcoglycan assembly. *J Biol Chem.* 27:21785-21790.

- Zhuang Y, Kim CG, Bartelmez S, Cheng P, Groudine M, Weintraub H. (1992). Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:12132-12136.

ANEXO

Solución de lisis (100 ml)

NH ₄ Cl (2M)	77.5 ml
KHCO ₃ (1M)	10 ml
EDTA (0.5 M)	2 ml
H ₂ O	~ 100 ml
Ajustar pH a 7.41	

Solución de desnaturalización

NaOH	0.5 M
NaCl	1.5 M

Solución de neutralización

Tris, pH 8.0	1 M
NaCl	1.5 M

Solución de pre-hibridación

EDTA	2 mM
Esperma de salmón	50 µg/ml
NaCl	900 mM
Dextran sulfato	100 µM
Polivinil pirrolidona	20 µM
Ficoll	2 µM
Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O	9.3 mM
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	15.5 mM
Formamida	40%
SDS	1%
H ₂ O	~ 2 l

Solución de hibridación

Se agrega la sonda marcada radiactivamente a la solución de hibridación.

SSC 2X

Solución de pre-hibridación	150 ml
Formamida al 50%	75 ml
PIPES 2X	30 ml de PIPES 10X
SDS	0.5%
Esperma de salmón	1.5 ml de una solución 10 mg/ml

Solución SM (1 l)

NaCl	5.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8 mM
Tris pH 7.6	50 mM
Gelatina	0.01%

NZY Top Agar

NZY broth 1 l
Agarosa 0.7%

NZY Broth (1 l)

NaCl 10 g
Tryptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
H₂O ~ 1 l
Ajustar pH a 7.5 con NaOH al 5%

LB Broth (1 l)

NaCl 10 g
Tryptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
H₂O ~ 1 l
Ajustar pH a 7.0 con NaOH 5N

APÉNDICE

ARTICULO PUBLICADO

NFI-C2 negatively regulates α -sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts.

Delgado-Olguín P, Rosas-Vargas H, Recillas-Targa F, Zentella A, Bermumez de Leon M, Cisneros B, Salamanca F, and Coral-Vázquez R.
(2004). *Biochem Biophys Res Commun.* 319(3):1032-1039.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Delgado-Olguín P.

Propuse la idea del trabajo y realicé la totalidad de los experimentos.

Rosas-Vargas H.

Contribuyó con ayuda en el tamizaje de la biblioteca genómica y en la revisión del manuscrito.

Zentella A.

Facilitó las instalaciones del cuarto de cultivo de su laboratorio, donó la línea celular C2C12 y aportó enseñanzas sobre su manutención y transfección.

Recillas-Targa F.

Facilitó las instalaciones de su laboratorio, en el que se realizó prácticamente la totalidad de los experimentos. Brindó asesoría en la planeación experimental, participó activamente en la discusión de los resultados así como en la revisión y corrección del escrito.

Bermumez de Leon M.

Aportó enseñanzas sobre la transfección de la línea celular C2C12.

Cisneros B.

Facilitó las instalaciones de su laboratorio para realizar ensayos de transfección y colaboró en la revisión del escrito.

Salamanca F.

Gestionó trámites para el apoyo económico del estudiante de Doctorado Delgado-Olguín P mediante la beca de apoyo otorgada por el IMSS, y fungió como miembro del comité tutorial.

Coral-Vázquez R.

Brindó asesoría en la planeación experimental, así como enseñanzas sobre diversas metodologías. Discutió activamente los resultados obtenidos, contribuyó en la revisión y corrección del escrito.



NFI-C2 negatively regulates α -sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts[☆]

Paul Delgado-Olguín,^{a,b} Haydeé Rosas-Vargas,^a Félix Recillas-Targa,^b Alejandro Zentella-Dehesa,^c Mario Bermúdez de León,^d Bulmaro Cisneros,^d Fabio Salamanca,^a and Ramón Coral-Vázquez^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Mexico City, Mexico

Received 21 April 2004

Available online 28 May 2004

Abstract

α -Sarcoglycan striated muscle-specific protein is a member of the sarcoglycan–sarcolemma complex. Positive and negative transcriptional regulation of sarcoglycan genes are important in sarcoglycan's intracellular localization and sarcolemma stability. In the present work we assessed the function of NFI transcription factors in the regulation of α -sarcoglycan promoter through the C2C12 cell line differentiation. NFI factors act alternatively as activators and negative modulators of α -sarcoglycan promoter activity. In myoblasts NFI-A1.1 and NFI-B2 are activators, whereas NFI-C2 and NFI-X2 are negative regulators. In myotubes, all NFI members are activators, being NFI-C2 the less potent. We identified the α -sarcoglycan promoter NFI-C2 response element by testing progressive deletion constructs and point mutations in C2C12 cells over-expressing NFI-C2. Gel-shift and chromatin immunoprecipitation experiments demonstrated that NFI factors are indeed interacting in vitro and in vivo with the binding sequence. These results suggest a NFI role in C2C12 cell differentiation.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: α -Sarcoglycan; Promoter; NFI transcription factors; Transcriptional regulation; C2C12 differentiation

α -Sarcoglycan (α -SG) is a *trans*-sarcolemma protein expressed exclusively in striated muscle [1] that forms part of the sarcoglycan–sarcolemma (SG) complex (composed by α , β , γ , δ , ϵ , and ζ -SGs and sarcolemma) [2–4], that in turn is a subcomplex of the dystrophin associated glycoproteins complex or DGC [5]. DGC is composed basically by dystrophin, dystroglycan (DG), and SG complexes [5]. SG complex associates with DG complex through δ -SG [2]. Through its amino terminus, dystro-

phin contacts filamentous actin at the cytosol [5]. It has been proposed that DGC confers sarcolemma stability by establishing a *trans*-sarcolemma bridge connecting basal lamina through α -DG and cytoskeleton through dystrophin [6]. The relevance of DGC in muscle fiber physiology is clearly demonstrated by the fact that deficiency of almost each of its components constitutes the primary cause of muscular dystrophies characterized by a wide spectrum of phenotypes [7]. In particular, mutations in α , β , δ , and γ -SG genes cause limb girdle muscular dystrophies (LGMD) 2D, 2E, 2C, and 2F types, respectively [8].

LGMD phenotypes have been studied in spontaneous mutant and knockout animal models [9]. Mice deficient for the striated muscle-specific protein γ -SG develop a muscular dystrophy similar to human LGMD2C [10].

[☆] Abbreviations: SG, sarcoglycan; DGC, dystrophin associated glycoprotein complex; DG, dystroglycan; LGMD, limb girdle muscular dystrophy; NFI, nuclear factor I; EMSA, electrophoretic mobility shift assay.

* Corresponding author. Fax: +52-55-55-88-5174.

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

The dystrophic phenotype of these mice is rescued in the tibialis anterior and gastrocnemius muscles when injected with a recombinant adenovirus expressing γ -SG or in the quadriceps of the right limb when injected with a recombinant adeno-associated virus expressing γ -SG [11]. Interestingly, over-expression of γ -SG cDNA also causes a dystrophic phenotype as shown in a mouse model over-expressing a high copy number of a cDNA encoding γ -SG mRNA. In these mice, mislocation of γ -SG protein was observed besides upregulation of α and β -SG gene expression [12]. These facts suggest that not only positive, but also negative regulation of transcriptional levels of muscle-specific expression sarcoglycan genes (α -SG and γ -SG) may play an important role in sarcolemmal stability and proper SG's cellular localization. This fine modulation must be achieved at least in part by the combinatorial action of several transcription factors regulating promoter activity [13].

The NFI family of transcription factors composed by NFI-A1.1, NFI-B2, NFI-C2, and NFI-X2 [14–17] was identified as necessary for viral replication [18], and has been also implicated in positive and negative regulation of transcriptional activity over several promoters [19–22]. Interestingly, they can stimulate or repress promoter activity depending on the cellular context [23]. NFI tissue-specific function is just beginning to be understood through the generation and study of NFI deficient murine models [24–26]. Specifically in differentiated muscle, through analysis of aldolase A gene promoter activity in transgenic cell lines, it has been reported that some isoforms of NFI induce gene expression of specific muscle fiber types [27]. NFI factors are widely transcribed, but interestingly, NFI-C2 and NFI-X2 transcripts express predominantly in skeletal muscle [28], even though no specific function has been demonstrated in this tissue, nor in the muscle cell differentiation process.

In order to assess NFI function in transcriptional regulation of α -SG promoter in undifferentiated and differentiated striated muscle cells we tested the activity of the four NFI family members over the α -SG promoter controlling the luciferase reporter gene in transient transfection assays in the mouse myoblastic cell line C2C12. We found that NFI-C2 and NFI-X2 act as α -SG promoter negative regulators in myoblasts, and as activators in myotubes, whereas NFI-A1.1 and NFI-B2 act as activators in both differentiation stages. We identified the functional DNA recognition sequence mediating transcriptional negative regulation by NFI-C2 in α -SG promoter in myoblasts by testing a series of constructs harboring progressive deletions of the promoter and by point mutation of the NFI consensus sequence. We demonstrate that this element contacts NFI proteins *in vitro* by gel-shift assays using C2C12 nuclear extracts and *in vivo* through chromatin immunoprecipitation experiments. Our results show that NFI-C2 and NFI-X2, whose mRNAs are predominantly expressed in

striated muscle, act both as negative transcriptional regulators and also as activators of α -SG muscle-specific promoter activity depending on the differentiation stage in C2C12 cells.

Materials and methods

Constructs and plasmids. FIB2194 DNA fragment containing the complete α -SG promoter and progressively deleted promoter inserts were PCR amplified from a mouse genomic clone previously isolated from a λ FIXII Genomic Library (Stratagene) that contains 5 kb upstream of exon 2 (unpublished results). FIB2194 (+4/–2189) DNA fragment was cloned into pGlow-TOPO (Invitrogen) and subcloned at *Bgl*II site of pGL3-Basic vector (Promega). Primer sequences for FIB2194 were as follows: PALFAB2A 5'-GGTGAAGCACTGTTCTTCC-3' and PALFAB1A 5'-GCCTAGCCAGTGAGTGACAG-3'. Deleted α -SG promoter inserts were generated using primers flanked by a *Bam*HI restriction site. The previously digested PCR products were cloned at the *Bgl*II site of pGL3-Basic vector to generate constructs pGL3F2, F4, F5, F7, and F8. The corresponding primer sequences were as follows: DELALFAB2 5'-CGCGGATCCA TAGGTGGCTGAACATGTGC-3', DELALFAB4 5'-CGCGGATC CTGTTAAGCCAGTTGTGACG-3', DELALFAB5 5'-CGCGGATCCCTCAGAGAGGACGGAACACA-3', DELALFAB7 5'-CGCGGATCCCTGGCTGGGATAATTCTCT-3', and DELALFAB8 5'-CGCGGATCCATACACCTGTCATCCAGCA-3'. The common reverse primer sequence used was: DELALFAB13R 5'-CGCGGATCCCTGCTAGCCAGTGAGTGAC-3'. Amplification conditions were as follows for all products: 1 cycle at 95 °C for 1 min, 30 cycles at: 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, and 72 °C 3 min, and 1 cycle at 72 °C for 7 min. Recombinant plasmid pGL3INFIMUT was generated using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to manufacturer's instructions. Primer sequence harboring mutations in the INF1 site was: INFIMUTF 5'-CCGTTCAAATTAACACA AAAATAGAGGAAGG-3'. Only the sense strand is showed. Mutations and DNA fragment integrity were confirmed by DNA sequencing. pCHA, B, C, and X vectors encoding HA-tagged NFI-A1.1, NFI-B2, NFI-C2, and NFI-X2 transcription factors, respectively, and pCH vector encoding HA-tag, used for *trans*-activation experiments, were kindly provided by Dr. Richard M. Gronostajski.

Cell culture. C2C12 cells were cultured in growing conditions in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum in a humidified atmosphere at 37 °C and 5% CO₂. Once cell confluence was reached, differentiation was induced by substituting growing medium by differentiation medium DMEM containing 1% horse serum.

Transfections. 384,000 cells corresponding to 40% confluence were seeded in 9.6 cm² culture wells. Twenty-four hours later, cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Cells were transfected with 1 μ g of each promoter construct, co-transfected with different amounts of NFI encoding vectors and 100 ng of pRL/TK (Promega) *Renilla reniformis* luciferase vector which was used for normalization. Luciferase activity in myoblasts was measured 24 h post-transfection. Replicates were induced to differentiation and luciferase activity was measured in myotubes 4 days later. Luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to manufacturer's instructions in a TD-20/20 luminometer (Turner Designs).

Nuclear extracts. C2C12 cells nuclear extracts from myoblasts were prepared as described previously [29]. Briefly, 500,000 cells were harvested, resuspended in 1 ml of PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 2 mM KH₂PO₄), and centrifuged for 15 s at 13,000 rpm in a Eppendorf bench microfuge. The pellet was resuspended in 400 μ l cold buffer A (10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 0.5 mM PMSF) and

incubated on ice for 15 min. After adding 25 μ l of 10% NP-40 (Fluka), the mix was vortexed for 10 s and centrifuged at 13,000 rpm in a Eppendorf microfuge for 30 s. The pellet was resuspended in 50 μ l cold buffer C (20 mM Hepes, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF) and incubated at 4 °C for 15 min on a rotation wheel. The extracts were centrifuged at 8000 rpm for 5 min in a Eppendorf microfuge. The supernatant was -70 °C frozen or used for gel-shift and super-shift assays. Protein concentration was determined by the Bradford assay (Bio-Rad).

EMSA and super-shift assays. Complementary oligonucleotides used as probes including the consensus recognition sequence of NFI, designated as 1NFI (Fig. 3) were end labeled with 1 U of T4 polynucleotide Kinase (Fermentas) in presence of 1 μ Ci [γ - 32 P]ATP (Amersham) at 37 °C for 30 min. Oligonucleotides were annealed and purified by polyacrylamide gel electrophoresis. Five micrograms of nuclear extracts protein was incubated with 20,000 cpm of probe on ice for 15 min and 15 min at room temperature in a final volume of 20 μ l gel-shift buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 50 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1 mM DTT, and 1 μ g poly(dI-dC) as non-specific competitor). For competition experiments, nuclear extracts were first incubated with 300 ng of unlabeled probe and later with the labeled probe under the same conditions. For super-shift assays, nuclear extracts were incubated with 2 μ g of anti-NFI antibody (N-20 Santa Cruz Biotechnology), or 2 μ g of a rabbit anti-goat HRP-conjugated IgG (Zymed) as non-specific antibody, in rotation for 12 h at 4 °C. Complexes were then incubated with the labeled probe. Samples were electrophoresed in a 5% polyacrylamide gel at 150 V for 2.5 h. Gel was dried and exposed to a radiographic film. Oligonucleotide sequences used as probes were as follows: 1NFIF 5'-CCGTTCAAATTGGCCA CAAACATAGAGGAAGG-3' and INFIMUT 5'-CCGTTCAAATT AAACACAAAATAGAGGAAGG-3'. The first primer corresponds to the wild-type probe and the last one was used as mutant competitor. Only the sense strands are showed.

Chromatin immunoprecipitation assay. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed as previously described [30] with slight modifications. Briefly, 2×10^7 cells were harvested to be used with each antibody and resuspended in ChIP lysis buffer (5 mM Hepes, pH 8.0, 8 mM KCl, 0.5% NP-40 plus protein inhibitors PMSF, aprotinin, and leupeptin). Nuclei were isolated, lysed, and cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. An average of 500 bp chromatin fragments were obtained by sonication. Chromatin fragments interacting with NFI factors were immunoprecipitated using an anti-NFI antibody (N-20 Santa Cruz Biotechnology). Cross-linking was reversed at 65 °C overnight, DNA was recovered after Rnase I and proteinase K treatment, phenol chloroform extracted, and used as template to amplify by PCR a 580 bp DNA fragment including the 1NFI recognition element. Primer sequences were as follows: 1NFIF, 5'-AGTCTAGG GATGTTGGTGTG-3' and INFIR, 5'-GTCTGCATACAAGAGG AAGG-3'. As negative control, a 139 pb DNA fragment of exon four of α -SG gene was PCR amplified. Oligonucleotide sequences used were as follows: α -SGE4F, 5'-ACTGTCCGACTCACCTACCA-3' and α -SGE4R, 5'-TGACTTGGTACCCACGATCT-3'. These oligonucleotides were end labeled under the conditions mentioned before. PCR cycling conditions were as follows for both DNA fragments: 1 cycle at 95 °C for 1 min, 30 cycles at 95 °C 1 min, 61 °C 1 min, and 72 °C 1 min, and 1 cycle at 72 °C for 7 min.

Results

NFI family of transcription factors positively and negatively regulates α -SG promoter activity

In order to address the function of NFI transcription factors in muscle cell differentiation over α -SG pro-

motor, whose mRNA has only been detected in striated muscle [1], NFI cDNA *trans*-activation assays were performed. The plasmid containing the entire 2.2 kb α -SG promoter driving the expression of the luciferase reporter gene was co-transfected with 200 ng of each NFI cDNA in the C2C12 muscle derived cell line. Luciferase reporter activity was evaluated in transiently transfected myoblasts and myotubes. We observed that in myotubes, α -SG promoter activity was 6-fold higher than in myoblasts (Fig. 1), consistent with the fact that α -SG gene transcript is naturally more abundant at this differentiation stage [31,32]. Surprisingly we found that NFI-C2 and NFI-X2 act as negative regulatory factors in myoblasts (Fig. 1A), decreasing reporter activity 0.37- and 0.19-fold, respectively, whereas NFI-A1.1 and NFI-B2 act as positive regulators, both increasing activity 0.18-fold. In contrast, in myotubes, all factors positively stimulated promoter activity (Fig. 1B). When NFI-A1.1, NFI-B2, and NFI-X2 cDNAs were co-transfected, a 3.3-, 3.6-, and 3.9-fold activation was observed, respectively, although NFI-C2 increases only 2.1-fold. These results show that NFI family of transcription factors act differentially over α -SG promoter activity depending on the differentiation stage of C2C12 cells, being NFI-C2 the most prominent α -SG promoter negative modulator in myoblasts.

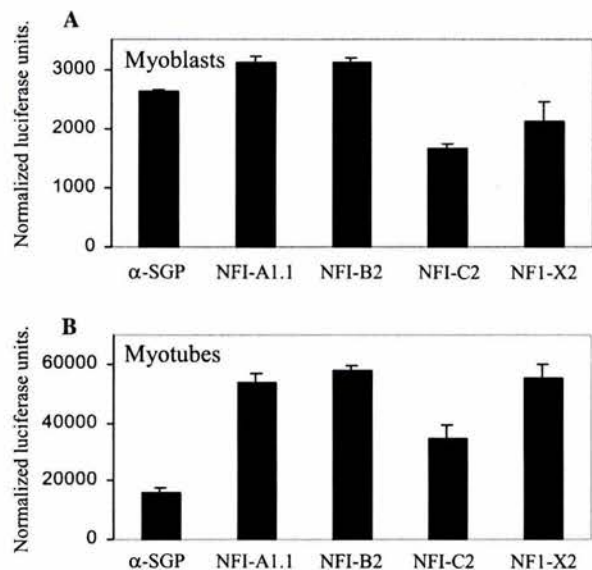


Fig. 1. Transcriptional effect of NFI transcription factors over the α -sarcoglycan gene promoter. C2C12 cells were transiently co-transfected with 1 μ g pGL3F1B2194 (+4/-2193) containing the complete promoter (α -SGP) and 200 ng of the plasmids encoding the NFI transcription factors indicated below (A) and (B). Luciferase activity measured in myoblasts (A) and myotubes (B) α -SGP corresponds to the α -SG promoter co-transfected with pCH which encodes an HA-tag. Normalized luciferase units are shown. A representative experiment of three performed in duplicate is shown. SE are presented in this and following figures.

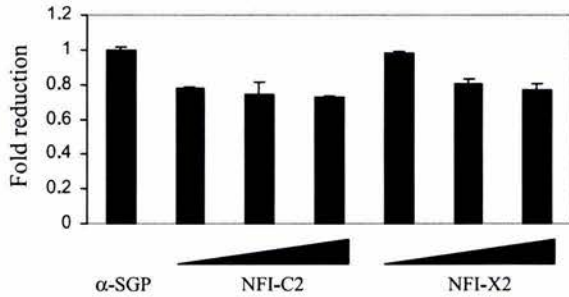


Fig. 2. NFI-C2 and NFI-X2 are negative modulators of α -SG promoter activity. Construct pGL3F1B2194 containing the complete promoter (α -SGP) was co-transfected with 50, 100, and 200 ng of the plasmids encoding the NFI factors indicated below. Fold reduction is shown. The graph represents an average of three independent experiments performed in duplicate.

NFI-C2 and NFI-X2 act as α -SG promoter negative regulators in myoblasts

There are evidences suggesting that transcriptional negative modulation is relevant in controlling the appropriated SG gene expression [12]. This regulation could be achieved in part by the combinatorial action of transcription factors [13]. Our *trans*-activation assays show that NFI-C2 and NFI-X2 influence negatively the

α -SG promoter in myoblasts. With the aim to confirm their negative modulation over α -SG promoter, we co-transfected the complete α -SG promoter construct with 50, 100, and 200 ng NFI-C2 and NFI-X2 cDNAs. We found a decrease in luciferase activity with the co-transfected cDNAs (Fig. 2). Luciferase activity decrement was observed with 50 ng NFI-C2 transfected cDNA, whereas with the same quantity of NFI-X2 cDNA, there was practically no effect. These results confirm the NFI-C2 and NFI-X2 negative activity over α -SG promoter. We conclude that NFI-C2 and NFI-X2 are negative modulators of α -SG promoter activity in C2C12, being NFI-C2 the NFI most prominent negative modulator in myoblasts.

NFI-C2 negatively regulates α -SG promoter through the 1NFI site

Since we found that NFI-C2 factor is the most active negative regulator or modulator of the NFI family of transcription factors over α -SG promoter in myoblasts, we decided to analyze the promoter sequence in order to identify the negative responsive element of NFI-C2. Through comparing the full-length promoter sequence with MatInspector V2.2 database [33] we identified six putative consensus binding motifs for NFI. To

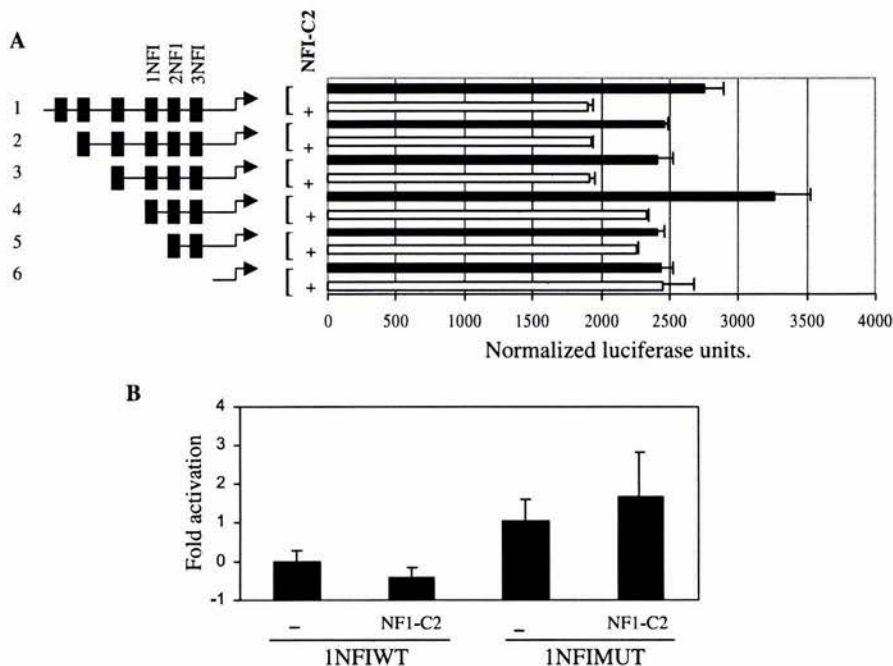


Fig. 3. NFI-C2 regulates α -SG promoter through the 1NFI recognition sequence. (A) NFI-C2 transcriptional activity over pGL3F1B2194, containing the complete α -SG promoter (construct 1), and the promoter progressively deleted constructs pGL3F2, F4, F5, F7, and F8 (constructs 2–6, respectively) were tested. Schematic representations of NFI recognition element positions at the tested constructs are shown as black boxes. Sites 1NFI, 2NFI, and 3NFI are indicated above. Open bars correspond to luciferase values of NFI-C2 co-transfected constructs (+). (B) 1NFI site mediates NFI-C2 negative modulation activity over α -SG promoter. C2C12 myoblasts were co-transfected with constructs pGL3F5 WT (INFIWT) or pGL3 F5 mutant for 1NFI site (INFIMUT), with pCH (–) or NFI-C2 (NFI-C2) encoding for an HA-tag, and NFI-C2 cDNA, respectively. Fold activation over INFIWT is observed. The average of three independent experiments performed in duplicate is shown.

demonstrate the contribution of those motifs over the α -SG promoter we transiently co-transfected in myoblasts a series of promoter constructs with progressive deletions spanning the NFI binding sequences identified, with 200 ng NFI-C2 cDNA (Fig. 3A). Negative effect of NFI-C2 over-expression persisted in constructs 1, 2, 3, and 4 in Fig. 3A. When the designated 1NFI site was deleted in construct 5, luciferase activity reached almost the same level of the observed for the non cDNA co-transfected construct (Fig. 3A, construct 5). When 2NFI and 3NFI sites were deleted in construct 6, we observed no effect of NFI-C2 (Fig. 3A, construct 6). These results suggest that NFI-C2 negatively modulates α -SG promoter activity mainly through the 1NFI site, and that 2NFI and 3NFI site contribution is minor or absent.

To confirm the involvement of 1NFI site in NFI-C2 negative modulation of α -SG promoter, we tested in transiently transfected myoblasts the NFI-C2 activity over construct 4 in which 6 nucleotide substitutions at the 1NFI site were incorporated (1NFIMUT) (Fig. 3B). Co-transfection of α -SG promoter construct 5 (1NFIWT) with 300 ng NFI-C2 cDNA induced a 0.4-fold decrease in reporter activity (Fig. 3B), consistent with the observed negative effect of the nuclear factor over α -SG promoter activity (Figs. 1 and 2). Mutation of 1NFI site (1NFIMUT) relieved the repressive effect of NFI-C2 and induced a 1-fold activity increment, confirming that this site constitutes a negative α -SG promoter activity modulator in myoblasts (Fig. 3B). Altogether these results confirm that NFI-C2 can negatively modulate the α -SG promoter activity through the 1NFI binding sequence in C2C12 myoblasts.

NFI transcription factors interact with 1NFI site in vitro and in the chromatin context

We have shown that 1NFI site contributes to the negative activity of NFI-C2 over α -SG promoter. We decided to address the capacity of this factor to bind in vitro and in vivo to such sequence. We first carried out gel-shift and super-shift assays using a probe corresponding to the 1NFI sequence (1NFIWT) in the presence of C2C12 myoblast nuclear extracts (Fig. 4). Competition experiments were performed using as unlabeled oligonucleotide competitors, the 1NFI oligonucleotide containing the WT 1NFI site sequence (WT) and the mutant sequence 1NFIMUT (MUT) containing six nucleotide substitutions in 1NFI site (Fig. 4A). The gel-shift assays show that 1NFI wild-type probe (WT) forms a specific retarded complex, which is self-competed with the unlabeled 1NFIWT sequence (Fig. 4A). The formation of this complex was not competed when 1NFIMUT sequence was used as competitor (Fig. 4, compare lanes 3, 4, and 5), confirming a nuclear factor interaction with the 1NFI sequence. In order to know if a NFI-family member of transcription factors interacts

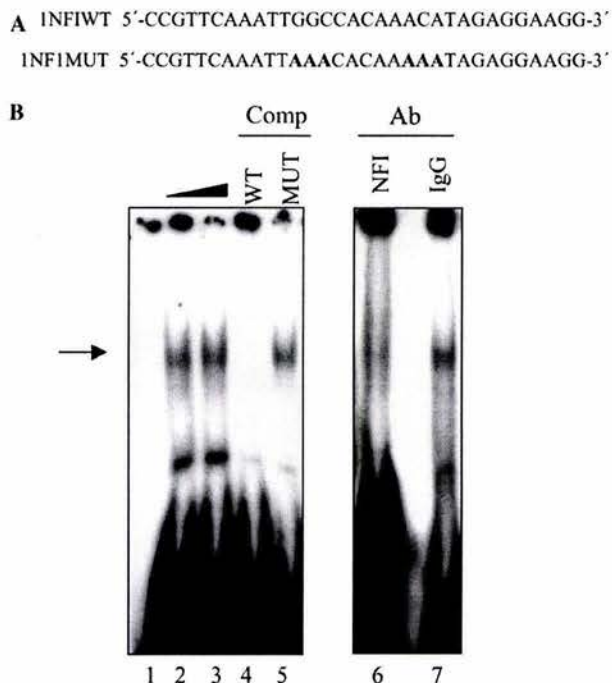


Fig. 4. 1NFI site recognizes NFI transcription factors in vitro. Gel-shift and super-shift assays for NFI-C2 responsive element 1NFI. (A) sequence of the wild-type probe (1NFIWT) containing the 1NFI site, and the mutant sequence (1NFIMUT) used as unlabeled competitor. Mutations introduced are shown in bold. (B) Lane 1 corresponds to free probe. Lanes 2 and 3 correspond to increasing amounts of C2C12 myoblast protein nuclear extracts (5 and 10 μ g, respectively) incubated with probe. In lanes 4 and 5, the competition of the complex by 1NFI probe (WT) and not by 1NFI mutant (MUT) unlabeled competitors is shown, respectively. Lanes 6 and 7 show the competition of the complex by the presence of 1 μ g NFI antibody and not by the same amount of an unspecific antibody (IgG), respectively.

with the 1NFI motif, we performed super-shift assays by pre-incubating myoblast nuclear extracts with a NFI-specific antibody, capable of recognizing all NFI members. We observed that the presence of the NFI antibody abolishes the formation of the retarded complex (Fig. 4B, lane 6). In contrast, the retarded complex remains intact when nuclear extracts were pre-incubated with an unspecific antibody (IgG) (Fig. 4B, IgG lane 7). These results suggest that NFI family members of transcription factors interact with 1NFI site of α -SG promoter in vitro.

To confirm such interaction we decided to test the presence in vivo of NFI family members of transcription factors at the 1NFI site, in the context of C2C12 myoblast's chromatin structure through ChIP assays. We amplified a DNA sequence containing the 1NFI (1NFI) site and as negative control a portion of α -SG exon 4 (α -SGE4) using as templates the antibody unbound and bound fractions of immunoprecipitated chromatin from C2C12 myoblasts. We detected an amplification product corresponding to a DNA fragment containing the NFI site from bound and unbound chromatin

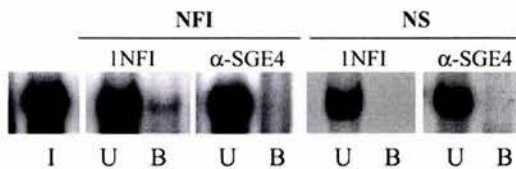


Fig. 5. NFI bind the 1NFI sequence in vivo. Chromatin immunoprecipitation assay using a NFI transcription factors specific polyclonal antibody to amplify a DNA fragment around the 1NFI site. An 1NFI site containing DNA fragment (1NFI) and a portion of α -SG exon 4 (α -SGE4) were PCR amplified from input (I) DNA, the unbound (U), and bound (B) chromatin fractions immunoprecipitated with an NFI (NFI) or an unspecific antibody (NS). The data are representations of two independent experiments.

immunoprecipitated fractions with the NFI (NFI) antibody, suggesting that NFI interacts with the 1NFI site in vivo (Fig. 5). We were not able to detect the amplification product corresponding to the α -SG exon four, suggesting the specificity for the NFI binding at the 1NFI containing DNA region. In addition, no amplification products were detected from the bound fraction of chromatin immunoprecipitated with an unrelated antibody (NS). These results show that a member or members of the NFI family of transcription factors in vivo bind the 1NFI site, responsible for mediating the NFI-C2 negative modulation effect over the α -SG promoter activity.

Discussion

Tissue-specific transcriptional regulation can be addressed through a variety of approaches depending on the level of regulation of interest, such as combinatorial activities of transcription factors or chromatin structure mediated regulation. The elemental level of transcriptional regulation approach corresponds to the structural and functional characterization of a promoter region, besides of the assessment of the activity of particular transcription factors through their recognition sites driving expression specificity. These approaches could serve as the bases for further understanding of more complex transcriptional regulation mechanisms such as chromatin remodeling. Our interest in analyzing the α -SG promoter is highlighted by recent experimental data showing the relevance and contribution of promoter architecture and nuclear factor interactions on highly regulated responses [34]. We addressed the transcriptional regulation of the mouse α -SG muscle-specific promoter dissecting its activity and focusing our attention on the NFI family of transcription factor activity over this regulatory region in the mouse muscle derived cell line C2C12, capable of differentiating in vitro. In this model system and through NFI over-expression by transient co-transfection assays we assessed the differential activities

of the family of transcription factors over α -SG promoter in myoblast and myotube C2C12 differentiation stages. We found that NFI-A1.1 and NFI-B2 are α -SG promoter activators in myoblasts, whereas NFI-C2 and NFI-X2 are negative modulators. In contrast, in myotubes all NFI members behave like activators. Through transiently transfecting a series of α -SG promoter deletion constructs and site directed mutagenesis we identified the NFI recognition site mediating NFI-C2 negative activity over α -SG promoter, and demonstrate that it binds NFI nuclear factors in vitro and in vivo through DNA-protein interaction and chromatin immunoprecipitation assays, respectively.

In order to understand the differential activity of the NFI family of transcription factors over α -SG promoter over the C2C12 differentiation process, we performed NFI factors over-expression assays. We found at first instance that α -SG promoter is six times more active at the myotube stage versus myoblast. This observation is consistent with a previous report showing that α -SG transcript is more abundant at myotubes [31]. The activity of a 1.5 kb DNA fragment containing α -SG promoter regulating luciferase reporter gene expression is also more active in C2/4 myotubes versus myoblasts [32]. These observations suggest that there should be differential regulatory activities driving the α -SG expression through C2C12 differentiation. Our results support the idea that the members of the NFI family of transcription factors could play differential roles in regulating α -SG promoter activity during differentiation since NFI-C2 and NFI-X2 act as α -SG promoter negative activity modulators in myoblasts, whereas in myotubes they act as activators.

It is well established that promoter activity can be modulated in different ways, but one interesting aspect that remains unanswered is if the relative abundance of distinct members of the NFI family of transcription factors during C2C12 cell differentiation lead to highly specific and regulated responses.

Another scenario is that differential regulation is conditioned by NFI co-activator or co-repressor association. Since α -SG expression rises in myotubes, it is possible that a repressive chromatin structure keeps low promoter activity in myoblasts, and in myotubes is activated through recruitment of chromatin remodelers like histone acetyltransferase, as observed for myogenin promoter, where MyoD attracts chromatin remodeling activities [35]. The possibility of NFI involvement in recruiting histone modification and/or chromatin remodeling activities to α -SG promoter is based on several facts: that NFI-C interacts through its C-terminal domain to the histone acetyltransferase CBP [36] and to TAF55, which in turns interacts with Sp1 and YY1 transcription factors [37]. Sp1 is known to interact with the SWI/SNF-like chromatin remodeling BAF complex, involved in cell proliferation and differentiation [38].

YY1 transcription factor influences transcription positively and negatively through recruitment of histone deacetylases and histone acetyltransferases [39]. More recently, it has been demonstrated that YY1 attracts a specific H4 (Arg3) methyltransferase through active promoters [40]. In addition, YY1 has been identified as part of the Polycomb group of proteins that maintain stable and heritable gene repression during embryogenesis in *Drosophila* [41]. Furthermore, it has been shown that NFI factor is required for the association of BRG1 chromatin remodeling complex to the mouse mammary tumor virus promoter [22]. All these evidences support that NFI can directly or indirectly regulate its recognizing promoters through a wide spectrum of interactions that could explain the activities that NFI displays in particular circumstances over different promoters [19–22].

Here we found that NFI-C2 and NFI-X2 act as negative modulators of α -SG promoter activity. Mainly, NFI have been proposed to repress promoter activity through competition with Sp1 for the interaction with its DNA binding sequence [42,43]. The fact that NFI regulate promoter activity through interactions with co-repressors has been proposed [44], however, there are no strong confirming evidences. It is possible that NFI-C2 and NFI-X2 participate in keeping low α -SG activity in C2C12 myoblasts since they negatively modulate the promoter in this stage and become activators in myotubes. An interesting observation is the presence of Sp1 recognition elements close to INFI site, raising the possibility that a competition mechanism could participate in NFI-C2 and NFI-X2 mediated α -SG promoter activity negative modulation, although Sp1 interaction's functional influence and effect over promoter activity remain to be tested.

Muscle-specific promoters are regulated by the MyoD family of transcription factors that recognize the consensus sequence CANNTG also known as E box [45]. A search for DNA transcription factor-recognition sequences for proteins for which cooperative binding exists with the MyoD family member myogenin revealed that NFI recognition sites are frequently found near E boxes [46]. This observation raises the possibility of MyoD and NFI to cooperate in transcriptional regulation of muscle-specific promoters. This seems to be relevant since we have identified E boxes near the identified putative NFI binding sites in the α -SG promoter. This may represent a link between NFI and muscle-specific promoter activity regulation through differentiation, since MyoD family of transcription factors is known to regulate this process [47]. The results presented in this work constitute to our knowledge, the first attempt to define the NFI family of transcription factors' contribution over muscle-specific promoters activity through muscle cells differentiation.

Acknowledgments

P. Delgado-Olguín is a Ph.D. student supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through the Grant 158524, by the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM, and by the IMSS fellowship award. We gratefully acknowledge funding support from Association Française contre les Myopathies (Grant MNM 2000 Group 1). This work was partially supported by CONACyT (Grant 33863-N and 42653-Q), PAPIIT-DGAPA (IN203200 and IN209403), The Third World Academy of Sciences (TWAS, Grant 01-055RG/BIO/LA), and the Fundación Miguel Alemán to F.R.T. We thank Georgina Guerrero Avendaño for excellent technical assistance.

References

- [1] S.L. Roberds, R.D. Anderson, O. Ibraghimov-Beskrovnyaya, K.P. Campbell, Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhelin), *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 23739–23742.
- [2] Y.M. Chan, C.G. Bonnemann, H.G. Lidov, L.M. Kunkel, Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 2033–2044.
- [3] A.J. Ettinger, G. Feng, J.R. Sanes, Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32534–32538.
- [4] M.T. Wheeler, S. Zarnegar, E.M. McNally, Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy, *Hum. Mol. Genet.* 11 (2002) 2147–2154.
- [5] 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.
- [6] R.D. Cohn, K.P. Campbell, Molecular basis of muscular dystrophies, *Muscle Nerve* 23 (2000) 1456–1471.
- [7] F. Sciandra, M. Bozzi, M. Bianchi, E. Pavoni, B. Giardina, A. Brancaccio, Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin–glycoprotein complex, *Ann. Ist. Super. Sanita* 39 (2003) 173–181.
- [8] A.A. Hack, M.E. Groh, E.M. McNally, Sarcoglycans in muscular dystrophy, *Microsc. Res. Tech.* 48 (2000) 167–180.
- [9] M. Durbeej, K.P. Campbell, Muscular dystrophies involving the dystrophin–glycoprotein complex: an overview of current mouse models, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12 (2002) 349–361.
- [10] A.A. Hack, C.T. Ly, F. Jiang, C.J. Clendenin, K.S. Sigrist, R.L. Wollmann, E.M. McNally, Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin, *J. Cell Biol.* 142 (1998) 1279–1287.
- [11] L. Cordier, A.A. Hack, M.O. Scott, E.R. Barton-Davis, G. Gao, J.M. Wilson, E.M. McNally, H.L. Sweeney, Rescue of skeletal muscles of gamma sarcoglycan-deficient mice with adeno associated virus-mediated gene transfer, *Mol. Ther.* 1 (2000) 119–129.
- [12] X. Zhu, M. Hadhazy, M.E. Groh, M.T. Wheeler, R. Wollmann, E.M. McNally, Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of Sarcoglycan assembly, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21785–21790.
- [13] B. Lemon, R. Tjian, Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control, *Genes Dev.* 14 (2000) 2551–2569.
- [14] R.A. Rupp, U. Kruse, G. Multhaup, U. Gobel, K. Beyreuther, A.E. Sippel, Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 2607–2616.
- [15] C. Santoro, N. Mermod, P.C. Andrews, R. Tjian, A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and

- DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs, *Nature* 334 (1988) 218–224.
- [16] G. Paonessa, F. Gounari, R. Frank, R. Cortese, Purification of a NFI-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA, *EMBO J.* 7 (1988) 3115–3123.
- [17] M. Meisterernst, L. Rogge, R. Foeckler, M. Karaghiosoff, E.L. Winnacker, Structural and functional organization of a porcine gene coding for nuclear factor I, *Biochemistry* 28 (1989) 8191–8200.
- [18] K. Nagata, R.A. Guggenheimer, T. Enomoto, J.H. Lichy, J. Hurwitz, Adenovirus DNA replication in vitro: identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 6438–6442.
- [19] L. Pan, S.T. Glenn, C.A. Jones, R.M. Gronostajski, K.W. Gross, Regulation of renin enhancer activity by nuclear factor I and Sp1/Sp3, *Biochim. Biophys. Acta* 1625 (2003) 280–290.
- [20] S. Majumder, K. Ghoshal, R.M. Gronostajski, S.T. Jacob, Downregulation of constitutive and heavy metal-induced metallothionein-I expression by nuclear factor I, *Gene Expr.* 9 (2001) 203–215.
- [21] C.S. Song, M.H. Jung, P.C. Supakar, B. Chatterjee, A.K. Roy, Negative regulation of the androgen receptor gene promoter by NFI and an adjacently located multiprotein-binding site, *Mol. Endocrinol.* 13 (1999) 1487–1496.
- [22] P.B. Hebbar, T.K. Archer, Nuclear factor I is required for both hormone-dependent chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 887–898.
- [23] A.Z. Chaudhry, A.D. Vitullo, R.M. Gronostajski, Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18538–18546.
- [24] T. Shu, K.G. Butz, C. Plachez, R.M. Gronostajski, L.J. Richards, Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in Nfia knock-out mice, *J. Neurosci.* 23 (2003) 203–212.
- [25] G. Steele-Perkins, K.G. Butz, G.E. Lyons, M. Zeichner-David, H.J. Kim, M.I. Cho, R.M. Gronostajski, Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 1075–1084.
- [26] L. das Neves, C.S. Duchala, F. Tolentino-Silva, M.A. Haxhiu, C. Colmenares, W.B. Macklin, C.E. Campbell, K.G. Butz, R.M. Gronostajski, F. Godinho, Disruption of the murine nuclear factor I-A gene (Nfia) results in perinatal lethality, hydrocephalus, and agenesis of the corpus callosum, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 11946–11951.
- [27] F. Spitz, M. Salminen, J. Demignon, A. Kahn, D. Daegelen, P. Maire, A combination of MEF3 and NFI proteins activates transcription in a subset of fast-twitch muscles, *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 656–666.
- [28] A.Z. Chaudhry, G.E. Lyons, R.M. Gronostajski, Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development, *Dev. Dyn.* 208 (1997) 313–325.
- [29] M.M. Muller, E. Schreiber, W. Schaffner, P. Matthias, Rapid test for in vivo stability and DNA binding of mutated octamer binding proteins with 'mini-extracts' prepared from transfected cells, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 6420.
- [30] V. Valadez-Graham, S.V. Razin, F. Recillas-Targa, CTCF dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α -globin gene domain, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 1354–1362.
- [31] S. Noguchi, E. Wakabayashi, M. Imamura, M. Yoshida, E. Ottawa, Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262 (1999) 88–93.
- [32] E. Wakabayashi-Takai, S. Noguchi, E. Ozawa, Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 948–957.
- [33] K. Quandt, K. Frech, H. Karas, E. Wingender, T. Werner, MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 4878–4884.
- [34] S.T. Smale, Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation, *Genes Dev.* 15 (2001) 2503–2508.
- [35] A. Mal, M.L. Harter, MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100 (2003) 1735–1739.
- [36] P. Leahy, D.R. Crawford, G. Grossman, R.M. Gronostajski, R.W. Hanson, CREB binding protein coordinates the function of multiple transcription factors including nuclear factor I to regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 8813–8822.
- [37] C.M. Chiang, R.G. Roeder, Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators, *Science* 267 (1995) 531–536.
- [38] H. Liu, H. Kang, R. Liu, X. Chen, K. Zhao, Maximal induction of a subset of interferon target genes requires the chromatin-remodeling activity of the BAF complex, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 6471–6479.
- [39] M.J. Thomas, E. Seto, Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key?, *Gene* 236 (1999) 197–208.
- [40] N. Rezaei-Zadeh, X. Zhang, F. Namour, G. Fejer, Y.D. Wen, Y.L. Yao, I. Gyory, K. Wright, E. Seto, Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1, *Genes Dev.* 17 (2003) 1019–1029.
- [41] L. Atchison, A. Ghias, F. Wilkinson, N. Bonini, M.L. Atchison, Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo, *EMBO J.* 22 (2003) 1347–1358.
- [42] M.C. Nehls, R.A. Rippe, L. Veloz, D.A. Brenner, Transcription factors nuclear factor I and Sp1 interact with the murine collagen alpha I (I) promoter, *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991) 4065–4073.
- [43] M.C. Nehls, M.L. Grapillon, D.A. Brenner, NFI/Sp1 switch elements regulate collagen-alpha (i) gene expression, *DNA Cell. Biol.* 11 (1992) 443–452.
- [44] R.M. Gronostajski, Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development, *Gene* 249 (2000) 31–45.
- [45] A.B. Lassar, J.N. Buskin, D. Lockshon, R.L. Davis, S. Apone, S.D. Hauschka, H. Weintraub, MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer, *Cell* 58 (1989) 823–831.
- [46] W.D. Funk, W.E. Wright, Cyclic amplification and selection of targets for multicomponent complexes: myogenin interacts with factors recognizing binding sites for basic helix-loop-helix, nuclear factor I, myocyte-specific enhancer-binding factor 2, and COMPI factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 9484–9488.
- [47] M.E. Pownall, M.K. Gustafsson, C.P. Emerson Jr., Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 18 (2002) 747–783.

ARTICULO ENVIADO

MyoD *trans*-activation potential modulation by α -sarcoglycan E-boxes during myogenic differentiation.

Delgado-Olguín P, Rosas-Vargas H, Recillas-Targa F, Salamanca F, and Coral-Vázquez R. (2005).

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Delgado-Olguín P.

Participé en la planeación experimental y realicé la totalidad de los experimentos.

Recillas-Targa F.

Facilitó las instalaciones de su laboratorio, en el que se realizó gran parte de los experimentos. Brindó asesoría en la planeación experimental, participó activamente en la discusión de los resultados así como en la revisión y corrección del escrito.

Rosas-Vargas H.

Contribuyó con ayuda en el tamizaje de la biblioteca genómica, en la discusión de resultados y en la revisión del manuscrito.

Salamanca F.

Gestionó trámites para el apoyo económico del estudiante de Doctorado Delgado-Olguín P mediante la beca de apoyo otorgada por el IMSS, y fungió como miembro del comité tutorial.

Coral-Vázquez R.

Propuso la idea del trabajo. Parte de los experimentos se realizaron en su laboratorio. Brindó asesoría en la planeación experimental, así como con enseñanzas sobre diversas metodologías. Discutió activamente los resultados obtenidos, contribuyó en la revisión y corrección del escrito.

MyoD *trans*-activation potential modulation by α -sarcoglycan E-boxes during myogenic differentiation

Paul Delgado-Olguín^{1,2}, Félix Recillas-Targa², Haydeé Rosas-Vargas¹, Fabio Salamanca¹
and Ramón Coral-Vázquez^{1*}.

¹ Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S. XXI-IMSS. Ciudad de México, México.

² Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

* To whom correspondence should be addressed: Ramón Coral-Vázquez, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc No. 3 30, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, México D.F. 06725, México. E. mail: rmcoralv@prodigy.net.mx Tel: (5255)-56276941. Fax: (5255)-55885174.

ABSTRACT

MyoD exerts differential activities over muscle promoters regulating myogenesis, implying that its *trans*-activation potential must be modulated to achieve a specific activity. We identified two negative regulatory E-boxes that modulate the MyoD *trans*-activation potential over α -sarcoglycan core promoter during C2C12 cells differentiation. *In vitro*, E-box2, conserved in mouse and human binds MyoD and myogenin, and its ablation relieves MyoD *trans*-activation potential modulation over α -sarcoglycan promoter. Moreover, substitution of conserved E-box2 central and flanking nucleotide tracts abolish MyoD binding and the *trans*-activation modulation effect. Chromatin immunoprecipitation experiments revealed that in C2C12 myoblasts, MyoD, TFIID and TFIIB factors that interact in a protein complex, locate at the modulator element, whereas in myotubes locate at both the modulator and core promoter. We propose a model in which MyoD *trans*-activation potential over α -sarcoglycan promoter is in part regulated through MyoD and basal transcription machinery preferential binding to the modulator element, composed by E-box1 and E-box2, over the core promoter. Our observations suggest that MyoD contributes to the α -SG promoter regulation through targeting general transcription factors to a muscle promoter modulator element. In addition, this model constitutes an explanation for the differential regulatory activities displayed by MyoD during myogenic differentiation in a promoter specific manner.

INTRODUCTION

The dystrophin associated glycoprotein complex (DGC) establishes a *trans*-sarcolemmal bridge, contacting laminin at extra cellular matrix through α -dystroglycan and actin at cytoskeleton through dystrophin (1). Deficiency of most of the components of DGC causes heterogeneous muscular dystrophies (2). Sarcoglycan-sarcospan DGC subcomplex, composed by α , β , γ , δ , ϵ , ζ -sarcoglycans (SG) and sarcospan is expressed during muscle differentiation (3, 4, 5). γ and ζ -SGs are expressed at striated and smooth muscles (6, 5), ϵ , β and δ -SGs are broadly expressed, whereas α -SG has been detected exclusively in striated muscle (7). Primary deficiency of either α , β , γ or δ -SG causes limb girdle muscular dystrophies 2D, 2E, 2C and 2F, respectively (1, 8), and transgenic mice over-expressing γ -SG develop a severe muscular dystrophy (9). These evidences suggest that not only positive, but also negative modulation of SGs expression is important for proper muscle physiology. α -SG expression is regulated at the transcription level as suggested by the enrichment of the mRNA at terminal differentiation of the C2/4 muscle cell line, which is a subclone derived from C2C12 cells (10). α and γ -SG promoters stimulate reporters expression during differentiation of C2/4 cells, moreover γ -SG promoter is *trans*-activated by MyoD (11).

Myogenesis is controlled by the MyoD family of regulatory factors (MRFs: Myf5, MyoD, myogenin and MRF4) (12). MRFs recognize the consensus sequence CANNTG, named E-box (13), present in the majority of muscle specific promoters and enhancers (14, 15). MyoD is considered a transcriptional master regulator since it induces the myogenic phenotype in a wide variety of cells (16), indicating its contribution in reprogramming complex series of transcriptional events over several target promoters leading to myogenic commitment. These facts suggest that MyoD displays specific differential activities, as demonstrated through microarrays analysis on MyoD cDNA transduced fibroblasts that revealed subsets of up and down-regulated genes (17). MyoD participates in promoter silencing of muscle-specific genes only in the undifferentiated state of C2C12 mouse myoblastic cell line, whereas in myotubes acts as a *trans*-activator (18). These facts imply that in differentiated muscle cells, E-boxes generally act positively over promoter and/or enhancer elements, raising questions on how through E-boxes binding; MyoD displays differential specific positive or negative activities, implying the necessity of modulating MyoD *trans*-activation potential over muscle promoters during myogenic commitment and differentiation.

In the present investigation we addressed the mechanism by which MyoD *trans*-activation potential is in part regulated through an α -SG promoter element containing two E-boxes. We initially cloned and functionally analyzed the 2.6 kb α -SG gene promoter sequence, which is positively regulated during cell differentiation. Further investigation identified a regulatory sub-element composed by two E-boxes called E-box1 and E-box2 that modulates the MyoD *trans*-activating effect over α -SG core promoter in myoblasts and myotubes. MyoD binds *in vitro* to the so called modulator element in C2C12 myoblasts and myotubes nuclear extracts. Using MyoD and Myogenin *in vitro* transcribed and translated extracts we found that E-box2, conserved in mouse and human, is able to be recognized by both myogenic factors. Furthermore, site directed mutagenesis of E-boxes core sequence

and E-box2 central and flanking conserved nucleotides relieved the MyoD recognition and the *trans*-activation potential modulation effect over α -SG core promoter. *In vivo*, MyoD, TFIID and TFIIB basal transcription factors, bind in myoblasts the modulator element, and not the core promoter, whereas in myotubes they concomitantly interact to both regions. Our observations support a mechanistic model in which MyoD *trans*-activation potential over α -SG promoter is regulated by tethering of the basal transcription machinery to the modulator element. This model suggests that promoter architecture, and in particular E-boxes composition are central for the MyoD action over muscle-specific gene expression regulation during myogenic differentiation.

MATERIALS AND METHODS

λ FIXII genomic library screening

We screened a total of 1×10^6 clones from a mouse λ FIXII genomic library (Stratagene) using as probe a [α - 32 P]dCTP labeled 936 bp PCR amplified DNA fragment corresponding to α -SG gene exons 2, 3 and intron 2. Primer sequences used to amplify this DNA fragment are the following: 5'ALFAF, 5'-ATGGCAGCAGTAACTTGGATAC-3' and 5'ALFAR, 5'-ACAAACACACGACCCACAAGTAGGT-3'. PCR conditions were: 1 cycle at 95° for 5 min, 25 cycles at 95° 1 min, 60° 1 min and 72° 1 min, and 1 cycle at 72° for 7 min. We isolated two clones containing the sequence used as probe as confirmed by PCR and DNA sequencing.

Constructs and plasmids

Construct pGlow-TOPO F1B2194 was generated by amplifying a 2609 bp DNA fragment (accession number: AY648297) containing the full length α -SG promoter and cloning it into pGlow-TOPO vector (Invitrogen) containing *GFP* as reporter gene. pGL3F1B2609 (construct 1) was generated by excising the 2609 bp α -SG promoter insert from pGlow-TOPO F1B2194 with *Bgl*II and cloning it into the *Bgl*II site of pGL3-Basic vector (Promega) containing luciferase as reporter gene. α -SG promoter deletion constructs 3, 5, 6, 8 and 9 (corresponding to constructs pGL3F2, F4, F5, F7 and F8 respectively) were previously reported (19). α -SG promoter deletion constructs 2, 4, 7, 10, 11, 12 and 13 inserts (corresponding to constructs pGL3F1, F3, F6, F9, F10, F11 and F12) were generated by PCR using *Bam*HI restriction sites flanked oligonucleotides. After PCR products digestion, they were cloned into the *Bgl*II site of pGL3-Basic vector (Promega). The forward oligonucleotides in 5'-3' orientation used were as follows: DELALFAB1: 5'-GCATCAGCATGGCTTTGTAG-3'; DELFAB3: 5'-GTGAGCTGGAGAGAGCCCTCT-3'; DELALFAB6: 5'-ATAGAGGAAGGGCCAGAAAG-3'; DELALFAB9: 5'-GTTTAAGAGCCCTGGTTGCT-3'; DELALFAB10: 5'-GTCCGATTCCCTCTTCTAGC-3'; DELALFAB11: 5'-CACAGACGCCAGATAAAACC-3' (*Bam*HI recognition sequences were omitted). The common reverse primer was previously reported (19). Construct 14 corresponds to pGL3F1B2194 with the insert in 3'-5' orientation. α -SG core promoter was deleted in construct 15 by restriction enzyme digestion from pGL3F2 using *Hind*III and *Bst*EI sites that eliminate a 190 bp DNA fragment. Protruding ends were blunted with Mung Bean enzyme (Promega), and plasmid religated. pGL3CP construct containing 80 bp that include the α -SG core promoter was generated by digesting pGL3F12 construct with *Pvu*II and *Xho*I enzymes. *Pvu*II restriction disrupts the E-box sequence located immediately upstream from the transcription initiation site (Fig. 1). The modulator element, was cloned using two complementary oligonucleotides flanked by *Bam*HI restriction sites that after annealing and digestion were inserted at the *Sma*I site, where *Bgl*II linkers were inserted upstream of α -SG F12 promoter fragment in construct 13. pGL3CP+E1-2 (CP+MOD) construct containing α -SG core promoter and the E-box1-2 modulator element at the *Sma*I cloning site, was generated by digesting the previously

mentioned construct with PvuII and XhoI restriction enzymes. The pGL3-Promoter-MOD construct was generated by cloning the modulator element into the BamHI site downstream of SV40 promoter. Constructs CP+E1MUT, CP+E2MUT and CP+E1-2MUT, containing the core promoter and the modulator element with site directed mutations at E-box1, 2 and double mutant, respectively were generated using the QuickChange site directed mutagenesis kit (Stratagene). Mutations were confirmed by DNA sequencing. The oligonucleotide sequences used to generate site directed mutations were as follows: E-1MUT: 5'-ACCCAGGTGAATTCAGTGGCCCAG-3' and E-2MUT: 5'-GGCCCAGAGCCGCGGTTCCCACAC-3'. Only sense chains are shown. Constructs CP+E-1MUTGGCC, CP+E-1MUTCC and CP+E-1MUTCCC containing E-1 mutated and E-2 harboring substitutions at the GGCC, CC and CCC E-box2 sequences were generated using CP+E1MUT as template. Nucleotide substitutions were introduced as described above. Primer sequences were as follows: GGCCME2f: 5'-GGTGAGTTCAGCAGAGCACCTGTTCCCAGGATCTTCGG-3', GGME2F: 5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCAGGTGTTCCCAGGATCTTCGG-3' and CCCME2F: 5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCACCTGTTAGTAGGATCTTCGG-3'. Combinatorial substitution of the nucleotide tracts were generated using the next primers: E2CCCGGCCMf: 5'-GGTGAGTTCAGCAGAGCACCTGTTAGTAGGATCTTCGG-3', E2CCCGGMf: 5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCAGGTGTTAGTAGGATCTTCGG-3' and E23CGGGGCCMf: 5'-GGTGAGTTCAGCAGAGCAGGTGTTAGTAGGATCTTCGG-3'. Only sense chains are shown. pcDNA3-N-myc, pcMyoD-N-myc and pcMyogenin-N-myc, vectors, encoding an N-myc tag, N-myc-tagged MyoD and N-myc-tagged Myogenin were kindly provided by Dr. Robyn Meech.

Cell culture and transfections

C2C12 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum. To induce differentiation, when confluence was reached, growing medium was changed by differentiation medium DMEM supplemented with 1% horse serum. C2C12 myoblasts were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as indicated by manufacturer (Invitrogen). To normalize luciferase activities, we co-transfected pRL/CMV vector encoding *Renilla reniformis* luciferase. Luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to manufacturer instructions in a TD-20/20 luminometer (Turner Designs). 384,000 cells corresponding to 40% confluence were seeded in six well plates and transfected 24 hr later. We assessed luciferase activity after 24 hr in myoblasts to avoid cell culture overgrowth and cell-cell contact induced differentiation. Replicates were induced to differentiation and luciferase activity was measured in myotubes 4 days later. For generating stable transfectants, we co-transfected C2C12 myoblasts with 3 µg of either pcMyoD-N-myc or pcDNA3-N-myc vectors with 800 ng of the promoter-less version of pEGFP-1 (Clontech) vector encoding the neomycin resistance gene. Cells were cultured for 2 weeks in DMEM with 10% fetal bovine serum in presence of 0.6 mg/ml of geneticin to select stable transfectant pools.

Western-blot assay

C2C12 myoblasts and myotubes protein extracts were boiled in protein loading buffer for 5 min and subjected to SDS-PAGE in 15% polyacrilamide gels. After protein transference PVDF membranes were blocked for 2 hr in 5% skimmed milk and 1% BSA 1X TBS. Primary antibodies were added in a 1:500 dilution and incubation proceeded through 2 hr. Membranes were washed 5 times for 5 min each with TBS 0.05% TWEEN. Secondary Goat anti-rabbit HRP coupled antibody (Zymed) was added (1:5000) in 5% skimmed milk, 1% BSA 1X TBS and incubation proceeded through 1 hr. Membranes were washed 4 times 5 min each with TBS, 0.05%TWEEN and once with TBS. Blots were developed with SuperSignal reagent (Pierce) according to manufacturer instructions. The primary antibodies used: MyoD (M-318), myogenin (M225), TFIID (TBP) (SI-1) and TFIIB (SI-1) from Santa Cruz Biotechnology.

Co-immunoprecipitation assays

C2C12 cells and stable transfectants for N-myc-MyoD and N-myc were lysed in modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, and 1 µg/ml each aprotinin and leupeptin). For immunoprecipitation, antibodies were added to cell lysates and incubation proceeded for 2 hr at 4°C on a rotation wheel. 20 µl of Protein A/G PLUS-Agarose (Santa Cruz Biotechnology) were added. Cell lysates were incubated for 4 hr at 4°C on a rotating wheel. Beads were washed twice with modified RIPA buffer and twice with PBS. Immunoprecipitated proteins were recovered by boiling the pellet in protein loading buffer, after centrifugation, supernatant was resolved through SDS-PAGE. Protein detection was performed as described above. The used antibodies were the same as the mentioned above plus c-myc (9E10) from Santa Cruz Biotechnology.

Gel-shift, super-shift assays and *in vitro* transcription/translation

Gel-shift and super-shift assays were performed as previously described (19). We used MyoD (M-318) antibody for super-shift assays. *In vitro* translated MyoD and myogenin extracts were obtained using the TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega). 8 µl of the resulting extracts were used per gel-shift reaction performed in the same conditions for C2C12 nuclear extracts. Primer sequences of probes were as follows: EBOX1.F (including E-box1 sequence): 5'-ACCCCAGGTCAGGTGAGTGGCCCAG-3', EBOX2.F (including E-box2 sequence): 5'-GGCCAGAGCACCTGTTCCACAC-3' and E2WTf (containing E-box2 sequence and flanking conserved oligonucleotides): 5'-GGTGAGTGGCCCAGAGCACCTGTTCCAGGATCTTCGG-3'. Only sense chains are shown. The mutant versions of these probes are shown at the "constructs and plasmids" section.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP assays were performed as reported (20). Briefly, 2×10^7 cells were lysed in 10 ml of ChIP lysis buffer (5 mM HEPES pH 8.0, 8 mM KCl, 0.5 % NP-40 plus protein inhibitors PMSF, aprotinin and leupeptin). Isolated nuclei were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min. Nuclei were sonicated to obtain a 500 bp average of chromatin fragments. For Immunoprecipitation, chromatin samples were overnight incubated with antibodies against MyoD (M-318), myogenin (M225), TFIID (TBP) (SI-1), TFIIB (SI-1) and c-myc (9E10) used as unspecific antibody (Santa Cruz Biotechnology) at 4° C. After overnight cross-linking reversal at 65°C, RNase I, Proteinase K treatment and phenol-chloroform extraction, DNA was used as template for PCR amplifying the next α -SG promoter DNA fragments. The E-box1 and E-box2-containing modulator region (203 bp), using the next oligonucleotides. E-boxChIPR: 5'-TGTTAAGGCCAGTTGTCAGC-3' and SILR: 5'-TGTGTTCCGTCCTCTCTGAA-3'. The core promoter 155 bp region with primers alphabF: 5'-TCACTCTGGCAATGGAAAGA-3' and alphabR: 5'-TACTGCTGCTGCCATAGTTG-3'. An α -SG exon four 139 bp DNA fragment, used as negative control, was generated using the oligonucleotides α -SGE4F: 5'-ACTGTCCGACTCACCTACCA-3' and α -SGE4R: 5'-TGACTTGGTACCCACGATCT-3'. Oligonucleotides were [γ - 32 P]ATP end labeled.

RESULTS

α -sarcoglycan promoter is composed of multiple putative regulatory elements

α -SG promoter is regulated in a muscle-specific manner (7, 10) moreover, positive and negative regulation of SG genes expression is relevant for proper muscle physiology (9). These facts prompted us to isolate and functionally analyze the α -SG promoter in order to identify regulatory elements affecting promoter activity in a muscle cell line. By screening a mouse genomic library, we isolated two positive clones containing the α -SG promoter. We amplified a 2609 bp DNA fragment including the α -SG promoter (accession number: AY648297) and cloned it upstream of the *GFP* reporter gene. We transfected this construct in C2C12 cells and observed a progressive increase on GFP fluorescence in transfected cells at days 1, 3 and 7 post-differentiation induction (data not shown).

In order to identify transcription factors binding sites composing α -SG promoter, its DNA sequence was analyzed with MatInspector 7.2.2 (21). We found putative binding sites for MyoD, Mef2, GATA, NFI, Sp1 and Oct family members, known to regulate a wide spectrum of promoters (see supplementary material).

These results show that the α -SG promoter is positively regulated during C2C12 cells differentiation. In addition, the identification of putative MyoD binding sites favors the idea that α -SG promoter is regulated in a muscle-specific milieu.

α -sarcoglycan promoter contains a regulatory element composed by two putative MyoD, one Sp1 and NFI binding sites

Since computer assisted analysis of α -SG promoter sequence identified putative binding sites for transcription factors known to regulate muscle-specific promoters, we analyzed their influence over α -SG promoter activity in C2C12 myoblasts and myotubes. First, we transiently transfected C2C12 cells with constructs 1, that includes the full length promoter regulating the luciferase reporter gene, and assessed reporter activity at days 0 to 6 after transfection. 24 hours after transfection, replicates were induced to differentiation. We observed a linear increase in luciferase activity along myogenic cells differentiation, with a slight decrease at day 6, possibly due to plasmid degradation (data not shown). This result is in agreement with the GFP fluorescence observed in C2C12 cells (data not shown). Constructs 1 to 13, which harbor progressive deletions of α -SG promoter driving luciferase reporter gene expression, were transfected in the same myogenic cell line (Fig. 2A). As negative controls, we transfected constructs 14 and 15, containing the α -SG promoter in 3'-5' orientation and a core promoter deletion, respectively; the empty vector was also analyzed (construct 16) (Fig. 2A). α -SG promoter (construct 1) was 6 times more active in myotubes than in myoblasts (Fig. 2B). The reporter gene activity analysis suggests that α -SG promoter is composed of several positive and negative regulatory sub-elements, rendering a difficult functional characterization of the promoter. All constructs were transcriptionally more active in myotubes *versus* myoblasts, excepting construct 13, which showed a similar activity in both differentiation stages. When a 188 bp DNA fragment corresponding to the 5' end of construct 6 including 2 putative Sp1 and one NFI motifs

were deleted (construct 7), we observed a luciferase activity decrease in myotubes, suggesting that the deleted DNA region may positively contribute to the overall promoter activity. In contrast, when the 5' end 182 bp DNA fragment of construct 5 containing two E-boxes (E-box1 and E-box2), NFI and Sp1 putative binding sequences was deleted we observed an increment on luciferase activity in myotubes (Fig. 2B; construct 6). This fact favors the idea that the deleted DNA fragment corresponds to an α -SG promoter regulatory element, which in addition to other promoter components, contribute negatively to its activity. To validate our transfection system, we confirmed the differentiation status of the C2C12 myoblasts and myotubes cell cultures by microscopic visualization. We observed morphological characteristics of the corresponding differentiation stages, like myotubes forming typical muscle fibers (Fig. 2C). To further corroborate the differentiation stages of the C2C12 cultures, we performed Western-blot on myoblasts and myotubes protein extracts using an anti-myogenin antibody (Fig. 2D). We detected this early muscle differentiation marker only in myotubes. All together these results confirm that α -SG promoter is positively regulated through the C2C12 cells differentiation process and suggest that α -SG promoter includes a positive regulatory element composed of: Sp1 and NFI putative binding sites, and a region composed of MyoD (E-box1 and E-box2), NFI (19) and Sp1 putative recognizing sites that modulates the promoter activity.

E-box1 and E-box2 affect the α -SG core promoter activity in C2C12 myoblasts and myotubes

E-boxes are binding sequences for the MyoD family of transcription factors that generally act as activators of muscle-specific promoters (16). Interestingly, in the α -SG promoter deleted constructs activity analysis we found a regulatory element containing two putative MyoD binding sites called E-box1 and E-box2 acting in C2C12 myoblasts and myotubes (Fig. 1B). This fact raised the interesting possibility that these E-boxes participate in the modulation of the α -SG promoter activity. In order to address the promoter-specific effect of E-box1 and E-box2 we first decided to test their action over a non-myogenic promoter, the heterologous SV40 promoter. To this end, we transiently transfected pGL3-Promoter-MOD construct, containing the luciferase reporter gene controlled by SV40 promoter and E-box1 and E-box2. We compared this construct activity to the pGL3-Promoter vector, containing the SV40 promoter. The luciferase activity was assessed in C2C12 myoblasts and myotubes. As expected, we found no effect of E-boxes over the SV40 non-muscle promoter activity (data not shown). The lack of E-boxes influence over the viral promoter prompted us to test if E-boxes act specifically over α -SG core promoter. To this end we transfected pGL3CP construct, containing the 80 bp α -SG core promoter, which lacks E-boxes, and pGL3CP+MOD construct, containing E-box1 and E-box2 upstream of α -SG core promoter DNA sequence (Fig. 2A). We found that the element containing E-box1 and E-box2 sequences affects the α -SG core promoter activity, reducing luciferase expression in myoblasts and myotubes. These results suggest that E-box1 and E-box2 constitute a regulatory element negatively affecting specifically the α -SG core promoter since it did not affect the heterologous SV40 promoter, and that its effect persists over C2C12 cells differentiation.

E-box1 and E-box2 sequences constitute a modulator of MyoD *trans*-activation potential over α -SG core promoter

MyoD is the only MRF that negatively regulates muscle gene promoters, specifically in myoblasts (18). Since we identified an E-boxes containing element that negatively affects α -SG promoter activity in myoblasts and myotubes (Fig. 2A), we reasoned that MyoD could be mediating such effect. We tested this hypothesis through MyoD over-expression assays, by co-transfecting the core promoter alone, or coupled to the E-box1 and E-box2 element, with increasing amounts of a myc-tagged MyoD cDNA encoding plasmid (Fig. 2B). As control a myc-tagged myogenin cDNA encoding plasmid was co-transfected. Unexpectedly, α -SG core promoter was 38-fold *trans*-activated by MyoD and not by myogenin in C2C12 myoblasts and myotubes (Fig. 2B). These results suggest that MyoD stimulatory effect over α -SG core promoter activity is independent of DNA binding, since the α -SG core promoter lacks MyoD binding sites, and specific, since myogenin does not affect the α -SG promoter activity. When we co-transfected the core promoter coupled to E-box1 and E-box2 element, with the MyoD cDNA, we also observed MyoD to *trans*-activate the α -SG core promoter, but in a lower extent (Fig. 2B). These results suggest that E-box1 and E-box2 element acts by down modulating the MyoD stimulatory effect over α -SG core promoter. Since these results support that E-box1 and E-box2 act as a MyoD *trans*-activation modulator, we called it: modulator element.

To test the involvement of E-box1 and E-box2 in the MyoD *trans*-activation potential modulation over α -SG promoter we transfected the modulator harboring mutations that disrupt E-box1, E-box2 or both (Fig. 2C). Consistently with our previous experiments, we found the core promoter to be strongly *trans*-activated by MyoD over-expression in myoblasts and myotubes, and in a lesser extent when the modulator element is placed upstream of the core promoter. When E-box1 was disrupted in myoblasts, the MyoD *trans*-activation potential over α -SG promoter was relieved, whereas in myotubes, the modulation effect persisted. When E-box2 was ablated, the MyoD modulation effect was completely lost in both differentiation stages. Mutation of both E-box1 and E-box2 completely relieved the modulation effect. These results demonstrate that E-box2 is sufficient to mediate the MyoD *trans*-activation potential modulation effect in myotubes, whereas E-box1 is functional only in myoblasts since its mutation did not relieve the MyoD activity modulation effect in myotubes.

***In vitro* the modulator element and E-box2 bind MyoD and Myogenin**

In order to address the MyoD binding to the modulator sequence, we performed gel-shift and super-shift assays using as probes the modulator, and the E-box1 (E-1) and E-box2 (E-2) sequences individually (Fig. 3). We used nuclear extracts from C2C12 myoblasts and myotubes (Fig. 3A), and MyoD and myogenin *in vitro* transcription/translated (TNT) extracts (Fig. 3B). C2C12 myoblasts and myotubes nuclear extracts were incubated with the modulator sequence (Fig. 3A). We observed at least three and two retarded complexes in myoblasts and myotubes, respectively (Fig. 3A). To determine if MyoD is present in such complexes we performed super-shifts using an anti-MyoD antibody. We observed a

slow mobility complex that was competed with the unlabeled probe, demonstrating the specificity of the interaction (Fig. 3A). These results indicate that MyoD binds *in vitro* to the modulator element in C2C12 nuclear extracts at both differentiation stages consistently with the fact that the modulator activity persists over myoblasts and myotubes differentiation stages (Fig. 2A).

In order to confirm MyoD and assess myogenin binding to the modulator element and in particular to E-1 or E-2 motifs, we used TNT extracts (Fig. 3B). Incubation of the modulator sequence probe with MyoD and myogenin TNT extracts revealed specific retarded complexes, indicating that both MRFs interact with the modulator sequence *in vitro* (Fig. 3B). Self competition with unlabeled probe abolished complexes formation. Incubation of E-1 and E-2 probes with unprogrammed TNT extracts revealed unspecific retarded bands (Fig. 3C). Incubation of MyoD and myogenin TNT extracts with E-1 probe showed only the unspecific bands seen when unprogrammed extract was used (Fig. 3D). Self competition with unlabeled probe abolished complex formation, and competition with an E-1 mutant probe did not, indicating that unprogrammed extract protein or proteins binding is sequence specific (Fig. 3D). E-2-TNT MyoD incubation revealed specific retarded bands (Fig. 3E). In addition, E-2-TNT myogenin interaction revealed specific bands migrating slightly faster than the observed for E-2 incubated with TNT unprogrammed extract (Fig. 3C). Complexes detection was abolished when self competition was performed with unlabeled probe and not with a mutant E-2 probe (Fig. 3E). All together these results show that MyoD and myogenin are able to interact with the modulator sequence and that E-box2 binds MyoD and myogenin *in vitro*. The data also suggest that E-1 is unable to recognize neither MRF *in vitro*. Furthermore, MyoD binds the modulator element in the context of C2C12 myoblasts and myotubes (Fig. 3A). These findings are consistent with our previous observation of E-box2 being 100 % conserved in mouse and human (see below), and with the fact that E-box2 is sufficient to mediate the MyoD *trans*-activation potential modulation effect over α -SG promoter in C2C12 myoblasts and myotubes.

The E-box2 surrounding sequences are highly conserved and relevant for the MyoD activity modulation.

Based on our results, we consider E-box2 as a central component of the modulator, then, we asked if such regulatory element is conserved in mouse and human. We aligned mouse and human α -SG gene 5' non-coding sequences and found the modulator E-boxes core sequences to be conserved, in particular, E-box2 with 100% of identity (Fig. 4A). Interestingly, we found GGCC, CC, and CCC sequences, located upstream, inside and downstream from E-box2 to be conserved, what prompted us to test the contribution of these conserved nucleotides in the MyoD recognition of E-box2. To reach this goal we performed EMSA using MyoD *in vitro* transcription/translation extracts and complementary oligonucleotides, as probes, harboring nucleotide substitutions at the corresponding sites (Fig. 4B). We find that mutation of the GGCC sequence did not affect MyoD binding (Fig 4B, mut1). On the other hand, substitution of the E-box2 central nucleotides significantly diminished the intensity of the retarded band (Fig. 4B, mut2),

whereas substitution of the CCC bases, completely abolished the retarded complex detection (Fig. 4B, mut3). Combinatorial conserved nucleotide sequences substitution significantly diminished E-box2 MyoD binding, although complexes were still detected, what can be explained by the fact that E-box2 consensus sequence is not altered (Fig. 4B, mut4-6). This contradicts the fact that substitution of CCC bases abolished MyoD binding since E-box2 core consensus is also intact in the corresponding probe sequence, suggesting that such specific substitutions drastically alter the E-box2 organization, affecting MyoD binding. The results also outline the relevance of the CC central bases in the MyoD recognition. We performed competition experiments using the corresponding unlabeled probes and E-box1 probe, which is not able to bind MyoD and myogenin (Fig. 3B). The intensity of the retarded bands was measured and graphed for easy interpretation of the data (Fig. 3B, lower panel). These results show that the conserved E-box2 flanking and central nucleotides, particularly CC and CCC sequences, are relevant for the E-box2 recognition by MyoD.

The contribution of the central and flanking sequence elements to the E-box2-MyoD interaction suggest their relevance in the modulation of MyoD *trans*-activation potential over α -SG promoter. To address this issue, we transfected constructs CP+E-1MUTGGCC, CP+E-1MUTCC and CP+E-1MUTCCC, containing the α -SG core promoter, the modulator element with E-1 mutated and E-2 harboring substitutions at the GGCC, CC and CCC E-box2 sequences, respectively in C2C12 cells. We found that substitution of either conserved sequence element abolished the modulator effect over MyoD *trans*-activation potential in myotubes (Fig. 3C). Interestingly, substitution of the GGCC nucleotides abolished the modulator activity although it did not affect MyoD binding to E-box2. This fact strongly suggests the possibility of another factor to be involved in the modulator effect. In addition we found that substitution of the CCC sequence increased the MyoD *trans*-activation effect, arguing in favor of the fact that E-box2 is critical for the modulator role over α -SG core promoter. These results confirm the relevance of the conserved E-box2 central and flanking nucleotides in its recognition by MyoD and in the MyoD *trans*-activation potential modulation over the α -SG core promoter.

MyoD, TFIID and TFIIB bind *in vivo* the α -SG modulator element in C2C12 myoblasts, and both modulator and core promoter regulatory elements in myotubes

MyoD converts a wide variety of cells to the myogenic lineage (16), implying the involvement of MyoD in the regulation of a wide spectrum of transcriptional regulatory events and to perform differential activities over its target promoters (22). These facts raise questions on how the *trans*-activation potential of the MyoD master regulator is modulated, or how it regulates other transcription factors or co-factors to perform specific functions. We demonstrated that α -SG promoter E-box1 and E-box2 element possess a MyoD *trans*-activation potential modulation activity in C2C12 myoblasts and myotubes, what prompted us to begin to address the mechanism by which this modulator affects the α -SG core promoter. Previous reports established a relationship between MyoD and components of the basal transcription machinery (23). This suggested us that MyoD binding and *trans*-activation to α -SG core promoter could be achieved through general transcription factors.

To address such interactions we performed chromatin immunoprecipitation assays in C2C12 myoblasts and myotubes using anti-MyoD, TFIID and TFIIB antibodies (Fig. 5). We found that in myoblasts MyoD, TFIID and TFIIB co-localize at the modulator element but not at the core promoter (Fig. 5A). In contrast, in myotubes, there was co-localization at both regulatory elements (Fig. 5B). As control we used an unspecific antibody for chromatin immunoprecipitation, which showed no enrichment of the amplified fragments on the bound fractions (Fig. 5A and B, UN). As an additional control we used PCR amplification primers spanning the α -SG exon four. No amplification products were detected when employing the B fractions of chromatin immunoprecipitated with the corresponding antibodies from C2C12 myoblasts and myotubes. These results demonstrate that MyoD and basal transcriptional machinery members TFIID and TFIIB are located at the α -sarcoglycan promoter modulator element and not at the core promoter region in C2C12 myoblasts, whereas in myotubes, basal transcription machinery and MyoD complex co-localize at both regions.

***In vivo* MyoD interacts with TFIID and TFIIB in C2C12 myoblasts and myotubes**

The fact that MyoD and basal transcription machinery members were found to co-localize at the α -SG modulator and at the core promoter in myotubes implies the possibility of a protein complex formation. To confirm MyoD and basal transcription factors interaction and strengthen our observations we performed co-immunoprecipitation (co-IP) assays using anti-MyoD, TFIID and TFIIB antibodies in C2C12 myoblasts and myotubes cell lysates (Fig. 6A). By Western-blot, we detected TFIID in co-immunoprecipitated material with an anti-MyoD antibody from C2C12 myoblasts and myotubes. When using TFIID and TFIIB antibodies for co-IP in C2C12 myoblasts and myotubes, we detected interactions with MyoD (Fig. 6A). We did not identify MyoD, TFIID and TFIIB when immunoprecipitating with a c-myc unspecific antibody used as negative control. Consistently with our previous results co-IP show that MyoD interacts with TFIID and TFIIB basal transcription machinery members in C2C12 myoblasts and myotubes.

In order to confirm these results we performed the same co-IPs using an anti-myc antibody as immunoprecipitating agent in two independent C2C12 cell lines that stably express a myc-tagged MyoD and a myc-tag alone, respectively (Fig. 6C). Myc-tagged MyoD expression in stably transfected cells was confirmed by Western-blot using an anti-MyoD antibody (Fig. 6B). When immunoprecipitating N-myc-MyoD with an anti-c-myc antibody from C2C12 myoblasts cell lysates and revealing with anti-MyoD, TFIID and TFIIB antibodies, respectively, we detected the corresponding signals (Fig. 6C), whereas any signals were observed in myc-tag expressing cells. In myotubes expressing tagged MyoD, we found an interaction between MyoD and TFIIB, but not with TFIID. We interpret this result based on the possibility that the tag interfered with immunoprecipitation or detection since we identified TFIID in C2C12 immunoprecipitations using a MyoD antibody (Fig. 6A). Supporting the specificity of the interactions, we did not reveal signals in N-myc expressing cells. All together these results show that MyoD physically interacts with the basal transcription machinery in the C2C12 myoblasts and myotubes environment,

and are consistent with our previous results showing that these factors interact in conjunction with the α -SG modulator element in myoblasts and both the modulator and core promoter in myotubes.

DISCUSSION

Myogenesis is regulated by the myogenic regulatory factors (MRFs) (13, 12). MyoD master regulator reprograms the gene expression pattern in a variety of non-muscle cells, inducing myogenic commitment (16) presumably by up and down regulating subsets of muscle genes (17, 18), implying that MyoD exerts differential activities over its target promoters. These facts indicate that MyoD *trans*-activation potential must be modulated in order to achieve a specific expression profile during MyoD directed myogenesis. In this investigation, as part of the first approach to understand how the α -SG promoter is regulated, we found two E-boxes that affect the α -SG core promoter activity. We found that such E-box1 and E-box2 modulate the MyoD *trans*-activation potential over the α -SG core promoter in C2C12 myoblasts and myotubes. We demonstrate that this modulator element binds MyoD in C2C12 myoblasts and myotubes. Disruption of E-box1 and E-box2 relieved the MyoD *trans*-activation modulation effect over α -SG core promoter; moreover, such effect resides in E-box2 central and flanking conserved nucleotides. MyoD, TFIID and TFIIB bind the modulator element in myoblasts and both modulator and α -SG core promoter in myotubes. MyoD interactions with basal transcription machinery members were confirmed through co-IP assays. Our results support a model in which MyoD is responsible of targeting basal transcription machinery to a muscle-specific promoter modulator element, that is one of the components regulating the α -SG promoter function during myogenic differentiation.

Regulated gene expression resides partly on combinatorial action of transcription factors (24), implying that sophisticated promoters are contacted by diverse factors performing differential activities in order to achieve a specific gene expression response pattern. This vision is supported by our finding showing that the α -SG promoter incorporates positive and negative regulatory elements acting differentially in C2C12 myotubes, and by the fact that α -SG full-length promoter is differentially regulated by NFI family of transcription factors during myogenic differentiation (19). Moreover, this regulatory element is down regulated by Sp1 in transiently transfected C2C12 myoblasts (our unpublished observations), supporting the notion that α -SG expression pattern is regulated by a plethora of transcription factors and mechanisms.

E-boxes are known to positively regulate muscle promoters and enhancers in differentiated muscle cells (14, 15). We found that E-box1 and E-box2 modulate the α -SG core promoter in C2C12 myoblasts and myotubes. This fact suggest that E-boxes play a different role from activating muscle promoters in differentiated muscle and suggest them to participate in finer transcriptional modulation mechanisms. This notion supports the fact that MyoD activity is regulated in the context of its recognition sequence (25). Since MyoD activate muscle genes, its modulation seems to be a critical task from the biomedical perspective since abnormal over-expression of a muscle gene had been related to muscular

dystrophy (9). This also raises the idea that besides muscle-specific regulators activity, basal transcription factors *trans*-activation potential must be modulated in some way in order to maintain proper expression levels of muscle genes. In this regard, the association of MyoD with basal transcription machinery and their recruitment to the modulator turns to be relevant, since support the notion that basal transcription factors activity could be controlled by contacting muscle specific regulators during myogenesis.

The modulator element posses a 61% of identity between mouse and human, whereas E-box2 core sequence is fully conserved between both species, supporting its central contribution to the MyoD modulator effect over α -SG promoter. E-box2 is flanked by conserved nucleotides, which are critical for E-box2 recognition by MyoD and mediate its *trans*-activation potential modulation. These facts are in agreement with data showing that core and flanking sequences, besides the central variable nucleotides are involved in the specificity and affinity of E-boxes recognition by bHLH family of transcription factors (26, 27). Instead, E-box1 is not fully conserved and it does bind neither MyoD nor myogenin *in vitro*, although it contributes to the MyoD *trans*-activation potential modulation over α -SG core promoter in myoblasts. One possible explanation is that MyoD and myogenin require a co-factor like E12 or E47 to bind E-box1, since heterodimerization confers DNA binding specificity to MRFs (28). This fact suggests the implication of such bHLH factors in the MyoD *trans*-activation potential modulation mediated through E-box1, although this issue has not been assessed.

We observed that MyoD positively affects α -SG core promoter activity despite this region lacks E-boxes, suggesting the DNA binding and promoter activation being mediated through an intermediary protein. This intermediary could be part of basal transcription machinery since MyoD is known to stabilize TFIIB binding to the transcriptional pre-initiation complex (23). Specifically, MyoD binding to the α -SG core promoter DNA fragment tested, which lacks E-boxes, could be achieved through TAFII₁₅₀, required for core promoter function (29, 30). TAFII₂₅₀ could also be involved since a complex containing it, besides TAFII₁₅₀ and TBP, activate a core element as shown through reconstituted transcription assays (31). MyoD interaction to α -SG core promoter could also be achieved through the Mediator complex since it is contacted by specific transcription activators (32), although, Mediator-MyoD interactions remain to be tested. These evidences favor the possibility that MyoD, through contacting basal transcription factors is able to bind and stimulate core promoters. Such scenario seems to be supported by our ChIP results over α -SG core promoter in C2C12 myotubes, stage where the full-length promoter is active, and by over-expression assays, showing that α -SG core promoter is contacted and *trans*-activated by MyoD, respectively.

MyoD repress muscle gene expression through recruitment of histone deacetylases (HDAC) to E-boxes in undifferentiated muscle cells, whereas it works as a transcriptional activator in differentiated muscle through several mechanisms, like chromatin remodeling (18). We detected MyoD, TFIID and TFIIB to interact constitutively with the α -SG modulator element over C2C12 differentiation, and with the core promoter only in myotubes, where full-length promoter is completely active. These facts support a mechanistic model for the modulator way of action, where MyoD is in charge of tethering basal transcription machinery and HDAC activities to the α -SG modulator element in

myoblasts, favoring the establishment of a transcriptionally inactive status, which could explain the absence of TFIID, TFIIB and MyoD at the α -SG core promoter. In myotubes, where α -SG promoter is active, it has been demonstrated that MyoD recruits p300/CBP histone acetyltransferase complex (33) and PCAF to muscle promoters (18). Moreover, MyoD regulates differentiation through the action of the ATP-dependent SWI/SNF chromatin remodeling complex (34). In addition, we found MyoD to interact with TFIID, which contribute to chromatin remodeling activities through TAFII₂₅₀ (35). Based on these interactions, we can hypothesize that MyoD promotes acetylation of α -SG core promoter in myotubes, making it accessible for general transcription factors that in turn recruit MyoD to such regulatory region, resulting in α -SG gene expression. At this differentiation stage, the α -SG core promoter, which is *trans*-activated by MyoD, could be modulated through MyoD and basal transcription machinery preferential binding to the modulator element over the core promoter. This notion is supported by our findings showing that the modulator element affects α -SG core promoter activity, and that it modulates MyoD *trans*-activation potential over such regulatory region in myotubes. This mechanism of MyoD modulation is strengthened by the fact that E-box2 conserved central and flanking nucleotides mediate MyoD binding and activity modulation despite they do not form part of the E-box2 core sequence. These results favor the idea that E-box2 is a high affinity element for myogenic factors recognition.

MyoD expression is down regulated during myogenesis of the developing mouse (36), what could underestimate the necessity of modulating the MyoD *trans*-activation potential over the α -SG promoter in myotubes. However, we found that even in low quantities, MyoD acts as a strong *trans*-activator over the α -SG core (Fig. 2) and full length promoter (data not shown), supporting the relevance of the modulator, which could participate in the establishment of a highly regulated expression pattern induced by MyoD during myogenic differentiation.

MyoD regulates a complex transcriptional network determining muscle promoters activity pattern through myogenesis. To this end MyoD perform diverse activities through binding and recruitment of co-activators or co-repressors (18). In addition, MyoD activity is modulated by several mechanisms mainly involving post-translational modifications (37) like phosphorylation (38), acetylation (39) and, ubiquitination (40). Our results suggest that besides these interactions and modifications, a MyoD regulated specific expression pattern can be achieved through basal transcription machinery targeting to muscle promoter modulator elements, suggesting a mechanism by which basal transcription could be controlled by a myogenic master regulator through interaction with E-box sequences in a muscle-specific promoter way.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank to Georgina Guerrero Avendaño for excellent technical assistance. We also thank to James Ellis and Sergey Razin for critical reviewing of the manuscript and Thomas Jenuwein for helpful discussion and comments.

Delgado-Olguín P. is a Ph.D student supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through the grant 158524, by the Dirección General de Estudios

de Posgrado, UNAM, and by the IMSS fellowship award. We acknowledge funding support from Association Française contre les Myopathies (Grant MNM 2000 Groupe 1) to R.C.V. This work was partially supported by CONACyT (Grant 33863-N and 42653-Q), PAPIIT-DGAPA (IN203200 and IN209403), The Third World Academy of Sciences (TWAS, Grant 01-055RG/BIO/LA) and the Fundación Miguel Alemán to F.R.T.

REFERENCES

1. Hack,A.A., Groh,M.E., and McNally,E.M. (2000) Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc. Res. Tech.*, **48**, 167-180.
2. Cohn,R.D., and Campbell,K.P. (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, **23**, 1456-1471.
3. Ettinger,A.J., Feng,G., and Sanes,J.R. (1997) Epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32534-32538.
4. Noguchi,S., Wakabayashi,E., Imamura,M., Yoshida,M., and Ozawa,E. (2000) Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 640-648.
5. Wheeler,M.T., Zarnegar,S., and McNally,E.M. (2002) Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2147-2154.
6. Barresi,R., Moore,S.A., Stolle,C.A., Mendell,J.R., and Campbell,K.P. (2000) Expression of gamma-sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan sarcospan complex. *J. Biol. Chem.*, **275**, 38554-38560.
7. Liu,L., Vachon,P.H., Kuang,W., Xu,H., Wewer,U.M., Kylsten,P., and Engvall,E. (1997) Mouse adhalin: primary structure and expression during late stages of muscle differentiation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **235**, 227-235.
8. Durbeej,M., and Campbell,K.P. (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **12**, 349-361.
9. Zhu,X., Hadhazy,M., Groh,M.E., Wheeler,M.T., Wollmann,R., and McNally,E.M. (2001) Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of sarcoglycan assembly. *J. Biol. Chem.*, **27**, 21785-21790.
10. Noguchi,S., Wakabayashi,E., Imamura,M., Yoshida,M., and Ozawa,E. (1999) Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **262**, 88-93.
11. Wakabayashi-Takai,E., Noguchi,S., and Ozawa,E. (2001) Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 948-957.
12. Sabourin,L.A., and Rudnicki,M.A. (2000) The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.*, **57**, 16-25.
13. Lassar,A.B., Buskin,J.N., Lockshon,D., Davis,R.L., Apone,S., Hauschka,S.D., and Weintraub,H. (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a

- region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell*, **58**, 823-831.
14. Xiao,J., Jethanandani,P., Ziober,B.L., and Kramer,R.H. (2003) Regulation of alpha7 integrin expression during muscle differentiation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 49780-4978.
 15. Chang,T.H., Primig,M., Hadchouel,J., Tajbakhsh,S., Rocancourt,D., Fernandez,A., Kappler,R., Scherthan,H., and Buckingham,M. (2004) An enhancer directs differential expression of the linked Mrf4 and Myf5 myogenic regulatory genes in the mouse. *Dev. Biol.*, **269**, 595-608.
 16. Weintraub,H., Tapscott,S.J., Davis,R.L., Thayer,M.J., Adam,M.A., Lassar,A.B., and Miller,A.D. (1989) Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5434-5438.
 17. Bergstrom,D.A., Penn,B.H., Strand,A., Perry,R.L., Rudnicki,M.A., and Tapscott,S.J. (2002) Promoter-specific regulation of MyoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol. Cell*, **9**, 587-600.
 18. Mal,A., and Harter,M.L. (2003) MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 1735-1739.
 19. Delgado-Olguin,P., Rosas-Vargas,H., Recillas-Targa,F., Zentella-Dehesa,A., Bermúdez,M., Cisneros,B., Salamanca,F., and Coral-Vazquez,R. (2004) NFI-C2 negatively regulates α -sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 1032-1339.
 20. Valadez-Graham,V., Razin,S.V., and Recillas-Targa,F. (2004) CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken α -globin gene domain. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 1354-1362.
 21. Quandt,K., Frech,K., Karas,H., Wingender,E., and Werner,T. (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4878-4884.
 22. Berkes,C.A., Bergstrom,D.A., Penn,B.H., Seaver,K.J., Knoepfler,P.S., and Tapscott,S.J. (2004) Pbx marks genes for activation by MyoD indicating a role for a homeodomain protein in establishing myogenic potential. *Mol. Cell*, **14**, 465-477.
 23. Heller,H., and Bengal,E. (1998) TFIID (TBP) stabilizes the binding of MyoD to its DNA site at the promoter and MyoD facilitates the association of TFIIB with the preinitiation complex. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2112-2119.
 24. Lemon,B., and Tjian,R. (2000) Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.*, **14**, 2551-2569.
 25. Weintraub,H., Dwarki,V.J., Verma,I., Davis,R., Hollenberg,S., Snider,N., Lassar,A., and Tapscott,S.J. (1991) Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev.*, **5**, 1377-1386.
 26. Blackwell,T.K., Huang,J., Ma,A., Kretzner,L., Alt,F.W., Eisenman,R.N., and Weintraub,H. (1993) Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 5216-5224.

27. Walhout,A.J., van der Vliet,P.C., and Timmers,H.T. (1998) Sequences flanking the E-box contribute to cooperative binding by c-Myc/Max heterodimers to adjacent binding sites. *Biochim. Biophys. Acta*, **1397**, 189-201.
28. Lassar,A.B., Davis,R.L., Wright,W.E., Kadesch,T., Murre,C., Voronova,A., Baltimore,D., and Weintraub,H. (1991) Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*, **66**, 305-315.
29. Kaufmann,J., Verrijzer,C.P., Shao,J., and Smale,S.T. (1996) CIF, an essential cofactor for TFIID-dependent initiator function. *Genes Dev.*, **10**, 873-886.
30. Kaufmann,J., Ahrens,K., Koop,R., Smale,S.T., and Muller,R. (1998) CIF150, a human cofactor for transcription factor IID-dependent initiator function. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 233-239.
31. Verrijzer,C.P., Chen,J.L., Yokomori,K., and Tjian,R. (1995) Binding of TAFs to core elements directs promoter selectivity by RNA polymerase II. *Cell*, **81**, 1115-1125.
32. Myers,L.C., and Kornberg,R.D. (2000) Mediator of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 729-49.
33. McKinsey,T.A., Zhang,C.L., and Olson,E.N. (2001) Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 497-504.
34. de la Serna,I.L., Carlson,K.A., and Imbalzano,A.N. (2001) Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat. Genet.*, **27**, 187-190.
35. Mizzen,C.A., Yang,X.J., Kokubo,T., Brownell,J.E., Bannister,A.J., Owen-Hughes,T., Workman,J., Wang,L., Berger,S.L., Kouzarides,T., Nakatani,Y., and Allis,C.D. (1996) The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*, **87**, 1261-1270
36. Sasson,D., Lyons,G., Wright,W., Lin,V.,Lassar,A., Weintraub,H., and Buckingham,M. (1989) Expression of two myogenic regulatory factors: myogenin and MyoD during mouse embryogenesis. *Nature*, **314**, 303-307.
37. Puri,P.L., and Sartorelli,V. (2000) Regulation of Muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. *J. Cell. Physiol.*, **185**, 155-173.
38. Tintignac,L.A., Sirri,V., Leibovitch,M.P., Lecluse,Y., Castedo,M., Metivier,D., Kroemer,G., and Leibovitch,S.A. (2004) Mutant MyoD lacking Cdc2 phosphorylation sites delays M-phase entry. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 1809-1821.
39. Poleskaya,A., and Harel-Bellan,A. (2001) Acetylation of MyoD by p300 requires more than its histone acetyltransferase domain. *J. Biol. Chem.*, **276**, 44502-44513.
40. Batonnet,S., Leibovitch,M.P., Tintignac,L., and Leibovitch,S.A. (2004) Critical role for lysine 133 in the nuclear ubiquitin-mediated degradation of MyoD. *J. Biol. Chem.*, **279**, 5413-5420.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. DNA sequence containing the α -SG promoter region (accession number AY648297). The 2.6 kb nucleotide sequence was analyzed through MatInspector 7.2. The identified putative binding sites for transcription factors are indicated. MRF's binding sites are shown as E-boxes. E-box1 and E-box2 are located between nucleotides -1885 to -1805. The modulator and the α -SG core promoter containing sequences are shaded. Transcription initiation site is indicated as +1.

Figure 2. α -sarcoglycan promoter activity is controlled by positive and negative regulatory elements. (a) α -SG promoter constructs driving luciferase gene (*LUC*, open arrow) expression. Construct numbers are indicated in bold. Promoter fragment lengths with respect to transcription initiation site (arrow) are indicated. (b) 1 μ g of each construct were transiently transfected in C2C12 cells. Luciferase activities in transfected myoblasts (open bars) and myotubes (solid bars) are shown as normalized luciferase units. The average of three independent experiments performed in duplicate is shown. SE bars are shown here and in the following experiments. (c) C2C12 myoblasts (MB) and myotubes (MT) cell culture microphotographs. Scale bar corresponds to 50 μ m. (d) Anti-myogenin (a-myog) Western-blot using 20 μ g of C2C12 myoblasts (MB) and myotubes (MT) protein extracts. Arrow shows position of the myogenin signal in the membrane Ponceau red staining, that is presented as loading control.

Figure 3. E-box1 and E-box2 modulate MyoD *trans*-activation potential over α -SG core promoter. (a) 1 μ g of α -SG core promoter (CP) and core promoter with the modulator containing the E-box1 and E-box2 (CP+MOD) constructs were transfected in C2C12 cells. Fold reduction of CP+MOD *versus* CP activity in myoblasts and myotubes is shown. The average of three independent experiments performed in duplicate is shown. (b) 1 μ g of α -SG core promoter (CP) and core promoter with E-box1 and E-box2 (CP+MOD) constructs were co-transfected with 300 ng, 500 ng and 1 μ g of pcMyoD-N-myc (MyoD), encoding N-myc-MyoD or 1 μ g of pcMyogenin vector, encoding N-myc-myogenin (myogenin) in C2C12 cells. Normalized luciferase units from myoblasts and myotubes are shown. An average of three independent experiments performed in duplicate is shown. (c) E-box1 and E-box2 ablation relieves MyoD *trans*-activation potential over α -SG promoter. Constructs CP, containing the α -SG core promoter, CP+MOD containing the core promoter and the modulator element, CP+E1MUT, CP+E2MUT and CP+E1-2MUT, incorporating mutations in E-box1, E-box2 and E-box1 and E-box-2 respectively were co-transfected with pcMyoD vector, expressing N-myc-MyoD (+) in C2C12 cells. Fold activation in myoblasts and myotubes is shown. Data represent the average of three independent experiments performed in duplicate.

Figure 4. The modulator element and E-box-2 interact *in vitro* with both MyoD and myogenin. (a) The modulator probe was incubated with C2C12 myoblasts (MB) and myotubes (MT) nuclear extracts (NE). Anti-MyoD antibody (a-MyoD) incubation with nuclear extracts formed a super-shifted retarded complex (SS). Arrows denote protein interactions with modulator in myoblasts. Solid arrowheads denote complexes formed in myotubes. Comp, competitor. Coupled *in vitro* transcription/translation TNT (c) unprogrammed (UN), MyoD and myogenin (myog) extracts were incubated with (b) the modulator (MOD), (d) E-box1 (E-1) and (e) E-box2 (E-2) probes. Arrows indicate retarded complexes. * indicate unspecific retarded complexes for E-1 and E-2. Solid arrow heads indicate the E-2 specific complexes. Comp, competitor. Comp M, mutated competitor.

Figure 5. E-box2 conserved central and flanking nucleotides contribute to MyoD binding and modulation over α -SG core promoter. (a) DNA sequence alignment of mouse and human α -SG promoter E-box1, E-box2 and adjacent sequences. E-box1 and E-box2 are shown in bold. * indicate matched nucleotides. Gaps (-) were introduced to achieve the best alignment. Conserved nucleotide sequences are boxed. Probes containing E-box2 with substitutions of the conserved nucleotides are indicated as mut1 to 6. (b) The probes were used in EMSA assays in presence of *in vitro* transcription/translation MyoD extracts. Bandshifts were competed (Comp) with the corresponding unlabeled probe and with E-box1 (E-1), which is unable to bind MyoD. Band intensities were quantified by Imagequant. Intensity percent with respect to wild-type E-box2 probe is shown in the lower panel. (c) 1 μ g of the corresponding constructs containing mutations at the E-box2 conserved nucleotide tracts in the context of CP+E1MUT were MyoD co-transfected in C2C12 cells. The reported gene activity was compared to that of the α -SG core promoter (CP), core promoter with the modulator element (CP+MOD) and core promoter with the modulator mutated at E-box1 (CP+E1MUT). Values represent the average of three independent experiments performed in duplicate.

Figure 6. MyoD and basal transcription machinery bind *in vivo* to the α -SG promoter modulator in myoblasts and both modulator and core promoter in myotubes. (a) The α -SG promoter modulator (MOD), core promoter (CP), and α -SG exon 4 (E4) DNA regions were PCR amplified from the unbound (U) and bound (B) fractions of immunoprecipitated chromatin from C2C12 myoblasts using antibodies directed against MyoD, TFIID, TFIIB and an IgG unspecific (UN) antibody. (b) The same experiments as in (a) were performed from C2C12 myotubes immunoprecipitated chromatin. Chromatin immunoprecipitations were performed independently at least twice with the same results.

Figure 7. MyoD interacts with TFIID and TFIIB in C2C12 myoblasts and myotubes. (a) C2C12 myoblasts (B) and myotubes (T) cell lysates were incubated with antibodies against MyoD, TFIID, TFIIB and c-myc unspecific antibody for immunoprecipitation (IP). Western-blots (WB) were performed using anti-MyoD, TFIID and TFIIB antibodies. (b) N-myc and N-myc-MyoD (MyoD) C2C12 stably transfected myoblasts protein extracts were subjected to Western-blot using an anti-MyoD antibody (a-MyoD). Unspecific bands (UN) serve as loading control. (c) Immunoprecipitated (IP) material with a c-myc antibody from C2C12 myoblasts (MB) and myotubes (MT) stably expressing N-myc-MyoD (MyoD) or N-myc alone, were subjected to Western-blot with anti-MyoD, TFIID and TFIIB antibodies.

-2605 GGTGAAGCACTGTTTCTTCTCAGGGTTCAAGGGCAGAGTGTCTGCTGCCTGTTCTCAGAGTTAGACCTGCAAGAGAA 80
 -2525 GGGTAGATGCAGGAATGAAGGGCCAGAGGTGTCCACCATCAAAGGCATCATGGAAGAGCCGACCCTGGGCTGTGAACTT 160
 -2445 TCTGAACATT**E-box** **CAGCTG**GCATCAGCATGGCTTTGTAGGAAGTTAGAAACTGCCAGGCCTCAGC**GATA** **E-box** **CAGCTG**TAAAAACA 240
 -2365 TGGGCTATGGGAATATCTGTCTCATGTTACTGCTGTGGGTATGACATGGGTGAGCAGACATAAATGCTTGTGAGCCTT**T** 320
 -2285 **NFI** **GGCACAGAGACGG**ACAGGCCATCAGTCCCTTCTCACCATCACACAAAGCCCCAGTCAGGCAGGATTTTCTCATCTCTGTAT 400
 -2205 GGTATAGGTGGCTGAA**E-box** **CATGTG**CTGCTTTCAGTATTTTGTGAGTCTCTGCAGAGGCCAGCACAAATCGTGACGCTTAT 480
 -2125 AATTGTGGAAGCAGAGGCCCTGGAGAGGGCTAGTTACTTAAAGCCACGCTGCGAGGAACGTCAAGCTGGAACTCCAACCC 560
 -2045 TTATGGAATTAGCCCCAGCTATGTGAGCTGGAGAGAGCCTCTCTGCTTACCTGTCCCAT**NFI** **TTGGCCGATACCGTCTGG**CT 640
 -1965 TGCTCCAGCCGGACCTTACATGGGAGATGTTGGTCTGCGGCTCAGGCTGGGGAACA**GATA**CTTCTGCTTGTCTGTTAAG 720
 -1885 GCAGTTGTCAGCCAGCCTCTACACTTACTAGTTGTAGACCC**E-box1** **CAGGT** **E-box2** **CAGGTGAGTGGCCAGAGCACCTGTTCCACAC** 800
 -1805 CATGATGTTCTAAGGCTGG**NFI** **Sp1** **TTGGCACAGGGAT** **GGGGAGGGG**TGAGTCACAAGTACCCAGACAGCCTAGGAAGAGGAGG 880
 -1725 TACAGGAGAAAAGACTTCAGAGAGGACGGAACACATATGACCTGCTCAAGGTCTGCCAAGGGACAAGGCAGGAGGGGAC 960
 -1645 ACCAGGCAGAGAGAGCAGCTTGGATGGAGGCCAGGAAACTAAGAGGACACATTAAGCTAGGCCAGAGTCTAGGGATGTTG 1040
 -1565 GTGTGTGT**Sp1** **Sp1** **NFI** **GGGGTGG** **GAGGTG**CCGTTCAAAT**TTGGCCACAAAC**ATAGAGGAAGGGCCAGAAAGCCATCGACTGGGGATGA 1120
 -1485 GCTGGGAGCTCAAGAACAAAT**E-box** **CAGTTG**TTGAGATTT**MEF2** **TAAA**CAACTGAGCTGGGGATGGTTGGGGTAGGGGTGTAGAG 1200
 -1405 AGATGGCTCAGTGGCTAAGAG**E-box** **CACTTG**CTGCTCTTGCAAAGGATCTGGGTTT**GATA**TTCCAGCACCCACAGGGTGGCTCAC 1280
 -1325 AAC**E-box** **CACCTG**GATACTCCAATTCAGAGGATTCCTCTTCTGATCTTTGTGGCTCCA**GATA**AGCAAGGCATACATAAACA 1360
 -1245 CACAGGTAGGCCA**E-box** **CACTTG**TACACAGAAAATA**MEF2** **AAAT**AAACCTTAAAGCCTTAAGAGAGGGCCCAAGTAGCCAGCTTG 1440
 -1165 TGGCTTTGAAAAATACGCTGAGGGACTGGAGAGATGGCTCAGTGGTTAGGAGTACGGGTTGCTTTTCTGAACTCTGG 1520
 -1085 GTTCTGTCCCAGCA**E-box** **CACATG**GAGGCTAAAAAGTCAATCTCCGAAACTGTGTGATCCAATACCTTCTCTTGTATG 1600
 -1005 CAGACAAAAAATGCAGAGAAGACATCCAAATGTACAAACACATGCATTTTGGGTAAAAAGAAAAACAAAAACAAACTG 1680
 -925 GAGTGGAGGCTGGTGTACTGAGAGCTCTGAGGGTAGAGGTGTCTAGGGTCCCCGGTGGGTGTAACAGAACAAGCTGAG 1760
 -845 AGGGTCGTGGGCCCTTAAATGAGC**NFI** **TGGCTGGGATA**TTCTCCTGTATCCAGGGCACATCA**GATA**CCCAATGAGACCCTGTT 1840
 -765 TCAAAAAATAAAACAAACAGAGCAAGACAAAAGCCAAAGCCAAACAATAGAATCCAAGGCTGTGAATGGGGCCAGTTAT 1920
 -685 GGAGTAC**NFI** **TTGGCTAACACACA**GAGTCTGGGTTT**OCT** **ATAAA**ACGGAATATGGGGGCATA**E-box** **CACCTG** 2000
 -605 TCATCCCAGCACTCAGGAGATGAGGCAGCA**GATA**GGGGTTCAAGATCACCTTCACAACATAG**OCT** **CATG**TTGAGGCCAGCC 2080
 -525 TGGACTACATGAGAGTGTCTTGTAAAAACAAAAGGGCTGGAAACAATGGCTCAGTGGTTAAGAGCCCTGGTTGCTCCTC 2160
 -445 CAGAGGACCAGAGTCCAGTCC**GATA**TTGGCCA**GATA**CTCAACCCGCGCTGTCTGTAACACAGTTCAGGGGATTGGATGTCC 2240
 -365 GATTCCTCTTCTAGCTTTCTGGGGACTGCGTT**E-box** **CAGGTG**GTGCACAGACATCCATGCAGTCAAAGCAGGCAACAGAC 2320
 -285 AAAATAATAAAAACAGAAGGAACAAGAGAAGTGCAAAATAATACATCAAATATATAATATTAATAAAAAACAAAACACAGACG 2400
 -205 CCA**GATA**AAACCCATTGTGGTACCAGGGAACAAGTGGGATG**OCT** **ATGG**GTGAGGACAGTGTCCACCCAGAGTCAAGTGC 2480
 -125 TCACTCTGGAAATGGAAGAGGCCCACTCTGGGCAAGGCTGGCC**E-box** **CAGCTG**GTCTGCCACACCTCTTCTCCCTCCCTCC 2560
 -45 CCCTCCCTCTGCTCCTCCAGCCCCCTGTCCTCTCACTCACTGGCTAGGC +1 2609

Figure 1

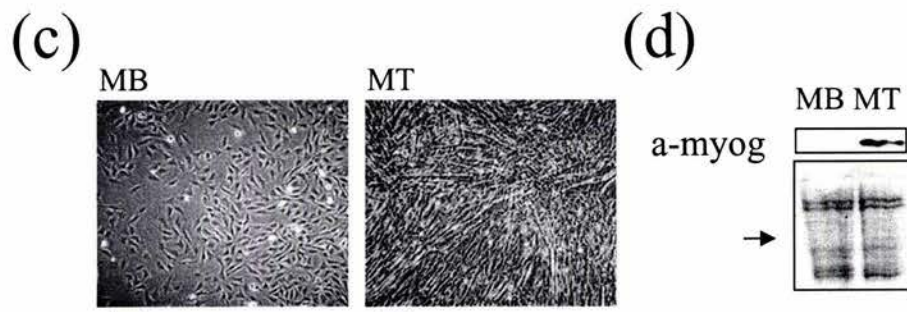
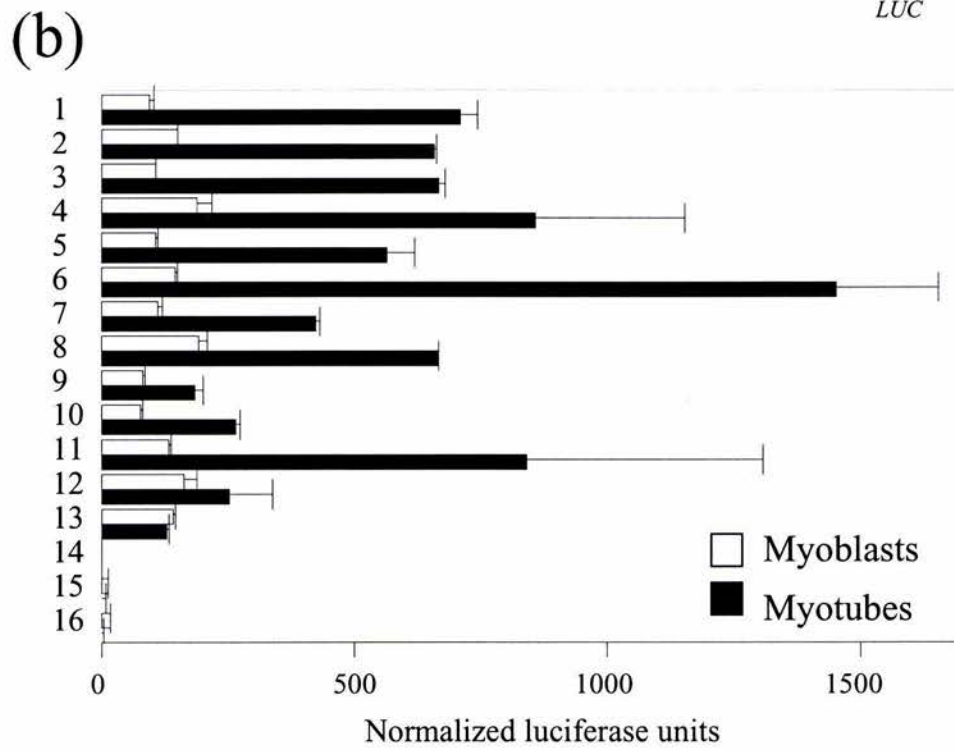
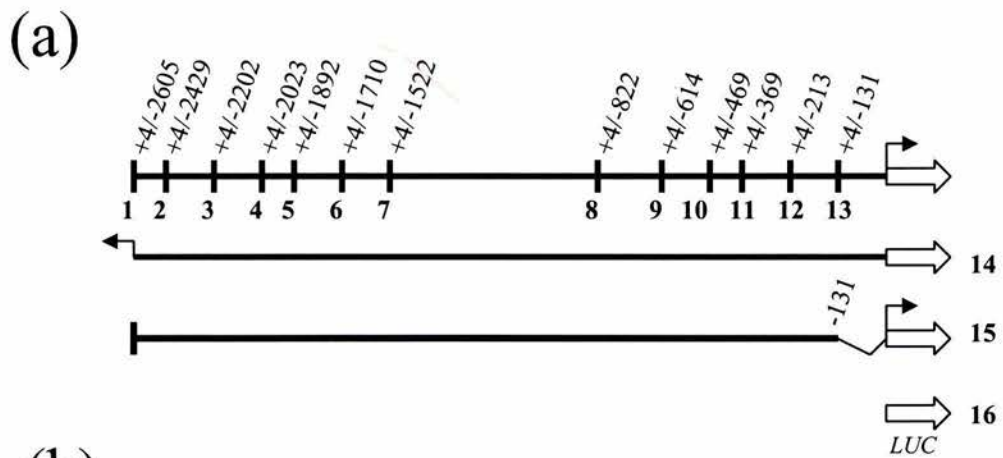


Figure 2

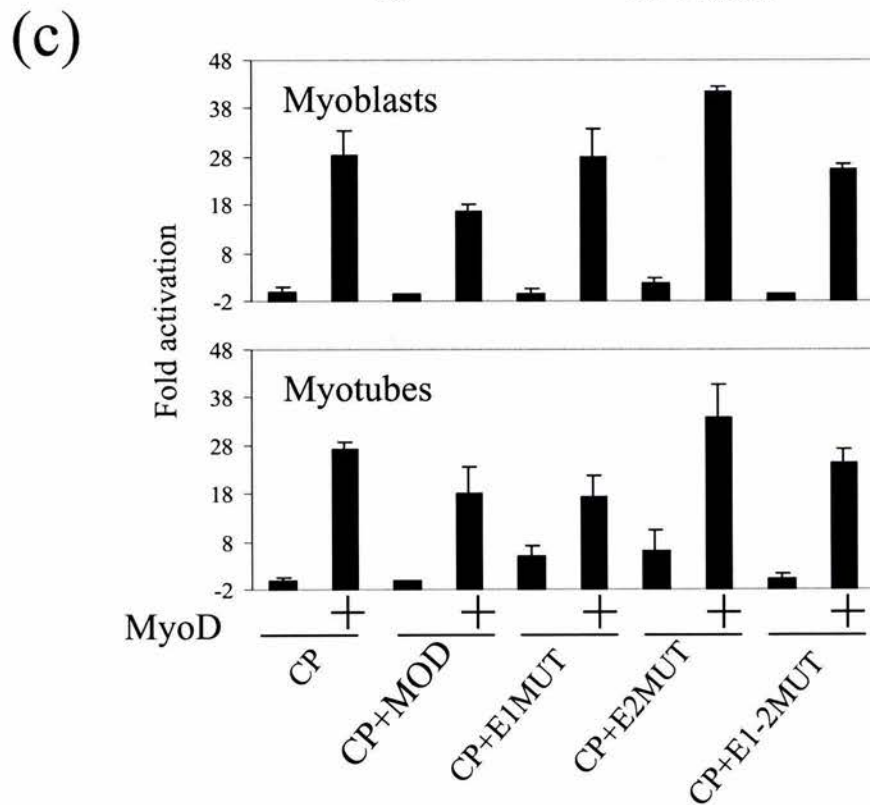
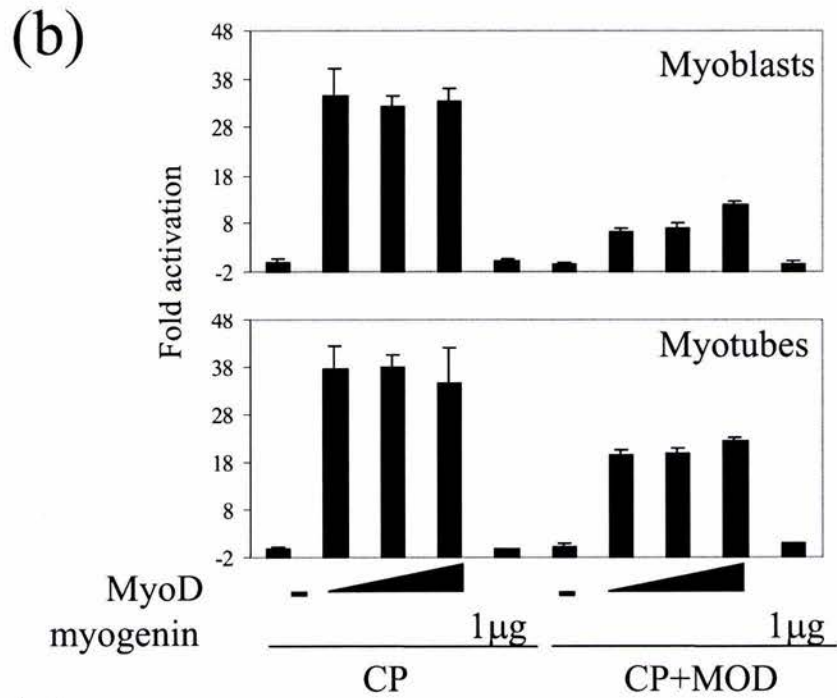
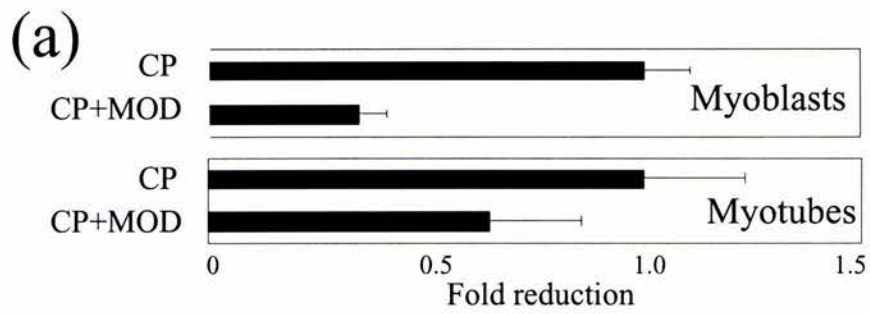
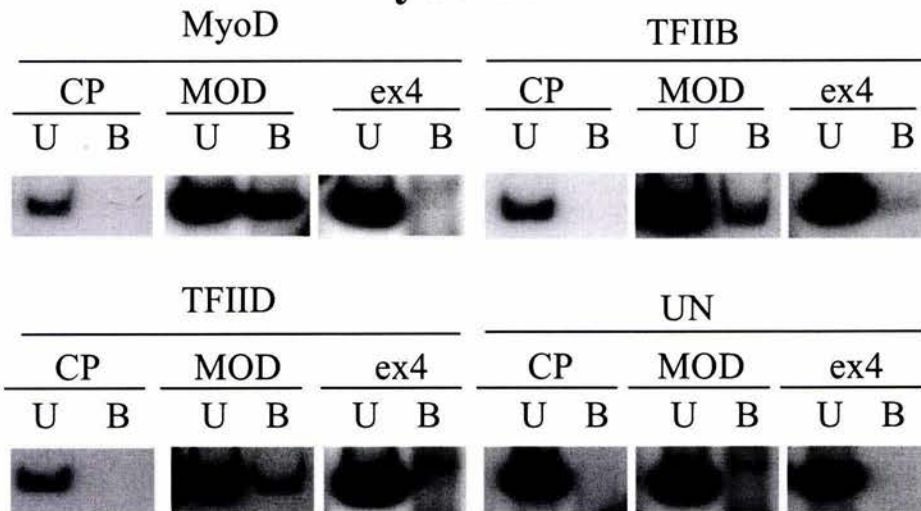


Figure 3

(a)

Myoblasts



(b)

Myotubes

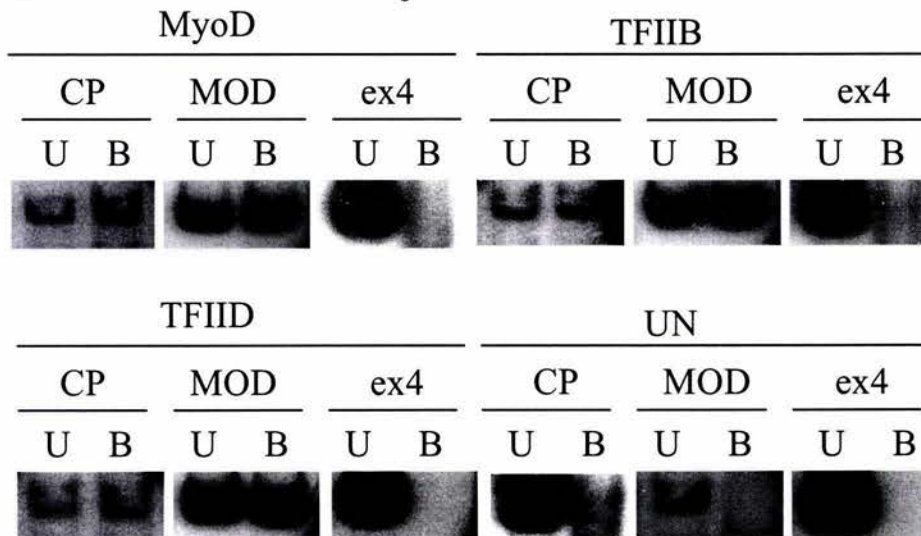
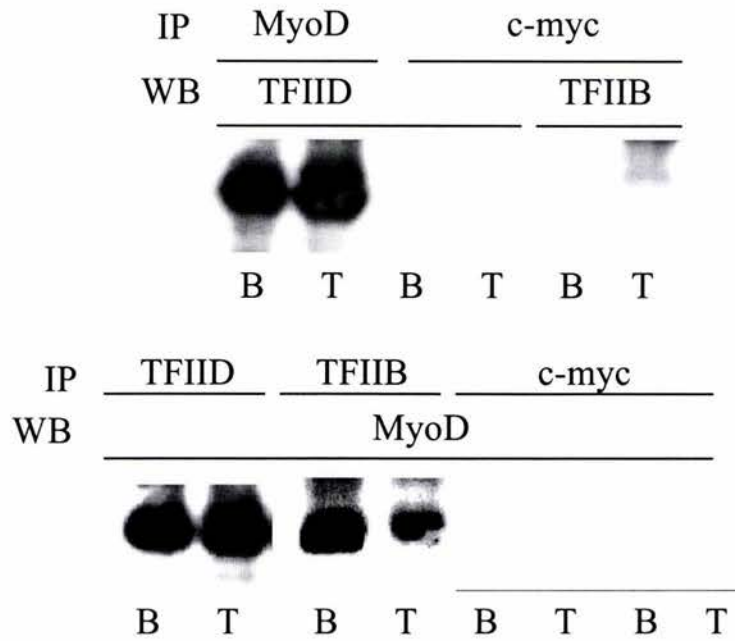
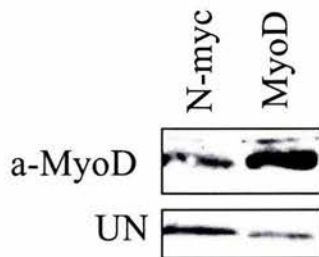


Figure 6

(a)



(b)



(c)

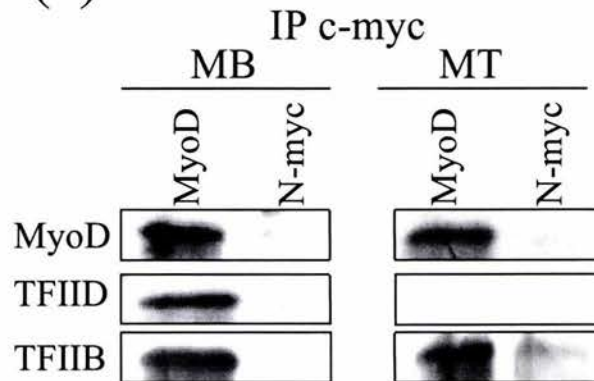


Figure 7

ARTICULO DE REVISIÓN EN PREPARACIÓN

MyoD: a multifunctional myogenic master regulator

Delgado-Olguín P, Recillas-Targa F and Coral-Vázquez R.

(2005) En preparación.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Todos los autores participan equitativamente en la preparación del escrito.

MyoD: a multifunctional myogenic master regulator

Paul Delgado-Olguín^{1,2}, Félix Recillas-Targa², Fabio Salamanca¹ and Ramón Coral-Vázquez^{1*}.

¹Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional S. XXI-IMSS. Ciudad de México, México.

² Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.

* Corresponding author: Ramón Coral-Vázquez, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc No. 330, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, México D.F. 06725, México. E. mail: rmcoralv@prodigy.net.mx Tel: (5255)-56276941. Fax: (5255)-55885174.

Abstract

Introduction

The first observations that suggested the existence of one or some myogenic regulators arisen from experiments consisting in the treatment of 3T3 and CH3/10T1/2CL8 mouse fibroblastic cell lines with 5-azacitidine or 5-aza-2'-deoxycitidine (Taylor and Jones., 1979). These are cytosine analogue compounds incapable of being methylated, that, after incorporated into the DNA molecule during replication, avoid the methylation mediated repression of gene promoters, causing general expression de-regulation (Jones et al., 1979). The treated fibroblasts presented three different mesenchimal phenotypes, one of them characterized as striated muscle (Taylor and Jones., 1979). To confirm this finding, 10T1/2 cells were treated with 5-azacitidine to induce the myogenic phenotype. Cells from the same line, without 5-azacitidine treatment were transfected with the myoblastic treated cells DNA. These experiments revealed that one of 15,000 transfected cell colonies became myogenic (Lassar et al., 1986). Through this way, the existence of one or several myogenic inducing factors was inducted, whose expression is repressed in non-muscle cells, and induced when the methylation of their regulatory regions is suppressed.

With the aim to identify the putative myogenic factor/s, a myocytes cDNA subtractive library screening was performed using as probe myoblasts DNA. As result, three cDNAs were selected, and transfection of one of them into fibroblast and other cell lines conferred stable muscular phenotype (Davis et al., 1987). The identified cDNA was named "myoblast determination gene number one" or MyoD, whose mRNA expression is detected only in striated muscle (Davis et al., 1987).

Three more myogenic factors were later identified: Myf5, Myogenin and MRF4 or Myf6, also called herculin (Braun et al., 1989; Edmonson and Olson, 1989; Rhodes and Konieczni, 1989; Wright et al., 1989; Miner and Wold, 1990). These are known as myogenic regulatory factors or MRFs, which control the myogenic program (Sabourin and Rudnicki, 2000).

MyoD structure and function

General protein structure

MyoD, as the MRFs, form part of the bHLH transcription factors, which possess a region composed of basic residues and a helix-loop-helix motif (Garrel and Campuzano, 1991). MyoD is composed by 318 aminoacids (aa) forming discrete domains. aa 1-60 from amino terminus form an acid domain (Fig. 1). aa 62-101 contain a cysteine and histidine rich sequence, that participate indirectly in chromatin remodelling (Gerber et al., 1997). The basic region is located between aa 102-124 (Tapscott et al., 1988), which is critical in the MyoD DNA recognition and in muscle-specific transcriptional activation (Davis et al., 1987) as further described. Between aa 143-162 an homologous region contained in Myc transcription factors is encoded, which mediates oligomerization (Lee, 1989; Davis et al., 1987; Zhuang et al., 1992). This region is involved in cellular specification and sexual determination in *Drosophila*. Factors including such motif include *achaete-scute*, *daughterless* and *twist* (Villares and Cabrera, 1987; Caudy et al., 1988; Thisse et al., 1988). The carboxy-terminus of MyoD is located in aa 163-318 (Tapscott et al., 1988), and contains an α -helix (H3) between aa 245 and 258 (Fig. 1) (Berkes et al 2004). The C-terminus, as the cysteine-histidine rich region at N-terminus, participates indirectly in chromatin remodelling in

transcriptionally repressed regulatory regions (Gerber et al; 1997). These regions are relevant in stable MyoD binding to muscle-specific regulatory regions through interaction with a complex containing the homeodomain Pbx protein (Berkes et al 2004).

Most of the MyoD functions had been explained through its three dimensional structure, resolved in a resolution of 2.8 Angstroms by the analysis of the bHLH dimer crystal (Ma et al., 1994). This fact raised the possibility of explaining partially the MyoD mediated transcriptional mechanism. Each bHLH MyoD monomer, including residues 102-116 forms two α -helix structures connected through an 8 aa loop. The first helix (H1) contains the basic region. Regions H1 and helix 2 (H2) form a “bundle” of four left-turned helices (Ma et al., 1994) (Fig. 2).

Amino terminus

The activating MyoD region is located in this aa tract, that can be substituted by the VP16 activation domain without losing myogenic activity in the dimeric context (Black et al., 1998). The N-terminal activating region had been mapped in 53 aa, and its activity increments when other portions of the protein are deleted, suggesting that this domain is encrypted (Weintraub et al 1991). This structural conformation could be relevant since N-terminus is a ubiquitination target to proteasome mediated degradation in nucleus (Lingbeck et al 2003). To activate the N-region, MyoD must contact DNA, besides oligomerize with other bHLH factors in order to induce a conformational change that exposes the activating region (weintraub et al 1991). The N-terminus is relevant for cooperative DNA binding, as demonstrated through a MyoD deletion mutant protein lacking aa 3-56, which binds a single recognition site and fails to bind

the two E-boxes in the muscular creatinin kinase (MCK) enhancer cooperatively. This seems to be important, since *in vivo*, occupancy of two or more E-boxes by MyoD is required for transcriptional activation of a reporter gene (Weintraub et al 1990). The N-terminal histidine cysteine rich region has been demonstrated to be critical in myogenesis as a global process, since, as the H3 domain, participate in the transcriptional regulation of a discrete subset of genes after MyoD induced myogenesis in MyoD^{-/-}Myf5^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (Berkes et al 2004).

Basic region

Structure and function

This region, rich in Arginine, Lysine and hydrophobic residues (Anthony-cahil et al 1992) is located 5' from the HLH domain, and is critical in MyoD DNA binding to the mayor groove (Davis et al 1990) (Fig. 2). Basic region is indispensable for the myogenic function, since when substituted by the analogous sequence of the *Drosophila achaete-scute* protein, muscle-specific gene activation is abolished. MyoD DNA binding is not sufficient to activate the myogenic differentiation program, since, such MyoD basic region substitution allows DNA recognition *in vitro*. (davis et al 1990).

The oligomerization and DNA binding functions of the bHLH domain are structurally separated in sub-domains. The myogenic critical region of the basic aa sequence contains 13 aa, 6 of which are different in the homologous region of E12 factor (aa B1, B2 and B3) (weintraub et al 1991) (Fig. 1), that like E47, is part of bHLH transcription factors family, recognizing the same DNA sequence as MyoD members (E-box), but that lack myogenic activity (Murre et al 1989b). This difference in aa composition between both factors suggest that the MyoD basic region encodes for a

myogenic specificity function, separable from the DNA binding function. These facts had been experimentally confirmed through substituting the MyoD basic region by the corresponding in E12. This MyoD chimerical protein is able to bind DNA, but lacks myogenic potential (Davis et al 1990). MyoD DNA binding is mediated through aa pairs B2 and B3 (Fig. 1), that when mutated, DNA binding, besides muscle-specific activation are abolished (Davis et al 1990). Two key aa for the basic region functions had been identified: Alanine 114, whose substitution causes a considerable decrement in the MyoD DNA affinity, and Threonine 115, that participates, in the regulation of transcriptional activation (Weintraub et al 1991), which is modulated through such residue phosphorylation in mitogenic stimuli conditions (ie, high serum concentrations), where MyoD activity is attenuated (Liu et al 1998).

The analysis of a chimerical E12 protein, where the basic region was substituted by the corresponding to MyoD, which acquires myogenic conversion capacity, permitted the identification of three aa, from the four separating the basic tract from H1, that are critical for myogenic conversion (Davis and Weintraub 1992) (Fig. 1). Mutation of the third aa of this region (Lysine), does not abolish myogenic conversion, suggesting that this residue is dispensable for such phenomenon (op cit). The relevance of this critical residues, is explained by the fact that when MyoD forms homodimers, the basic region is arranged in an α -helix, that is continued with H1 (Fig. 1), so, this sequence, that lacks Proline or glycine (that do not favour the formation of α -helices) (Anthony-cahill et al 1992), must conserve its primary structure in order to acquire the right three-dimensional conformation to bind DNA in a dimer context (Ma et al 1994).

The DNA sequence specific recognition by MyoD is indispensable to the activation of the myogenic program through the regulation of muscle-specific

promoters. The DNA recognition specificity is encoded at the basic region, as demonstrated through a chimerical MyoD protein with the E12 basic region harbouring a site directed mutation that re-establishes Alanine 114. This substitution confers to the protein the capacity of activating transcription through the recognition of E-boxes, as shown through reporter genes co-transfection assays (weintraub et al 1991). As we can appreciate, the DNA recognition specificity and muscle-specific transcriptional activation are related to oligomerization. It had been demonstrated that the transcriptional activation mediated by MyoD homodimers, is less efficient than the induced for example by MyoD-E47 heterodimers, that show more cooperativity in DNA binding (Bengal et al 1994). This notion is supported by the fact that heterodimers of proteins harbouring mutations at the basic region, maintain their DNA binding capacity, although they lack transcriptional *trans*-activation activity over a reporter gene. In addition, they have high dissociation rates during multiple E-boxes binding (Bengal et al 1994), confirming the relevance of oligomerization in the DNA binding specificity and muscle-specific activation.

DNA recognition

bHLH transcription factors recognize DNA at sequences called E-boxes, which consensus is CANNTG, where NN represents any particular nucleotide. These sequences were originally identified as *in vivo* protein recognition sites in immunoglobulines enhancers (Church et al 1985; ephrusi et al 1985). E-boxes were later identified in muscle-specific genes regulatory regions (Lassar et al 1989). DNA recognition is achieved through the bHLH domain (Fig. 2), that forms two amphipatic α -helixes, although most of the DNA contacts are established through the basic region

(Ma et al 1994). There are two highly conserved aa in H1 (Leucine and Phenylalanine), whereas in H2 there are five conserved residues. H1 and H2 are separated by a loop, and interact to DNA through their hydrophobic surfaces (Murre et al 1989).

The specificity in MyoD DNA recognition and transcriptional activation is regulated at two levels: at oligomerization and in the composition of the consensus sequence. In the former level, specificity depends on the proteins interacting with MyoD, that influence the basic region conformation at which binding is achieved (Blackwell and Weintraub 1990; Kopengnavon et al 2000), what results in differential preferences for the target sequence (Kopengnavon 2000). In the second level, MyoD DNA binding preferences are determined by the flanking, besides the consensus variable central nucleotides (Blackwell et al., 1993; Walhout et al., 1998; Delgado-Olguín et al. unpublished observations), although these are not contacted by MyoD (Ma et al 1994). It had been determined that MyoD preferentially recognizes the consensus sequence NTCACCTGAA, or **GG** as variable nucleotides (in bold) (Blackwell and Weintraub 1990). An example of the relationship between DNA binding specificity and regulation of MyoD activity by the E-box composition had been described in the IgH gene enhancer, which is not activated by MyoD although it posses two E-boxes (Weintraub 1994). One of such E-boxes was found to impede activation and even repress a reporter gene, since its mutation increases reporter activity. Further experiments revealed that such repression is mediated through two nucleotides flanking such E-box, that when mutated, permit activation by MyoD. These results raised the hypothesis postulating that the IgH enhancer has evolved to contain repressors directed to MyoD, and not to activators like E12 (Weintraub et al 1994), that functions in B cells (Kadesch 1992), where the enhancer is active (Kadesch 1986).

The identification of the aa involved in the E-box recognition was possible through the MyoD bHLH motif dimer crystal analysis. Glu 118 is particularly important in the consensus recognition. A lateral chain Oxygen of this residue accepts a H bond with the nucleotide C5 (Fig. 3). Other Oxygen of this base establishes a weak H bond with the N6 of A6 nucleotide. On these bases, the DNA chain is slightly curved, and is modified by the basic domain binding. The wide groove becomes narrower (10.8 Angstroms vs 12.3 Angstroms of B DNA), and the wide groove widens (8.1 Angstroms vs 4.8 Angstroms in B DNA) (Ma et al. 1994).

Arg 111 recognizes the bases T and G, it concedes a H bond to the N7 of the base G10' (Fig. 3). It also establishes a contact mediated by H₂O with the O6 of nucleotide G10', besides contacting an O phosphodiester in the same nucleotide. The side chain of this residue forms a H bond with the OH group of Thr 114, that by hydrophobic bonding contacts the methyl group of nucleotide T9' through the γ carbon (op cit 1994).

In a MyoD homodimer, Alanine 114 and threonine 115 are buried in the DNA major groove (Fig. 2). This suggests that their role in transcriptional activation resides in the conformation of Arginine 111, that is also positioned in the DNA-protein interface (op cit 1994). Analysis of the structure of the non-myogenic bHLH factor Max, revealed that Arginine 111 locates outside of the major groove (ferre de amare et al 1993). This observation suggests that such aa must stay buried in the DNA-protein interface in order of myogenic activity to occur (Ma et al 1994). In this scenario, when Ala 114 or Thr 115 are mutated, the Arg 111 position is compromised as also is the myogenic activity of MyoD (Weintraub et al 1991).

MyoD activation through the basic region

As clearly demonstrated, the basic region, specifically aa Ala 114 and Thr 115 are responsible for miogénesis induction, nevertheless, the MyoD activating region had been mapped at the amino terminus (weintraub et al 1991). In this section we aboard the relationship between these domains in transcriptional regulation. First, its important to remember that there are evidences indicating that the N-domain is encrypted in the MyoD context, and that it is exposed only when it contacts co-activators (op cit 1991) and specific DNA recognition is established (Huang et al 2000). It had been recently demonstrated that the basic domain myogenic aa act as transmitter of the activation signal to the N-terminus (Black et al 1998). This hypothesis is based in the fact that a MyoD hybrid protein, containing the E12 basic domain harbouring mutations in the myogenic residues, is not able to activate muscle-specific transcription through contacting MEF2C co-factor. This interaction confers MyoD the activation signal, that in turn is not transmitted through the non-functional basic region to the N-terminus. Based in these evidences, it is postulated that the protein-protein contact confers the activation signal, but it is not enough to mediate myogenesis, and that also the transmission of such signal is required (op cit 1998). The activation signal transmission is accomplished through intra-molecular structural changes (Huang et al 2000). This affirmation is based on the observation that MyoD with a substitution in Ala 114-Asparagin or hystidine (that are bulky aa) is not able to activate a reporter gene (op cit 1998). The same research group demonstrated that these changes cause Arg 111, engaged in DNA contacts in wt MyoD dimmers, to become exposed. This exposure is thought to impede Arg 111 to contact the N7 of the last G of the E-box at the mayor groove. In addition they show that the conformational change induced by the Ala 114

substitution is propagated to the activation region at the N-terminus, obstructing the MyoD-co-activator heterodimer response (Op cit 1998). These observations, besides the fact that Ala 114 is only present in myogenic bHLH factors, suggest that the activation domain functions only if the basic region myogenic code is intact. During MyoD DNA binding, such myogenic code determines the conformation of the basic and activation regions. In this scenario, the activation domain is only exposed when there is DNA binding in the correct sequence, supporting a regulation way for MyoD activity specificity (op cit 1998).

The bHLH domain

This domain, homologous to the corresponding region in Myc family of factors, as the basic region, is critical in the myogenic MyoD capacity, but not for nuclear localization as determined through analysis of functional domains by directed deletions (tapscott et al 1988). The required minimal region required to induce myogenesis in 10T1/2 stably transfected cells spans 68 aa including the region homologous to the Myc domain and the basic region (tapscott et al 1988), that are necessary for homo and hetero dimerization with widely expressed factors as E12 and E47 (Zhuang et al 1992) and for DNA specific recognition (Lassar et al 1989, davis et al 1990).

MyoD heterodimerization with E12 and E47 factors is important from the perspective of transcriptional regulation (lassar et al 1991). The MyoD-E12 or E47 complexes recognize E-boxes with more affinity than homodimers, and H2 is necessary for the recognition (Murre et al 1989). The E-boxes recognition by these complexes constitute a central point in the myogenic regulation, since act synergistically in potentiating expression of genes containing their target sequences, as of reporter genes regulated by multimerized E-boxes (lassar et al 1991). Cystein 126 in H1 and

Asparagine 146 and Gln 152 in H2, are important in MyoD specific heterodimerization with E12, since establish attraction pairs with such factor (Shirakata et al 1993).

The MyoD bHLH domain, specifically through the basic region, H1 and the aa separating them (Kaushal et al 1994) (Fig.1), that are the portions with myogenic activity (davis and weintraub 1992), mediate MyoD heterodimerization with MEF2A (muscle enhancer factor 2). This factor belongs to the “MCM1 agamous deficiens and serum response factor” (Yu et al 1992) super family, that as the MRFs, play a central role in myogenic differentiation (naya and olson 1999). Such role is achieved through its cooperation in the muscle-specific gene activation by binding E-boxes or AT rich DNA sequences, that constitute MEF2 target sites (olson et al 1995). The cooperativity of both factors has been demonstrated through fibroblasts co-transfection, what showed that over-expression of both, causes an increment in myogenic conversion in comparison to the number of colonies myogenically committed by MRFs alone (molkenin et al 1995). It is interesting to note that the recognition sites for both factors had been found close to each other in muscle gene promoters, what suggest the relevance of the physical contact of both in the constitution of an activation complex. Another relevant aspect concerning to this organization resides in the hypothesis of MEF2 in conferring specificity to MyoD in the activation of muscle promoters (Kaushal et al 1994). Al together, these observations highlight the relevance of MyoD oligomerization through the HLH domain, that is critical in the specificity and the modulation of the MyoD and directed transcriptional control (Davis et al 1990).

The loop region

The MyoD protein sequence corresponding to the loop separating H1 and H2 is conserved in length and composition between mouse, *C. elegans*, *Drosophila* and frog (hoopwood et al 1990, Murre et al 1989; Krause et al 1990; michelson et al 1990), what suggest its functional relevance. Nevertheless this sequence is tolerant to variation, since, alterations in aa composition does not alter the MyoD myogenic activation function (Davis et al 1990), although length variations influence remain to be tested.

References

- [1] Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; 17:771-719.
- [2] Jones PA, Taylor SM, Wilson VL. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res* 1983; 84:202-211.
- [3] Lassar AB, Paterson BM, Weintraub H. Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1986; 47:649-656.
- [4] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51:987-1000.
- [5] Braun T, Bober E, Buschhausen-Denker G, Kohtz S, Grzeschik KH, Arnold HH, Kotz S. Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible autoactivation by the Myf gene products. *EMBO J* 1989; 8:3617-3625.
- [6] Edmondson DG, Olson EN. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* 1990; 4:1450.
- [7] Rhodes SJ, Konieczny SF. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev* 1989; 12B:2050-2061.
- [8] Wright WE, Sassoon DA, Lin VK. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 1989; 56:607-617.
- [9] Miner JH, Wold B. Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:1089-1093.
- [10] Sabourin LA, Rudnicki MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000; 57:16-25.

- [11] Garrell J, Campuzano S. The helix-loop-helix domain: a common motif for bristles, muscles and sex. *Bioessays*. 1991; 13:493-398.
- [12] Gerber AN, Klesert TR, Bergstrom DA, Tapscott SJ. Two domains of MyoD mediate transcriptional activation of genes in repressive chromatin: a mechanism for lineage determination in myogenesis. *Genes Dev* 1997; 11:436-450.
- [13] Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 1988; 242:405-411.
- [14] Lee WM. The myc family of nuclear proto-oncogenes. *Cancer Treat Res* 1989; 47:37-71.
- [15] Zhuang Y, Kim CG, Bartelmez S, Cheng P, Groudine M, Weintraub H. Helix-loop-helix transcription factors E12 and E47 are not essential for skeletal or cardiac myogenesis, erythropoiesis, chondrogenesis, or neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:12132-12136.
- [16] Villares R, Cabrera CV. The achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell* 1987; 50:415-424.
- [17] Caudy M, Vassin H, Brand M, Tuma R, Jan LY, Jan YN. daughterless, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the achaete-scute complex. *Cell* 1988; 55:1061-1067.
- [18] Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, Perrin-Schmitt F. Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J* 1988; 7:2175-2183.

- [19] Ma PC, Rould MA, Weintraub H, Pabo CO. Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. *Cell* 1994; 77:451-459.
- [20] Black BL, Molkenin JD, Olson EN. Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol Cell Biol* 1998; 18:69-77.
- [21] Weintraub H, Dwarki VJ, Verma I, Davis R, Hollenberg S, Snider L, Lassar A, Tapscott SJ. Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes Dev* 1991; 5:1377-1386.
- [22] Lingbeck JM, Trausch-Azar JS, Ciechanover A, Schwartz AL. Determinants of nuclear and cytoplasmic ubiquitin-mediated degradation of MyoD. *J Biol Chem* 2003; 278:1817-1823.
- [23] Weintraub H, Davis R, Lockshon D, Lassar AB. MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: Occupancy of two sites is required for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:5623-5627.
- [24] Anthony-Cahill SJ, Benfield PA, Fairman R, Wasserman ZR, Brenner SL, Stafford WF 3rd, Altenbach C, Hubbell WL, DeGrado WF. Molecular characterization of helix-loop-helix peptides. *Science* 1992; 255:979-83.
- [25] Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 1990; 60:733-746.
- [26] Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 1989; 58:537-544.

- [27] Liu LN, Dias P, Houghton PJ. Mutation of Thr115 in MyoD positively regulates function in murine fibroblasts and human rhabdomyosarcoma cells. *Cell Growth Differ* 1998; 9:699-711.
- [28] Davis RL, Weintraub H. Acquisition of myogenic specificity by replacement of three amino acid residues from MyoD into E12. *Science* 1992; 256:1027-1030.
- [29] Bengal E, Flores O, Rangarajan PN, Chen A, Weintraub H, Verma IM. Positive control mutations in the MyoD basic region fail to show cooperative DNA binding and transcriptional activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91:6221-6225.
- [30] Church GM, Ephrussi A, Gilbert W, Tonegawa S. Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature* 1985; 313:798-801.
- [31] Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W. B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 1985; 227:134-140.
- [32] Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H. MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 1989; 58:823-831.
- [33] Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989; 56:777-783.
- [34] Blackwell TK, Weintraub H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 1990; 250:1104-1110.

- [35] Kophengnavong T, Michnowicz JE, Blackwell TK. Establishment of distinct MyoD, E2A, and twist DNA binding specificities by different basic region-DNA conformations. *Mol Cell Biol* 2000; 20:261-272.
- [36] Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, Weintraub H. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol Cell Biol* 1993;13:5216-5224.
- [37] Walhout AJ, van der Vliet PC, Timmers HT. Sequences flanking the E-box contribute to cooperative binding by c-Myc/Max heterodimers to adjacent binding sites. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1397:189-201.
- [38] Weintraub H, Genetta T, Kadesch T. Tissue-specific gene activation by MyoD: determination of specificity by cis-acting repression elements. *Genes Dev*. 1994; 8:2203-2211.
- [39] Kadesch T. Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription. *Immunol Today* 1992; 13:31-36.
- [40] Kadesch T, Zervos P, Ruezinsky D. Functional analysis of the murine IgH enhancer: evidence for negative control of cell-type specificity. *Nucleic Acids Res* 1986; 14:8209-21.
- [41] Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 1993; 363:38-45.
- [42] Huang J, Weintraub H, Kedes L. Intramolecular regulation of MyoD activation domain conformation and function. *Mol Cell Biol* 1998; 18:5478-5484.
- [43] Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 1991; 66:305-315.

- [44] Shirakata M, Friedman FK, Wei Q, Paterson BM. Dimerization specificity of myogenic helix-loop-helix DNA-binding factors directed by nonconserved hydrophilic residues. *Genes Dev* 1993; 7:2456-2470.
- [45] Kaushal S, Schneider JW, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* 1994; 266:1236-4012.
- [46] Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 1992; 6:1783-1798.
- [47] Naya FS, Olson E. MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11:683-688.
- [48] Olson EN, Perry M, Schulz RA. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev Biol* 1995; 172:2-14.
- [49] Molkenkin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* 1995; 83:1125-1136.
- [50] Hoopwood ND, Pluck A, Gurdon JB. MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *EMBO J* 1989; 8:3409-3417.
- [51] rause M, Fire A, Harrison SW, Priess J, Weintraub H. Ce MyoD accumulation defines the body wall muscle cell fate during *C. elegans* embryogenesis. *Cell* 1990; 63: 907-919.

[52] Michelson AM, Abmair SM, Bate M, Arias AM, Maniatis T. Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 1990; 4:2086-2097.

Figure legends

Figure 1. MyoD protein structure. MyoD spans 318 aminoacids, and posses in its amino terminus (N) a cystein rich region (CH), followed to 3' by the basic, junction (J) and helix loop helix (bHLH) domains. Helix 1 (H1) and helix 2 (H2) are indicated. This domain is continued by the carboxy-terminal protein portion (C), which contains the helix 3 (H3). The position of aminoacids limiting some domains are indicated. The aminoacids composing each part of the bHLH domain are showed. Aminoacid groups B1, B2 and B3 are indicated. Taken from Davis et al, 1990 [40].

Figure 2. Three dimensional MyoD bHLH homodimimer crystal structure. The structure shows the four "bundle" a-helices formed by MyoD homodimimerization through helices 1 and 2. The basic region, that interacts with the DNA double helix mayor groove, forms a continued a-helix with helix 1, which is separated from helix 2 through a loop. Aminoacids delimiting such domains are indicated. Taken from Ma et al, 1994 [37].

Figure 3. MyoD ribbon like structure of the bHLH motif. Aminoacids Thr 115 and Ala 114 are buried into the DNA mayor groove, whereas Arg 111 contacts DNA positioned our of the mayor groove. Lys 124, that forms part of the junction region separating the basic domain from Helix 1 is indicated. Taken from Kopengnavon et al, 2000 [53].

Figure 4. MyoD aminoacids that contact the DNA recognition site. The scheme represents a DNA double helix as two parallel lines, containing the corresponding bases represented as boxes. The wide lined boxes represent consensus CAGCTG. The bases marked as ' represent their position in the 3'-5' DNA chain. Circles represent phosphate groups, being the grey circles the groups contacted by MyoD. DNA bases and phosphate groups contacted by the corresponding MyoD aminoacids are indicated by arrows. Double pointed arrows indicate the interactions established by MyoD aminoacids. Taken from Ma et al, 1994 [34].

Figure 5. MyoD suffers activation structural changes when binding DNA and contacting co-activators. (A) The DNA specific recognition by the basic region (dark grey) produces a structural change constituting an activating signal that (B) must be propagated to the amino terminal region, constituting the activation domain (AD) in order to be able to contact co-activators (c) and initiate myogenic activation (A).

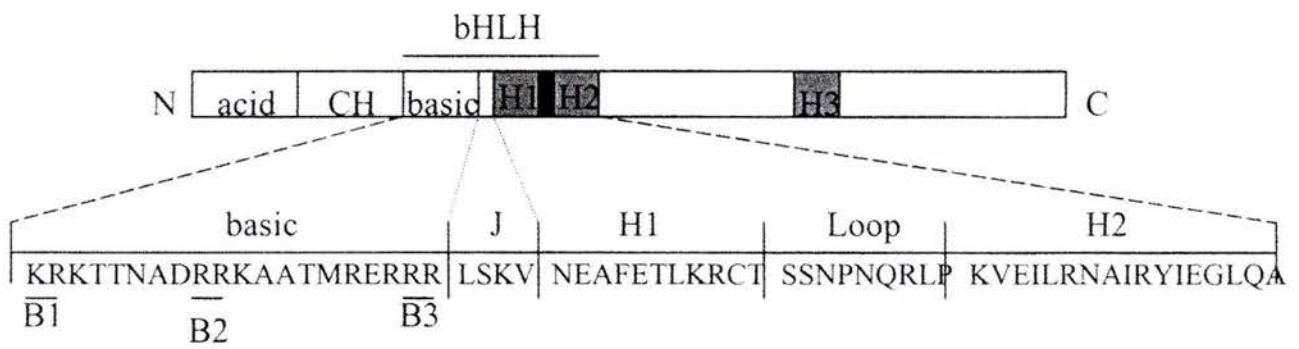


Figure 1

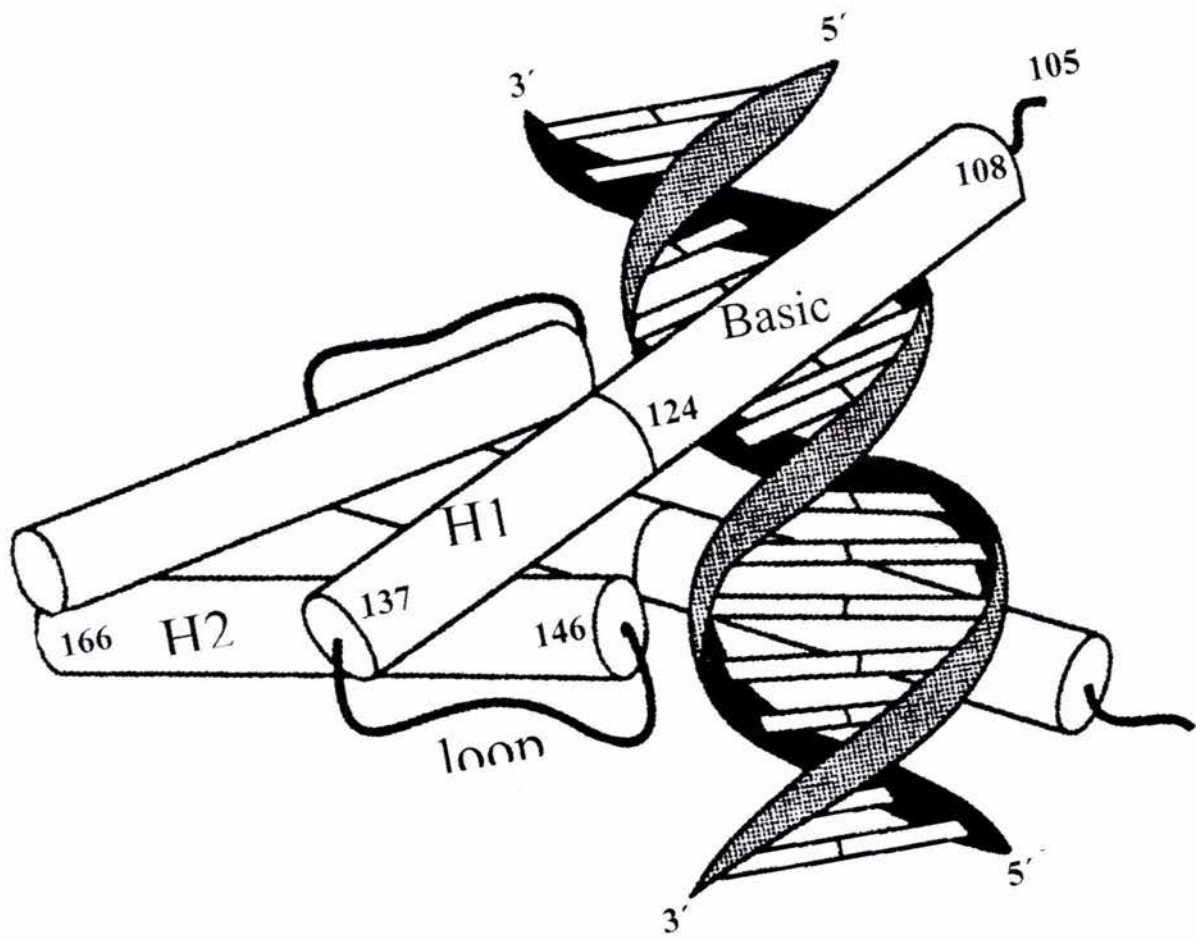


Figure 2

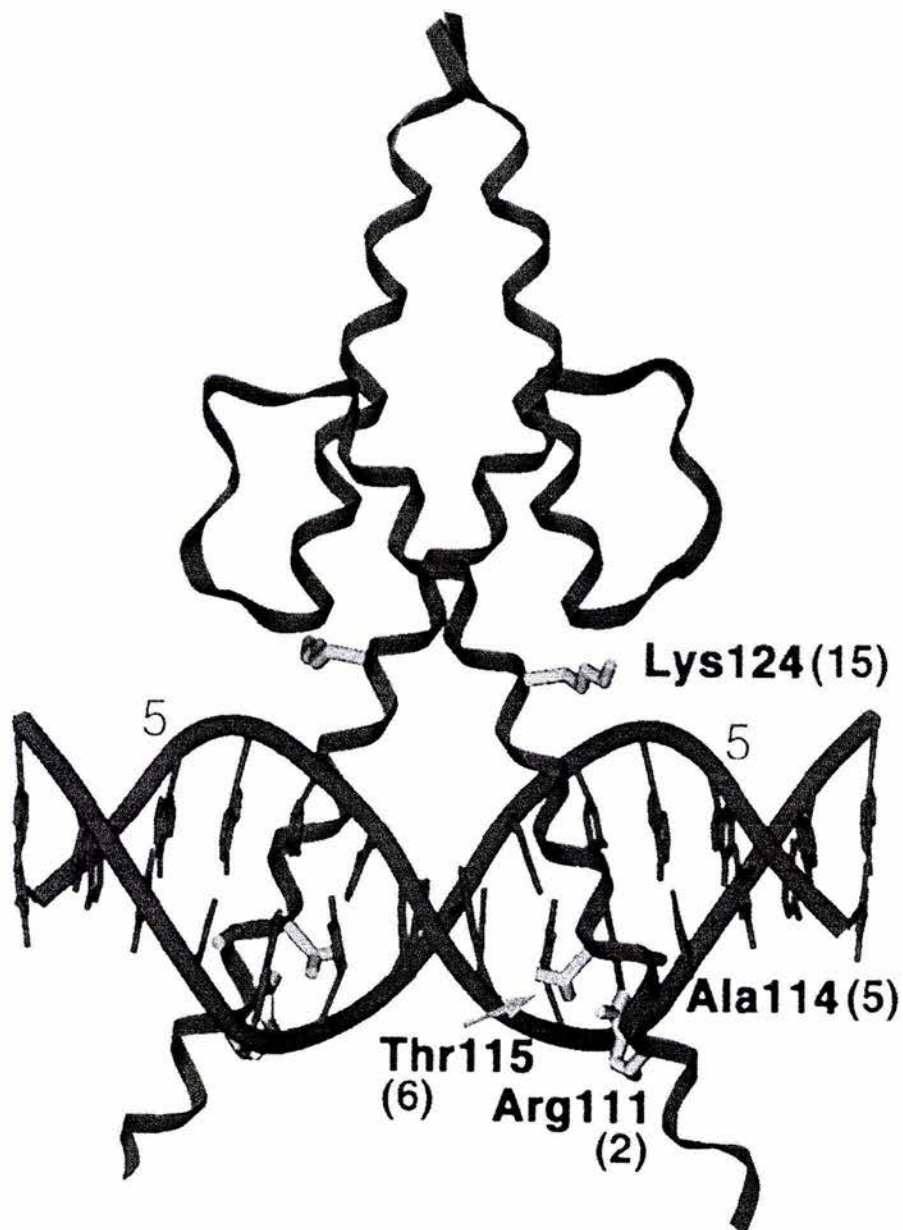


Figure 3

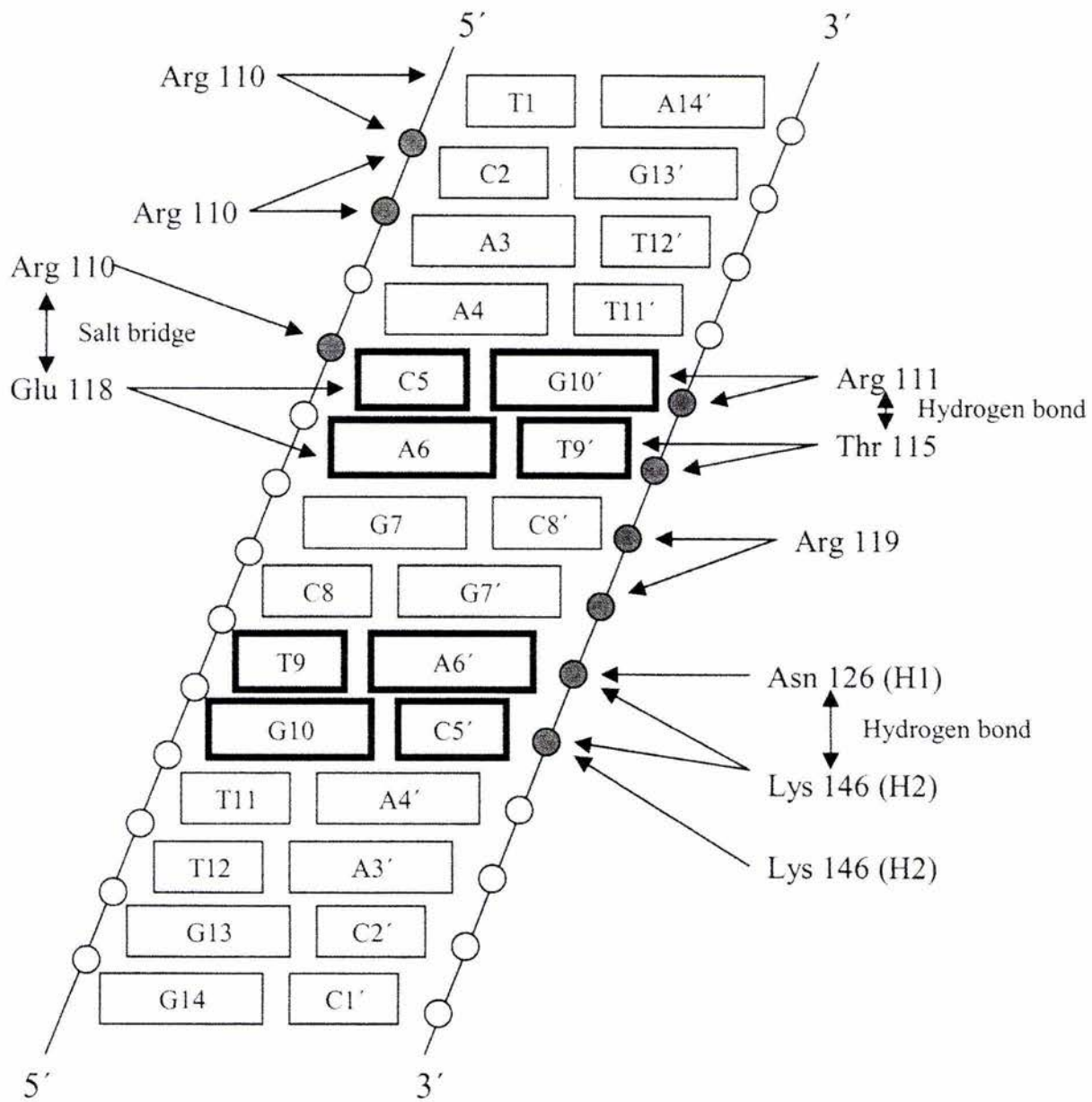


Figure 4

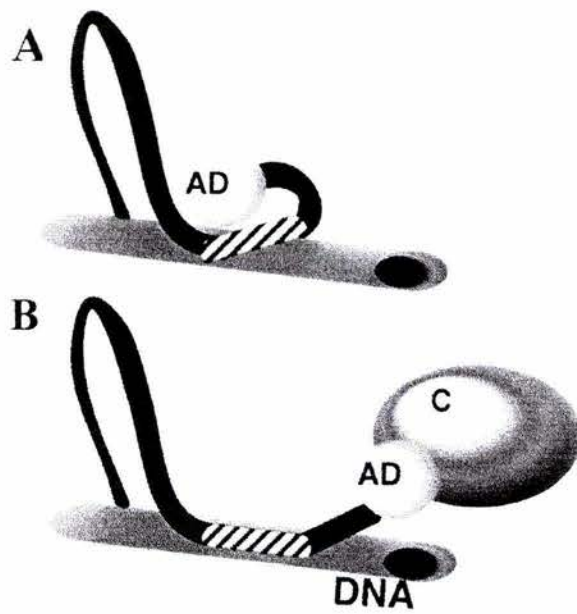


Figure 5