



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN
DE CALSECUESTRINA CARDIACA HUMANA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
MÉDICO CIRUJANO JOSÉ LUIS REYES JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ÁNGEL ZARAIN HERZBERG

MÉXICO, D. F.

MAYO, 2008

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN DE
CALSECUESTRINA CARDIACA HUMANA**

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias
presenta**

Medico Cirujano José Luis Reyes Juárez

Tutor: Dr. Ángel Zarain Herzberg

סוניהגל סיאפורבש בוט

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
a. El Acoplamiento Excitación-Constracción	5
b. Componentes del Retículo Sarcoplásmico	9
i. La Calsecuestrina	9
ii. El Canal de Liberación de Calcio	19
iii. La ATPasa de Calcio	22
c. Expresión de Calsecuestrina	25
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	31
V. MATERIALES Y MÉTODOS	32
VI. RESULTADOS	39
a. Caracterización del gen humano de <i>Casq2</i>	39
b. Análisis de la secuencia de la región reguladora 5' del gen <i>hCasq2</i>	41
c. Análisis comparativo de la región reguladora 5' del gen humano de <i>Casq1</i>	45
d. Actividad transcripcional del gen <i>hCasq2</i> en células musculares cardíacas	47
e. Actividad transcripcional el gen <i>hCasq2</i> en mioblastos y miotubos de líneas celulares de músculo esquelético	49
f. Actividad transcripcional del gen <i>hCasq2</i> en fibroblastos en la línea celular C3H10T1/2	52
g. Actividad transcripcional y expresión del gen <i>hCasq2</i> durante la diferenciación muscular esquelética	53

h.	Propiedades de unión ADN/Proteína del motivo conservado en la región reguladora 5' del gen <i>hCasq2</i>	56
i.	Propiedades funcionales de los sitios MEF-2, E-box, CArG-box proximales en la región reguladora 5' del gen <i>hCasq2</i>	62
j.	Expresión de factores de transcripción miogénicos durante la diferenciación muscular	69
VII.	DISCUSIÓN	80
VIII.	CONCLUSIONES	93
IX.	PERSPECTIVAS	94
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
XI.	APENDICE I: Artículo publicado	109

ÍNDICE DE FIGURAS

I.1 Estructura del retículo sarcoplásmico	4
I.2 El acoplamiento excitación-contracción	8
I.3 Estructura de los dominios de CASQ y Tiorredoxina	11
I.4 Estructura cristalina de calsecuestrina	12
I.5 Distribución de cargas en la molécula de calsecuestrina	13
I.6 Modelo de los cambios conformacionales de calsecuestrina	14
I.7 Distribución de la calsecuestrina en el interior del retículo sarcoplásmico	17
I.8 Modelo de los efectos de la fosforilación por PKA del RyR2 en el corazón	21
I.9 Función del complejo SERCA/PLB, estructura de fosfolamban	24
I.10 Expresión de Calsecuestrina 2 en diferentes tejidos del ratón	27
VI.1 Estructura del gen humano de <i>Casq2</i>	39
VI.2 Sitio de inicio de la transcripción del gen <i>hCasq2</i>	40
VI.3 Análisis de la secuencia proximal de la región reguladora 5' del gen <i>Casq2</i>	43,44
VI.4 Comparación de las regiones reguladoras-5' de los genes <i>hCasq1</i> y <i>hCasq2</i>	46
VI.5 Construcciones <i>hCasq2/Luc</i> generadas	48
VI.6 Actividad Transcripcional del gen <i>hCasq2</i> en Cardiomiocitos	48
VI.7 Actividad Transcripcional del gen <i>hCasq2</i> en mioblastos y miotubos de Sol8	51
VI.8 Actividad Transcripcional del gen <i>hCasq2</i> en Fibroblastos	52
VI.9 Actividad Transcripcional del gen <i>hCasq2</i> durante la diferenciación muscular esquelética	54
VI.10 Expresión del ARNm de Calsecuestrina 2 durante la diferenciación muscular esquelética	55
VI.11 Capacidad de unión a proteínas del sitio MEF-2	58

VI.12 Capacidad de unión a proteínas del sitio E-box consenso	59
VI.13 Capacidad de unión a proteínas del sitio CArG-box del gen <i>hCasq2</i>	61
VI.14 Actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCasq2</i> mutadas en cardiocitos	64
VI.15 Actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCasq2</i> mutadas en músculo esquelético	66
VI.16 Actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCasq2</i> mutadas en fibroblastos	68
VI.17. Niveles relativos de los factores de transcripción durante la diferenciación miogénica	70
VI.18 Cambios en la expresión de MEF-2A durante la diferenciación muscular	71
VI.19 Cambios en la expresión de SRF durante la diferenciación muscular	73
VI.20 Cambios en la expresión de MEF-2C durante la diferenciación muscular	75
VI.21 Cambios en la expresión de MEF-2D durante la diferenciación muscular	77
VI.22 Cambios en la expresión de Miogenina durante la diferenciación muscular	79
VII.1 Esquema del comportamiento de las secuencias de ADN de la region reguladora de <i>hCasq2</i>	85

TABLAS

1. Oligonucleótidos para EMSA y Mutagénesis	37
2. Oligonucleótidos para PCR en tiempo real	38
3. Resumen de los resultados en músculo esquelético	79

ABREVIATURAS

AEC	Acoplamiento Excitación Contracción
CaM	Calmodulina
CaMK	Cinasa Dependiente de Ca^{2+} /Calmodulina
CASQ	Calsecuestrina
CPVT	Taquicardia Ventricular Polimórfica Catecolaminérgica
DHPR	Receptor de Dihidropiridina
EMSA	Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética
HAND	Heart And Neural crest Derivatives expressed transcription factor
JCN	Juntina
jRS	Retículo Sarcoplásmico de Unión
LCIC	Liberación de Calcio Inducida por Calcio
LRS	Retículo Sarcoplásmico Longitudinal
MHC- \langle	Miosina de Cadena Pesada \langle
MEF-2	Myocyte Enhancer Factor-2
NCX	Intercambiador Sodio Calcio
PKA	Proteína Cinasa A
PLB	Fosfolamban
PMCA	Transportador de Calcio de Membrana Plasmática
PP1	Fosfatasa 1
RS	Retículo Sarcoplásmico
RyR	Canal de Liberación de Calcio, Receptor de Rianodina
SERCA	ATPasa de Calcio del Retículo Sarcoplásmico
SRF	Serum Response Factor
TnC	Troponina C
TRD	Triadina
VMLC	Miosina de Cadena Ligera

I. INTRODUCCIÓN

La contracción muscular es un proceso altamente regulado, que depende de la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y que en el músculo estriado se encuentra regulada primordialmente por el retículo sarcoplásmico (RS), el cual funciona como un almacén de altas concentraciones de Ca^{2+} (0.5 a 10 mM). El RS es un extenso sistema de membranas intracelulares que rodea a cada miofibrilla, a manera de una cisterna llena de calcio. Cada miofibrilla se divide en estructuras sarcoméricas y el RS también se divide en compartimentos especializados (1). Cada segmento de RS inicia y termina en una cisterna terminal, que junto con la estructura membranosa llamada túbulo transverso (túbulo T) conforman las estructuras denominadas como tríadas o RS de unión (JRS). En el músculo cardíaco la tríada no está tan definida como lo está en el músculo esquelético, debido a que no se encuentran regularmente dos cisternas terminales con relación al túbulo T, y la estructura más frecuentemente encontrada son las díadas, en donde se asocia una cisterna terminal al túbulo T; aunque las características estructurales esenciales de esta estructura se mantienen (Figura I.1) (2, 3). En las células cardíacas, existen relativamente menos túbulos transversos, pero en general son de mayor diámetro, y normalmente solo están asociados en uno de sus lados a una cisterna terminal, por lo que las estructuras de tríadas son raras en el miocardio. Estas características morfológicas sugieren que el acoplamiento entre la excitación y contracción muscular (AEC) ocurre casi exclusivamente por señales originadas en las uniones triádicas en el músculo esquelético, mientras que en el

cardiomiocito la liberación de Ca^{2+} del RS es inducida por el Ca^{2+} que entra por los canales tipo L voltaje dependientes (receptores de dihidropiridina, DHPR) (4, 5). Las regiones del RS que no se encuentran en la cercanía de los túbulos T, se conocen como RS longitudinal (LRS) que está constituido por membranas tubulares ramificadas en el interior de la célula cuya función primordial es el transporte activo de Ca^{2+} al interior del RS durante la relajación muscular (6) .

Las principales proteínas que regulan la captación, almacenaje y liberación de Ca^{2+} en el RS tanto de músculo esquelético como cardiaco son la ATPasa de Ca^{2+} (SERCA), la proteína de alta capacidad de unión a Ca^{2+} llamada calsecuestrina (CASQ) y el canal de liberación de Ca^{2+} también conocido como receptor de rianodina (RyR) (7-10). En el cardiomiocito, el AEC comienza cuando un estímulo despolarizante en el túbulo T activa al canal de calcio sensible a voltaje del sarcolema (receptor de dihidropiridina, DHPR), el cual permite la entrada de pequeñas cantidades de Ca^{2+} extracelular al citoplasma induciendo al canal RyR para que libere Ca^{2+} del interior del RS para elevar la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de ~ 20 nM hasta ~ 1 μM . La fuerza de contracción muscular está regulada por la unión de Ca^{2+} a la troponina C, que desencadena el entrecruzamiento de actina y miosina (11). Durante la relajación muscular en el corazón humano, el Ca^{2+} se transporta del citoplasma al RS principalmente por la ATPasa de Ca^{2+} (60-70%) y posteriormente se transporta al exterior por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (30-40%). Por tanto, la contracción y la relajación en miocitos cardiacos se regula por las concentraciones de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

El manejo anormal del calcio por el cardiomiocito, contribuye de manera predominante a la disfunción contráctil observada en la hipertrofia cardiaca severa y en la insuficiencia cardiaca. Ambos, la contracción y la relajación muscular se encuentran alteradas en los miocitos cardiacos de seres humanos y de modelos animales de insuficiencia cardiaca (12-16). Se ha demostrado que la disminución en la velocidad de acortamiento del miocito cardiaco durante la contracción se correlaciona tanto a la actividad reducida de ATPasa miofibrilar (17), así como a una concentración disminuida de $[Ca^{2+}]_i$ (18-20). Por lo tanto, es razonable asumir que *in vivo* el contenido de calcio del RS es bajo en la insuficiencia cardiaca y contribuye a la disminución de contractilidad y generación de fuerza del cardiomiocito.

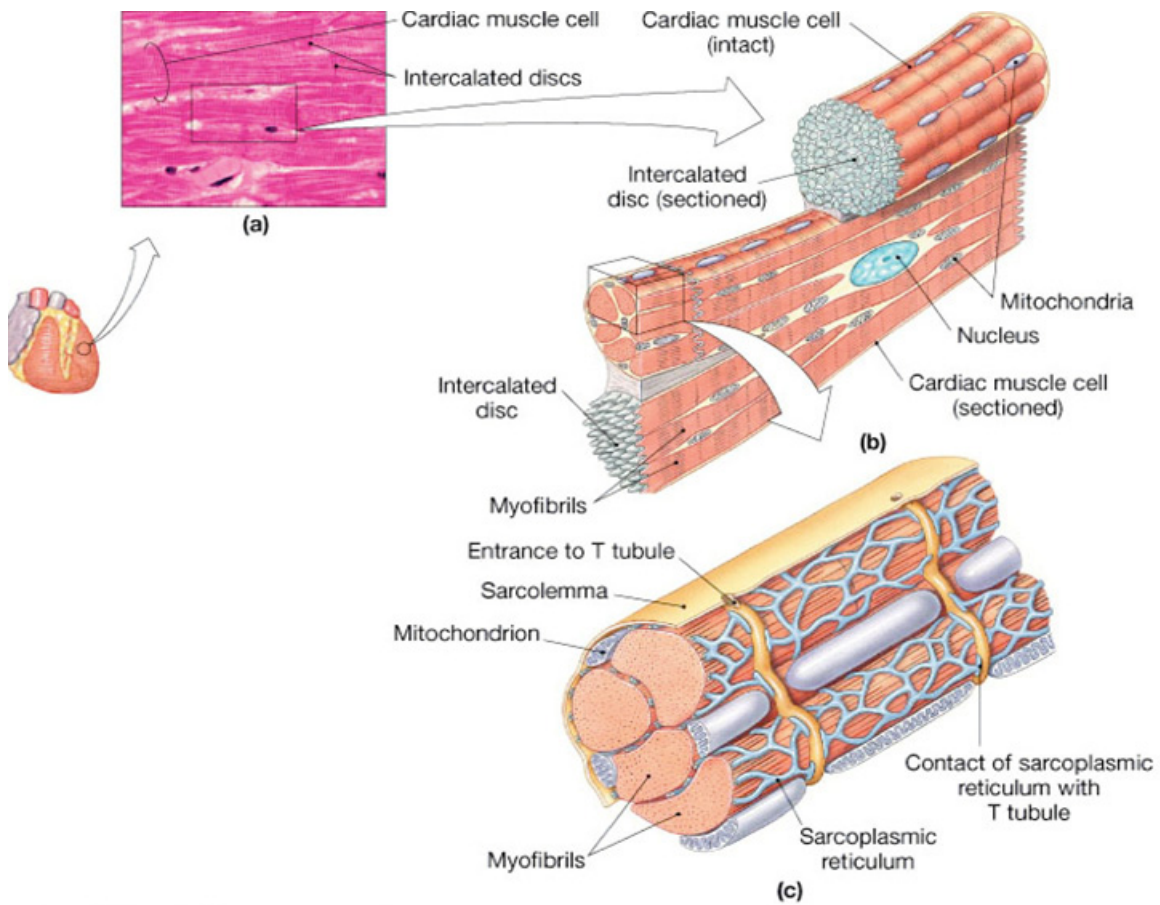


Figura I.1 Estructura del retículo sarcoplásmico. Anatomía del RS en células cardíacas Panel A. Corte histológico de ventrículo izquierdo que muestra a los cardiomiocitos en su disposición habitual, y los discos intercalados para la propagación del impulso eléctrico. Panel B. Esquema de la estructura de la fibra muscular cardíaca , donde se observa la disposición de los componentes celulares, y el espacio extracelular, prolongado por el túbulo T. Panel C. Esquema de la ultraestructura de una fibra muscular, donde se observa el túbulo T y su relación con las cisternas del retículo sarcoplásmico,; y se observa la relación del retículo sarcoplásmico con la miofibrilla.

EL ACOPLAMIENTO EXCITACIÓN CONTRACCIÓN

El acoplamiento entre la excitación y contracción muscular (AEC) es el mecanismo que acopla la despolarización del sarcolema con la liberación de Ca^{2+} del RS, es un proceso que depende de la interacción entre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (DHPR) y los canales de liberación de Ca^{2+} del RS (RyR). La liberación de Ca^{2+} por el RS es esencial en la actividad cardiaca y es el activador directo de los miofilamentos que llevan a cabo la contracción; el manejo incorrecto de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ por los cardiomiocitos es una de las principales causas de disfunción contráctil y arritmias en condiciones patológicas (21, 22).

Durante el potencial de acción, el Ca^{2+} entra a la célula por la activación de los canales tipo L (DHPR), debida a la despolarización lo que provoca una corriente entrante de Ca^{2+} (I_{Ca}), la entrada de una cantidad pequeña de Ca^{2+} es detectada por el canal RyR y resulta en la activación de éste, lo que permite que los RyRs se abran y permitan la salida de una cantidad masiva de Ca^{2+} del RS de forma rápida, la combinación del Ca^{2+} entrante por el canal DHPR y el liberado del RS incrementa rápidamente la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que permite la unión del Ca^{2+} con la troponina C, lo que a su vez permite la activación de la maquinaria contráctil (23). Recientemente se han descrito otros dos mecanismos que pueden inducir la liberación de Ca^{2+} del RS; el primero es a través de canales tipo T dependientes de Ca^{2+} , el segundo es por medio del NCX, al invertir el flujo y generar una entrada de Ca^{2+} tanto por un aumento de la concentración de Na^+ citosólico y/o por una despolarización; sin embargo ambos mecanismos son

menos efectivos en provocar la liberación de Ca^{2+} por el RS, en comparación con el DHPR y se desconoce si tienen un papel en condiciones fisiológicas (24).

Los canales DHPR se activan por la despolarización y se inactivan en una forma Ca^{2+} dependiente, lo que limita la cantidad de Ca^{2+} que entra a la célula por el potencial de acción, esta inactivación dependiente de Ca^{2+} es mediada por CaM unida al extremo carboxilo-terminal del canal DHPR. Generalmente, la zona donde se encuentran los canales DHPR está en proximidad al JRS, donde se encuentran los canales RyR, con lo que funcionalmente se facilita la activación de los estos. La apertura de un canal DHPR asociado a un canal RyR (couplon) asociando 2-4 iones Ca^{2+} al RyR es suficiente para activar totalmente el proceso de liberación en ese couplon y desencadenar la apertura del mismo. Los RyR que se encuentran en la periferia de un couplon, pueden activarse ya sea por una concentración local alta de Ca^{2+} ($>10 \mu\text{M}$) o por un acoplamiento con el RyR del couplon, con lo que se tiene un mecanismo de todo o nada, pero debido a que la concentración de Ca^{2+} entrante decae rápidamente entre couplones, deriva en que la activación no se propague; un mecanismo que funciona para generar un margen de seguridad es la asociación de más de un canal de RyR por couplon (10-25 DHPR/100 RyR) con lo que se asegura que cada couplon dispare y propague el impulso inicial (21, 22).

Una vez que se ha llevado a cabo la contracción muscular, es necesario que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, regrese a sus niveles en reposo (10-20 nM), para permitir la relajación muscular. En el proceso de retirar el Ca^{2+} del citoplasma, hay 2 mecanismos fundamentales en mamíferos, uno está dado por SERCA2a

mencionado previamente, que se encarga de transportar activamente el Ca^{2+} al interior del RS, el otro mecanismo de importancia es el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), el cual desplaza por gradientes Ca^{2+} hacia el exterior de la célula, y desplaza Na^+ al interior de la célula. Existen además otros mecanismos que pueden contribuir al movimiento del Ca^{2+} , como son las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y los transportadores mitocondriales de Ca^{2+} , sin embargo su contribución para restituir la concentración normal de Ca^{2+} intracelular $[\text{Ca}^{2+}]_i$ total en la relajación durante condiciones fisiológicas normales es mínima. En condiciones fisiológicas en el corazón humano, SERCA2 desplaza de vuelta al interior de RS ~60% del Ca^{2+} y el NCX moviliza ~40% del Ca^{2+} restante al espacio extracelular, aunque estos porcentajes varían de especie a especie y pueden modificarse en condiciones patológicas (21, 22). (Figura I.2)

La liberación de Ca^{2+} del RS inducida por Ca^{2+} (LCIC) en cardiomiocito es un mecanismo de retroalimentación positiva, pero su inactivación es necesaria para la recarga diastólica, por lo que se han propuesto tres mecanismos para esta inactivación: 1) la depleción del RS de Ca^{2+} , 2) la inactivación o adaptación del RyR y 3) el agotamiento estocástico. El agotamiento estocástico se refiere a que todos los canales DHPR y RyR se cierran simultáneamente, la corriente entrante de Ca^{2+} decae rápidamente y se interrumpe el proceso de liberación; este mecanismo es poco probable que ocurra, debido al número de canales que se activan normalmente. La depleción local de Ca^{2+} no es capaz de explicar en su totalidad la inactivación de la LCIC

debido a que se han observado que después de tiempos prolongados (>200 ms) de activación, es un escenario en el que la cantidad de Ca^{2+} liberado por el RS no disminuye. Se han propuesto dos formas de inactivación de RyR, ambas dependientes de Ca^{2+} , una es la inactivación por absorción en la que el RyR es incapaz de reabrirse hasta que se recupera, y la otra es por adaptación en la que después de activarse, las probabilidades de apertura del canal son menores, pero aún es posible que se abra ante una corriente mayor de Ca^{2+} entrante. Hasta el momento no se ha determinado si solo uno de estos mecanismos predomina sobre los otros, y existen pocos estudios que arrojen datos concluyentes (21-25)

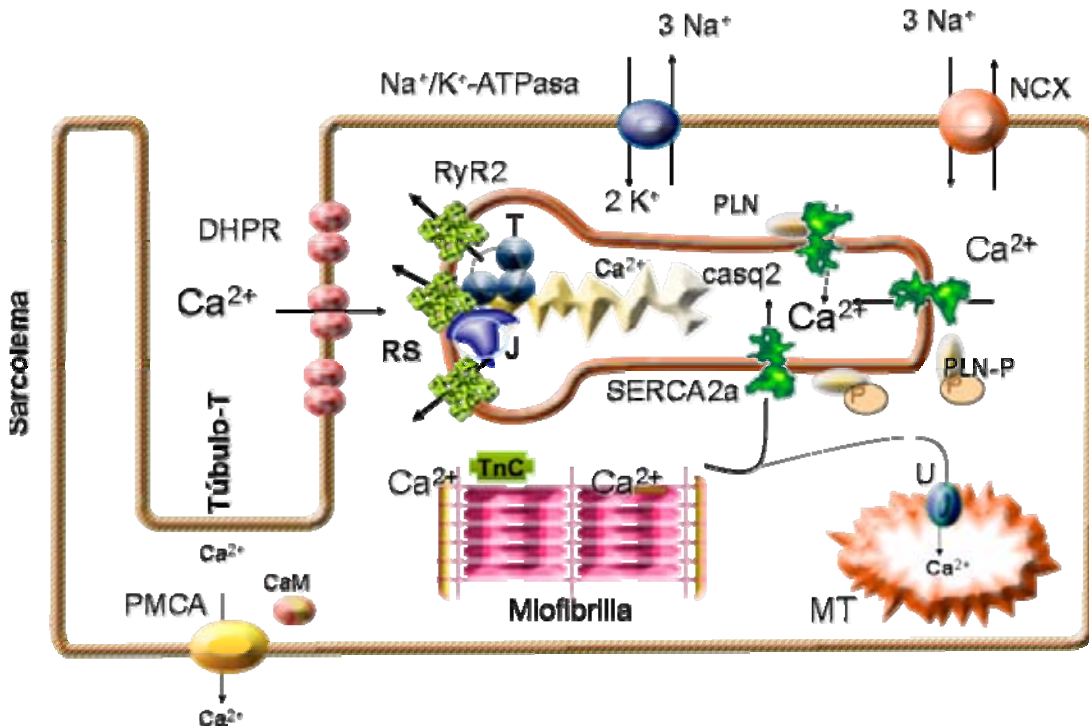


Figura I.2 El acoplamiento excitación-contracción. El AEC comienza cuando el DHPR recibe un estímulo despolarizante, que lo activa permitiendo la salida de Ca^{2+} del RS por medio del RyR para activar a la TnC y permitir la contracción muscular. Durante la relajación el Ca^{2+} del citosol es retirado por SERCA2a hacia el RS, o por el NCX hacia el espacio extracelular. Al interior del RS, el Ca^{2+} es unido por CASQ para evitar su precipitación. PLN, Fosfolamban; J, Junctina, T, Triadina, PMCA, ATPasa- Ca^{2+} de la Membrana Plasmática.

COMPONENTES DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO

Los principales componentes proteicos del retículo sarcoplásmico han sido bien caracterizados, particularmente los del JRS debido a la importancia de esta estructura en la fisiología de la contracción; los componentes de mayor importancia son el canal de liberación de Ca^{2+} o receptor de rianodina (RyR), la proteína calsequestrina (CASQ), y algunas otras como la juntina y la triadina que participan en el anclaje de CASQ al RyR además de participar en su regulación; existen otras proteínas como la calstabilina 2 que se une al RyR en su cara citoplásmica y contribuye a su regulación (26). El otro componente de gran importancia en la estructura y función del RS es la ATPasa de Ca^{2+} del RS (SERCA) junto con su proteína reguladora fosfolamban (PLB) (27), que se encuentra predominantemente en la zona del LRS.

La Calsequestrina

La calsequestrina es la proteína más abundante en el interior del RS, en donde constituye la principal proteína que une Ca^{2+} y es capaz de almacenar Ca^{2+} en una cantidad suficiente (0.5 a 2 mM) para permitir las contracciones de manera repetida (26). La CASQ es una proteína con un peso molecular estimado de 44 kDa; altamente ácida, conteniendo más del 37% de los aminoácidos de Asp o Glu, concentrados en la región C-terminal. Estas características la convierten en una proteína con una alta capacidad para unir Ca^{2+} , (30-50 mol Ca^{2+} /mol CASQ), con una afinidad relativamente baja (K_d 1mM) a fuerzas iónicas normales (28, 29). Existen dos isoformas descritas de CASQ codificadas por genes distintos

(*Casq1* y *Casq2*), la isoforma CASQ1 se localiza en músculo esquelético, y la isoforma CASQ2 en el músculo esquelético de contracción lenta. Se encuentra exclusivamente en las cisternas del JRS, no se ha encontrado en el LRS (6), se le observa en la proximidad de la membrana del RS aunque no está anclada a ésta, sino que está asociada a las proteínas juntina y triadina, que junto con el RyR forman un complejo multiproteico (30). Se ha descrito su función principal como amortiguador de $[Ca^{2+}]$ para evitar la precipitación debido a las altas concentraciones de este ion que se hallan al interior del RS. Hasta el momento no se han descrito diferencias funcionales entre ambas isoformas, por lo que los resultados obtenidos con una isoforma se consideran válidos para ambas (26, 31).

Tras la unión a Ca^{2+} la CASQ sufre cambios conformacionales, y en respuesta al incremento de las concentraciones de Ca^{2+} produce la precipitación de la proteína que deriva en la producción de fibras o cristales en forma de agujas (31). Por estas características en condiciones normales en el RS dos tercios del Ca^{2+} asociado a CASQ se encuentran en agregados, y un tercio se encuentra asociado a CASQ soluble. En base a estos datos se infiere que se requiere de la formación de complejos para la unión de alta capacidad Ca^{2+} /CASQ. Los estudios de cristalización demuestran que la CASQ carece de dominios de unión a Ca^{2+} característicos como el dominio "EF-hand", típico de proteínas ligadoras de Ca^{2+} como la troponina C (32). Estos datos sugieren que la unión Ca^{2+} /CASQ en lugar de requerir de múltiples sitios de unión a Ca^{2+} , está dada por la atracción electrostática por los residuos negativos en CASQ (Figura

I.5) (26, 32). Los estudios de cristalización también demuestran que la CASQ tiene tres dominios casi idénticos organizados en tándem denominados I, II, III, con una topología similar a la de la tiorredoxina bacteriana (Figura I.3) (32). La cristalización también comprueba que existen dos tipos de interacción en las interfases de la dimerización: “front to front”, “back to back” (Figura I.4); ambos tipos de interacción acumulan una gran cantidad de residuos ácidos. Se cree que la unión a Ca^{2+} se da cuando las cargas positivas de este llenan las bolsas negativas formadas en los contactos de dimerización (31, 33).

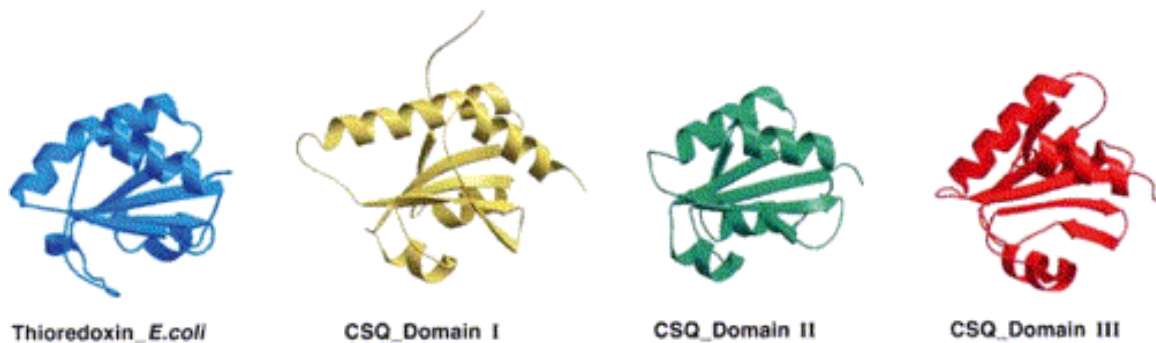


Figura I.3 Estructura de los dominios de CASQ y Tiorredoxina. Comparación entre los tres dominios (dominio I, residuos 13-124; dominio II, residuos 125-228; dominio III, residuos 129-352) de calsecuestrina esquelética de conejo y el dominio de tiorredoxina de *E. Coli*. Tomado de Wang (1998)

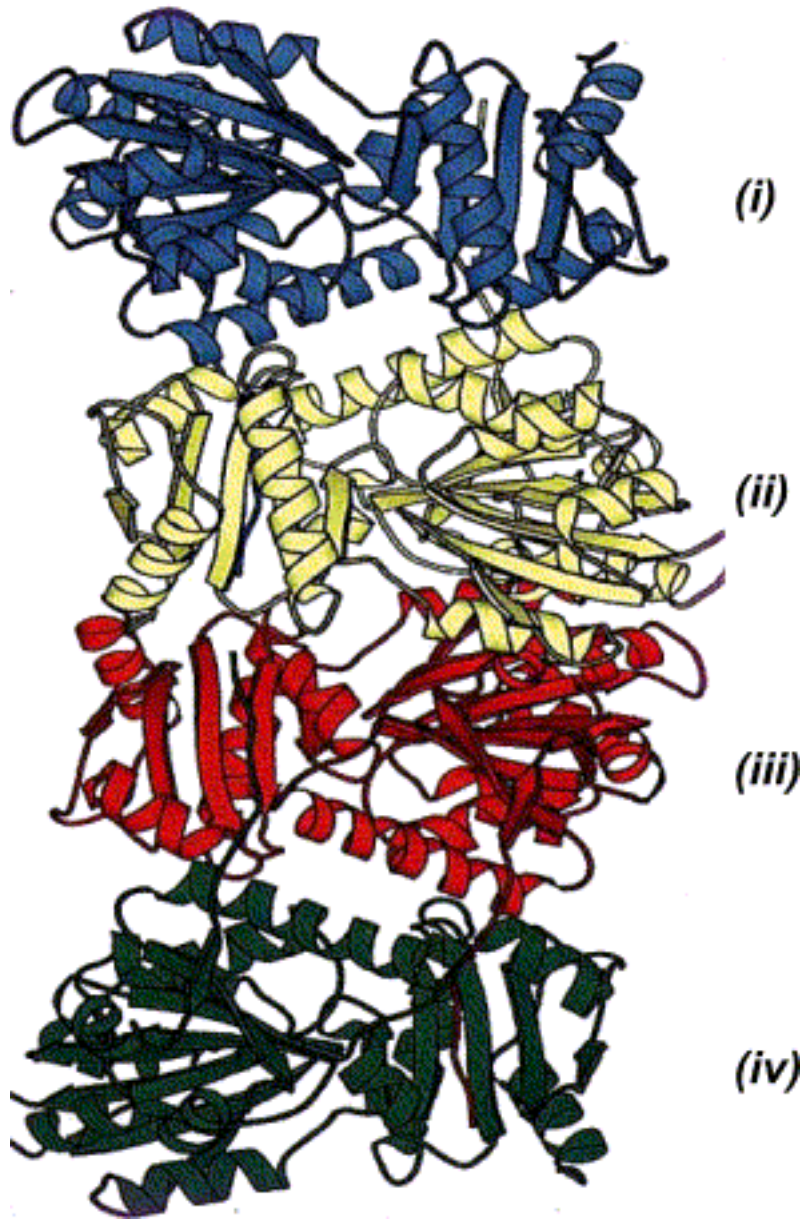


Figura I.4 Estructura cristalina de calsecuestrina. Ilustración de las interacciones entre cuatro moléculas de calsecuestrina esquelética de conejo, las interacciones “front to front” se ven entre la molécula azul (i) y amarilla (ii), y entre la molécula roja (iii) y la molécula verde (iv). La interacción “back to back” se observa entre la molécula amarilla (ii) y la roja (iii). Tomado de Wang (1998).

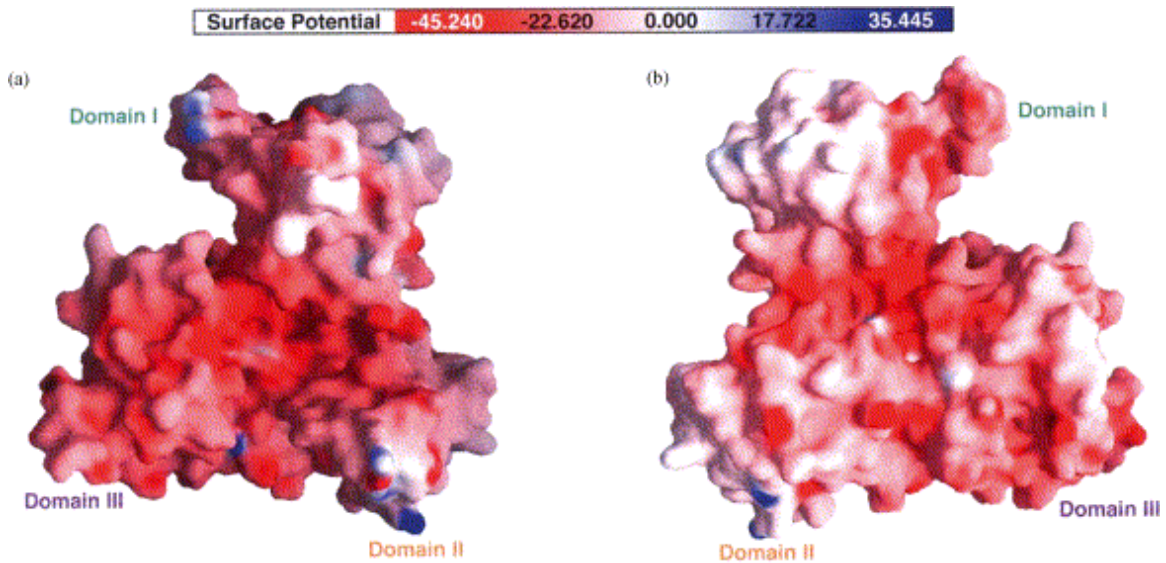


Figura I.5 Distribución de cargas en la molécula de calsecuestrina. La carga en la molécula de calsecuestrina de frente (a) y de espalda (b). El color rojo es negativo, azul positivo y blanco neutral o hidrofóbico. El dominio III en el extremo C-terminal, tiene el potencial electronegativo más grande. Todos las zonas electronegativas son por residuos Asp y Glu. Tomado de Wang (1998).

Por medio del uso de mutantes que truncan la proteína en diferentes secciones, se determinó el papel del Ca^{2+} para la formación de los contactos “front to front”, “back to back”, en la polimerización de CASQ, y tras la determinación de los estados de conformación y de polimerización se propuso un modelo. En la presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} o la ausencia, la CASQ se encuentra mayoritariamente lineal debido a la repulsión de cargas. A medida que se incrementan las concentraciones de Ca^{2+} , los dominios de tiorredoxina adquieren su conformación por el efecto negativizante que ejerce el Ca^{2+} sobre la repulsión de cargas. A mayores incrementos de la concentración de Ca^{2+} se empiezan a presentar las interacciones entra moléculas de CASQ, dándose la interacción “front to front” primero debido a que la región N-terminal de la que depende tiene un menor número de residuos ácidos; en el caso de la

interacción “back to back”, es la última en aparecer, debido a que la región C-terminal de la que depende posee una mayor cantidad de residuos ácidos y requiere de más Ca^{2+} para neutralizar la carga. En la presencia de concentraciones superiores a 5 mM se forma un polímero lineal de CASQ, tras la formación de los dímeros dependientes de las interacciones “front to front” y “back to back” (Figura 1.6) (32-34).

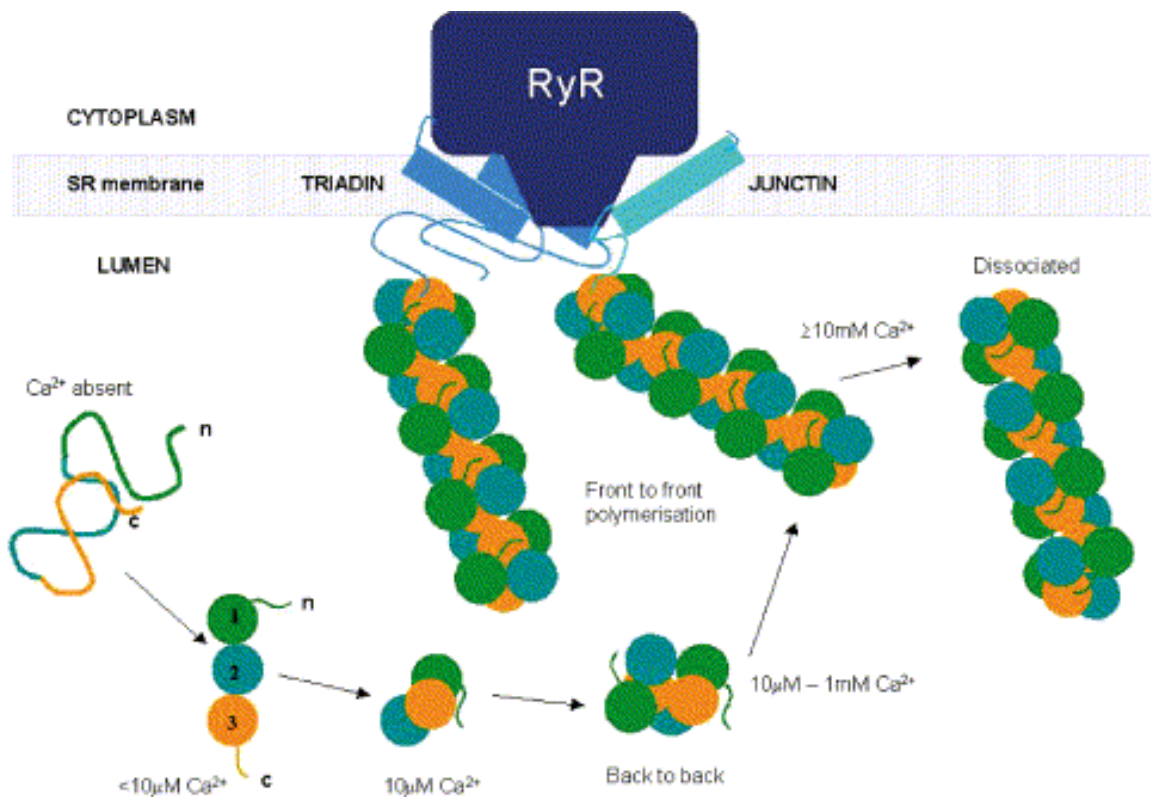


Figura 1.6 Modelo de los cambios conformacionales de calsequestrina. En ausencia de Ca^{2+} , la CASQ se encuentra desplegada, con un incremento a $<10\ \mu\text{M}$, la estructura se condensa y forma los tres dominios tipo tiorredoxina. Conforme incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]$ $10\ \mu\text{M}$, la CASQ se dimeriza con interacciones “back to back”, entre $10\ \mu\text{M}$ y $1\ \text{mM}$, se forman polímeros lineales por medio de las interacciones “front to front”, y hay interacciones con el RyR vía TRD y JCN. A concentraciones $<10\ \text{mM}$, el polímero se disocia del RyR. Tomado de Beard (2004).

En las concentraciones habituales de Ca^{2+} en el RS y las distintas proteínas, se ha demostrado que la mayoría de la CASQ se encuentra en matrices fibrosas densas que están compuestas de polímeros y multímeros de CASQ (Figura 1.7) (35). Hasta el momento se ignora si durante el proceso de contracción-relajación la CASQ sufre cambios en la polimerización o si esta se mantiene. Se ha especulado que la existencia de dichos cambios como un mecanismo para la disociación del Ca^{2+} durante la contracción en el AEC. Se ha determinado que la concentración de Ca^{2+} presente en el interior del RS durante la contracción, disminuye hasta un 54%, mientras que la cantidad de Ca^{2+} unido a CASQ disminuye hasta un 28%. Hasta el momento no existen datos que confirmen que los cambios conformacionales son el mecanismo por medio del cual se libera el Ca^{2+} (28).

Además de interactuar consigo misma en forma de oligómeros, la CASQ se asocia con otros componentes del RS en la región donde están localizados los RyR. Fundamentalmente interactúa con las proteínas triadina (TRD) y juntina (JCN) y posiblemente RyR2 (30). Estas interacciones están dadas por dominios de aminoácidos cargados en los extremos N- o C-terminal. Se ha demostrado que estas interacciones con TRD y JCN, median la asociación entre el RyR y la CASQ, y que se ha demostrado el papel de CASQ como regulador del RyR (36, 37).

La TRD es una proteína de la membrana en el jRS, posee un segmento N-terminal corto, un dominio único transmembranal, y una región C-terminal de gran carga, que se localiza en la luz del RS y constituye la mayor parte la

proteína. Hasta el momento se han identificado tres isoformas, de las cuales la TRD-1 (40 kDa) es la más abundante en el corazón. La región C-terminal es capaz de interactuar con CASQ, RyR y JCN. Esta porción de la proteína se caracteriza por la presencia de segmentos largos de residuos KEKE. El sitio de unión a CASQ se ha identificado en un solo dominio KEKE conformado por 15 residuos (210-224) (30, 38, 39). Se han propuesto dos roles para la TRD, el primero exclusivamente como proteína de anclaje, concentrando CASQ en la proximidad del RyR, facilitando la liberación de Ca^{2+} por proximidad. El otro papel propuesto es la posibilidad de que la TRD regule directamente al RyR (6, 40), lo que es apoyado por experimentos con ratones transgénicos, en los que se sobre-expresa 5 veces TRD, y se encuentra una disminución en el miocardio de JCN y RyR2, sin alteraciones en la cantidad de CASQ, estos ratones presentan alteraciones en el manejo de Ca^{2+} , incluyendo una relajación más lenta, decaimiento de los transientes de Ca^{2+} , y fuerza de contracción disminuida (41). Estos hallazgos son similares a los encontrados en pacientes con taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT), en los que la función de CASQ se altera o incluso no existe la proteína (42), lo que sugiere que existe una regulación doble por parte de TRD(o JCN) y CASQ2 al receptor de RyR.

La JCN es una proteína de unión a CASQ de 26 kDa, presentes en las membranas del jRS, posee una estructura de dominios similar a la de TRD, con un dominio N-terminal corto, un solo paso transmembranal, y una región C-terminal larga y altamente cargada. El dominio luminal contiene dominios KEKE

y sitios para interacción con otras proteína (26, 43). Por medio de experimentos en membranas lipídicas se ha observado que es capaz de estimular al RyR y aumentar sus probabilidades de apertura (36). A diferencia de TRD, la JCN no parece tener un sitio específico de unión a CASQ. De forma similar a la TRD la sobre-expresión de JCN, se asocia con alteraciones en el manejo de Ca^{2+} , y alteraciones en la estructura del RS, caracterizados por un estrechamiento de las cisternas del jRS y compactación del contenido del RS (28, 44).

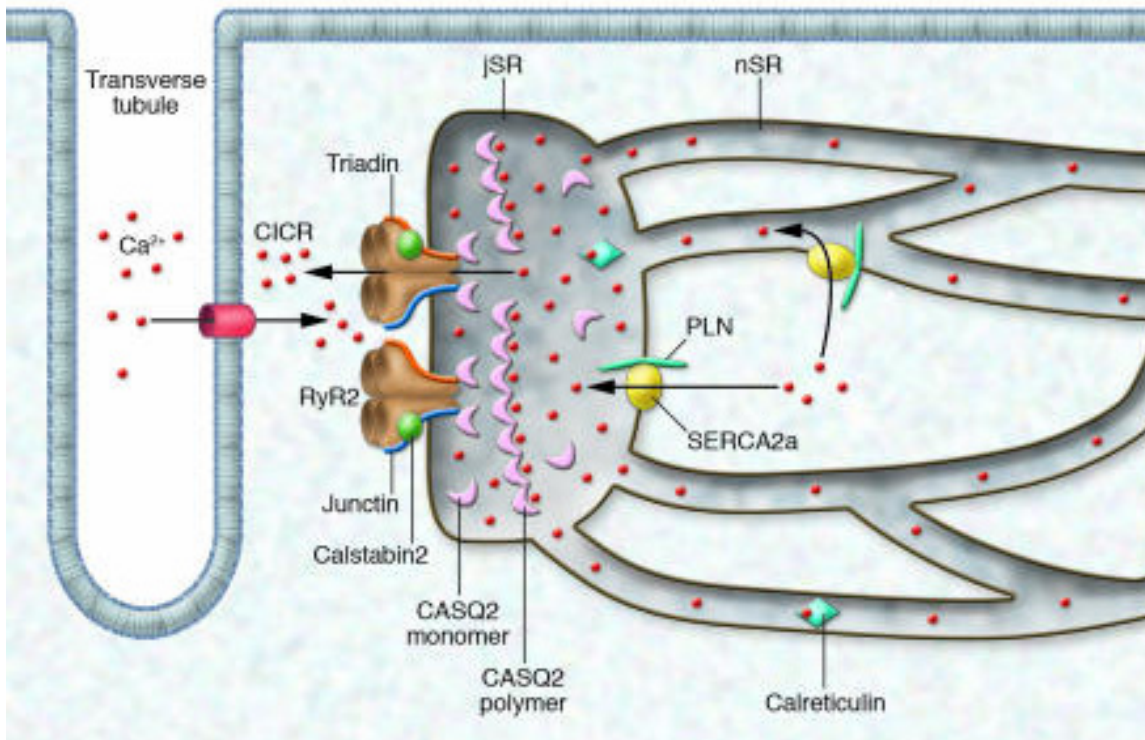


Figura I.7 Distribución de la calsequestrina en el interior del retículo sarcoplásmico. La CASQ se encuentra en el interior del jRS, en su forma monomérica ante concentraciones de Ca^{2+} bajas <1 mM, se asocia al RyR por medio de la Junctina y la Triadina. Ante concentraciones altas de Ca^{2+} >10 mM, la CASQ se encuentra polimerizada y disociada del RyR. Tomado de Gyorke (2007).

La CASQ fue descrita inicialmente como un buffer de Ca^{2+} al interior del RS, pero los estudios posteriores han demostrado un papel importante en la regulación del RyR y por lo tanto en la liberación de Ca^{2+} por el RS. Como ya se mencionó la TRD y/o la JCN parecen tener un papel mediando la interacción entre el RyR y CASQ, donde la CASQ parece regular negativamente el RyR, disminuyendo las probabilidades de apertura. Esto es apoyado por los datos experimentales, que han demostrado que en presencia de concentraciones bajas de Ca^{2+} (<2 mM) en el interior de RS, la CASQ se encuentra fundamentalmente en forma lineal y asociada a TRD/JCN, disminuyendo la actividad del RyR, mientras que a concentraciones altas (>10 mM) de Ca^{2+} la mayor parte de la CASQ se haya en polímeros y disociada de JCN y TRD, lo que deriva en una mayor probabilidad de apertura del canal (32, 40, 45, 46). Otro dato que señala la importancia de la CASQ es el aportado por estudios con ratones transgénicos sobre-expresando CASQ2, en los que se encontró, el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíaca de forma temprana (47, 48). Como se mencionó brevemente se ha descrito una enfermedad conocida como Taquicardia Ventricular Polimorfa Catecolaminérgica, (CPVT) en la que los pacientes presentan varios polimorfismos que truncan a la proteína, estos pacientes tienen un corazón estructuralmente normal, y con una función cardíaca conservada, sin embargo presentan liberaciones aberrantes de Ca^{2+} durante la relajación cardíaca que desencadena arritmias letales, en condiciones estresantes como la estimulación con agonistas β -adrenérgicos, y en condiciones en las que se aumenta el metabolismo como el ejercicio (46, 49-51).

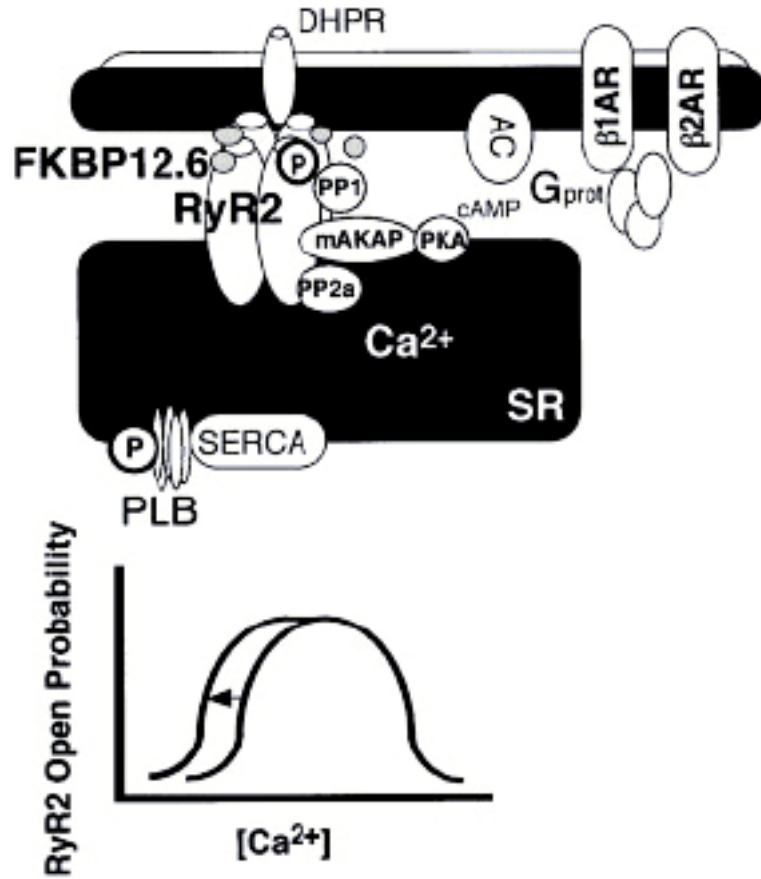
El canal de liberación de calcio

El canal de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RyR) es un componente central del AEC, que controla la salida de Ca^{2+} del RS, la cual activa y regula la contracción muscular. La estructura, función y regulación de los RyR han sido descritas a lo largo de la última década (52). Los RyR pertenecen a una familia de canales de liberación de Ca^{2+} altamente conservada evolutivamente. Se han descrito tres isoformas de RyR codificadas por tres genes distintos (*Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3*); la isoforma RyR1 que se encuentra en el músculo esquelético de contracción rápida, la isoforma RyR2 que se expresa en músculo cardíaco y cerebro, y la isoforma RyR3 que se expresa en músculo liso y cerebro (53-55). Los RyRs se encuentran formando el canal de liberación de Ca^{2+} en tetrámeros, en esta conformación es el canal iónico de mayor dimensión descrito con un peso ~ 2000 kDa (26). Aproximadamente, 90% de cada una de las subunidades del canal, se encuentran formando una región N-terminal, que protruye hacia el citosol y que tiene funciones reguladoras (52); esta región inicialmente fue descrita como los “pies” del RyR por microscopía electrónica y habitualmente se encuentra en gran proximidad (120 \AA) a los túbulos T y los canales de Ca^{2+} tipo L (DHPR) (56, 57). La región amino-terminal contiene varios dominios reguladores que controlan las propiedades de apertura del poro C-terminal, también le confiere propiedades de proteína de andamiaje al RyR localizando numerosas proteínas reguladoras clave del complejo. Cada una de las subunidades del RyR contiene sitios de unión para calmodulina (CaM), calstabilina 2 (previamente conocida como proteína de unión a FK-506; FKBP1-

B), proteína cinasa A (PKA), fosfatasa 1 y 2 (PP1/PP2) y sorcina (16). En la superficie luminal del RS se encuentra la unión de calsecuestrina mediada por la triadina y juntina (30).

La regulación del RyR durante el ejercicio o estrés es mediada por la activación de receptores adrenérgicos- β acoplados a proteínas G, que median la activación de la adenilato ciclasa, lo que resulta en un incremento en los niveles de AMPc, que a su vez deriva en una activación de la PKA; la PKA entonces fosforila al RyR en un dominio conservado de cremallera de leucina/isoleucina (58); esta fosforilación provoca que la calstabilina 2 se disocie del complejo del canal; este fenómeno aumenta la probabilidad de apertura del canal RyR, y la sensibilidad a la activación dependiente de Ca^{2+} (Figura I.8) (59, 60). La integración de la activación simpática y la activación cardíaca por fosforilación del RyR mediada por PKA, es un mecanismo conservado evolutivamente que permite una adaptación rápida del gasto cardíaco durante el ejercicio o estrés súbito (la respuesta lucha-huida) (61). Las PP1/PP2 se encargan defosforilar al RyR, permitiendo que calstabilina 2 se vuelva a unir al RyR y reestablecer las propiedades de apertura del canal. También, se ha observado que la PP1 disminuye la actividad del RyR. Se ha propuesto que la PP1 al estar unida al RyR, confiere estabilidad al RyR y promueve la apertura y cierre acoplados de grupos de RyRs que funcionan como unidades de liberación de Ca^{2+} (16). Por lo anterior, se sugiere que el desacoplamiento de RyR contribuye significativamente a la disminución del AEC observado en la insuficiencia cardíaca (16).

Figura 1.8 **Non-failing heart.** En el corazón, la activación por β -adrenergicos (Gprot), que aumenta los niveles de AMP cíclico, induce la disociación de la dependencia de Ca^{2+} de la activación por T (receptor de calcio) del canal. Resulta en una curva de activación por Ca^{2+} desplazada a la izquierda y una mayor apertura del canal. Resulta en una mayor contractilidad.



RyR2 en el corazón (receptores triméricos G_s) por los niveles de cAMP, induce la disociación de la dependencia de Ca^{2+} de la activación por T (receptor de calcio) del canal. Resulta en una mayor apertura del canal. Resulta en una mayor contractilidad.

Non-failing heart

La ATPasa de Calcio

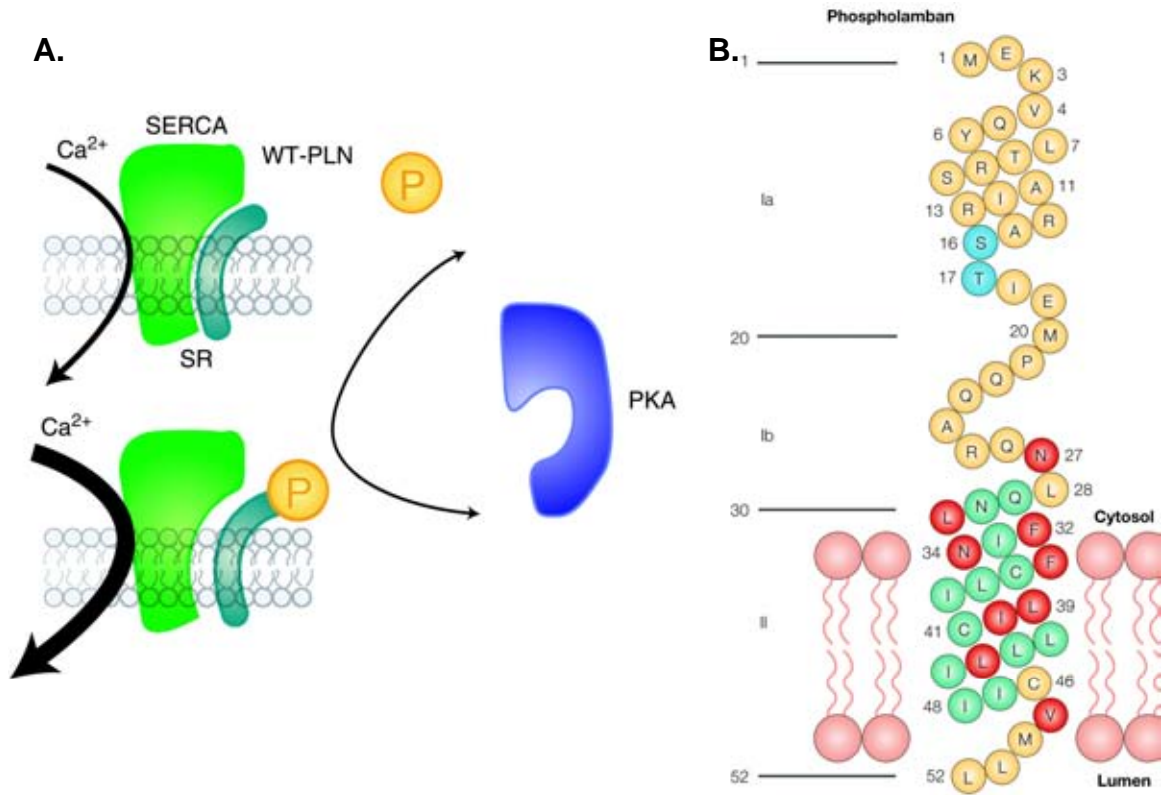
Las ATPasas de Ca^{2+} del RS (SERCAs) son proteínas de ~110 kDa y pertenecen a la familia de enzimas altamente conservadas (ATPasas tipo E1-E2), son enzimas dependientes de ATP que transportan Ca^{2+} activamente hacia el interior del RS (62). La familia de bombas de calcio SERCA consta de tres genes homólogos llamados *SERCA1*, *SERCA2* y *SERCA3* (63-65). El gen *SERCA1* se expresa en el músculo esquelético de contracción rápida y codifica un pre-ARNm que por empalme alternativo produce dos isoformas cuya expresión se regula durante el desarrollo, la SERCA1a o isoforma adulta y la SERCA1b o isoforma neonatal (63). El gen *SERCA2* codifica para tres isoformas producidas por mecanismos de empalme alternativo del transcrito primario llamadas SERCA2a, SERCA2b y SERCA2c, que también se expresan de manera tejido específica (64). La isoforma SERCA2a se expresa predominantemente en el músculo cardiaco y en menor cantidad en el músculo esquelético de contracción lenta, aunque también se expresa en niveles más bajos en el músculo liso y tejidos no musculares (66). La isoforma SERCA2b se expresa de forma ubicua en la mayoría de los tipos celulares principalmente en músculo liso y células no musculares. La isoforma SERCA2c descubierta recientemente, se ha reportado que se expresa durante la diferenciación monocítica, en corazón y en otros tejidos (67). El gen *SERCA3* codifica para seis isoformas producidos por empalme alternativo del pre-ARNm que se expresan predominante en las células epiteliales y de origen hematopoyético (68).

SERCA2a se encuentra principalmente en el LRS, y participa en el bombeo de Ca^{2+} del citoplasma hacia el interior del RS durante la relajación muscular. SERCA2a cataliza el gradiente electrogénico de 2 iones de Ca^{2+} por una molécula de ATP hidrolizada; SERCA2a tiene una afinidad alta por Ca^{2+} ($K_m \sim 0.1 \mu\text{M}$) y es capaz de mantener la concentración citosólica en reposo de 10-20 nM (11, 69). La densidad de SERCA2a en la membrana del RS es muy alta ($30000/\mu\text{m}^2$) y el 80% del contenido de proteínas es SERCA2a, debido a esto solo son necesarios 1 o 2 ciclos de transporte de Ca^{2+} para recuperar la concentración de Ca^{2+} citoplásmica durante la relajación muscular (11).

En el cardiomiocito, SERCA2a se regula por fosfolamban (PLB), una proteína de 52 aminoácidos con un peso de 6.1 kDa, que forma un homopentámero que tiene tres dominios citosólicos, el dominio 1a (aminoácidos 1-20) donde se encuentran los sitios para fosforilación por PKA (Ser 16) y por la cinasa de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Thr 17), el dominio 1b (aminoácidos 21-30) es rico en aminoácidos amidados y el dominio II que atraviesa la membrana del RS. (Figura 1.9B) Cuando PLB se encuentra defosforilado actúa como un inhibidor de la actividad de SERCA2; se ha demostrado que la fosforilación por la cinasa dependiente de $\text{Ca}^{2+}/\text{Calmodulina}$ (CaMKII) resulta en un incremento de la actividad de SERCA. La fosforilación de PLB, está dada normalmente por la activación de receptores β -adrenérgicos, que se encuentran acoplados a proteínas G y a través de la activación de la adenil ciclase se incrementan los niveles de AMPc que activan a la PKA, la cual tiene como uno de sus blancos a PLB. La fosforilación de PLB reduce su interacción con SERCA2, lo que resulta

en aumento de la V_{max} de SERCA2 para el transporte de Ca^{2+} (27, 70).(Figura I.9

A)



EXPRESIÓN DE CALSECUESTRINA

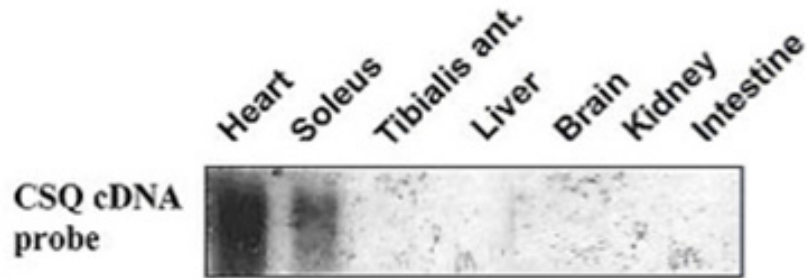
Como se menciona anteriormente, en los mamíferos existen dos isoformas de CASQ codificadas por genes distintos (*Casq1*, *Casq2*), la isoforma CASQ1 se encuentra en músculo esquelético de contracción rápida (100%), y también en músculo esquelético de contracción lenta (75% del total de CASQ); la isoforma CASQ2 se haya en el músculo esquelético de contracción lenta (25% del total de CASQ) y en el músculo cardiaco (100% del total de CASQ) (71). En el músculo esquelético tanto de contracción rápida como lenta, durante la etapa fetal se expresa de manera casi exclusiva el gen *Casq2*, y hay un cambio hacia la isoforma CASQ1, en el periodo neonatal llegando al patrón adulto ya mencionado (72). En el músculo cardiaco la isoforma CASQ2 se sintetiza de forma exclusiva desde la etapa fetal hasta la vida adulta. Ninguno de los dos genes se expresan en tejidos no musculares, ni en músculo liso (Figura I.10). Los dos genes en el humano se localizan en el cromosoma 1, *Casq1* en 1q21, y *Casq2* en 1p23. Ambos genes comparten una gran similitud de aminoácidos en la secuencia peptídica, entre las dos isoformas (60%) y alrededor de 80% a nivel del ARNm (26, 31).

Debido a la relevancia de los componentes del RS en el músculo cardiaco para la función del mismo, la expresión de los genes que codifican para estos componentes ha sido analizada extensamente en pacientes con varias patologías cardiacas, incluyendo la hipertrofia en insuficiencia cardiaca, miocardiopatías hipertróficas y dilatadas, y cardiopatías congénitas; entre los hallazgos se ha descrito la alteración de la expresión de varios genes

involucrados en el manejo de Ca^{2+} en el cardiomiocito, incluyendo una disminución de la cantidad total de SERCA2a, un aumento en la expresión de PLB y NCX, además de cambios en la expresión de varios genes, regresando a un patrón de expresión fetal. Sin embargo en todos los estudios *in vivo*, la expresión de *Casq2* se mantiene constante en las distintas patologías, aun cuando otros componentes clave del manejo de Ca^{2+} en el cardiomiocito se encuentran alterados (73-76). Estos datos aunados a los cambios drásticos encontrados en los ratones transgénicos con sobre-expresión de CASQ2, y las alteraciones encontradas en pacientes con ausencia de CASQ2 funcional, sugieren que la expresión del gen *Casq2* se encuentra regulada de forma estrecha y precisa.

Hasta el momento se han clonado los genes de *Casq2* de humano, ratón y conejo (71, 77), y se ha secuenciado el gen *Casq2* en la vaca, perro, chimpancé, ratón, rata, y humano, además del gen de *Casq* del pollo. Sin embargo no se habían analizado los mecanismos que regulan la expresión a nivel transcripcional de ninguno de los genes de calsequestrina. El trabajo de esta tesis constituye el primer estudio de la regulación transcripcional del gen *Casq2* (78).

A)



B)

Brain	Eye	Liver	Lung	Kidney
Heart	Skeletal	Smooth		
Pancreas	Thyroid	Thymus	Submax. Gland	Spleen
Testis	Ovary	Prostate	Epididy.	Uterus

Figura I.10 Expresión de calsecustrina 2 en diferentes tejidos del ratón. Panel A. Northern blot para casq2, con RNA de tejidos de ratón, la expresión se observa exclusivamente en el músculo cardiaco, y en menor medida en el músculo soleus, que es un músculo de contracción lenta, no se observa mensajero en el músculo de contracción rápida tibial anterior, ni en tejidos no musculares. Panel B. Dot blot para calsecustrina 2 en ratón, se observa la mayor expresión en el corazón, y en mucho menor grado en músculo esquelético, mientras que algunas trazas se alcanzan a observar en tiroides, testículo y epidídimo. Tomado de Kranias (2001).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La regulación de la expresión génica en el corazón, ha sido estudiada en varios genes, entre los que se encuentran la miosina de cadena pesada alfa (MHC- α), la troponina C (TnC) y la miosina ventricular cadena ligera de-2 (VMLC-2), en los que se ha demostrado un patrón de expresión similar, con una expresión en músculo esquelético particularmente de contracción lenta, muy por debajo a la observada en el músculo cardiaco (en promedio 10 veces); Donde la expresión muscular específica esta regulada por los elementos proximales, y las secuencias de ADN distales, actúan como enhancers cardiaco específicos (79-82). Se han identificado varios factores de transcripción músculo específicos que están involucrados en la regulación de estos genes, entre los factores relacionados están MEF-2 (*Myocyte Enhancer Factor-2*), SRF (*Serum Response Factor*), Nkx 2.5, GATA-4, HAND-1, HAND-2 (83-86). El gen de calsequestrina tiene una diferencia fundamental con todos los genes cardiacos específicos cuya regulación ha sido estudiada hasta el momento, que consiste en la ausencia de cambios en los niveles de transcripción del gen *hCasq2* en distintas patologías cardiacas (insuficiencia cardiaca, hipertrofia cardiaca, miocardiopatía dilatada). En estas patologías se encuentran alteraciones intracelulares (estado hiperadrenérgico, aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} , activación de vías hipertróficas) que derivan en un cambio en el patrón de expresión de genes cardiacos, activándose la expresión de genes fetales al mismo tiempo que se disminuyen los niveles de transcripción de los genes cardiacos adultos (16, 76, 87, 88). La mayoría de los factores de transcripción mencionados están

regulados por vías de señalización intracelular que se alteran en las patologías mencionadas (89), esto hace necesario determinar la regulación transcripcional del gen *Casq2* para conocer los mecanismos por medio de los que el nivel de expresión se mantiene constante, aun cuando el patrón de expresión se haya modificado por algún estado patológico.

Debido a que el gen presenta una expresión tejido específica y sostenida, la región reguladora se convierte en una posible herramienta para emplearse en terapia génica cardíaca, empleando la región reguladora del gen *Casq2* asociada al ADNc de genes cardíacos cuya expresión se encuentra disminuida como el gen *SERCA2*, y de esta forma restituir los niveles de la proteína en el corazón y en el caso de este ejemplo mejorar el transporte de Ca^{2+} al interior del RS, y el nivel de carga de este. Para esta potencial aplicación, se requiere de comprender la regulación del gen *Casq2*.

III. HIPÓTESIS

La expresión tejido específica del gen humano de calsequestrina cardiaca (*hCasq2*), se encuentra regulada a nivel transcripcional, por factores de transcripción que se expresan de forma específica en músculo cardiaco y esquelético y que están presentes en los núcleos de miocitos cardiacos y miocitos esqueléticos de contracción lenta, durante la diferenciación miogénica, y en el músculo adulto; tales como MyoD, Miogenina, HAND1, MEF-2 (A, C, D), SRF. Estos factores interactúan con la secuencias de ADN en la región reguladora 5' del gen *hCasq2*, y que por medio de esta interacción y la combinación de diferentes factores se da la expresión tejido específica, y constante que caracteriza a el gen de *hCasq2*. La regulación del gen *hCasq2*, debe ser similar a la de otros genes que codifican para proteínas específicas de músculo cardiaco, en donde los elementos proximales en la región reguladora, regulan la expresión músculo específica, mientras que los elementos distales actúan como enhancers específicos para músculo cardiaco.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es elucidar parte de los mecanismos que regulan a nivel transcripcional la expresión músculo esquelético y cardiaco específica del gen humano de calsecuestrina cardiaca.

Objetivos Específicos

1. Identificar por medio de análisis de secuencia las regiones que tengan probabilidad de regular transcripcionalmente la expresión del gen *hCasq2*, y comparar con otros genes con expresión cardiaco específica.
2. Demostrar la función de elementos reguladores musculares (CArG-box, MEF2 y E-box) presentes en la región reguladora del gen de *hCasq2* en miocitos cardiacos y miotubos esqueléticos.
3. Demostrar la interacción de secuencias de ADN que contienen CArG-box, MEF2 y E-box del gen de *hCasq2* con factores de transcripción presentes en extractos nucleares de miocitos cardiacos y de miotubos esqueléticos.
4. Caracterizar por mutagénesis dirigida el papel de los elementos CArG-box, MEF2 y E-box del promotor del gen de *hCasq2* en su transcripción en cardiomiocitos y miotubos de las líneas celulares de músculo esquelético de ratón.
5. Determinar la importancia de factores de transcripción miogénicos en la regulación de la expresión del gen de *hCasq2*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales. Todas las enzimas fueron adquiridas de Invitrogen y New England BioLabs. El [α - 32 P]ATP y [γ - 32 P]dCTP fueron adquiridos de PerkinElmer Life Sciences. Los oligonucleótidos de ADN fueron sintetizados en la Unidad de Biología Molecular, del Instituto de Fisiología Celular UNAM. El ARN total de corazón humano fue adquirido de BD Biosciences.

Clonación de ADN. Se corto un fragmento de ADN de 3276 pb Stu1-Stu1 de la clona genómica humana RP11485H8 (BACPAC Resources) que contiene 3102 pb de la región reguladora 5' del gen *hCasq2* y 176 pb de la región 5' no traducida del exón 1. Este fragmento se subclonó en un plásmido pGL3-basic previamente cortado con Stu1, por medio de técnicas estándar. Se generaron cinco construcciones adicionales por digestión con enzimas de restricción Nco I, Afl II, Pvu II, Xho I y Bln I, generando fragmentos de ADN de 2322, 1169 754, 462 y 252 pb, respectivamente.

Ensayo de Extensión de “Primer”. Se marcaron 300 ng de un oligonucleótido sintético complementario a la región 5' no traducida del exón 1 (5'-GGAAAGACTTACCACTCGGTC-3') con T4 Polinucleótido cinasa y [α - 32 P]ATP. Se realizó la transcripción reversa empleando poli(A)⁺ ARN de corazón humano adulto (BD Biosciences). Se incorporó una reacción de secuenciación de un templado conocido como marcador para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos.

Cultivo Celular. Mioblastos de las líneas celulares C₂C₁₂ y Sol8 (ATCC) fueron cultivados en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), designado como medio de crecimiento, hasta alcanzar 70% de confluencia. Posteriormente se indujeron para diferenciarse a miotubos, con un cambio de medio por DMEM suplementado con 3% de suero de caballo (HS) (90, 91) conocido como medio de diferenciación. Las células C3H10T1/2 se mantuvieron en cultivo en medio de crecimiento (92). Se realizaron cultivos primarios de cardiocitos de rata neonata de acuerdo al método descrito previamente (93), se sembraron en cajas tratadas con gelatina al 1%, y se mantuvieron en medio de crecimiento. Todos los medios de cultivo se suplementaron con kanamicina (60 mg/l), penicilina G (10 U/ml), estreptomycin (10 mg/ml), anfotericina B (0.025 µg/ml) y nistatina (10 U/ml).

Transfecciones y ensayos de reportero. Las construcciones pGL3-*hCasq2* (0.8 µg) y el pRL-CMV (0.05 µg) se co-transfectaron en células crecidas en cajas de 12-pozos usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Tras 2 horas el medio de cultivo con mezcla de transfección fue sustituido por medio de diferenciación para inducir diferenciación de células Sol8 y C2C12 a miotubos; en caso de mioblastos por medio de crecimiento para mantener el fenotipo, así como para las células C3H10T1/2 y los cardiomiocitos de ratas neonatas. En todos los experimentos se empleó como control positivo el plásmido pGL3-promoter, que contiene el promotor proximal (202 pb) de SV40; como control negativo se empleó el plásmido pGL3-basic el cual contiene el gen

de luciferasa sin promotor. Después de 48 horas de incubación a 37°C y 5% CO₂ las células se cosecharon, lisaron y se prepararon extractos proteicos con la finalidad de medir la actividad de luciferasa de luciérnaga y *Renilla*, se empleo el kit de reactivo de ensayo de luciferasa dual (Promega) en un luminómetro Wallac Victor² (PerkinElmer). Los resultados se normalizaron con la actividad de luciferasa de *Renilla*.

Se generaron líneas celulares estables de Sol8 y C2C12, por medio de la cotransfección de las construcciones pGL3-*hCasq2* conteniendo 288 y 3102 pb de la región reguladora 5' del gen de *hCasq2*, junto con pcDNA3.1, que contiene el gen de resistencia para el antibiótico de selección G418. Las células fueron cultivadas en medio de crecimiento suplementado con 500 µg/ml G418 y seleccionadas durante una semana. Después a las colonias seleccionadas se les determino su actividad de luciferasa. El número de copias del gen *hCasq2/Luc* integrado en el genoma, se determinó por la técnica de dot blot, empleando una sonda de ADN para luciferasa. Las células fueron crecidas en placas de 24 pozos hasta alcanzar 70% de confluencia, cuando fueron inducidas a diferenciarse con medio de diferenciación. Se prepararon extractos proteicos en estas células en un curso temporal desde mioblastos hasta miotubos diferenciados durante 5 días, y la actividad de luciferasa fue determinada. Los resultados se normalizaron dividiendo la actividad de luciferasa entre la concentración de proteína total.

Mutagénesis. Se realizó mutagénesis dirigida de las secuencias de unión a los factores transcripcionales MEF2, E-box y CArG-box, presentes en los primeros 202 pb de la región reguladora 5' de *hCasq2*, empleando el kit de mutagénesis de sitio dirigida QuickChange (Stratagene), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos empleados así como los cambios inducidos se encuentran en la Tabla 1. La mutación de los elementos mencionados se confirmó por secuenciación de ADN de los plásmidos obtenidos (94).

Ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Extractos nucleares de mioblastos y miotubos de C2C12 y Sol8, células C3H10T1/2 y cardiocitos de rata neonata fueron generados mediante una modificación al método descrito por Lassar (95), los oligonucleótidos de doble cadena empleados fueron los mismos que se utilizaron para la mutagénesis dirigida (Tabla 1). Los oligonucleótidos consenso MEF-2 y CArG-box empleados fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, el oligonucleótido consenso de E-box fue sintetizado en base a la secuencia reportado por Molkenin (1996). Las reacciones de apareamiento fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente preincubando 10 μ g de extracto nuclear en buffer de unión 1X (Tris HCL 50 mM, Glicerol 20%, NaCl 250 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 2.5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1mM), 1 μ g de poly(dI:dC), oligonucleótido de doble cadena marcado con [³²P]ATP, y para los ensayos de competencia se usaron los oligonucleótidos de ADN de doble cadena sin marca radioactiva en exceso molar de 50X y 100X. Los anticuerpos para los ensayos de super-retardo de MEF2, SRF, eHAND,

MyoD y Miogenina, fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Los complejos ADN-proteína fueron resueltos en geles de acrilamida al 5% no desnaturalizantes con glicerol al 2.5% (96).

RT-PCR en Tiempo Real. ARN total fue extraído de mioblastos y miotubos de células Sol8 diariamente hasta el día 5 de la diferenciación muscular. Por medio de TRIzol (Invitrogen). La reacción de transcripción reversa se realizó empleando 2 µg ARN total con Superscript III First Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron de acuerdo al método propuesto por Pfaffl, empleando GAPDH como control interno (97). La secuencia de los primers empleados se encuentra en la Tabla 2.

Análisis de Secuencia. Las secuencias de ADN fueron analizadas con MacVector 6.5.3 (Accelrys) BLAST (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> y MatInspector (Genomatix) <http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html>.

Análisis Estadístico. Los resultados se expresan como media de al menos 3 experimentos independientes +/- error estándar. Los valores de medias fueron comparados por análisis de varianza (SPSS 11) aplicando la prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

Tabla 1. Oligonucleótidos para EMSA y Mutagénesis

EMSA	
MEF-2 casq2	5'- TGCAT GATTTATTTTT AGCCTGAAACAAC -3'
MEF-2 consenso	5'- GATCGCT CTAAAAATA ACCCTGTCG -3'
MEF-2 casq2 mt	5'- CATTGCAT <u>GCTGGATCCTCC</u> GCCTGAAACAAC -3'
MEF-2 cons mt	5'- GATCGCT <u>GTAAACATA</u> ACCCTGTCG -3'
CArg-box casq2	5'- CTGCAT CCTAAAAATGG AGTTCC -3'
CArg-box consenso	5'- GGATGT CCATATTAGG ACATCT -3'
CArg-box casq2 mt	5'- CTGCAT CCTAAAAAT <u>TT</u> AGTTCC -3'
CArg-box consenso mt	5'- GGATGT CCATATT <u>ATT</u> ACATCT -3'
E-box casq2	5' GCCTGAAAC CAACT GCATCC 3'
E-box consenso	5' GGA CTGGGTGCAGGT GGGGGATGGGG 3'
E-box casq2 mt	5' GCCTGAAAC <u>CGACGG</u> GCATCC 3'
E-box consenso mt	5' GGA CTGGGT <u>GTGAAG</u> GGGGATGGGG 3'

El sitio consenso se resalta en negritas, los nucleótidos mutados se subrayan.

Tabla 2. Oligonucleótidos para PCR en tiempo real.

PCR	
GAPDH Fw	5'- GGAGAAACCTGCCAAGTATGATGA C-3'
GAPDH Rv	5'- TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG -3'
CASQ2 Fw	5'- AGCTTGTGGAGTTTGTGAAG -3'
CASQ2 Rv	5'- GGATTGTCAGTGTTGTCCC -3'
MEF-2A Fw	5' ACCAGCCCTAATGCTTTGTCTG 3'
MEF-2A Rv	5' GGTCTGTAGTGCTCAACATCCCAC 3
MEF-2C Fw	5'- AGGTAACACAGGCGGTCTGATG -3'
MEF-2C Rv	5'- TCATAGGGGGAGGAGATTTGGC -3'
MEF-2D Fw	5' ACTCCTTCCCTGGTGACATCATC 3'
MEF-2D Rv	5' CCATTAGCACTGTTGAGGTCTCCAC 3'
Miogenina Fw	5'- CAGGAGCCCCCACTTCTATGATG -3'
Miogenina Rv	5'- TCCCCAGTCCCTTTTCTTCCAG -3'
SRF Fw	5'- GATTCAGACCTGCCTCAACTCG -3'
SRF Rv	5'- TTCAGTGTGTCCTTGGTTTCCC -3'

VI. RESULTADOS

Caracterización del gen humano de *Casq2*

Las clonas genómicas humanas RP11-485H8 y RP5-929G5, fueron analizadas *in silico* con los programas MacVector, Blast y la suite MatInspector de Genomatix, para determinar la estructura del gen humano *hCasq2* y su región reguladora 5'. El análisis demostró que las dos clonas se traslapan, y contienen el gen completo de *hCasq2*, el cual está constituido por 11 exones, interrumpidos por 10 intrones, que se extienden a lo largo de 68 kb del genoma. Esta estructura es similar a la de los genes del conejo y el ratón, los cuales ya habían sido clonados, además de ser muy similar a la estructura del gen de *hCasq1*, difiriendo en el exón 11, en la región 3' no traducida. (Figura VI.1)

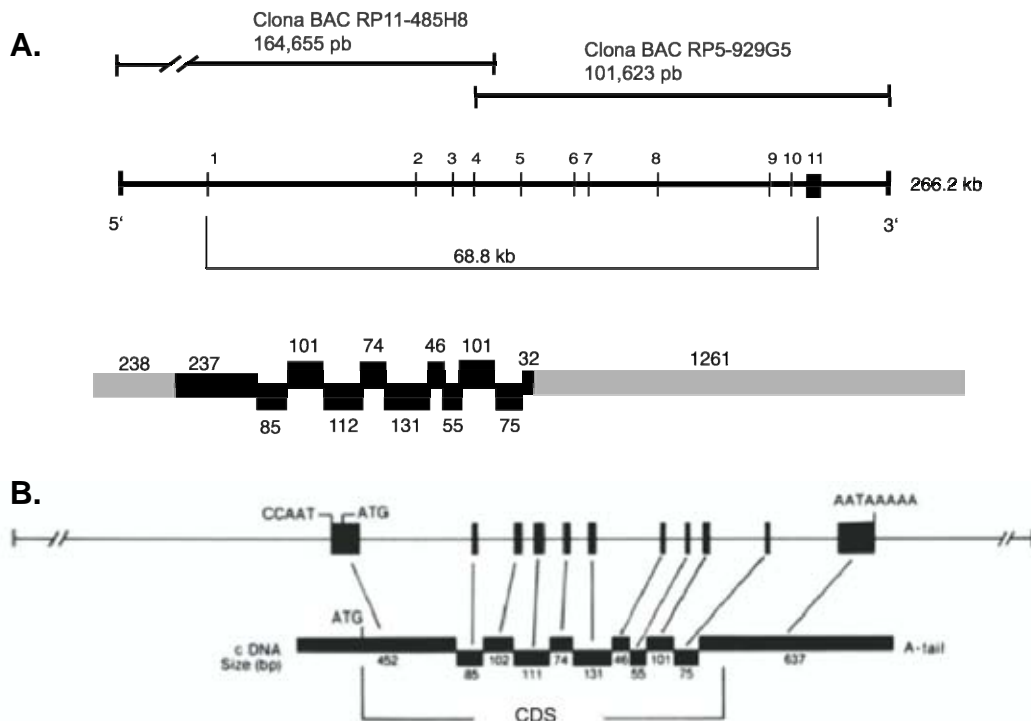


Figura VI.1 Estructura del gen humano de *Casq2*. A. El gen humano de *Casq2* se encuentra contenido completamente en 2 clonas junto con su región reguladora; está organizado en 11 exones, que producen un transcrito de ARN de 2548 nucleótidos. B. La estructura del gen de *hCasq1* es muy similar a la del gen *hCasq2*.

Después de este análisis se determinó el sitio de inicio de la transcripción por medio de un ensayo de extensión de “primer”, empleando Poli(A)⁺ ARN de corazón humano, los resultados mostraron dos productos principales de la extensión de 358 y 348 pb, los cuales se encontraron en las posiciones 241 y 261 pb por encima del codón de inicio de la traducción ATG (Figura VI.2). Estos sitios son iguales a los señalados por el análisis *in silico*.

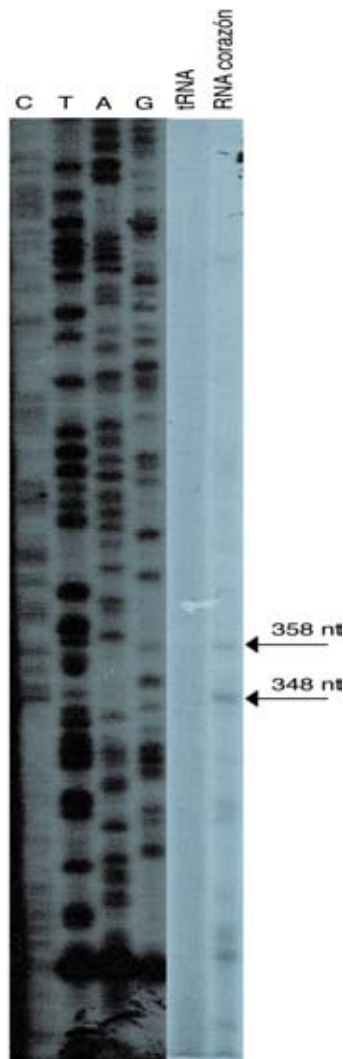


Figura VI.2 Sitio de inicio de la transcripción del gen *hCasq2*. Por medio del ensayo de Extensión de “Primer” se mapeo el sitio de inicio de la transcripción, se identificaron dos productos de extensión de 348 y 358 nucleótidos, localizando el sitio de inicio de la transcripción a 251 y 241 pb por arriba del sitio de inicio de la traducción.

Análisis de la secuencia de la región reguladora 5' del gen *hCasq2*

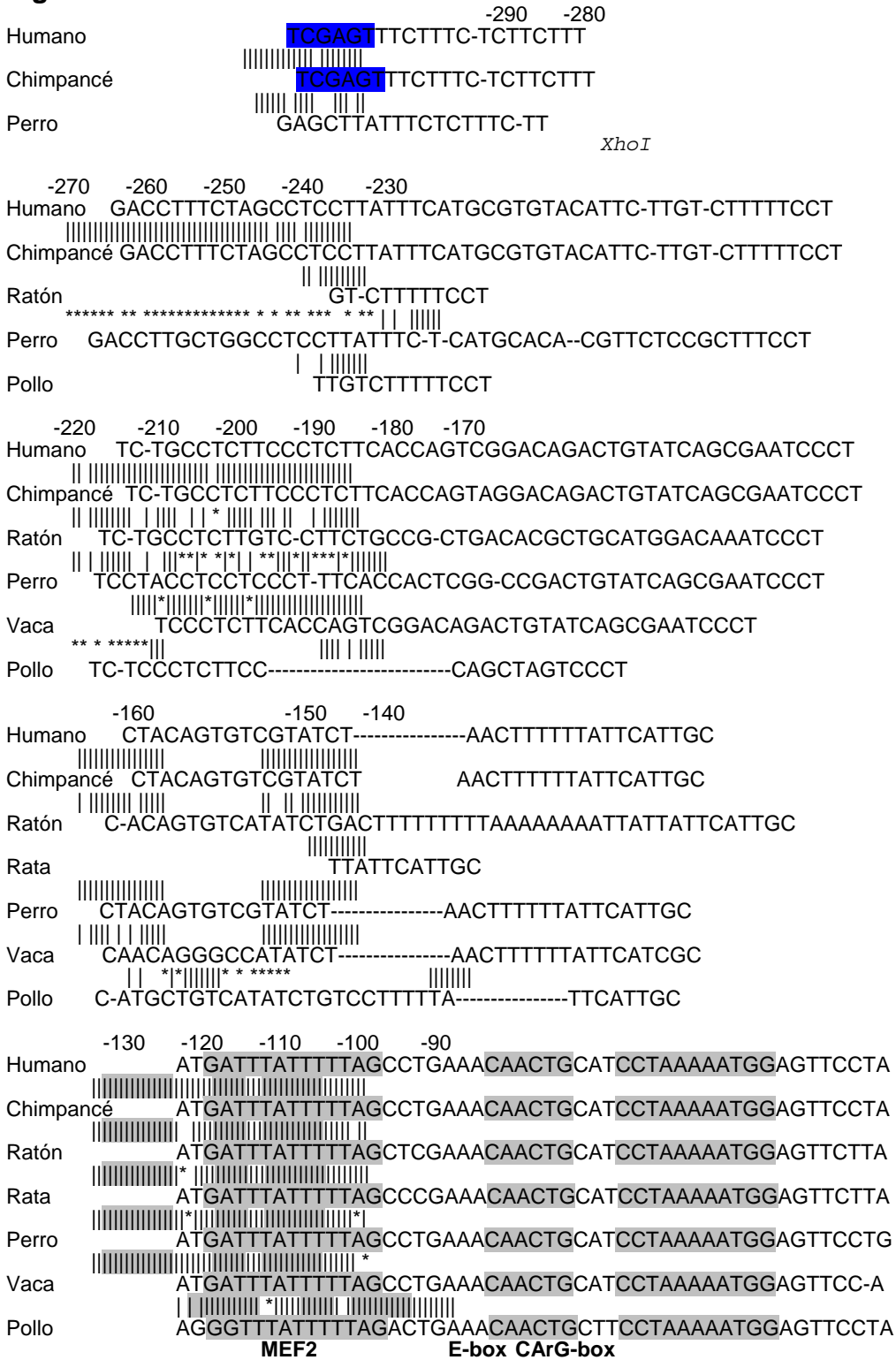
Se realizó un análisis *in silico* de los 3102 pb de la región reguladora 5' del gen *hCasq2*, que fueron clonados, para identificar la homología entre las distintas especies en las que se encuentra secuenciado el gen de *Casq2* (chimpancé, perro, vaca, ratón, rata, pollo) y determinar los sitios probables de unión para factores de transcripción. La homología con el pollo es importante debido a que en las aves solo se encuentra un solo gen de *Casq* y por tanto una sola isoforma que se expresa tanto en músculo esquelético como en músculo cardiaco.

El análisis reveló que la secuencia del gen humano comprendida entre -1 a -185 pb, se encuentra altamente conservada entre las especies: chimpancé (100%), perro (98%), vaca (93%), ratón (95%), rata (98%), pollo (87%), resaltando en particular una secuencia conservada entre -90 y -135 en el que se identificó un sitio MEF-2, una E-box y una CArG-box, las cuales son capaces de unir a los factores de transcripción MEF-2, Hand-1 y 2, y SRF, respectivamente, los cuales han demostrado tener un papel muy importante en la regulación de varios genes cardiaco y músculo específicos (MHC- α TnC, VMLC-2). La CArG-box encontrada en el gen *hCasq2*, es una CArG-box imperfecta ya que no es idéntica al consenso (CCW₆GG), pero contiene la misma configuración de una CArG-box encontrada en la región reguladora del gen MHC- α que ha sido probada como funcional en músculo cardiaco (80). Los otros dos elementos MEF-2 y E-box, cumplen completamente con el consenso de estos elementos (MEF-2: YTWAAATAR, E-box: CANNTG). Además de este motivo conservado

también se determinó en esta región altamente conservada una caja TATA imperfecta (Figura VI.3).

En el resto de los 3.2 kb de secuencia disponibles, no se identificaron secuencias de homología entre las distintas especies a excepción del chimpancé. Tras este análisis se predice que la región proximal debe tener un papel importante en la regulación tejido específica del gen; además en los genes con expresión cardiaca específica ya estudiados, se ha descrito que la región proximal confiere una especificidad para la expresión de genes en músculo estriado, y la regulación cardiaca específica está regulada por medio de enhancers distales.

Figura VI. 3



-80 -70 -60 -50 -40
 Humano ATGAGACAGAGGCTGAGCAGAGCTATGTAAGGTATCTGGGGCTTGGCCTCCC
 Chimpancé ATGAGACAGAGGCTGAGCAGAGCTATGTAAGGTATCTGGGGCTTGGCCTCCC
 Ratón ATGAGACAGAGGCTGGG-AGAGCTATGTAAGGTATCTAGGGCTTGGCCTCCC
 Rata ATGAGACAGAGGCTGGG-AGAGCTATGCAAGGTATCTAGGGCTTGGCCTCCC
 Perro ATGAGACAGGGGCTGGGCCGAGCTATGCGAGGTATCTGGGGCTGGGCCGCC
 Vaca ATGAGACAG-GGCTGGGCAGAGCTATGCAAGCTATCTGGGGCTGGGTGGCCC
 Pollo ATGACACGGGAGCTGGACACAGCTATGTAAGGTATCCAGGGCTTGGCCTGAC
TATA-box/MTB

-30 -20 -10 +1 +10
 Humano AGCCTCCCTAGCTTGGCTGTTTTTCTACTCTCAATGCGTGCGTCCGTGCGT
 Chimpancé AGCCTCCCTAGCTTGGCTGTTTTTCTACTCTCATGCGTGCGTGCCTGCGT
 Ratón AGCC--CGT-GCCTGGCTCTTG----CTCTG-----
 Rata AGCCTCC-T-GCCTGGCT
 Perro AGCCT
 Vaca AGCCT

+20 +30 +40 +50 +60
 Humano GCGTGCGTGCGTG--TG--TGTGTGTGTGTG--CCTCTGCTCTTTGTCT
 Chimpancé GCGTGCGTGCGTGCGTGCGTGTGTGTGTGTGTGCCTCTGCTCTTTGTCT

+70 +80 +90 +100 +110
 Humano CCTGAGCCACGATTCCAGAGCTGGCTGGACCCAAGGAGGTGAAGAGTCA
 Chimpancé CCTGAGCCACGATTCCAGAGCTGGCTGGACCCAAGGAGGTGAAGAGTCA

+120 +130 +140 +150 +160
 Humano CTTTTAGCCCCAGGAAGGGCAAAGAAGAGAGAAAATCAGCCTGTCTGCT
 Chimpancé CTTTTAGCCCCAGGAAGGGCAAAGAAGAGAGAAAATCAGCCTGTCTGCT

+170 +180 +190 +200 +210
 Humano CTCTCCTTGGCTCAACAAGGCCTCTAACAGTCTTCTGTCTCTATTCTGC
 Chimpancé CTCTCCTTGGCTCAACAAGGCCTCTAACAGTCTTCTGTCTCTATTCTGC
StuI

+220 +230 +240 +250
 Humano ACACGGCATATTTGGGAACGAGAAACAAAAGTTTTCCCAAATG
 Chimpancé ACACGGCATATTTGGGAACGAGAAACAAAAGTTTTCCCAAATG

Figura VI.3 Análisis de la secuencia proximal de la región reguladora 5' del gen *Casq2*. Los primeros 180 pb se encuentran altamente conservados entre las distintas especies analizadas. Se indica en color azul los sitios de restricción empleados, en color gris los probables sitios de unión a factores de transcripción, en color rojo los dos sitios de inicio de la transcripción y en color verde el sitio de inicio de la traducción.

Análisis comparativo de la región reguladora 5' del gen humano de *Casq1*

Se comparó la región reguladora 5' del gen humano de *Casq1* con la región reguladora del gen *hCasq2*, el análisis demostró que el gen de *hCasq1* carece de caja TATA, y cuenta con elementos proximales SP1 y E-box. A lo largo de los primeros 400 pb de la región reguladora, se localizan elementos MEF-2, CArG-box, E-box, Sp1, y GATA; los cuales también están conservados en el gen de *hCasq2*, sin embargo la disposición de estos elementos no tiene ningún parecido con la existente en *hCasq2*. El motivo que ese encuentra conservado en *hCasq2*, no tiene un equivalente en el gen de *Casq1*; solo se ha encontrado una configuración similar en la región reguladora distal del gen de MyoD. La similitud en los elementos encontrados entre ambos genes a pesar de su patrón de expresión diferenciado, se explica en parte porque la región proximal de los genes cardíaco específicos, confiere especificidad por el tejido muscular estriado en general mientras que los elementos más distales son los que regulan la expresión cardíaca específica (Figura VI.4).

- MEF-2
- E-box
- ⬠ CArG-box
- TATA-box
- GC-box
- GATA

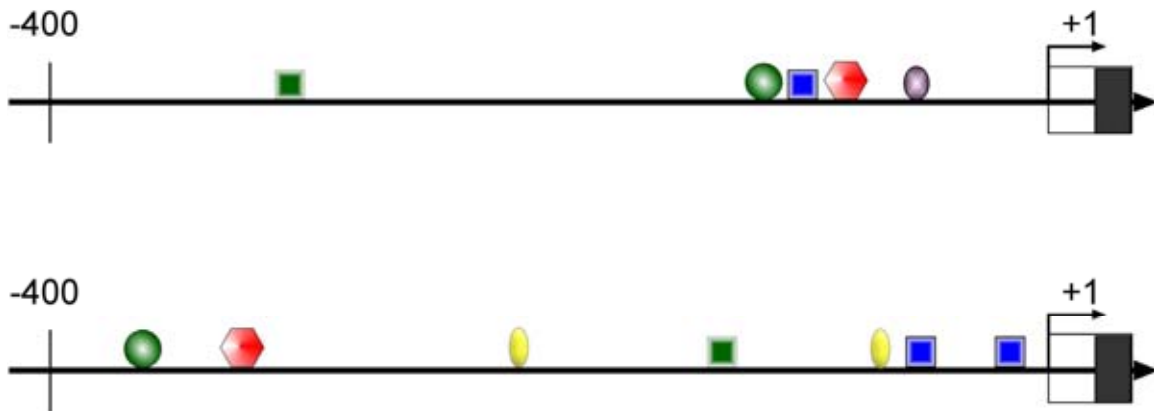


Figura VI.4 Comparación de las regiones reguladoras-5' de los genes de *hCasq1* y *hCasq2*. Esquema comparando sitios de unión para factores de transcripción, presentes en los primeros 400 pb de la región reguladora del gen *hCasq2* (arriba) y del gen *hCasq1* (abajo). Aun cuando ambas regiones comparten elementos la distribución de estos no es similar, además de que existen elementos específicos para cada uno de los genes, y existe la posibilidad de que otros factores específicos se asocien a la secuencia exclusivamente de uno de los genes.

Actividad Transcripcional del gen *hCasq2* en células musculares cardíacas

Con las seis construcciones quiméricas *hCasq2/Luc* generadas conteniendo fragmentos de 71, 288, 580, 1095, 2148 y 3102 pb de la región reguladora 5' (Figura VI.5), se analizó la actividad transcripcional en células musculares cardíacas de rata neonata. Por medio de transfecciones transitorias, se encontró que la actividad del gen reportero bajo el control del fragmento de ADN de 288 pb es equivalente a la actividad del promotor SV40, el cual es conocido como un promotor fuerte en células cardíacas. La construcción de 71 pb, que únicamente contiene la caja TATA, y no contiene ningún sitio de unión a factores de transcripción, tiene una actividad basal de solo el 20% de la observada con 288 pb, pero que es mayor a la observada en el plásmido sin promotor (pGL3-basic). Las construcciones de 580 y 1095 pb tienen una actividad muy similar entre ellas, la cual es 2 veces superior a la del fragmento de ADN de 288 pb. Conforme se incrementa el tamaño de la región reguladora empleada, la actividad transcripcional del gen reportero se incrementa, alcanzado un efecto de hasta 3.5 veces mayor con la construcción de 3.2 kb, que es muy similar a la observada en la construcción de 2148 pb. Estos resultados indican que ente -288 y -580 pb, y entre -1095 y -2148 pb, se concentran elementos de importancia para la regulación de la transcripción del gen *hCasq2* en músculo cardíaco (Figura VI.6). Los resultados también resaltan la importancia de los elementos contenidos entre -71 y -288 pb son de gran importancia para la expresión basal de este gen.

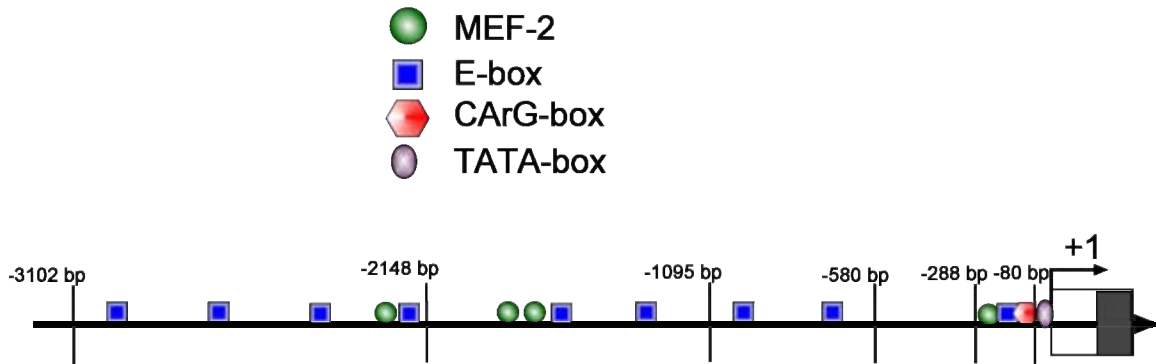


Figura VI.5 Construcciones *hCasq2*/Luc generadas. Se generaron 6 construcciones con diferentes longitudes de región reguladora 5'. Se indican los elementos de unión a factores de transcripción presentes en cada uno de los fragmentos.

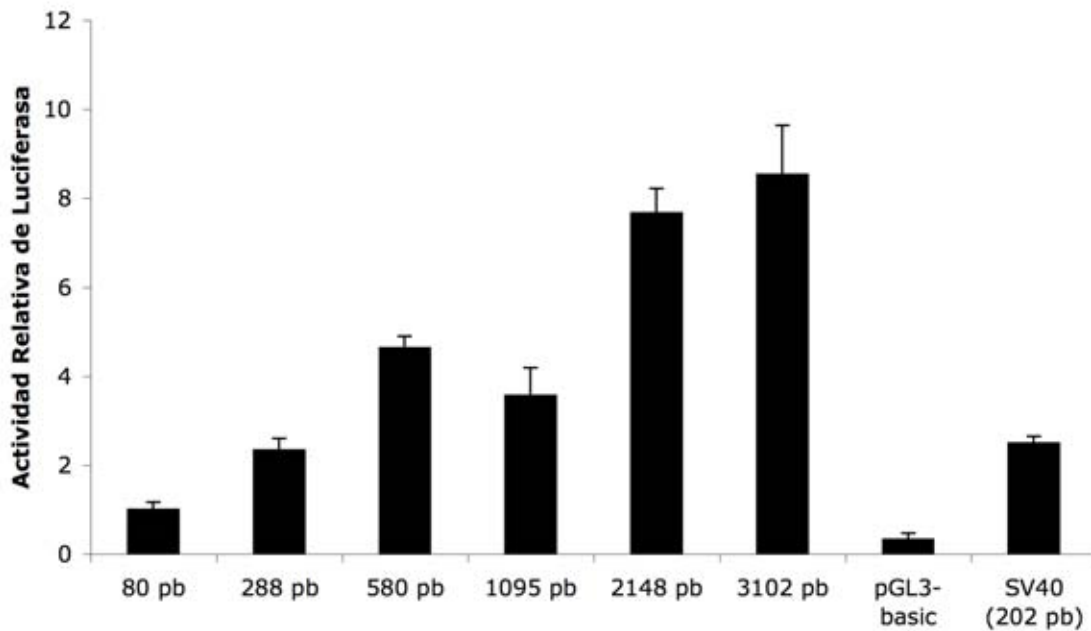


Figura VI.6 Actividad transcripcional de *hCasq2* en cardiomiocitos. Las construcciones *hCasq2*/Luc, fueron transfectadas transitoriamente en cardiocitos de rata neonata, la actividad de luciferasa se determinó a las 72 horas. La actividad es relativa a la observada con la construcción de -71 pb. Se utilizó como control negativo el vector pGL3-basic sin promotor, como control positivo el promotor basal (202 pb) de SV40. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado +/- error estándar.

Actividad transcripcional en mioblastos y miotubos de líneas celulares de músculo esquelético

Las mismas secuencias de *hCasq2*/Luc se analizaron en las líneas celulares Sol8 y C2C12, las cuales tienen un fenotipo muscular indiferenciado, y pueden ser inducidas a la diferenciación muscular esquelética una vez que alcanzan una confluencia superior al 70%, por medio del cambio de suero fetal bovino a suero de caballo en el medio de cultivo. Las células fueron transfectadas a una confluencia de 50% y mantenidas en medio de crecimiento por 24 horas, para determinar la actividad en células indiferenciadas (mioblastos). Para determinar la actividad en células en diferenciación (miotubos), las células fueron transfectadas con una confluencia de 70%, y después de la transfección se les agregó medio de diferenciación.

Los resultados mostraron un comportamiento opuesto al observado en los cardiocitos, donde las construcciones de mayor tamaño, mostraban una mayor actividad. En los mioblastos, ninguna de las construcciones tiene una activación de importancia, y sin alcanzar la mitad de la actividad transcripcional de la observada en miotubos con la secuencia de ADN de 71 pb, que fue la de menor actividad observada. Esto indica que el gen de *hCasq2* no tiene actividad transcripcional en células musculares indiferenciadas.

En miotubos de 48 horas, la secuencia de ADN de 71 pb, tuvo la menor actividad transcripcional, mientras que la secuencia de ADN de 288 pb alcanzó una actividad 12 veces por encima de la observada con la secuencia de ADN de 71 pb, la actividad de la secuencia de ADN de 288 pb es similar a la observada

con el promotor de SV40, que alcanza hasta 16 veces por encima de la de 71 pb. Lo más interesante de estos resultados es lo observado con los fragmentos de ADN de mayor tamaño de la región reguladora de *hCasq2*, mientras que en cardiocitos estas secuencias aumentan la actividad transcripcional, en miotubos la actividad de esta misma secuencia no tiene cambios con respecto a la actividad de las secuencias de ADN de 580, 1095, 2148 y 3102 pb, cuya actividad solo representa un 50% de la observada con la construcción de 288 pb (Figura VI.7).

Estos resultados demuestran la importancia de las secuencias localizadas entre -71 y -288 pb que se encuentran conservados entre especies, ya que junto con los resultados observados en cardiocitos, demuestran que esta región es de gran importancia para la regulación del gen *hCasq2*, tanto en células musculares cardiacas y esqueléticas, y que los elementos presentes río arriba de esta región parecen tener un papel muy importante en el músculo cardiaco, y aparentan tener un efecto negativo sobre la transcripción en miotubos de músculo esquelético.

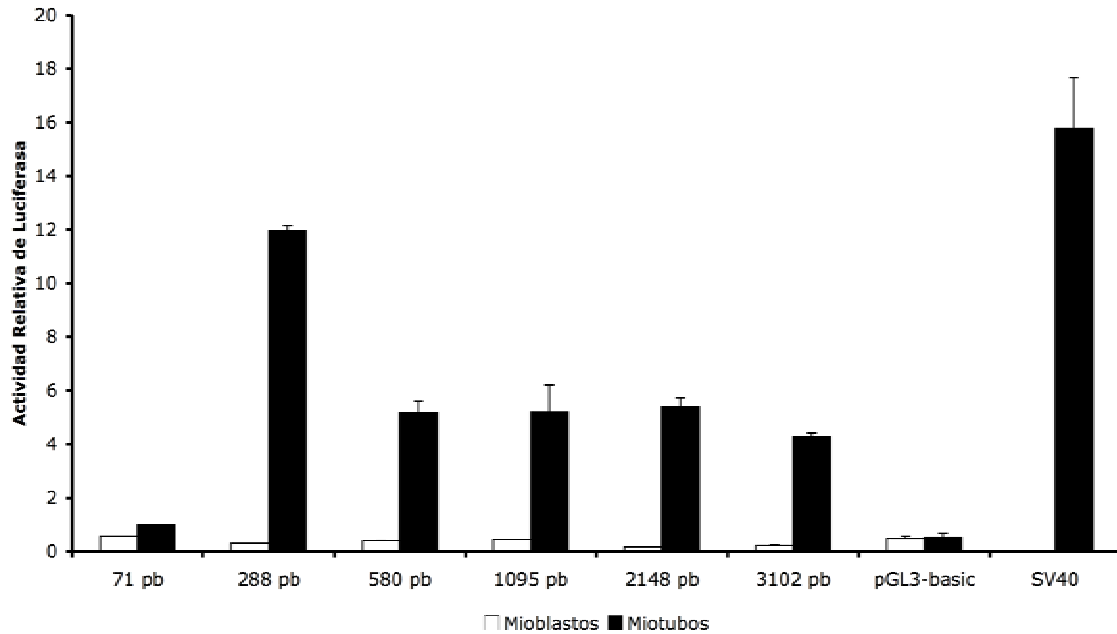


Figura VI.7 Actividad transcripcional del gen de *hCasq2* en mioblastos y miotubos de Sol8. Las construcciones *hcsaq2/Luc*, fueron transfectadas transitoriamente en mioblastos (barras blancas), e inducidos a diferenciarse (barra negra) la actividad de luciferasa se determino a las 48 horas. La actividad es relativa a la observada con la construcción de -71 pb en miotubos. Se utilizó como control negativo el vector pGL3-basic sin promotor, como control positivo el promotor basal (202 pb) de SV40. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado +/- error estándar.

Actividad Transcripcional del gen *hCasq2* en Fibroblastos de la Línea Celular C3H10T1/2

Con el objeto de confirmar que la especificidad de tejido se encuentra conferida por los elementos presentes en los primeros 3102 pb, se transfectó transitoriamente a células C3H10T1/2, las cuales tienen un fenotipo de fibroblastos y no expresan CASQ. Los resultados mostraron que ninguna de las 6 construcciones tuvo una activación transcripcional, manteniéndose en los niveles observados con la construcción sin promotor (pGL3-basic). Mientras que el control positivo con el promotor de SV40 mostró una activación significativa de hasta 35 veces por encima de las actividades observadas con las construcciones de *hCasq2* (Figura VI.8). Estos resultados demuestran la especificidad tisular conferida por este elemento de regulación, comprendido en un fragmento de ADN de 3102 pb.

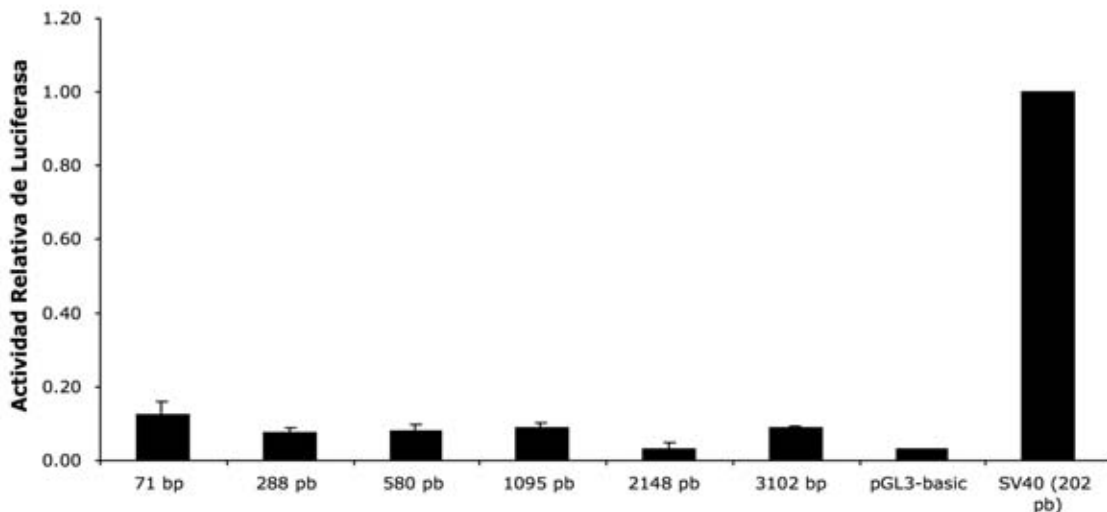


Figura VI.8 Actividad transcripcional del gen de *hCasq2* en fibroblastos. Las construcciones *hCasq2*/Luc, fueron transfectadas transitoriamente en fibroblastos la actividad de luciferasa se determinó a las 72 horas. La actividad es relativa a la observada con el promotor SV40. Los resultados son la media de 3 experimentos independientes por triplicado +/- error estándar.

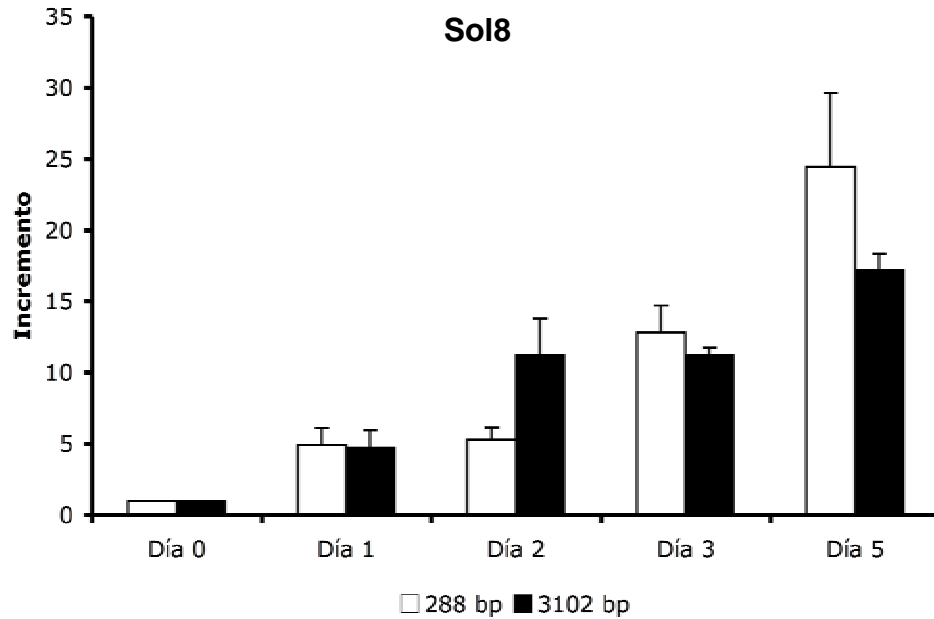
Actividad Transcripcional y Expresión del gen *hCasq2* durante la Diferenciación Muscular Esquelética

Para determinar el comportamiento de la transcripción del gen *hCasq2* durante la diferenciación muscular esquelética, se generaron líneas estables de Sol8 y C2C12, que expresan el gen quimérico *hCasq2/Luc* con secuencias de 288 pb y 3.2 kb. Para la generación de estas líneas estables, se emplearon las construcciones con 288 y 3102 pb de la región reguladora 5' de *hCasq2*, la actividad transcripcional fue determinada desde la etapa de mioblastos y diariamente durante la diferenciación muscular, hasta el día 5 cuando las células alcanzan un fenotipo de miotubos maduros.

El patrón de expresión del gen reportero es muy similar entre ambas construcciones, mostrando una inducción desde las primeras 24 horas de diferenciación, aunque la construcción de 288 pb muestra un incremento constante hasta alcanzar en el día 5 una actividad de 25 veces por encima de la observada en mioblastos, mientras que con la construcción de 3102 pb, alcanza una activación 10 veces superior a la de mioblastos en 48 horas, pero esta se mantiene constante a las 72 horas y aumenta hasta 15 veces al quinto día (Figura VI.9). Este patrón de activación es muy similar entre las dos líneas celulares (Sol8 y C2C12), como se observó en los resultados de los ensayos funcionales previos (Figura VI.7). La actividad de la secuencia de 288 pb es 3 veces mayor a la de la secuencia de 3.2 kb; esta relación se mantiene en las líneas estables, aunque no es aparente en la figura VI.9, debido a que se están

analizando los incrementos con relación a células indiferenciadas en cada línea estable, y no entre ellas.

A.



B.

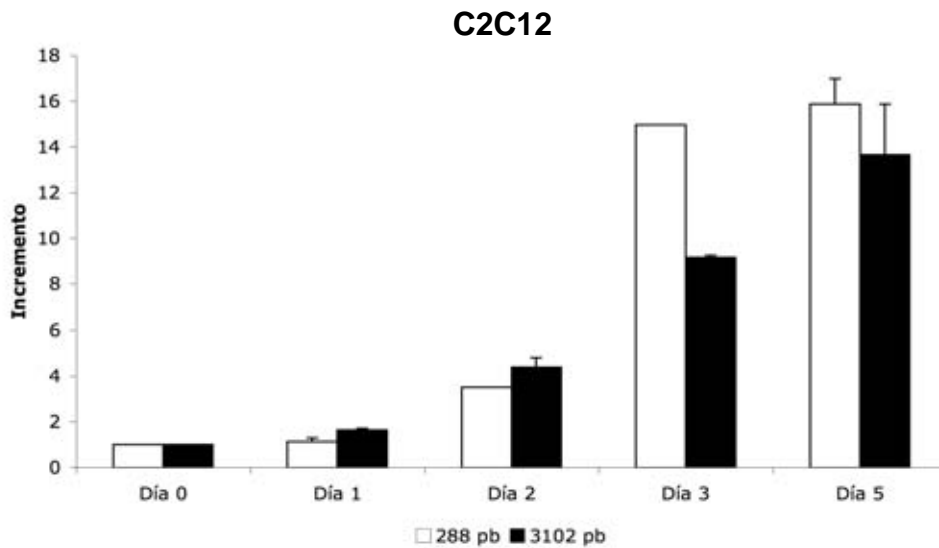


Figura VI.9 Actividad transcripcional del gen de *hCasq2* durante la diferenciación muscular esquelética. Panel A. Líneas celulares estables de Sol 8 fueron generadas empleando las construcciones *hCasq2/Luc* y su actividad transcripcional analizada durante la inducción a la diferenciación miogénica. Panel B. Líneas celulares estables de C2C12, fueron utilizadas en el mismo experimento. Los resultados se expresan como veces de incremento con respecto a la actividad en mioblastos (Día 0). Media +/- error estándar.

Para correlacionar la actividad transcripcional endógena del gen de *Casq2* con los cambios en la cantidad de mensajero, se aisló ARN total de células Sol8 durante la diferenciación muscular, para determinar sus niveles mediante RT-PCR en tiempo real (Figura VI.10). Los resultados muestran que el mensajero se incrementa desde el primer día de la diferenciación muscular, y continua incrementándose hasta alcanzar un nivel estable en el día 5, cuando las células tienen el fenotipo completo de miotubos. Este patrón coincide con el observado en las transfecciones, demostrando que la regulación de la expresión de *casq2* es a nivel transcripcional.

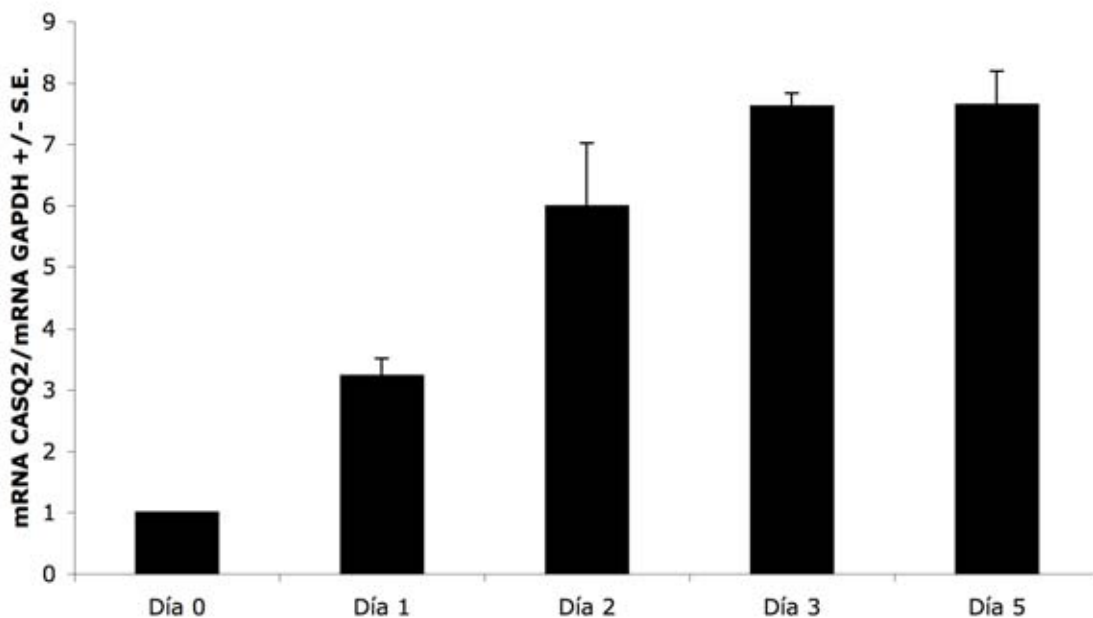


Figura VI.10 Expresión del ARNm de calsequestrina 2 durante la diferenciación muscular esquelética. Se aisló ARNm total de células Sol8 durante la diferenciación muscular esquelética, y se cuantificó el ARN mensajero de *Casq2* por RT-PCR en tiempo real. Los resultados se encuentran normalizados con los niveles de GAPDH. Los resultados se expresan como media +/- error estándar.

Propiedades de Unión ADN/Proteína del Motivo Conservado en la Región Reguladora 5' de *hCasq2*

Con base a los resultados obtenidos con los ensayos funcionales y el análisis de secuencia, se determinó que los elementos presentes en el motivo conservado entre -90 y -135 pb de la región reguladora de humano, tienen un papel central en la regulación de la expresión del gen, por lo que se decidió enfocarse en esta región.

Inicialmente se analizó si los sitios probables de unión a factores de transcripción MEF-2, E-box, CArG-box, por medio de ensayos de retardo de movilidad electroforética. Las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos de doble cadena empleados se muestran en la Tabla 2. Para cada uno de los sitios se realizaron experimentos con extractos nucleares obtenidos de cardiocitos de rata neonata, mioblastos y miotubos de la línea celular Sol8, y de fibroblastos C3H10T1/2.

El sitio MEF-2 de *hCasq2* mostró *in vitro*, la capacidad de unir a una proteína presente en los extractos nucleares de cardiocitos, esta unión probó ser específica por medio de las competencias con los oligonucleótidos de *Casq2* y consenso sin marcaje radioactivo, y con los oligonucleótidos de *Casq2* y consenso mutados. El complejo que se observó se super-retardó cuando se agregó a la reacción un anticuerpo que reconoce a los factores de transcripción MEF-2A, MEF-2C, MEF-2D; con lo que se puede identificar como un componente del complejo observado a alguno de los miembros de la familia de MEF-2.

El mismo experimento se realizó con extractos nucleares de mioblastos y miotubos de Sol8, en donde se observó un complejo de un peso aparente igual al observado con los cardiocitos, este complejo tiene las mismas propiedades que el observado con cardiocitos, y también se realizó un experimento de super-retardo con el anticuerpo MEF-2, aunque no completamente, indicando que otras proteínas participan en la formación de este complejo en músculo esquelético; el complejo que se observa con mioblastos es de menor intensidad que el de miotubos, lo que indica que la proteína es menos abundante en células indiferenciadas. Cuando se realizó este experimento con extractos nucleares de fibroblastos, no se observó la formación de complejos específicos, lo que indica que en los núcleos de fibroblastos no hay factores capaces de unirse a esta secuencia.

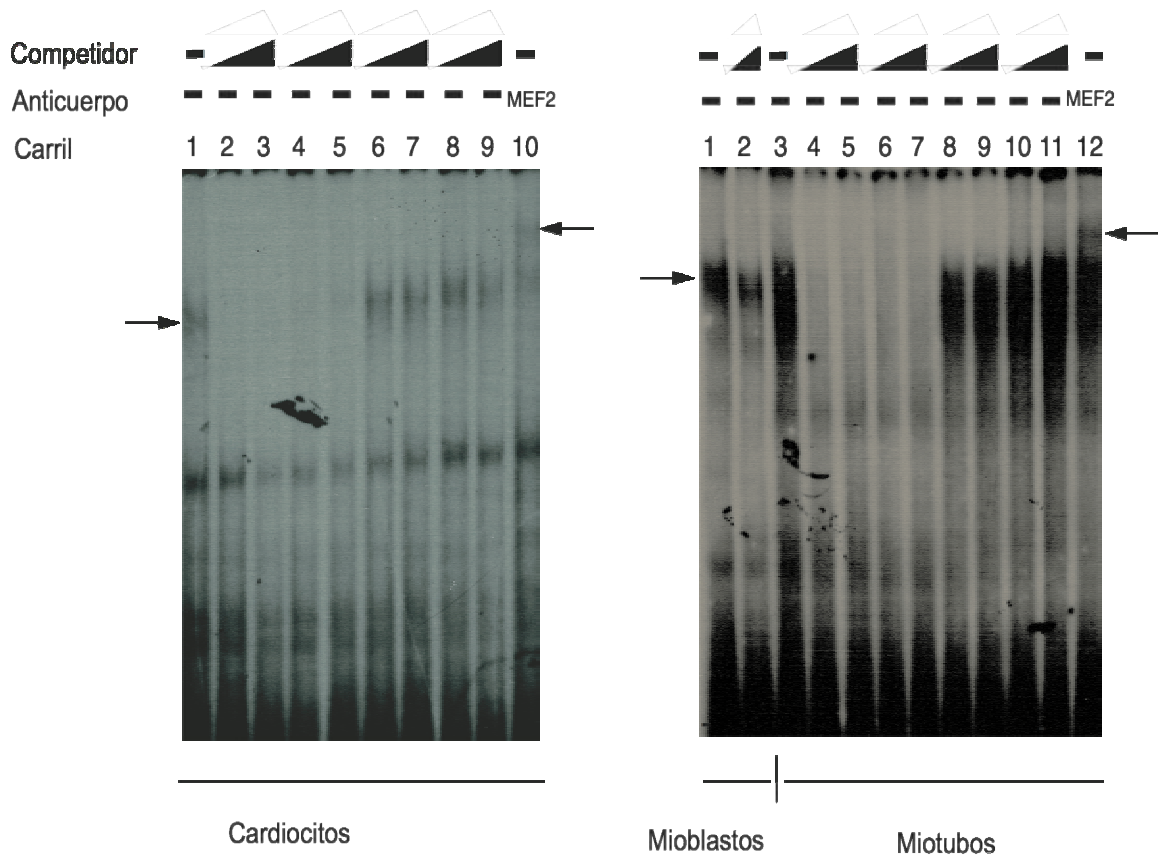


Figura VI.11 Capacidad de unión a proteínas del sitio MEF-2. Un oligonucleótido de doble cadena con el sitio MEF-2 de *hCasq2*, fue marcado radiactivamente e incubado con 10 µg de proteína de extracto nuclear de cardiocitos, mioblastos y miotubos de Sol8, la especificidad de la unión fue determinada por medio de competencias con excesos molares de sondas frías (Cardiocitos: carril 2 y 3, *Casq* 50 y 100X; carril 4 y 5 consenso 50 y 100X; carril 6 y 7 *Casq* mutada 50 y 100X; carril 8 y 9 consenso mutado 50 y 100X. Mioblastos carril 2 *Casq* 100x; Miotubos carril 4 y 5 *casq* 50 y 100X; carril 6 y 7 consenso 50 y 100X; carril 8 y 9 *Casq* mutada 50 y 100X; carril 10 y 11 consenso mutado 50 y 100X. Para identificar la proteína en el complejo se usó un anticuerpo para MEF-2 (carriles 10 y 12).

El sitio E-box también fue analizado por medio de la misma estrategia. Debido a que no se observaron complejos, se marco y analizó el oligonucleótido consenso, y se observó que si se forma un complejo específico, que disminuye de intensidad en presencia de anticuerpos para HAND1 en cardiocitos, y MyoD y Miogenina en miotubos; pero este complejo no es competido por el oligonucleótido de calsecuestrina. Los resultados indican que este sitio E-box no es capaz de unir directamente a factores de transcripción, por lo que su relevancia en la regulación del gen *hCasq2* es nula (Figura VI.12).

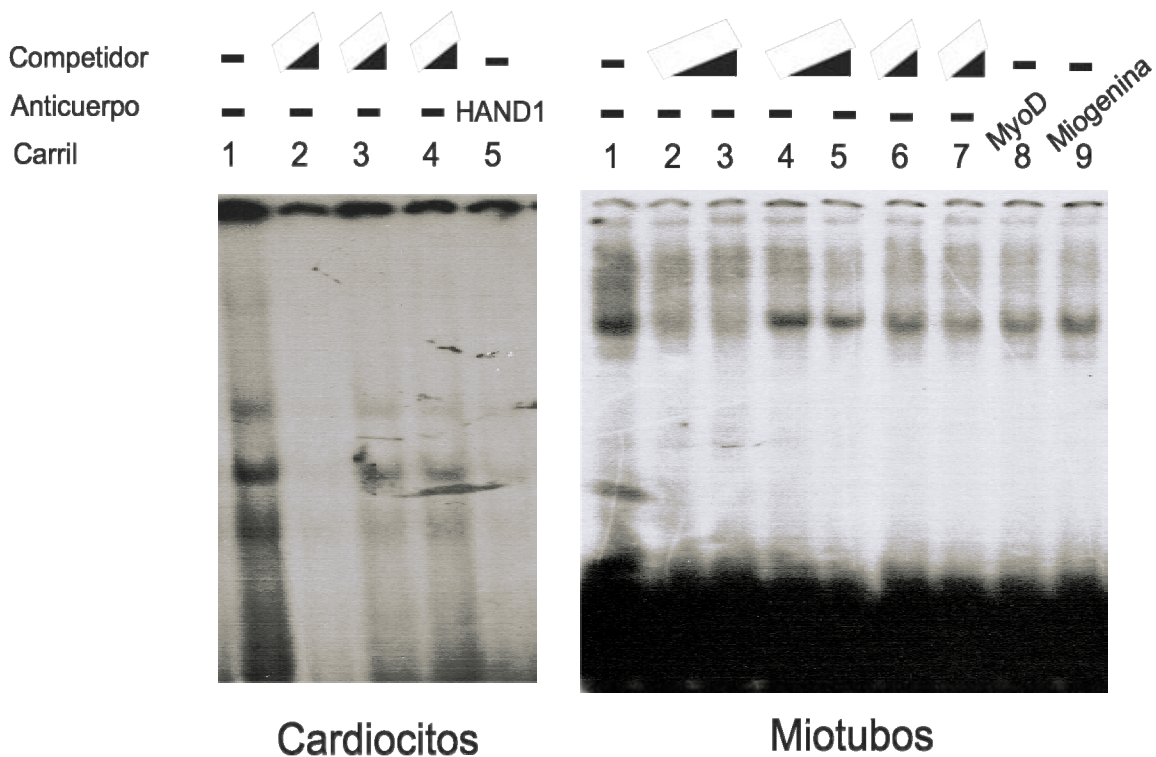


Figura VI.12 Capacidad de unión a proteínas del sitio E-box consenso. Un oligonucleótido de doble cadena con un sitio E-box funcional, fue marcado radiactivamente e incubado con 10 µg de extracto nuclear de cardiocitos y miotubos de Sol8, la especificidad de la unión fue determinada por medio de competencias con excesos molares de sondas frías (Cardiocitos: carril 2 consenso 100X; carril 3 *Casq* 100X; carril 4 *Casq* mutada 100X; Miotubos carril 2 y 3 consenso 50 y 100X; carril 4 y 5 *Casq* 50 y 100X; carril 6 consenso mutada 100X; carril 7 *Casq* mutada 100X. Para identificar la proteína en el complejo se uso un anticuerpo para HAND1 (carril 5), MyoD (carril 8) Miogenina (carril 9).

Por último se analizaron las propiedades del sitio CArG-box, como se mencionó previamente este sitio tiene la particularidad de no ser un sitio canónico, pero tiene una configuración idéntica a la de un elemento encontrado en el promotor de la MHC- α , el cual se ha demostrado que tiene capacidad para unir a factores de transcripción, además de participar en la regulación de la expresión del gen de la MHC- α . Los extractos de cardiocitos, formaron un complejo único y específico, lo que se comprobó por medio de las competencias con oligonucleótidos del mismo sitio y consenso, sin marcaje y en condiciones nativas y mutadas. Cuando se agregó a la reacción el anticuerpo para el factor de transcripción SRF (*Serum Response Factor*) se formó un complejo de super-retardo, con lo que se puede identificar y afirmar que SRF es el responsable de la formación de este complejo en cardiocitos (Figura VI.13).

El mismo sitio fue analizado con extractos de mioblastos y miotubos, mostró la formación de un complejo único y específico, de un tamaño aparente igual al de los cardiocitos, que se super-retardó con el anticuerpo para SRF. Al igual que en el caso de MEF-2, el complejo puede apreciarse en los extractos de mioblastos pero con una intensidad mucho menor. En el caso de los fibroblastos no se apreció ningún complejo específico (Figura VI.13).

Estos resultados, confirman que el sitio CArG-box presente en el motivo conservado, es capaz de unir al factor SRF, que se encuentra presente en músculo cardíaco y esquelético, y que puede tener un papel en la regulación del gen *hCasq2*, lo que debe ser confirmado por medio de estudios funcionales del sitio.

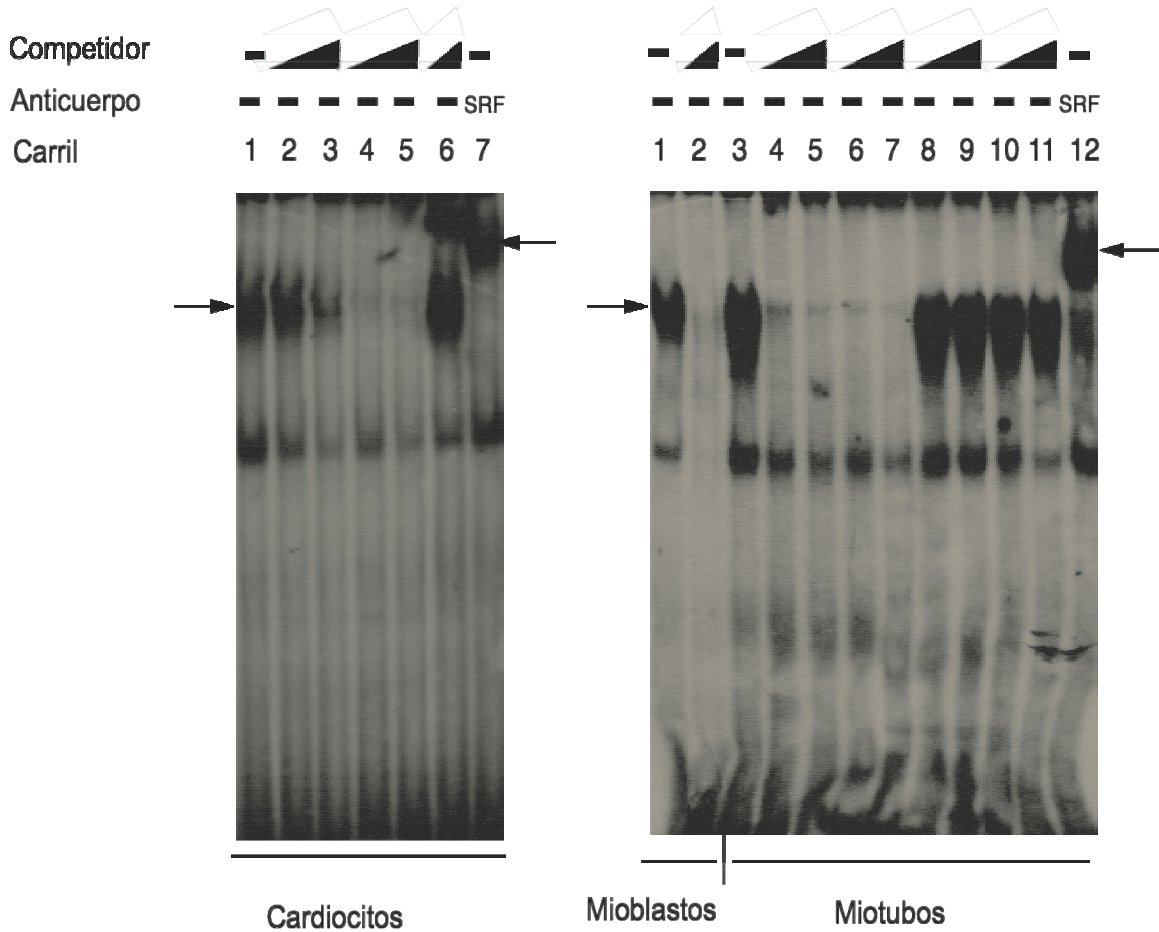


Figura VI.13 Capacidad de unión a proteínas del sitio CARG-box del gen *hCasq2*. Un oligonucleótido de doble cadena con el sitio CARG-box de calsecuestrina, fue marcado radiactivamente e incubado con 10 μ g de extracto nuclear de cardiocitos, mioblastos y miotubos de Sol8, la especificidad de la unión fue determinada por medio de competencias con excesos molares de sondas frías (Cardiocitos: carril 2 y 3, *Casq* 50 y 100X; carril 4 y 5 consenso 50 y 100X; carril 6 *Casq* mutada 100X; Mioblastos carril 2 *Casq* 100x; Miotubos carril 4 y 5 *Casq* 50 y 100X; carril 6 y 7 consenso 50 y 100X; carril 8 y 9 *Casq* mutada 50 y 100X; carril 10 y 11 consenso mutado 50 y 100X. Para identificar la proteína en el complejo se uso un anticuerpo para SRF (carriles 7 y 12).

Propiedades Funcionales de los Sitios MEF-2, E-box, CArG-box Proximales en la Región Reguladora 5' del gen de *hCasq2*

Una vez que se establecieron las propiedades de unión a factores de transcripción de los tres sitios presentes en el motivo conservado, se exploró la funcionalidad de los 3 sitios. Utilizando los oligonucleótidos mutados probados en los experimentos de EMSA que demostraron no ser capaces de unir a los factores de transcripción, se realizó mutagénesis dirigida de los sitios MEF-2, E-box y CArG-box, por medio de PCR en la construcción con la secuencia de ADN de 288 pb de región reguladora (Figura VI.3 y VI.5). La actividad transcripcional de las construcciones mutadas fue determinada 48 horas post-transfección en cardiocitos, mioblastos y miotubos de las líneas celulares Sol8 y C2C12, y fibroblastos de la línea celular C3H10T1/2.

En las células musculares cardiacas la construcción con el sitio MEF-2 mutado (mMEF-2) mostró una disminución en la actividad de hasta un 60% en relación a la actividad de la construcción nativa (Figura VI.14). En mioblastos la mutación del sitio MEF-2 no se asoció con cambios en la actividad transcripcional, debido a que la actividad transcripcional incluso con la construcción nativa es muy baja; el mismo caso se da en fibroblastos, donde la actividad transcripcional de este gen es casi inexistente. En el caso de miotubos de 48 horas, mMEF-2 tiene una reducción de hasta un 70% con respecto a la actividad de la construcción nativa. Estos datos junto con los obtenidos en los experimentos de EMSA, demuestran que el sitio MEF-2 proximal es funcional y tiene una gran relevancia en la regulación del gen *hCasq2* (Figuras VI.14, VI.15).

A pesar de que los experimentos de EMSA, no mostraron una asociación entre el sitio E-box y factores de transcripción, se analizó por medio de mutagénesis dirigida, el papel de este sitio en la activación transcripcional, ya que existe la posibilidad de que el resultado del EMSA sea un artefacto; además basado en las características de estos sitios consenso, que tienden a ser muy promiscuos (80, 98-101). En cardiocitos, se encontró que disminuye la actividad de forma muy pequeña y no significativa alcanzando solo entre 10 y 15% de reducción en la actividad con respecto a la observada con la construcción nativa. En miotubos los cambios en la actividad transcripcional son prácticamente imperceptibles y no significativos, incluso llegando a tener una tendencia no significativa hacia el incremento de la actividad transcripcional. En mioblastos y fibroblastos, de nueva cuenta no se perciben cambios por la baja actividad transcripcional de la construcción nativa. Estos datos y los obtenidos por EMSA, indican que este sitio no es funcional y no parece tener un papel relevante en la regulación de este gen en músculo cardíaco o esquelético (Figuras VI.14, VI.15).

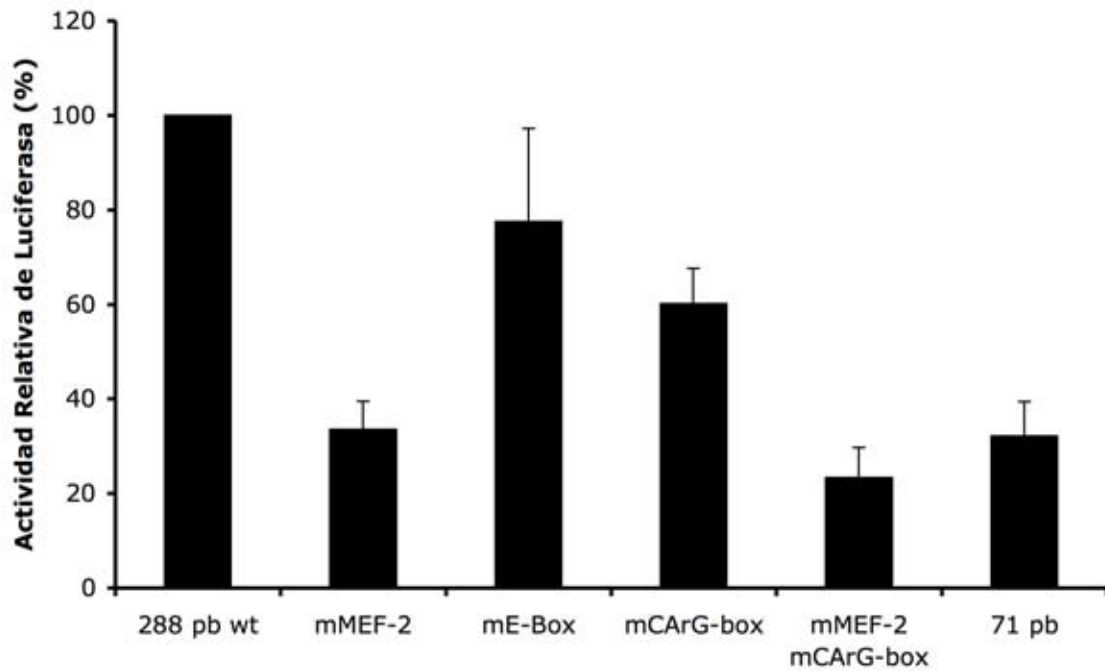


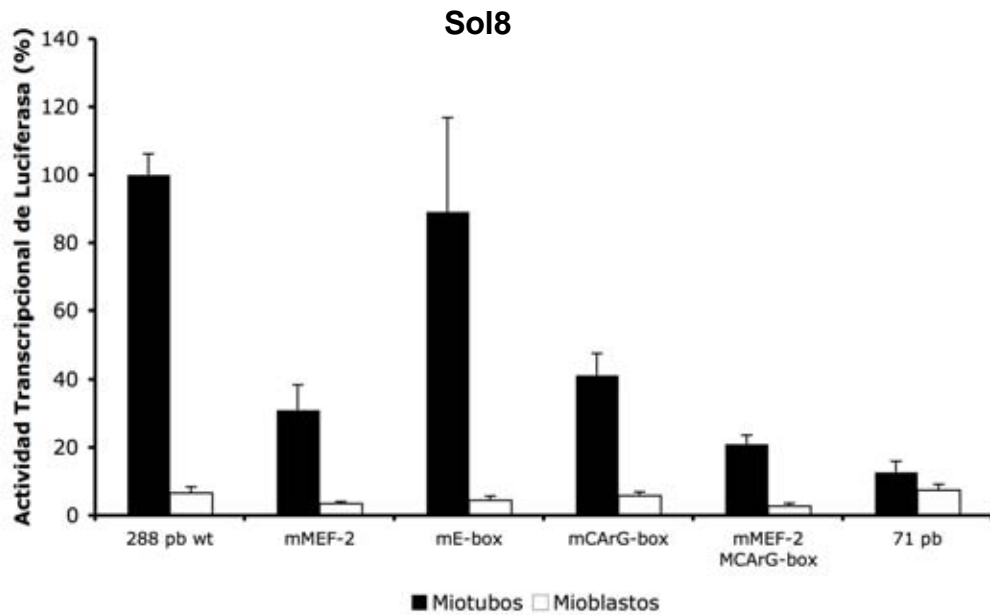
Figura VI.14 Actividad transcripcional de las construcciones del gen de *hCasq2* mutadas en cardiocitos. Las construcciones con mutaciones de los sitios MEF-2, E-box, CArG-box y MEF-2 + CArG-box, de la región proximal, fueron transfectadas en cardiocitos de rata neonata y su actividad de luciferasa determinada a las 48 horas. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a la construcción nativa de 288 pb. Media +/- error estándar.

La mutación del sitio CArG-box (mCArG-box) en cardiocitos, se asoció con una disminución de la actividad transcripcional de hasta un 40% con relación a la construcción nativa. En miotubos mCArG-box se encontró una disminución de hasta un 60% de la actividad con respecto a la construcción nativa. Como en los casos anteriores no se aprecian cambios en la actividad transcripcional en mioblastos ni en fibroblastos C3H10T1/2 (Figuras VI.14, VI.15).

En base a los resultados previos se decidió generar una construcción con una doble mutación de los sitios MEF-2 y CArG-box (mMEF-2 mCArG-box), para determinar si la disminución de la actividad transcripcional observada con cada una de ellas, es sinérgica. La actividad de mMEF-2 mCArG-box en cardiocitos, tuvo una disminución de un 80% con respecto a la observada en la construcción nativa, esta actividad hace a esta construcción equivalente a la construcción -71 pb de la región reguladora 5'. En miotubos la disminución de la actividad observada es de un 80%, equiparando a la construcción de -71 pb; en mioblastos y fibroblastos no se observaron cambios (Figuras VI.14, VI.15).

Los resultados obtenidos con la mutagénesis de los sitios de unión a factores de transcripción, indican que los factores MEF-2 y SRF tienen un papel clave en la regulación de la expresión de este gen, actuando de forma sinérgica; estos resultados también son interesantes, debido a que muestran que el sitio E-box, no tiene relevancia en la regulación de este gen, a pesar de que los factores de la familia de reguladores miogénicos en músculo esquelético y la familia HAND en músculo cardíaco, han sido descritos en la regulación de la mayoría de los genes musculares específicos.

A.



B.

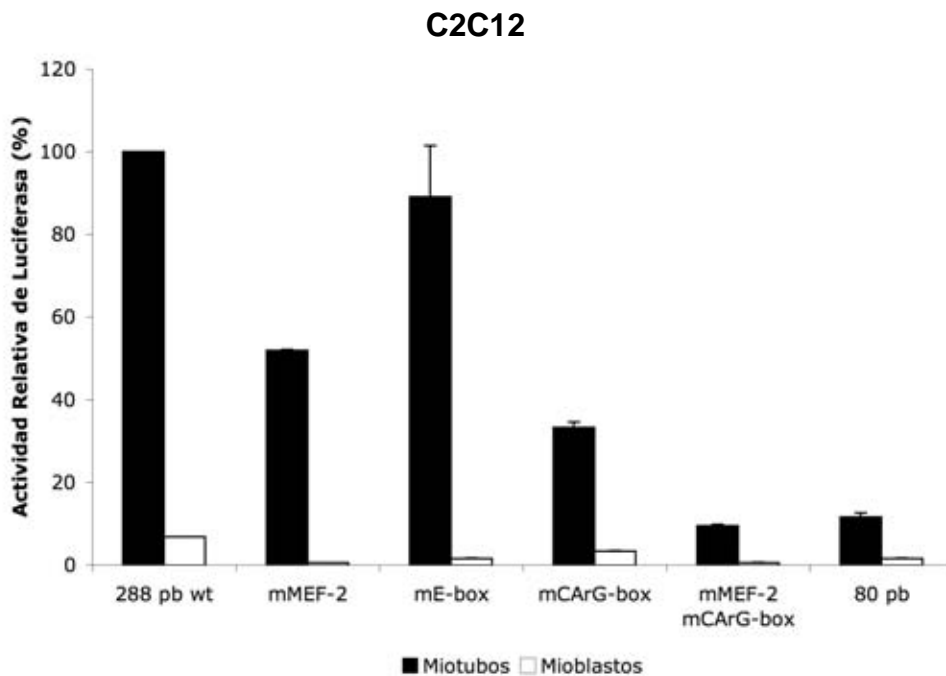


Figura VI.15 Actividad transcripcional de las construcciones del gen de *hCasq2* mutadas en músculo esquelético. Panel A. Las construcciones con mutaciones de los sitios MEF-2, E-box, CArG-box y MEF-2 + CArG-box, de la región proximal, fueron transfectadas en mioblastos (barras blancas) de línea celular Sol8 y la actividad determinada a las 24 horas; o en miotubos (barras negras) inducidos a diferenciarse por 48 horas. Panel B. El mismo experimento se realizó en la línea celular C2C12. Los resultados se expresan en porcentaje con respecto a la construcción nativa de 288 pb. Media +/- error estándar.

También se co-transfectaron en fibroblastos las construcciones mMEF-2, mCArG-box y mMEF-2 mCArG-box, junto con un vector de expresión de MEF-2C. Este experimento demostró que únicamente cuando hay MEF-2 y un sitio intacto en la región reguladora, se puede activar la transcripción. No se realizó el mismo experimento con el ADNc de SRF por no contar con el vector de expresión, este dato habría aumentado la relevancia de SRF , ya que podría mostrar que este factor es capaz de dirigir la expresión en células en las que no se encuentra ninguno de los factores de transcripción que regulan a este gen (Figura VI.16).

Estos datos señalan la importancia de estos dos sitios, ya que una vez mutados, la actividad transcripcional disminuye a niveles basales equivalentes a los observados con la secuencia de 71 pb, la cual carece del motivo conservado. Demostrando que ambos sitios (MEF-2 y CArG-box), son claves para que se de la expresión tejido específica, aunque se requiere de más elementos para que se observe el patrón completo de regulación.

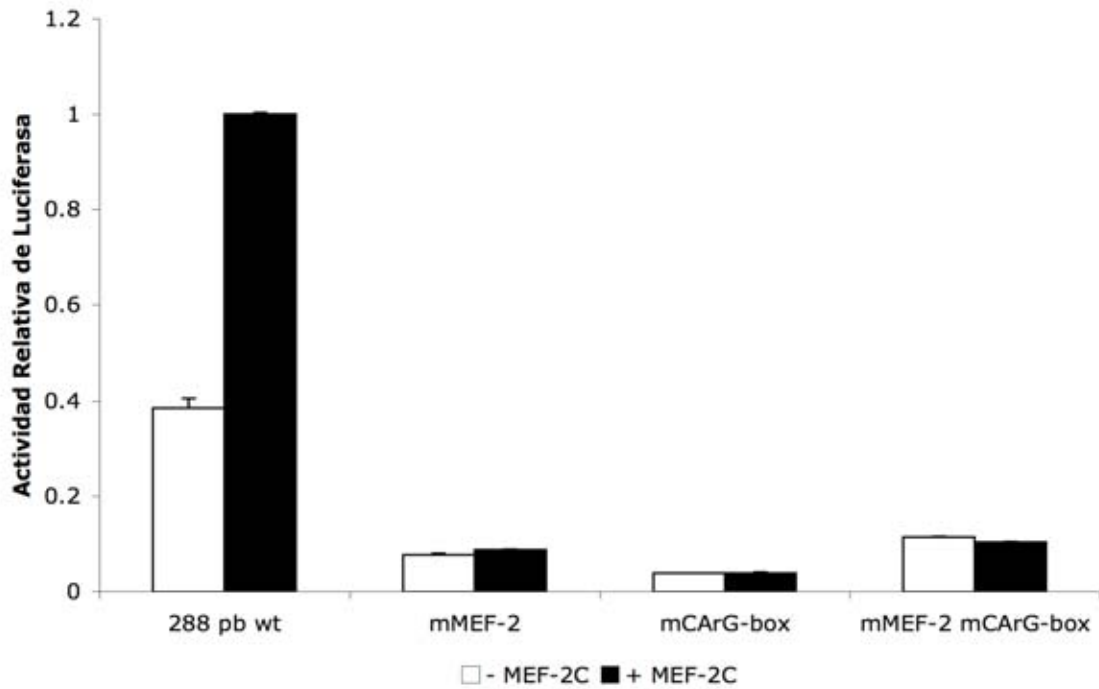


Figura VI.16 Actividad transcripcional de las construcciones del gen de *hCasq2* mutadas en fibroblastos. Las construcciones con mutaciones de los sitios MEF-2, CArG-box y MEF-2 + CArG-box, de la región proximal, fueron co-transfectadas en fibroblastos con 0.5 μ g MEF-2C (barras negras) o sin MEF-2C (barras blancas). Los resultados se expresan con respecto a la construcción nativa de 288 pb y MEF-2C. Media +/- error estándar.

Expresión de Factores de Transcripción Miogénicos Durante la Diferenciación Muscular

Debido a la relevancia funcional de los sitios MEF-2 y CARG-box en la regulación de la expresión de *hCasq2*, se cuantificaron los cambios en los niveles de expresión del ARN mensajero de factores de transcripción miogénicos, para establecer una correlación con la expresión de CASQ2. La expresión de los factores de la familia de reguladores miogénicos (MyoD, Miogenina, MRF-4, Myf-5) ha sido descrita extensamente. Los factores MyoD y MRF-4 tienen un nivel máximo a las 48 horas de iniciada la diferenciación para luego disminuir y mantenerse en niveles bajos pero constantes, mientras que miogenina y Myf-5, se incrementan de forma gradual y alcanzan un nivel máximo a los 7 días de diferenciación, para luego disminuir y mantenerse con niveles intermedios (95, 102-104). Sin embargo no se ha descrito el comportamiento de los factores de la familia de MEF-2, durante la diferenciación muscular a pesar de que se ha descrito el papel central que tiene esta familia de factores en la regulación durante el desarrollo muscular esquelético, y en la regulación de genes adultos en corazón y músculo esquelético. De igual manera la expresión de SRF durante la diferenciación muscular no ha sido establecida, a pesar de que tiene un papel importante en la expresión de genes de músculo esquelético de contracción lenta. En base a esto se cuantificó por RT-PCR en tiempo real los cambios en la cantidad del mensajero durante la diferenciación de células Sol8, desde mioblastos hasta miotubos de 5 días.

Los resultados demostraron que el mensajero más abundante en la etapa de mioblastos es MEF-2A, y el menos abundante es MEF-2D, mientras que MEF-2C tiene un nivel 3 veces menor, y SRF tiene niveles equivalentes a la mitad de MEF-2A (Figura VI.17). Estos niveles, no indican necesariamente el papel de cada factor en la regulación del gen *hCasq2*, ya que como se observa en los resultados de los experimentos de mutagénesis, la influencia de SRF, es muy similar a la de MEF-2, a pesar de que las distintas isoformas, hacen un nivel total de 2 veces por encima de el nivel de SRF. Estos resultados indican que el papel de los factores de transcripción en la regulación de *hCasq2* no están dados exclusivamente por los niveles de los mismos.

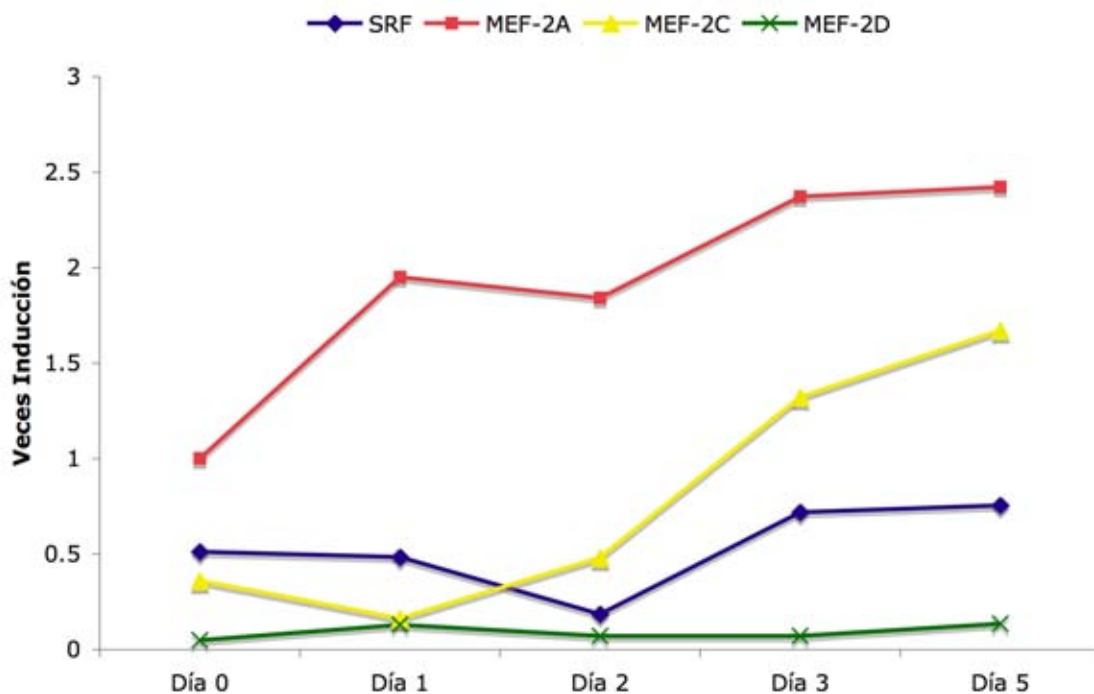


Figura VI.17. Niveles relativos de los factores de transcripción durante la diferenciación miogénica. Por RT-PCR en tiempo real se cuantificaron los niveles de ARNm de los factores SRF, MEF-2A, MEF-2C y MEF-2D, durante la diferenciación muscular en Sol8, la cantidad de mensajero fue normalizada con GAPDH, y comparada para determinar los niveles de los diferentes factores.

Durante la diferenciación muscular de Sol8, MEF-2A se induce dos veces en las primeras 24 horas de diferenciación, y alcanza un máximo en el tercer día cuando llega a niveles de 2.5 veces lo presente en miotubos, nivel de expresión que se mantiene estable hasta el día 5 (Figura VI.18). En el caso de MEF-2A, parece claro que una vez iniciada la diferenciación en células Sol8, se induce su expresión y se mantiene en un rango estrecho, hasta que se alcanza el fenotipo de miotubos. Como se mencionó previamente los niveles de los factores no parece correlacionarse con la activación transcripcional del gen *hCasq2*, pero algo que resalta es que MEF-2A tiene los mayores niveles al inicio de la diferenciación muscular, y se induce antes que los otros dos genes MEF-2 (C,D), por lo que cabría la hipótesis de que este es el primer gen de la familia en el que se activa la transcripción, y a la vez es responsable de activar la transcripción de los otros factores de la familia MEF-2.

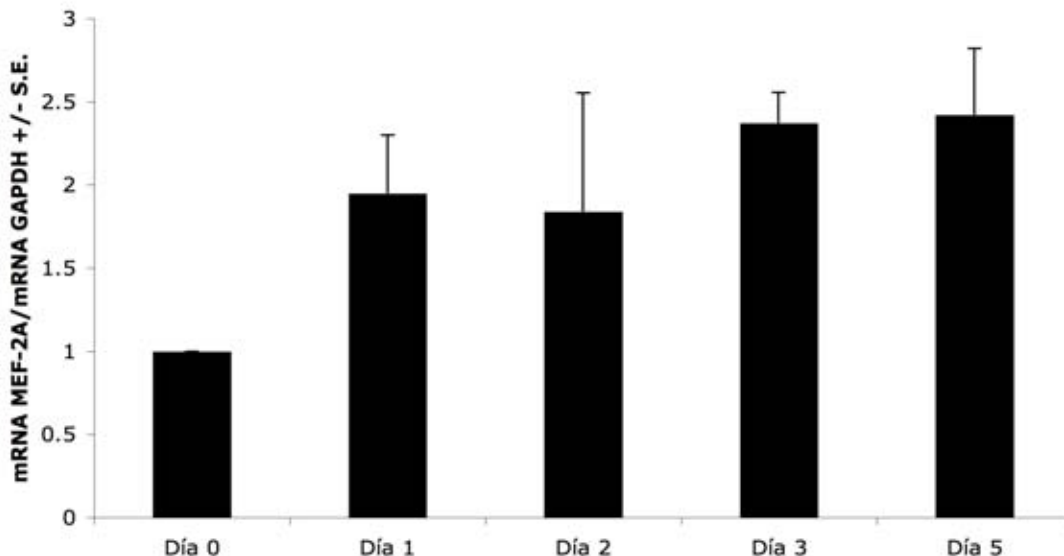


Figura VI.18 Cambios en la expresión de MEF-2A durante la diferenciación muscular. Los niveles del ARN mensajero de MEF-2A se cuantificaron durante la diferenciación muscular de Sol8 por RT-PCR en tiempo real. Media +/- error estándar.

En el mismo lapso SRF tiene cambios muy discretos, a las 48 horas hay una reducción moderada de sus niveles de hasta 0.5 veces, las 72 horas de diferenciación se incrementa a un nivel 1.5 veces por encima de los que se observa en mioblastos, y se mantiene constante hasta los cinco días (Figura VI.19). El dato mas sobresaliente arrojado por este experimento, es la disminución de hasta un 60% de la cantidad de mensajero en el segundo día de la diferenciación miogénica; este dato podría aparentar si se ve en relación a los resultados de los experimentos de mutagénesis de el sitio CArG-box en el motivo conservado, en donde a las 48 horas se observa una actividad transcripcional con una disminución de un 60% con respecto a la actividad basal. Sin embargo cuando se toman en cuenta los resultados con la secuencia CArG-box integra y la secuencia MEF-2 mutada, se observa que el sitio CArG-box es capaz de mantener la transcripción por encima de la actividad basal. Esto también es apoyado por los datos en la secuencia con ambos sitios mutados, cuando la actividad transcripcional se reduce a los niveles basales, apoyando la hipótesis de que SRF tiene un papel en la regulación de *hCasq2*. La disminución en la cantidad de mensajero es difícil de explicar, una posibilidad es que el mensajero que no tiene cambios en su expresión en las primeras 24 horas, y posteriormente se degrade el mensajero, y que solo ejerza su efecto en etapas mas tardías de la diferenciación muscular, o que esta disminución este controlada a nivel transcripcional, y que la presencia de algunos factores y/o co-factores en las primeras 48 horas de la diferenciación muscular, se retire esta represión, o por medio de otros elementos se active la transcripción del gen de

SRF, y se incrementen sus niveles. Obviamente, es necesario analizar a detalle el papel de SRF durante la diferenciación muscular, y la regulación del mismo.

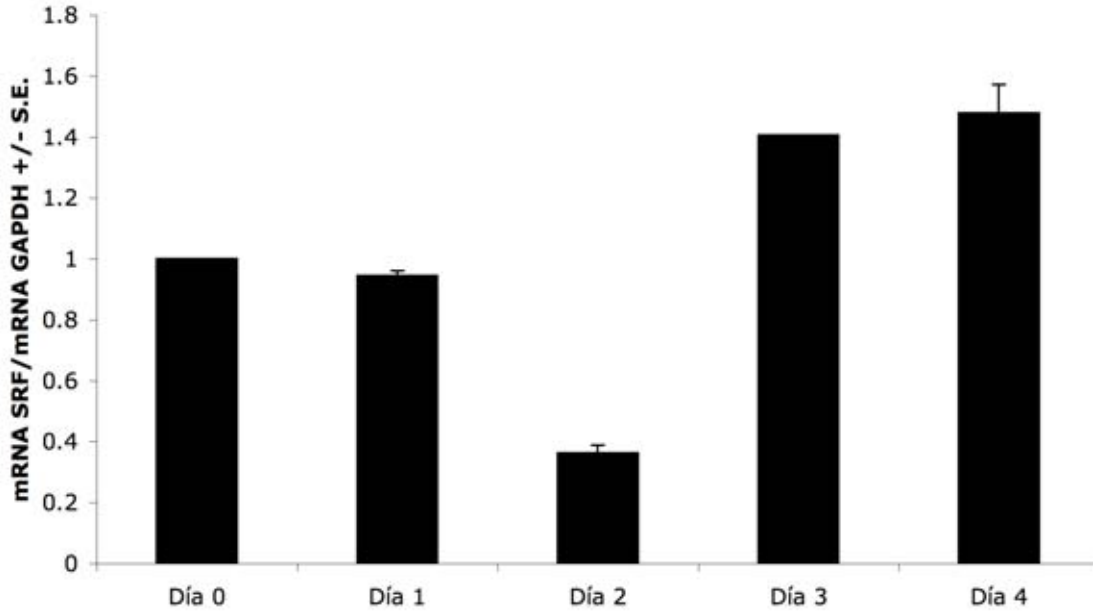


Figura VI.19 Cambios en la expresión de SRF durante la diferenciación muscular. Los niveles del ARN mensajero de SRF se cuantificaron durante la diferenciación muscular de Sol8 por RT-PCR en tiempo real. Media +/- error estándar.

En el caso de MEF-2C, se observa una disminución de 0.4 veces con respecto a su nivel de mioblastos en las primeras 24 horas, pero a partir de las 48 hrs se observa un leve incremento de 1.3 veces que continua hasta el quinto día de diferenciación con un nivel 4.6 veces por encima de lo presente en mioblastos (Figura VI.20). El factor MEF-2C, ha sido el mas estudiado de la familia, y ha sido identificado como el mas relevante en la regulación de genes musculares durante el desarrollo muscular, y en la etapa adulta. En el modelo de diferenciación que se empleó para este experimento, se observa que su expresión se induce entre el segundo y el tercer día, lo que es concurrente con la literatura, ya que no se trata de un regulador temprano de la diferenciación miogénica, y requiere de MyoD y Myf-5 para activar su transcripción; y en base a los resultados obtenidos también podría depender de MEF-2A. La importancia de MEF-2C, en la regulación de genes musculares adultos, puede estar relacionada con los niveles del mensajero, ya que estos tienen una tendencia ascendente desde el desarrollo y parecen continuar mas allá de los cinco días que dura la diferenciación en el modelo empleado. A pesar de que el incremento es muy claro, y es el mas grande entre los factores medidos, al quinto día de diferenciación, el nivel de mensajero de MEF-2C, continúa por debajo del nivel de MEF-2A, por lo que sería necesario medir los niveles de ambos factores en un modelo que permita llegar hasta el fenotipo de fibra muscular, y determinar el patrón de expresión de ambos genes. Por ejemplo realizando PCR *in situ*, en cortes de embriones de ratón.

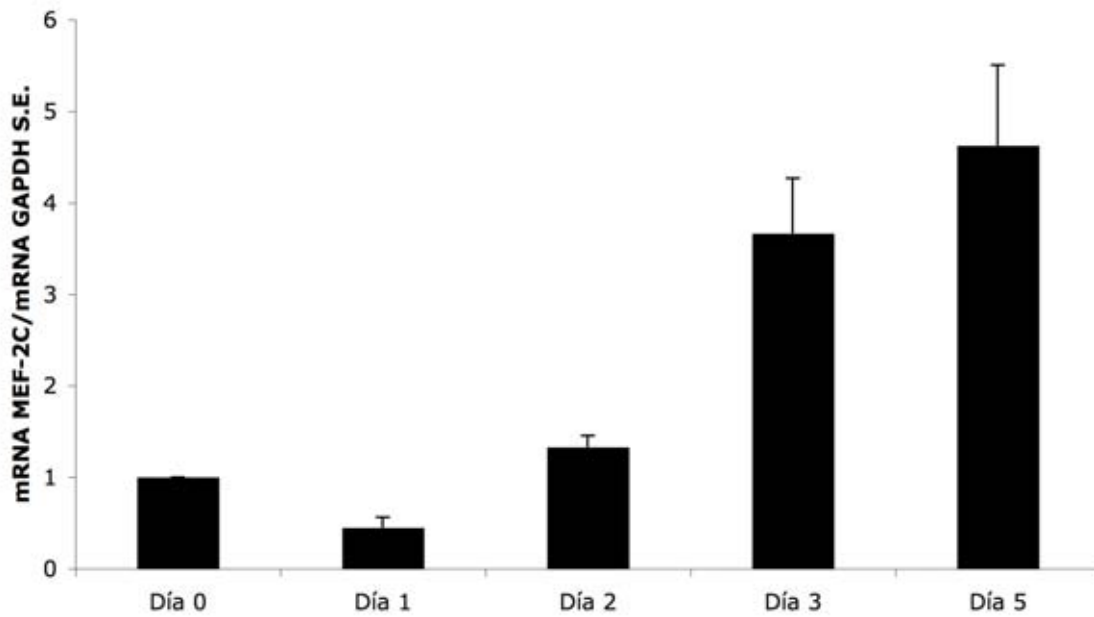


Figura VI.20 Cambios en la expresión de MEF-2C durante la diferenciación muscular. Los niveles del ARN mensajero de MEF-2C se cuantificaron durante la diferenciación muscular de Sol8 por RT-PCR en tiempo real. Media +/- error estándar.

Para MEF-2D a pesar de que se encuentra en niveles mucho menores a los de los otros factores, también se apreció un cambio, aumentando 2.7 veces a las 24 horas de diferenciación, para luego disminuir en los días 2,3 y 4 a un nivel 1.5 veces por encima del nivel de mioblastos; y finalmente tener un nuevo pico de 2.8 veces en el quinto días de diferenciación (Figura VI.21). Los niveles relativos de MEF-2D, fueron mucho menores a los de los otros factores (Figura VI.17), Sin embargo cuando se analiza a detalle la cantidad de mensajero presente, es claro que hubo una inducción de la expresión de MEF-2D. El comportamiento que sigue MEF-2D, es relativamente similar al observado en otros factores miogénicos como MyoD, el cual se induce rápidamente durante la diferenciación miogénica, para disminuir de una manera igual de rápida a las 48 horas, y permanecer en un nivel basal por el resto de la diferenciación. En el caso de MEF-2D, mas adelante vuelve a inducirse, la expresión del mensajero, lo que pudiera estar dado por la presencia de otros factores de transcripción, que se expresan mas tardíamente en la diferenciación muscular, y que contribuyan a la diferenciación de los miotubos, hacia una fibra muscular. De nuevo, esto debe ser estudiado con mas experimentos que permitan observar el desarrollo mas allá de miotubos.

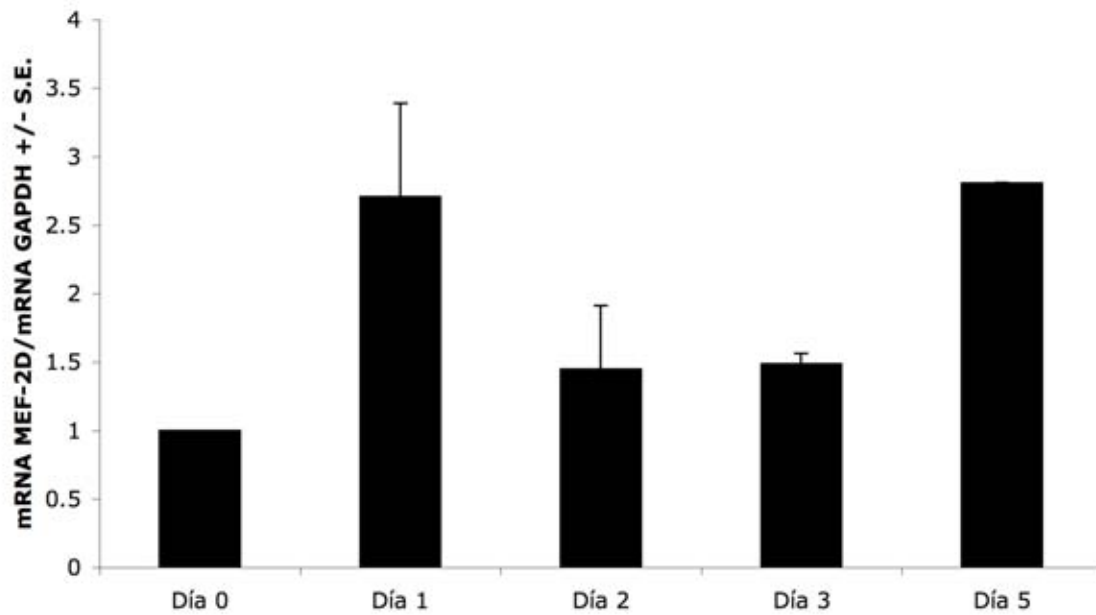


Figura VI.21 Cambios en la expresión de MEF-2D durante la diferenciación muscular. Los niveles del ARN mensajero de MEF-2D se cuantificaron durante la diferenciación muscular de Sol8 por RT-PCR en tiempo real. Media +/- error estándar.

Por último a pesar de que ya se ha descrito, se cuantificó el nivel de miogenina durante la diferenciación de células Sol8, para validar los resultados obtenidos. Se encontró que en mioblastos, la cantidad de miogenina fue la mitad de la cantidad de MEF-2A, y en un nivel similar a SRF y MEF-2C. Durante la diferenciación se observó un incremento a partir del primer día de 5.1 veces que continua gradualmente hasta llegar a 8.5 veces en el día 5 de la diferenciación muscular (Figura VI.22). Estos datos coinciden con los ya reportados, notando que miogenina es un factor cuyo papel, así como el de MRF-4, es tardío en la diferenciación miogénica, actuando una vez que MyoD y Myf-5 (103, 104), se han expresado, y activado el programa que compromete a la célula indiferenciada al programa de diferenciación muscular. En los datos es claro que miogenina se induce desde el comienzo, ya que los mioblastos, son células que ya están comprometidas hacia el linaje muscular, por la acción de MyoD, y que es motivo de una inducción aún mayor una vez que el fenotipo de miotubos se ha establecido, y se debe continuar el programa de diferenciación muscular.

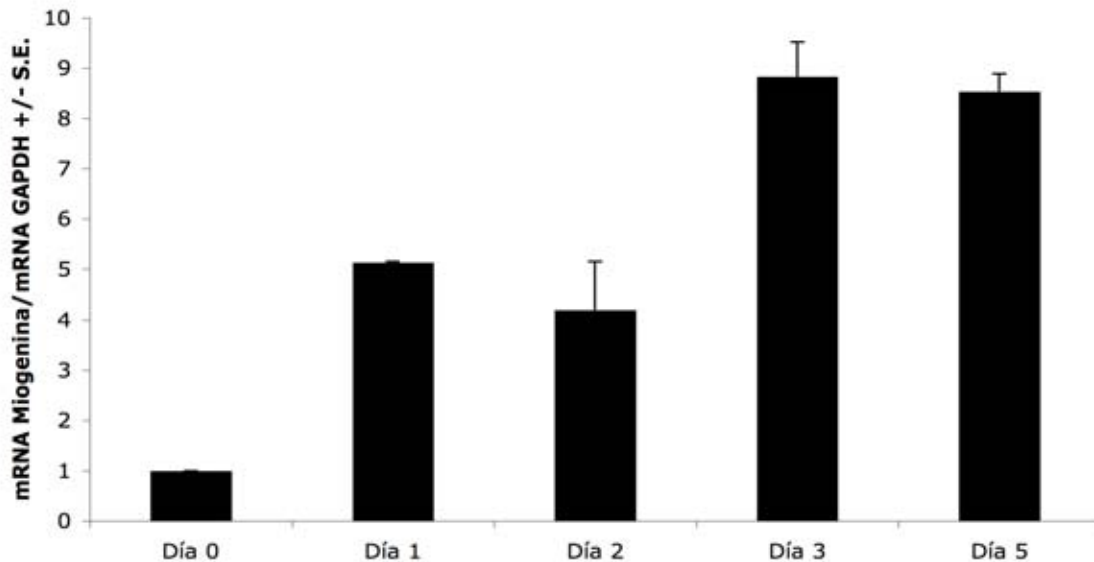


Figura VI.22 Cambios en la expresión de Miogenina durante la diferenciación muscular. Los niveles del ARN mensajero de Miogenina se cuantificaron durante la diferenciación muscular de Sol8 por RT-PCR en tiempo real. Media +/- error estándar.

Los resultados de esta sección, refuerzan la importancia de estos factores y de los sitios de unión del gen *hCasq2* en su regulación transcripcional, demostrando que hay una correlación entre sus niveles y la expresión del gen, además de que ya se demostró que se requiere de la funcionalidad de los sitios MEF-2 y CArG-box, para que exista una actividad transcripcional adecuada de este gen.

Tabla 3. Resumen de los resultados en músculo esquelético.

- La secuencia de ADN con los sitios MEF-2 y CArG-box, se activa 12 veces por encima de su nivel basal a las 72 horas de diferenciación miogénica.
- La mutación del sitio MEF-2, se asocia con una disminución de un 50% de la actividad transcripcional en miotubos.
- La mutación del sitio CArG-box, se asocia con una disminución de un 60% de la actividad transcripcional en miotubos.
- La mutación de ambos sitios disminuye la transcripción a niveles equivalentes a los de la secuencia de ADN que no contiene ambos sitios.
- Los niveles de ARNm de MEF-2 son 2-3 veces superiores en miotubos.
- Los niveles de ARNm de SRF son 1.5 veces superiores en miotubos.
- Las mutaciones no afectan la actividad transcripcional en ausencia de los factores de transcripción (mioblastos).

VII. DISCUSIÓN

La calsecuestrina cardiaca tiene un papel central en la homeostasis del Ca^{2+} en las células musculares estriadas; y es una proteína con una regulación muy controlada, lo que se evidencia por su expresión tejido específica, y al mantenimiento de sus niveles de expresión en estados patológicos, aún cuando la mayoría de las proteínas involucradas en la homeostasis de Ca^{2+} se alteran. Los datos anteriores destacan la necesidad de comprender los mecanismos por medio de los cuales se regula la expresión del gen *Casq2*. Los resultados de esta tesis, constituyen el primer trabajo realizado en cualquier especie sobre la regulación transcripcional de gen de calsecuestrina cardiaca, y demuestran que la regulación del gen *hCasq2* es a nivel transcripcional, por medio de factores de transcripción músculo específicos.

El análisis de la secuencia del gen *hCasq2*, aportó datos de gran relevancia para entender la regulación de este gen. Es bien conocido que la mayoría de los genes con expresión músculo cardiaco específico, presentan una expresión específica, en niveles altos en tejido cardiaco y en menor grado en músculo esquelético de contracción lenta; un patrón que es idéntico al observado con el gen *hCasq2*. En todos los genes que codifican para proteínas específicas del músculo cardiaco en los que se ha estudiado su regulación transcripcional se ha encontrado que los elementos proximales de la región reguladora, son suficientes para conferir la expresión músculo estriada específica, mientras que la expresión cardiaca se regula además por elementos distales (79-82, 101, 105, 106).

La región reguladora proximal del gen de *Casq2*, presenta una homología muy alta entre las distintas especies de mamíferos en las que se ha secuenciado (humano, chimpancé, rato, rata, perro, vaca) además del pollo; esta homología solo se presenta hasta los primeros 180 pb de región reguladora, después de la cual no existen regiones de homología, y se limitan a pequeños fragmentos de ADN de 20-30 pb distribuidos de manera aislada. La homología con el pollo es de una notoria importancia, debido a que en las aves solo se encuentra una isoforma de CASQ, la cual se expresa tanto en músculo cardiaco como en músculo esquelético. Estos resultados derivados del análisis de la secuencia, destacan, debido a que se conoce que los elementos de unión a factores de transcripción presentes en la región reguladora proximal son los responsables de conferir la especificidad por el tejido muscular estriado. En el gen *hCasq2* se encuentra muy conservada esta región proximal entre especies, lo que hacia sospechar desde un inicio, que los elementos presentes en los primeros 200 pb tienen un papel significativo, para regular la expresión tejido específica del gen *hCasq2*, lo que se comprueba con los resultados de los experimentos funcionales.

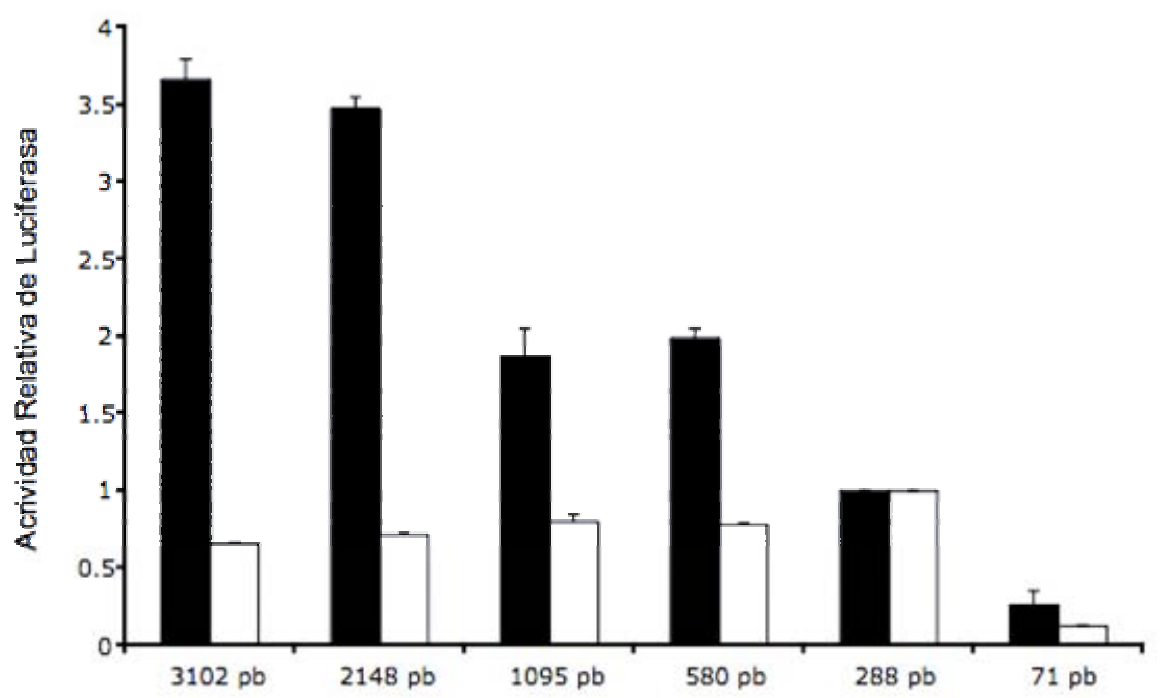
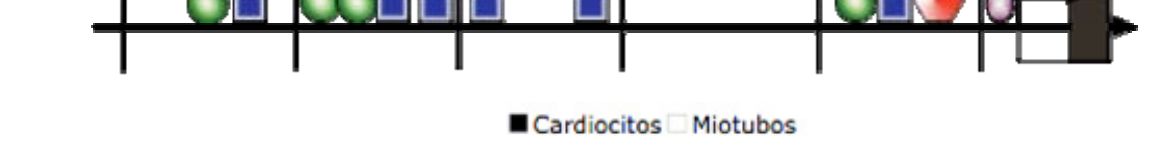
Además de la homología entre especies el dato más importante, son los probables elementos de unión a factores de transcripción en esta región, que incluyen sitios para MEF-2, E-box y CArG-box. Estos elementos han probado en numerosas ocasiones, la capacidad de unir a factores de transcripción miogénicos. El sitio MEF-2 une a miembros de la familia del *Myocyte Enhancer Factor 2* (A, C, D), el cual es un factor que pertenece a la familia de factores

MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, SRF)-box, y que ha demostrado ser un regulador central en la expresión de genes musculares esqueléticos, y ha sido mencionado como necesario para la expresión de algunos genes cardiacos (84, 98, 101). La E-box por su conformación, es un elemento muy promiscuo, capaz de unir a múltiples factores de transcripción según el tejido en el que se encuentre. En músculo esquelético la E-box une a la familia de reguladores miogénicos (MyoD, MRF-4, Miogenina, Myf-5), los cuales tienen un papel central en la diferenciación muscular esquelética (104, 107, 108). En el músculo cardiaco, la E-box une a los factores de transcripción HAND-1 y HAND-2, los cuales tienen una gran importancia en la diferenciación muscular cardiaca, y en la formación del corazón tetracameral (85, 99, 109, 110). Por último la CARG-box, es un sitio de unión para el factor SRF, el cual es otro miembro de la familia de factores MADS-box. SRF es un factor de gran relevancia en genes de músculo liso vascular, y también ha sido mencionado en la regulación de algunos genes cardiacos específicos (111-113); como se mencionó previamente la CARG-box presente en los genes de *Casq2*, no es un elemento canónico, pero tiene una configuración idéntica a una CARG-box presente en el gen de la MHC- α , que ha demostrado ser funcional en cardiomiocitos (80). Estos datos sugieren que este motivo conservado entre especies, tiene un papel relevante en la regulación del gen *hCasq2*, ya que los factores de transcripción que se unen a las secuencias de este, han demostrado en múltiples casos, la posibilidad de regular la transcripción de genes que codifican para proteínas de músculo cardiaco.

Los resultados de los estudios funcionales, muestran claramente que los elementos contenidos entre -71 y -288 pb, tienen un papel fundamental en la regulación de este gen, siendo capaces de activar de manera regulada la transcripción en cardiocitos de rata neonata y miotubos de la línea celular Sol8, pero no en fibroblastos; en ambos casos la actividad observada con esta construcción, es muy similar o equivalente a la actividad del promotor SV40, el cual es identificado como un promotor fuerte en ambos tipos celulares. El papel central en la regulación del gen *hCasq2* de esta región es destacado por la actividad observada con la construcción de -71 pb, que termina justo antes de el motivo en la secuencia altamente conservada, y solo alcanza niveles de activación ligeramente por encima de los observados con la construcción sin promotor. Los resultados obtenidos en cardiomiocitos con las otras construcciones son similares a los patrones en otros genes cardiacos, donde la expresión cardiaca es regulada por elementos distales. Los resultados sugieren que entre -288 y -580 pb y entre -1095 y -2148 pb se encuentran elementos que dirigen la expresión en músculo cardiaco, y que probablemente actúen como un enhancer cardiaco específico (Figura VII.1). Estas mismas construcciones en miotubos esqueléticos tienen un comportamiento opuesto, disminuyendo la actividad transcripcional, lo que sugiere que los elementos que actúan como enhancer en tejido muscular cardiaco, podrían actuar como reguladores negativos de la transcripción en músculo esquelético; lo que podría correlacionarse con los niveles bajos de expresión encontrados *in vivo* en músculo esquelético de contracción lenta (26, 77, 114). Los resultados

observados en fibroblastos, muestran que prácticamente no existe activación en células no musculares, lo que apoyaría la hipótesis de que la regulación de este gen esta dada por la presencia de factores de transcripción presentes en músculo. Estos resultados demuestran claramente que los elementos presentes en los primeros 288 pb de la región reguladora 5' son necesarios y suficientes para conferir una expresión músculo estriado específica, mientras que los elementos entre -580 y -2148 pb controlan la expresión en músculo cardiaco. (Figura VII.1)

-134 pb -86 pb
 Humano **ATGATTATTTT**AGCCTGAAACA**ACTGCAT**CCTAAAAATGGAGTTCGTA
 MEF-2 E-box CARG-box TATA-box
 3102 pb 2148 pb 1095 pb 580 pb 288 pb 71 pb



Las transfecciones estables mostraron que el patrón de activación entre el fragmento corto (288 pb) y el fragmento largo (3.2 kb) de región reguladora 5', son muy similares durante la diferenciación muscular, aunque la actividad de el fragmento corto es 3-4 veces mayor que el fragmento largo. Estos resultados muestran que la actividad transcripcional del gen se correlaciona claramente con los cambios en los niveles del ARN mensajero de CASQ2. Lo que apoya la hipótesis de que la regulación de la expresión del gen *hCasq2* está dada principalmente a nivel transcripcional.

En base a los resultados obtenidos con el análisis de secuencia y los estudios funcionales, se tomo la decisión de enfocar el trabajo al motivo de la secuencia conservada. Los experimentos de EMSA indican que los sitios MEF-2 y CArG-box son capaces de unir a los factores de transcripción MEF-2 y SRF, presentes en los núcleos de cardiocitos y miotubos esqueléticos. Mientras tanto, la E-box, no parece tener la capacidad de unir a proteínas presentes en los núcleos de cardiocitos o miotubos; este resultado es un tanto sorprendente debido a la promiscuidad de este elemento, sin embargo a pesar de cumplir con los requisitos para ser denominado un elemento E-box, no se ha reportado un elemento con la misma configuración (CAACTG) en la regulación de genes musculares, por lo que existe la posibilidad de que esta configuración de E-box no sea funcional en tejido muscular.

Los resultados de la mutagénesis aportan más datos que refuerzan la importancia de el motivo en los primeros 288 pb de región reguladora. Las mutaciones de MEF-2 y CArG-box, disminuyeron la actividad transcripcional en

cardiocitos y miotubos, en un 70 y 40%, respectivamente; mientras que la mutación de E-box, no tiene cambios de importancia en la actividad transcripcional. El resultado más contundente es la actividad observada con la construcción que contiene las mutaciones tanto de MEF-2 como de CArG-box, donde se encuentra una disminución de la actividad a niveles casi basales, y equivalentes a la actividad de la construcción de 71 pb, estos resultados demuestran que estos dos elementos son fundamentales para la expresión tejido específica, y parecieran ser los únicos responsables de esta.

Por último los resultados de la cuantificación de los factores de transcripción MEF-2 (A, C, D), y SRF, demuestran que durante la diferenciación muscular esquelética, hay una inducción en la expresión de estos factores, que es consistente con la inducción de la expresión de CASQ2, lo que aunado a los resultados de EMSA y mutagénesis dirigida, refuerza el papel de estos factores en la regulación de este gen.

A pesar de que MEF-2 y SRF, parecen ser los únicos responsables directos de la expresión tejido específica de *hCasq2*, sería muy aventurado el descartar el papel de otros factores, en parte porque se ha reportado en algunos estudios globales el papel de miogenina en miotubos (115), además de que es bien conocido que ambos factores tienen una gran capacidad para interactuar con otros factores, por medio de el dominio MADS, se sabe que no son capaces de interactuar entre ellos, pero son capaces de interactuar con factores de la familia de reguladores miogénicos en músculo esquelético, y con factores de la familia HAND en músculo cardiaco, ya que ambas familias poseen el dominio

bHLH (*Basic helix-loop-helix*) (103, 104, 108, 110, 116, 117). Se sabe que los factores de la familia MADS, son capaces de actuar como reguladores positivos y negativos en un mismo gen, dependiendo de los co-factores con los que estén interactuando.

En los últimos años se ha descrito una familia de co-factores conocida como miocardina, en especial los factores de transcripción relacionados a miocardina A/B, que han sido asociados a la regulación de genes cardiacos, por medio de la interacción con SRF potenciando su efecto, este podría ser uno de los co-factores que participen en la regulación de este gen (118-122). Los co-factores tienen una gran importancia en genes cardiacos, donde se ha propuesto la formación de complejos proteicos denominados como enhanceosomas, donde aunque un solo factor de transcripción haga contacto con el ADN, otros como MEF-2, NFAT, HAND-2, GATA-4, SRF están asociados a este mismo, junto con moléculas como p300/CBP y miocardina, formando el complejo que regula la expresión en corazón (101, 110, 123).

Los complejos proteicos que se forman, reclutan moléculas como p300, los cuales además de su función como co-factores, pueden interactuar con otras proteínas, como desacetilasas de histonas, las cuales actúan en otro nivel de regulación de la expresión (124-127). Se ha demostrado que los factores de la familia de reguladores miogénicos, principalmente MyoD, son regulados por asociaciones con enzimas remodeladoras de la cromatina. Se ha mencionado que la capacidad de MyoD para activar genes en la diferenciación muscular esquelética, está relacionada con su capacidad para reorganizar a la cromatina

en las regiones de estos genes, por medio de asociaciones con acetilasas de histonas (HAT), en particular p300/CBP, y PCAF (126). Las HAT activan la transcripción dependiente de MyoD, no solo por la acetilación de las histonas en la región de la E-box, sino acetilando a MyoD, incrementando su capacidad para unir DNA y su capacidad de transactivar (127).

La familia de factores MEF-2, también tiene la capacidad de interactuar con HAT por medio del dominio "MADS-box", específicamente p300/CBP, y al co-activador de receptores esteroideos (GRIP), con actividad intrínseca de HAT. La asociación de MEF-2 con GRIP estimula la transcripción dependiente de MEF-2, y parece ser necesaria para la diferenciación muscular (125). Por otra parte MEF-2 ha sido implicado con las desacetilasas de histonas clase II (HDAC), las cuales son muy abundantes en el tejido muscular cardíaco, y reprimir la transcripción de genes dependientes de MEF2.

Una de las áreas en donde es de un gran interés estas interacciones, es la remodelación de la cromatina en la hipertrofia y en la insuficiencia cardíaca, en donde se reactiva la expresión de genes fetales, y se regula negativamente a los genes cardíacos adultos. En estas condiciones se ha observado que p300/CBP, actúa como un regulador positivo de la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca, activándose por la activación de la vía p42/p44 MAPK, debida a la estimulación adrenérgica (125). Por otra parte las HDACs, se han señalado como reguladoras negativas de la hipertrofia e insuficiencia cardíaca, debido a su capacidad para inhibir la transcripción de genes dependientes de MEF-2 (125).

Uno de los aspectos relacionados con la regulación por la cromatina en este gen, está dado por la distribución de los sitios MEF-2 y E-box. Se ha probado que las HDAC4 y -5, impiden la diferenciación muscular mediada por MyoD, y que esta inhibición es mediada indirectamente por MEF-2, pero se requiere que ambos elementos estén dispuestos en tándem como en el gen *hCasq2*, para que las HDAC inhiban la función de MyoD (126). Como ya se menciono previamente, existen reportes en la literatura, que señalan que miogenina regula al gen de *Casq2*, en miotubos de células C2C12 (104), y pesar de que la secuencia E-box en el motivo conservado no parece ser funcional, no se puede descartar la influencia de MyoD o de otros factores de la familia de reguladores miogénicos, que pudiera interactuar con el factor MEF-2 unido a su secuencia en el motivo conservado, como co-factores, y promover la remodelación de la cromatina en este gen durante la diferenciación miogénica. lo que abre otra área a estudiar mas adelante en la regulación de este gen.

Otro aspecto a considerar con los dos factores de transcripción identificados en este trabajo, es que está bien descrito que MEF-2 y SRF, se encuentran regulados por medio de vías dependientes de Ca^{2+} , como calcineurina para MEF-2 (89, 107, 128-130) y la calmodulina cinasa para SRF (112, 131, 132); esto da una nueva dimensión de complejidad, debido a que uno de los aspectos más relevantes de la expresión de CASQ2, es el mantenimiento de sus niveles de expresión en los estados patológicos. Uno de los paradigmas básicos en las patologías cardiacas es la alteración en el manejo de las concentraciones de Ca^{2+} (16, 22, 24, 74, 76, 87, 88, 133-135). Estos datos

hacen suponer que deben existir más factores involucrados por vías no dependientes de Ca^{2+} , que regulen la transcripción de este gen.

A pesar de que los elementos distales no fueron parte del espectro abarcado por este trabajo, vale la pena mencionar que es necesario profundizar en el análisis de los mismo para tener una visión completa de la regulación de este gen. Como se menciona en los resultados, además del chimpancé con el que prácticamente los 3.2 kb de región reguladora no muestran diferencias, esta región no parece tener homología con otras especies. En esta región se logran identificar en la región de -1500 pb una porción donde se encuentran varios elementos MEF-2, E-box, NFAT, GATA-4. Esta región podría ser la responsable de la regulación cardíaca específica, pero es necesario determinar su papel específico en la activación transcripcional en células musculares cardíacas; determinar las propiedades de unión de las secuencias presentes en esta región a factores de transcripción, además debido a su presencia distal, se debe determinar si actúa como un enhancer cardíaco específico, comprobando si es capaz de ejercer su función de forma bidireccional, y activar la transcripción de forma músculo cardíaco específica en otros genes.

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales motivos para analizar la regulación del gen *hCasq2*, es su potencial aplicación en vectores para terapia génica cardíaca, empleando la región reguladora de *hCasq2* para controlar la expresión de otras proteínas, que sufren disminuciones en su nivel de expresión, en patologías como la insuficiencia cardíaca, por medio de genes quiméricos (ej. *hCasq2/SERCA2*), con virus adeno-asociados. De esta manera

se podría obtener una expresión tejido específica de la proteína, y que además no sería susceptible de ser modificada o disminuida por los estímulos presentes en el miocardio enfermo, como es el caso de los vectores actuales que están regulados por la región reguladora de MHC- α , la cual es regulada negativamente por las señales presentes en la insuficiencia cardíaca, además de evitar la expresión en otros tejidos, como pasa cuando los vectores son dirigidos por la región reguladora de CMV. Sin embargo, antes de explorarse esta opción, se deben de contestar varias preguntas que se plantean con los resultados obtenidos. En primer lugar se debe de determinar los mecanismos de regulación de la expresión en músculo cardíaco, por parte de los elementos distales contenidos en las regiones entre -288 y -580 pb y entre -1095 y -2148 pb, para definir si realmente tienen un papel de enhancer y por medio de que elementos se da la activación transcripcional. También es necesario determinar si los 3.2 kb de región reguladora que se tienen clonados abarcan la totalidad de la región reguladora 5'. Por último, es necesario determinar el papel de las interacciones entre los factores de transcripción que se unen a las secuencias de ADN en el gen *hCasq2*, y otros factores de transcripción y co-factores para comprender como se regula este gen sin ser afectado por los múltiples estímulos que se encuentran en patologías cardíacas.

VIII. CONCLUSIONES

1. La región reguladora 5' del gen *hCasq2* tiene una gran homología en sus primeros 180 pb con las regiones reguladoras de los genes *Casq2* de chimpancé, ratón, rata, perro, vaca y pollo.
2. En la región altamente conservada, se encuentran secuencias de unión a MEF-2, CArG-box y E-box.
3. Los elementos contenidos entre -71 y -288 pb son necesarios y suficientes para dirigir la expresión tejido específica características del gen *hCasq2*.
4. Los elementos contenidos entre -288 y -580 pb y entre -1095 y -2148 pb, parecen actuar como enhancers cardiaco específicos y como reguladores negativos en músculo esquelético.
5. Los sitios MEF-2 y CArG-box presentes en el casete son capaces de unir *in vitro* a los factores MEF-2 y SRF presentes en los núcleos de células musculares cardíacas y esqueléticas.
6. Las mutaciones de los sitios MEF-2 y CArG-box, disminuyen de forma importante la actividad transcripcional en células cardíacas y esqueléticas.
7. El sitio E-box no tiene un papel funcional en la regulación del gen *hCasq2*.
8. La mutación conjunta de los sitios MEF-2 y CArG-box, disminuye la actividad transcripcional a niveles basales.
9. Los sitios MEF-2 y CArG-box tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión del gen *hCasq2*.

IX. PERSPECTIVAS

1. Es necesario caracterizar los elementos distales de la región reguladora, debido a que estos muestran la capacidad de regular de manera positiva la transcripción en músculo cardíaco, llegando a activar la misma hasta 4 veces por encima de la actividad demostrada por la secuencia regulada por el motivo conservado en la expresión en músculo cardíaco, además de que estos elementos podrían funcionar como un enhancer específico de músculo cardíaco.
2. Debido a que en la regulación de los genes que codifican para proteínas específicas de músculo cardíaco, se ha demostrado que además de los factores de transcripción que se unen directamente al ADN, la interacción entre los factores y co-factores, aún cuando no están unidos al ADN puede influir en la transcripción de una manera equivalente a la de los factores que si se unen al ADN. En base a estos es necesario determinar las interacciones entre los factores de transcripción MEF-2 y SRF, con otros factores de transcripción (MyoD, Miogenina, HAND1) y co-factores (Id, miocardina), para lograr tener una visión mas amplia de la regulación de este gen.
3. Al determinar la interacción con otras proteínas por parte de los factores que se unen a el ADN, también se puede determinar la formación de macro-complejos proteicos que pudieran contribuir a la regulación en otros niveles, tales como la cromatina, y que añadiría datos para entender la regulación.

4. Se deben de generar vectores virales, con adenovirus que contengan un gen quimérico *hCasq2/Luc*, con el objeto de determinar si la secuencias contenidas en el fragmento de ADN de 3.2 kb, son suficientes para dirigir la expresión tejido específica observada en *CASQ2*, *in vivo*.
5. Una vez verificada la capacidad de los vectores virales, se deben de generar nuevos vectores en virus adeno-asociados, para inducir una expresión a largo plazo. Estos vectores deben de contener genes quiméricos con la región reguladora de *hCasq2*, controlando la expresión de proteínas como SERCA2, o dominantes negativas de PLB, para mejorar el transporte de Ca^{2+} , al interior del RS durante la relajación muscular, y así mejorar la contractilidad miocárdica.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jorgensen AO, Kalnins VI, Zubrzycka E, MacLennan DH. Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Localization by immunofluorescence of sarcoplasmic reticulum proteins in differentiating rat skeletal muscle cell cultures. *J Cell Biol.* 1977;74(1):287-98.
2. Page E. Quantitative ultrastructural analysis in cardiac membrane physiology. *Am J Physiol.* 1978 Nov;235(5):C147-58.
3. Van Winkle WB, Entman ML. Comparative aspects of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Life Sci.* 1979 Oct 1;25(14):1189-200.
4. Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Annu Rev Physiol.* 1979;41:473-84.
5. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol.* 1983;245(1):C1-14.
6. Franzini-Armstrong C, Protasi F, Tijssens P. The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 ;1047:76-85.
7. Michalak M, MacLennan DH. Assembly of the sarcoplasmic reticulum. Biosynthesis of the high affinity calcium binding protein in rat skeletal muscle cell cultures. *J Biol Chem.* 1980;255(4):1327-34.
8. Brandt NR, Brunschwig JP, Lattanzio FA. A functional identification of cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 ;128(2):739-45.
9. Jorgensen AO, Shen AC, Campbell KP. Ultrastructural localization of calsequestrin in adult rat atrial and ventricular muscle cells. *J Cell Biol.* 1985;101(1):257-68.
10. Wientzek M, Katz S. Isolation and characterization of purified sarcoplasmic reticulum membranes from isolated adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1991;23(10):1149-63.
11. Martonosi AN, Pikula S. The network of calcium regulation in muscle. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(1):1-30.

12. Dhalla NS, Das PK, Sharma GP. Subcellular basis of cardiac contractile failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1978;10(4):363-85.
13. Schwartz K, Chassagne C, Boheler KR. The molecular biology of heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1993;22(4 Suppl A):30A-3A.
14. Arai M, Matsui H, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res.* 1994;74(4):555-64.
15. Dillmann WH. Regulation of expression of cardiac sarcoplasmic reticulum proteins under pathophysiological conditions. *Mol Cell Biochem.* 1996;157(1-2):125-8.
16. Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):951-69.
17. Alpert NR, Brosseau C, Federico A, Krenz M, Robbins J, Warshaw DM. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(4):H1446-54.
18. Vannier C, Chevassus H, Vassort G. Ca-dependence of isometric force kinetics in single skinned ventricular cardiomyocytes from rats. *Cardiovasc Res.* 1996;32(3):580-6.
19. Palmer S, Kentish JC. Roles of Ca²⁺ and crossbridge kinetics in determining the maximum rates of Ca²⁺ activation and relaxation in rat and guinea pig skinned trabeculae. *Circ Res.* 1998;83(2):179-86.
20. Baker AJ, Figueredo VM, Keung EC, Camacho SA. Ca²⁺ regulates the kinetics of tension development in intact cardiac muscle. *Am J Physiol.* 1998;275(3):H744-50.
21. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 2002;415(6868):198-205.
22. Shannon TR, Bers DM. Integrated Ca²⁺ management in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:28-38.
23. Kamishima T, Quayle JM. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in cardiac and smooth muscle cells. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 5):943-6.
24. Richard S, Perrier E, Fauconnier J, Perrier R, Pereira L, Gomez AM, et al. 'Ca(2+)-induced Ca(2+) entry' or how the L-type Ca(2+) channel remodels its

- own signalling pathway in cardiac cells. *Prog Biophys Mol Biol.* 2005;90(1-3):118-35.
25. Brochet DX, Yang D, Di Maio A, Lederer WJ, Franzini-Armstrong C, Cheng H. Ca²⁺ blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):3099-104.
26. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol.* 2004;85(1):33-69.
27. Brittsan AG, Kranias EG. Phospholamban and cardiac contractile function. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32(12):2131-9.
28. Gyorke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res.* 2008;77(2):245-55.
29. Fryer MW, Stephenson DG. Total and sarcoplasmic reticulum calcium contents of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol.* 1996;493 (Pt 2):357-70.
30. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem.* 1997;272(37):23389-97.
31. Park H, Park IY, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker AK, et al. Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem.* 2004;279(17):18026-33.
32. Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH. Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol.* 1998;5(6):476-83.
33. Park H, Wu S, Dunker AK, Kang C. Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca²⁺ regulation. *J Biol Chem.* 2003;278(18):16176-82.

34. Cho JH, Ko KM, Singaravelu G, Lee W, Kang GB, Rho SH, et al. Functional importance of polymerization and localization of calsequestrin in *C. elegans*. *J Cell Sci*. 2007;120(9):1551-8.
35. Maguire PB, Briggs FN, Lennon NJ, Ohlendieck K. Oligomerization is an intrinsic property of calsequestrin in normal and transformed skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;240(3):721-7.
36. Gergs U, Berndt T, Buskase J, Jones LR, Kirchhefer U, Muller FU, et al. On the role of junctin in cardiac Ca²⁺ handling, contractility, and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H728-34.
37. Kasai M, Kawasaki T, Yamaguchi N. Regulation of the ryanodine receptor calcium release channel: a molecular complex system. *Biophys Chem*. 1999;82(2-3):173-81.
38. Knudson CM, Stang KK, Moomaw CR, Slaughter CA, Campbell KP. Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem*. 1993;268(17):12646-54.
39. Knudson CM, Stang KK, Jorgensen AO, Campbell KP. Biochemical characterization of ultrastructural localization of a major junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem*. 1993;268(17):12637-45.
40. Bers DM. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):417-29.
41. Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, et al. Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem*. 2001;276(6):4142-9.
42. di Barletta MR, Viatchenko-Karpinski S, Nori A, Memmi M, Terentyev D, Turcato F, et al. Clinical phenotype and functional characterization of CASQ2 mutations associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2006;114(10):1012-9.
43. Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa

calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 19(51):30787-96.

44. Kirchhefer U, Hanske G, Jones LR, Justus I, Kaestner L, Lipp P, et al. Overexpression of junctin causes adaptive changes in cardiac myocyte Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium*. 2006;39(2):131-42.

45. Chopra N, Kannankeril PJ, Yang T, Hlaing T, Holinstat I, Etensohn K, et al. Modest reductions of cardiac calsequestrin increase sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak independent of luminal Ca²⁺ and trigger ventricular arrhythmias in mice. *Circ Res*. 2007;101(6):617-26.

46. Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, Akin B, Yang T, Etensohn K, et al. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca²⁺ release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2510-20.

47. Schmidt AG, Kadambi VJ, Ball N, Sato Y, Walsh RA, Kranias EG, et al. Cardiac-specific overexpression of calsequestrin results in left ventricular hypertrophy, depressed force-frequency relation and p ulsus alternans in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Sep;32(9):1735-44.

48. Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dorn GW, 2nd, Kadambi VJ, Yatani A, et al. Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1998;273(43):28470-7.

49. Song L, Alcalai R, Arad M, Wolf CM, Toka O, Conner DA, et al. Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Clin Invest*. 2007;117(7):1814-23.

50. Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Colombi B, Drago F, Gasparini M, et al. Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2002;106(1):69-74.

51. Postma AV, Denjoy I, Hoorntje TM, Lupoglazoff JM, Da Costa A, Sebillon P, et al. Absence of calsequestrin 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res*. 2002;91(8):e21-6.

52. Lehnart SE, Wehrens XH, Kushnir A, Marks AR. Cardiac ryanodine receptor function and regulation in heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:144-59.
53. Marks AR, Tempst P, Hwang KS, Taubman MB, Inui M, Chadwick C, et al. Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(22):8683-7.
54. Otsu K, Willard HF, Khanna VK, Zorzato F, Green NM, MacLennan DH. Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 1990;265(23):13472-83.
55. Takeshima H, Yamazawa T, Ikemoto T, Takekura H, Nishi M, Noda T, et al. Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in myocytes from dyspedic mice lacking the type-1 ryanodine receptor. *Embo J.* 1995 Jul 3;14(13):2999-3006.
56. Wagenknecht T, Samsó M. Three-dimensional reconstruction of ryanodine receptors. *Front Biosci.* 2002;7:d1464-74.
57. Franzini-Armstrong C, Jorgensen AO. Structure and development of E-C coupling units in skeletal muscle. *Annu Rev Physiol.* 1994;56:509-34.
58. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Gaburjakova M, Gaburjakova J, Yang YM, et al. Phosphorylation-dependent regulation of ryanodine receptors: a novel role for leucine/isoleucine zippers. *J Cell Biol.* 2001;153(4):699-708.
59. Dorn GW, 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 2005;115(3):527-37.
60. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosembliit N, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101(4):365-76.
61. Wehrens XH, Marks AR. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease. *Trends Biochem Sci.* 2003;28(12):671-8.
62. MacLennan DH, Abu-Abed M, Kang C. Structure-function relationships in Ca²⁺ cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(8):897-918.

63. Korczak B, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Ingles CJ, Green NM, MacLennan DH. Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem*. 1988;263(10):4813-9.
64. Zarain-Herzberg A, Alvarez-Fernandez G. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase-2 gene: structure and transcriptional regulation of the human gene. *Scientific World Journal*. 2002;2:1469-83.
65. Dode L, De Greef C, Mountian I, Attard M, Town MM, Casteels R, et al. Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA. *J Biol Chem*. 1998;273(22):13982-94.
66. Lytton J, Zarain-Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem*. 1989;264(12):7059-65.
67. Gelebart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;303(2):676-84.
68. Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, Andersen JP, Clausen JD, Dode L, et al. Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. *J Biol Chem*. 2004;279(23):24297-306.
69. MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. *J Biol Chem*. 1997;272(46):28815-8.
70. MacLennan DH, Kranias EG. Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(7):566-77.
71. Yano K, Zarain-Herzberg A. Sarcoplasmic reticulum calsequestrins: structural and functional properties. *Mol Cell Biochem*. 1994;135(1):61-70.
72. Park KW, Goo JH, Chung HS, Kim H, Kim DH, Park WJ. Cloning of the genes encoding mouse cardiac and skeletal calsequestrins: expression pattern during embryogenesis. *Gene*. 1998;217(1-2):25-30.

73. Wang X, Ren B, Liu S, Sentex E, Tappia PS, Dhalla NS. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. *J Appl Physiol.* 2003;94(2):752-63.
74. Yano M, Ikeda Y, Matsuzaki M. Altered intracellular Ca²⁺ handling in heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115(3):556-64.
75. Sato Y, Schmidt AG, Kiriazis H, Hoit BD, Kranias EG. Compensated hypertrophy of cardiac ventricles in aged transgenic FVB/N mice overexpressing calsequestrin. *Mol Cell Biochem.* 2003;242(1-2):19-25.
76. Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;853:220-30.
77. Frank KF, Mesnard-Rouiller L, Chu G, Young KB, Zhao W, Haghghi K, et al. Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene. *Basic Res Cardiol.* 2001;96(6):636-44.
78. Reyes-Juarez JL, Juarez-Rubi R, Rodriguez G, Zarain-Herzberg A. Transcriptional analysis of the human cardiac calsequestrin gene in cardiac and skeletal myocytes. *J Biol Chem.* 2007;282(49):35554-63.
79. Dhar M, Mascareno EM, Siddiqui MA. Two distinct factor-binding DNA elements in cardiac myosin light chain 2 gene are essential for repression of its expression in skeletal muscle. Isolation of a cDNA clone for repressor protein Nished. *J Biol Chem.* 1997;272(29):18490-7.
80. Molkenin JD, Jobe SM, Markham BE. Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *J Mol Cell Cardiol.* 1996 Jun;28(6):1211-25.
81. Anderson PA, Greig A, Mark TM, Malouf NN, Oakeley AE, Ungerleider RM, et al. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res.* 1995;76(4):681-6.
82. Azakie A, Lamont L, Fineman JR, He Y. Divergent transcriptional enhancer factor-1 regulates the cardiac troponin T promoter. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(6):C1522-34.

83. Black BL, Ligon KL, Zhang Y, Olson EN. Cooperative transcriptional activation by the neurogenic basic helix-loop-helix protein MASH1 and members of the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) family. *J Biol Chem.* 1996;271(43):26659-63.
84. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:167-96.
85. Cripps RM, Olson EN. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. *Dev Biol.* 2002;246(1):14-28.
86. Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *Embo J.* 2000;19(9):2046-55.
87. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001;110 Suppl 7A:37S-46S.
88. Braunwald E, Bristow MR. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation.* 2000;102(20 Suppl 4):IV14-23.
89. Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, et al. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2004;94(1):110-8.
90. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270(5639):725-7.
91. Yaffe D, Saxel O. A myogenic cell line with altered serum requirements for differentiation. *Differentiation.* 1977;7(3):159-66.
92. Reznikoff CA, Brankow DW, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.* 1973;33(12):3231-8.
93. Claycomb WC. Culture of cardiac muscle cells in serum-free media. *Exp Cell Res.* 1981;131(1):231-6.
94. Braman J, Papworth C, Greener A. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Methods Mol Biol.* 1996;57:31-44.

95. Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*. 1991;66(2):305-15.
96. Kerr LD. Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol*. 1995;254:619-32.
97. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
98. Molkenkin JD, Markham BE. Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1993;268(26):19512-20.
99. Morin S, Pozzulo G, Robitaille L, Cross J, Nemer M. MEF2-dependent recruitment of the HAND1 transcription factor results in synergistic activation of target promoters. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32272-8.
100. Garami M, Gardner DG. An E-box motif conveys inhibitory activity on the atrial natriuretic peptide gene. *Hypertension*. 1996;28(2):315-9.
101. Meissner JD, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ. Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J Cell Physiol*. 2007:138-48.
102. Black BL, Martin JF, Olson EN. The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. *J Biol Chem*. 1995;270(7):2889-92.
103. Molkenkin JD, Black BL, Martin JF, Olson EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell*. 1995;83(7):1125-36.
104. Blais A, Tsikitis M, Acosta-Alvear D, Sharan R, Kluger Y, Dynlacht BD. An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev*. 2005;19(5):553-69.
105. Miyata S, Minobe W, Bristow MR, Leinwand LA. Myosin heavy chain isoform expression in the failing and nonfailing human heart. *Circ Res*. 2000;86(4):386-90.
106. von Harsdorf R, Edwards JG, Shen YT, Kudej RK, Dietz R, Leinwand LA, et al. Identification of a cis-acting regulatory element conferring inducibility of the

atrial natriuretic factor gene in acute pressure overload. *J Clin Invest.* 1997;100(5):1294-304.

107. Beylkin DH, Allen DL, Leinwand LA. MyoD, Myf5, and the calcineurin pathway activate the developmental myosin heavy chain genes. *Dev Biol.* 2006;294(2):541-53.

108. Berkes CA, Tapscott SJ. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):585-95.

109. Bodmer R, Venkatesh TV. Heart development in *Drosophila* and vertebrates: conservation of molecular mechanisms. *Dev Genet.* 1998;22(3):181-6.

110. Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, Molkentin JD. The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24390-8.

111. Balza RO, Jr., Misra RP. Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2006;281(10):6498-510.

112. Nelson TJ, Balza R, Jr., Xiao Q, Misra RP. SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(3):479-89.

113. Belaguli NS, Sepulveda JL, Nigam V, Charron F, Nemer M, Schwartz RJ. Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Mol Cell Biol.* 2000;20(20):7550-8.

114. Arai M, Alpert NR, Periasamy M. Cloning and characterization of the gene encoding rabbit cardiac calsequestrin. *Gene.* 1991;109(2):275-9.

115. Blais A, Dynlacht BD. Constructing transcriptional regulatory networks. *Genes Dev.* 2005;19(13):1499-511.

116. Black BL, Molkentin 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(1):69-77.

117. Wilson-Rawls J, Molkenin JD, Black BL, Olson EN. Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol Cell Biol.* 1999;19(4):2853-62.
118. Xing W, Zhang TC, Cao D, Wang Z, Antos CL, Li S, et al. Myocardin Induces Cardiomyocyte Hypertrophy. *Circ Res.* 2006;98(8):1089-97.
119. Oh J, Wang Z, Wang DZ, Lien CL, Xing W, Olson EN. Target gene-specific modulation of myocardin activity by GATA transcription factors. *Mol Cell Biol.* 2004;24(19):8519-28.
120. Zhang X, Azhar G, Zhong Y, Wei JY. Identification of a novel serum response factor co-factor in cardiac gene regulation. *J Biol Chem.* 2004;279(53):55626-32.
121. Creemers EE, Sutherland LB, McAnally J, Richardson JA, Olson EN. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development.* 2006;133(21):4245-56.
122. Pipes GC, Creemers EE, Olson EN. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* 2006;20(12):1545-56.
123. Gregoire S, Xiao L, Nie J, Zhang X, Xu M, Li J, et al. Histone deacetylase 3 interacts with and deacetylates myocyte enhancer factor 2. *Mol Cell Biol.* 2007;27(4):1280-95.
124. Olson EN, Backs J, McKinsey TA. Control of cardiac hypertrophy and heart failure by histone acetylation/deacetylation. *Novartis Found Symp.* 2006;274:3-12.
125. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Signaling chromatin to make muscle. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(6):763-72.
126. McKinsey TA, Zhang CL, Olson EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(5):497-504.
127. Yanazume T, Morimoto T, Wada H, Kawamura T, Hasegawa K. Biological role of p300 in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem.* 2003;248(1-2):115-9.

128. Molkentin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res.* 2004;63(3):467-75.
129. Olson EN, Williams RS. Remodeling muscles with calcineurin. *Bioessays.* 2000;22(6):510-9.
130. Wu H, Rothermel B, Kanatous S, Rosenberg P, Naya FJ, Shelton JM, et al. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *Embo J.* 2001;20(22):6414-23.
131. McKinsey TA. Derepression of pathological cardiac genes by members of the CaM kinase superfamily. *Cardiovasc Res.* 2007;73(4):667-77.
132. Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, Sinha S, Somlyo AP, Somlyo AV, et al. L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circ Res.* 2004;95(4):406-14.
133. MacLennan DH. Ca²⁺ signalling and muscle disease. *Eur J Biochem.* 2000;267(17):5291-7.
134. Bers DM, Eisner DA, Valdivia HH. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure: roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport. *Circ Res.* 2003;93(6):487-90.
135. Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem.* 2007;45:523-37.

APENDICE I
Artículo Publicado

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene in Cardiac and Skeletal Myocytes*

Received for publication, September 17, 2007 Published, JBC Papers in Press, October 15, 2007, DOI 10.1074/jbc.M707788200

José Luis Reyes-Juárez, Raúl Juárez-Rubí, Gabriela Rodríguez, and Angel Zarain-Herzberg¹

From the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal 04510

Calsequestrin is the main calcium-binding protein inside the sarcoplasmic reticulum of striated muscle. In mammals, the cardiac calsequestrin gene (*casq2*) mainly expresses in cardiac muscle and to a minor extent in slow-twitch skeletal muscle and it is not expressed in non-muscle tissues. This work is the first study on the transcriptional regulation of the *casq2* gene in cardiac and skeletal muscle cells. The sequence of the *casq2* genes proximal promoter (180 bp) of mammals and avians is highly conserved and contains one TATA box, one CArG box, one E-box, and one myocyte enhancer factor 2 (MEF-2) site. We cloned the human *casq2* gene 5'-regulatory region into a luciferase reporter expression vector. By functional assays we showed that a construct containing the first 288 bp of promoter was up-regulated during myogenic differentiation of Sol8 cells and had higher transcriptional activity compared with longer constructs. In neonatal rat cardiac myocytes, the larger construct containing 3.2 kb showed the highest transcriptional activity, demonstrating that the first 288 bp are sufficient to confer muscle specificity, whereas distal sequences may act as a cardiac-specific enhancer. Electrophoretic mobility shift assay studies demonstrated that the proximal MEF-2 and CArG box sequences were capable of binding MEF-2 and serum response factor, respectively, whereas the E-box did not show binding properties. Functional studies demonstrated that site-directed mutagenesis of the proximal MEF-2 and CArG box sites significantly decreased the transcription of the gene in cardiac and skeletal muscle cells, indicating that they are important to drive cardiac and skeletal muscle-specific transcription of the *casq2* gene.

The sarcoplasmic reticulum (SR)² is an intracellular organelle present in striated muscle cells, which has a key role on the regulation of the calcium concentrations during muscle contraction and relaxation (1). The SR is the main storage site of

intracellular calcium, storing Ca²⁺ up to 20 mM while maintaining the free SR Ca²⁺ concentration at ~1 mM (2, 3). The SR storage capacity enables the muscle cell to continuously contract without diminishing the Ca²⁺ available for each contraction-relaxation cycle. Calsequestrin (CASQ) is the most abundant protein in the lumen of the SR; it has a high capacity to bind Ca²⁺ (40–50 mol of Ca²⁺/mol of CASQ) with a moderate affinity ($K_d \sim 1$ mM) and prevents the precipitation of Ca²⁺ inside the SR. It is a highly acidic protein with over 50 Ca²⁺ binding sites, which are formed by the clustering of two or more negatively charged residues. The molecular weight of the CASQ monomer is 40 kDa; and is capable of polymerizing in response to increasing Ca²⁺ concentrations (>1 mM) (3). CASQ locates near the ryanodine receptor and attaches to it, via direct interaction or through anchoring by triadin and junctin. It has been suggested that CASQ has a regulatory role in SR Ca²⁺ release, by inhibiting the ryanodine receptor through interactions via triadin/junctin at high luminal Ca²⁺ concentrations (1–2 mM) (4), although the exact mechanism and physiological role of this inhibition has not been established. Thus, in recent years it has become clearer that CASQ has a role beyond its capability to buffer Ca²⁺.

In mammals two CASQ isoforms have been described, each one encoded by a different gene. In humans, the *casq1* gene is located in chromosome 1q21, and encodes for the CASQ1 isoform; and the *casq2* gene, located in chromosome 1p23, which encodes for the CASQ2 isoform. The adult fast-twitch skeletal muscle expresses exclusively the *casq1* gene, whereas slow-twitch skeletal muscle expresses mainly the *casq1* gene (~75% of total) and to a minor extent the *casq2* gene (~25% of total). Cardiac muscle expresses exclusively the *casq2* gene. Neither of the CASQ isoforms are present in non-muscle tissues nor in smooth muscle (5). Both human isoforms share a high nucleotide and amino acid homology, 84 and 80%, respectively (5). At this time there are no studies that point to differences in the physiological role of both CASQ isoforms, thus their roles shall be considered equivalent. The rabbit CASQ1 and the dog CASQ2 have been crystallized (6, 7); results of crystallization studies shown that the *casq* monomer was found to be constituted by three almost identical domains (I, II, and III) similar to that of *Escherichia coli* thioredoxin domain. It was found that CASQ polymerizes in response to rising concentrations of Ca²⁺ in the lumen of the SR, to form a homotetrameric complex (10 μM to 1 mM) and at higher concentrations of polymers, in concentrations higher than 10 mM the CASQ polymer dissociates from the Ca²⁺ releasing channel (8).

In the heart, the *casq2* gene expresses during fetal development and continues to adult life. In fast-twitch skeletal muscle,

* This work was supported by Secretaría de Educación Pública-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 42801 and Programa de Apoyo Para la Investigación y la Innovación Tecnológica-Universidad Nacional Autónoma de México Grant 215002, México. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ To whom correspondence should be addressed: Apartado Postal 70-159, México, D.F. 04510. Tel.: 52-55-56232258; Fax: 52-55-56162419; E-mail: zarain@servidor.unam.mx.

² The abbreviations used are: SR, sarcoplasmic reticulum; SRF, serum response factor; NFAT, nuclear factor-activated T cells; Luc, luciferase; CaM, calmodulin; MEF-2, myocyte enhancer factor 2; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; RT, reverse transcriptase; CASQ, calsequestrin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HS, horse serum; CMV, cytomegalovirus.

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

CASQ2 is the predominant isoform during the fetal period, and during neonatal life. Afterward, there is a switch to CASQ1 gene expression, making the CASQ1 isoform the only one found in adult muscle. Although, in slow-twitch skeletal muscle there is also a switch on CASQ isoform expression during development, in the adult life the *casq2* gene is still expressed (9). The CASQ2 mRNA levels have been measured in several heart pathological states such as cardiac hypertrophy, dilated cardiomyopathy, and heart failure, showing no changes on its expression level (10). Interestingly, in transgenic mice that overexpress CASQ2, it was observed that the mice develop cardiac hypertrophy and heart failure, with a typical fetal phenotype, associated with a higher Ca^{2+} storage capacity of the SR, as well as an impaired Ca^{2+} release, which leads to a diminished contractility (11). Another pathological state where CASQ2 is involved is the catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT), where several mutations in the *casq2* gene are present, inserting stop codons in the first exon of the gene, thus nullifying the expression of the *casq2* gene. These patients have a morphologically normal heart but are susceptible to develop ventricular arrhythmias when exercise or another stressing event are present (12–15). Taken together, these findings are suggestive that the transcription of the *casq2* gene is finely controlled during skeletal and cardiac muscle development, as well as in cardiac pathologies. Although the *casq2* gene of rabbit and mouse have already been cloned (16, 17), there are no studies regarding transcriptional regulation of the *casq2* gene.

The identification of cardiac-specific transcriptional regulatory elements and transcription factors controlling gene expression have been studied *in vitro* using the 5'-regulatory regions from contractile genes (α -myosin heavy chain, cardiac troponin I, ventricular myosin light chain 2), atrial natriuretic factor and brain natriuretic peptide (18–22). The studies have shown that GATA4, MEF-2, Nkx2.5, HAND1, HAND2, and serum response factor (SRF) are major regulatory factors involved in the transcriptional regulation of cardiac genes (23–25). However, the relative contribution of the transcription factors mentioned above varies in different gene promoters. This has made it difficult to understand the molecular mechanisms responsible for cardiac-specific gene expression.

In this work, we report the first attempt to understand the molecular basis of tissue specificity of the *casq2* gene. We cloned 3.2 kb of 5'-regulatory region of the human *casq2* gene, generated deletion constructs and performed functional analyses. We performed targeted mutagenesis and DNA-protein binding analysis in cardiac myocytes and in the skeletal muscle cell line Sol8. We identified proximal and distal regulatory elements important for the expression of skeletal myotubes and neonatal cardiac myocytes.

Our efforts were directed to a highly conserved region among species located in the first 180 bp of the 5'-regulatory region of the *casq2* gene, which contains one MEF-2, one E-box, and one CARg box putative binding sites. The results obtained in this work suggest that the proximal promoter is necessary and sufficient for cardiac and skeletal muscle expression, and that MEF-2 and SRF transcription factors participate for the tissue-specific expression of the *casq2* gene.

TABLE 1
Oligonucleotides sequences for PCR and EMSA

Oligonucleotides	
PCR	
GAPDH forward	5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC-3'
GAPDH reverse	5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3'
CASQ2 forward	5'-AGCTTGTGGAGTTTGTGAAG-3'
CASQ2 reverse	5'-GGATTGTCAGTGTGTC-3'
MEF-2C forward	5'-AGGTAACACACAGCGGTCTGATG-3'
MEF-2C reverse	5'-TCATAGGGGGAGGAGATTGGC-3'
Myogenin forward	5'-CAGGAGCCCCACTTCTATGATG-3'
Myogenin reverse	5'-TCCCAGTCCCTTTCTCCAG-3'
SRF forward	5'-GATTCAGACCTGCCTCAACTCG-3'
SRF reverse	5'-TTCAGTGTGTCCTGGTTTCCC-3'
EMSA	
MEF-2 casq2	5'-TGCATGATTATTTTTAGCCTGAAACAC-3'
MEF-2 consensus	5'-GATCGCTCTAAAATAACCCCTGTCG-3'
MEF-2 casq2 mt	5'-CATTGCATGCTGGATCCTCCGCTGAAACAC-3'
MEF-2 cons mt	5'-GATCGCTGTAACATAACCCCTGTCG-3'
CarG box casq2	5'-CTGCATCCTAAAATGGAGTTC-3'
CarG box consensus	5'-GGATGTCATATTTAGGACATCT-3'
CarG box casq2 mt	5'-CTGCATCCTAAAATTTAGTTC-3'
CarG box cons mt	5'-GGATGTCATATTTATTACATCT-3'

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—All restriction enzymes were acquired from Invitrogen and New England Biolabs. [γ - ^{32}P]ATP and [α - ^{32}P]dCTP were acquired from PerkinElmer Life Sciences. All DNA oligonucleotides were synthesized in the Molecular Biology Unit from the Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México. Human heart total RNA was acquired from BD Biosciences.

DNA Cloning—A 3276-bp StuI-StuI human genomic fragment from clone RP11-485H8 (BACPAC Resources), which contains 3102 bp of the 5'-regulatory region of the human *casq2* gene and 176 bp of the 5'-nontranslated sequence of exon 1, was subcloned into a pGL3-basic plasmid previously cut with StuI, using standard techniques. Five more constructs were generated by digestion with restriction enzymes NcoI, AflIII, PvuII, XhoI, and BlnI generating fragments of 2322, 1169, 754, 462, and 254 bp, respectively.

Primer Extension Analysis—A synthetic DNA oligonucleotide (300 ng) complementary to the coding sequence of exon 1 (5'-GGAAAGACTTACCACTCGGTC-3') was labeled using T4 polynucleotide kinase and [γ - ^{32}P]ATP. Reverse transcription was performed using poly(A)⁺ RNA from human adult heart (BD Biosciences). A sequencing reaction of a known template was used as a ladder for determining the molecular size of the extended DNA fragments.

Cell Culture—Sol8 myoblasts (obtained from ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), designated as growth media, until they reached a 70% confluence then, were induced to differentiate to myotubes by switching the media to DMEM supplemented with 3% horse serum (HS) (Invitrogen), designated as differentiation media. The C3H10T1/2 cells were maintained in growth media. Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were maintained with growth media. All the media were supplemented with kanamycin (60 mg/liter), penicillin G (10 units/ml), and streptomycin (10 mg/ml), amphotericin B (0.025 mg/ml), and nystatin (10 units/ml).

Transfection and Reporter Assays—The pGL3-*hcasq2* constructs (0.8 μg) and the pRL-CMV (0.05 μg) were co-transfected into cells grown in 12-well plates using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. After

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

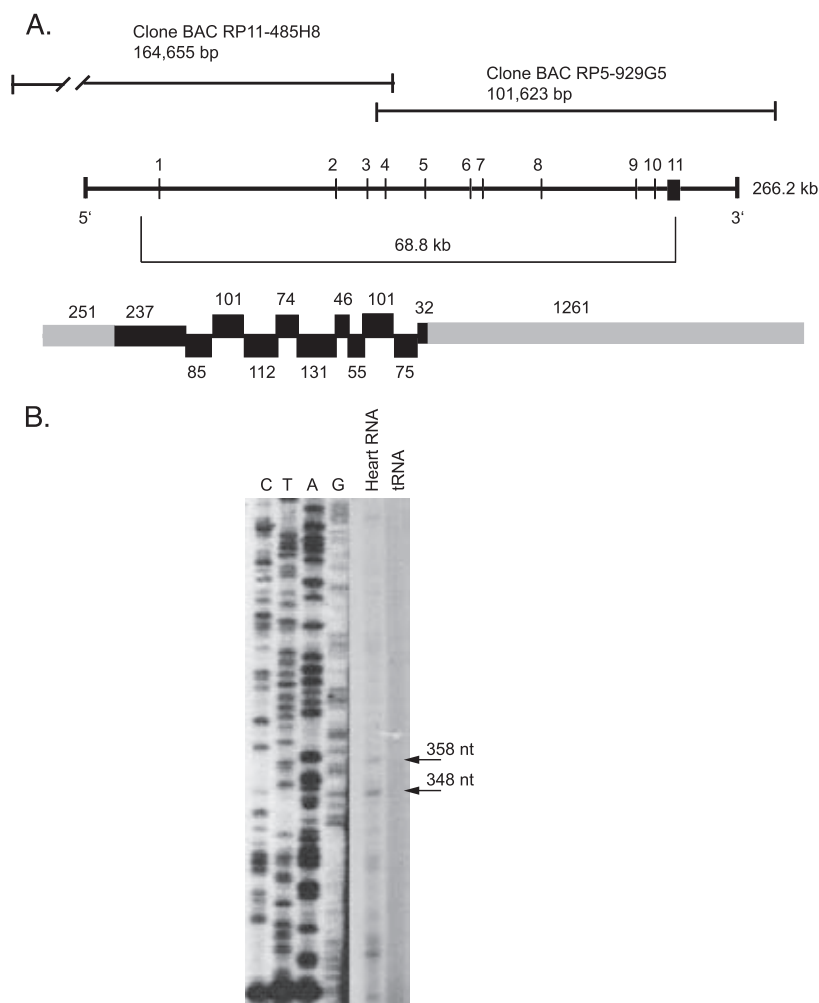


FIGURE 1. Structure of the human *casq2* gene. A, the human *casq2* gene is contained in human genomic clones RP11-485H8 and RP5-929G5 (BACPAC Resources). The gene is organized in 11 exons and 10 introns, which span over 68.8 kb of the genome, producing a single mRNA transcript of 2548 nucleotides (*nt*). B, the transcription initiation site was determined by primer extension of human cardiac mRNA as mentioned under "Experimental Procedures." Two main cDNA extension products of 358 and 348 nucleotides were obtained, locating the transcription initiation sites at 251 and 241 bp upstream from the ATG translation initiation codon and are indicated by arrows. To detect accurately the size of the extended cDNA products a sequencing ladder of a known template was used. The exposure time for the primer extension reaction was 24 h, and for the sequencing ladder 8 h.

2 h the transfection mixture was replaced by DMEM with 3% HS to induce differentiation of Sol8 cells to myotubes; or by DMEM with 10% fetal bovine serum to maintain the myoblast phenotype, as well for C3H10T1/2 and neonatal rat cardiomyocytes. The positive control in all experiments was the pGL3-promoter, which contains the proximal 202 bp of the SV40 promoter. Following 48 h incubation at 37 °C and 5% CO₂, the cells were lysed and assayed for firefly and *Renilla* luciferase, using the dual luciferase assay reagent kit (Promega) in a multiwell plate counter Wallac Victor² luminometer (PerkinElmer Life Sciences). The results were normalized with the *Renilla* luciferase activity.

Stably transfected Sol8 cell lines were generated by co-transfecting the pGL3-*hcasq2* constructs containing 288 and 3102 bp of the 5'-regulatory region of the human *casq2* gene with pCDNA3.1,

containing the resistance gene to the selecting antibiotic G418. The cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 500 µg/ml G418, and selected after 1 week of growth. Colonies selected were tested for luciferase activity. The number of copies of the *hcasq2*/Luc fragment integrated into genomic DNA was verified by dot-blot analysis using a DNA probe for luciferase. The colonies selected were grown on 24-well plates until they reached 70% confluence; at that time the cells were induced to differentiate by replacing the media with differentiation media. Cells were lysed on a time course from myoblasts to 5-day myotubes; cell extracts were assayed for luciferase activity. The results were normalized dividing the luciferase activity by the protein concentration.

Real Time RT-PCR—Total RNA was extracted from Sol8 myoblasts and myotubes daily up to day 5 of muscle differentiation, with TRIzol reagent (Invitrogen). RT was performed with 2 µg of total RNA using SuperScript III First Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, cDNA was diluted 15 times, and 9.2 µl/reaction were used for qPCR with SYBR Green ER qPCR Supermix for iCycler (Invitrogen). Results were analyzed according to the method suggested by Pfaffl (26), using GAPDH as loading control. Primers sequences are indicated on Table 1.

Mutagenesis—Site-directed mutagenesis of the proximal MEF-2, E-box, and CARG box sequences was conducted using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) as indicated by manufacturer's instructions, the MEF-2, E-box, and CARG box mutated oligonucleotides used are listed in Table 1. Mutation of the above elements was confirmed by DNA sequencing of the plasmids obtained.

Electrophoretic Mobility Shift Assay Studies—Nuclear extracts from Sol8 myoblasts and myotubes, and from neonatal rat cardiomyocytes were prepared as previously described (21). The sequence of the double-stranded DNA oligonucleotides were the same ones that were used for site-directed mutagenesis; consensus oligonucleotides for MEF-2 and CARG box used as specific competitors were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) (see Table 1). Binding reactions were performed by preincubating at room temperature in 1 × Binding Buffer (Tris-HCl, 50 mM; glycerol, 20%; NaCl, 250 mM; MgCl₂, 5 mM; EDTA, 2.5 mM; dithiothreitol, 1 mM; phenyl-

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

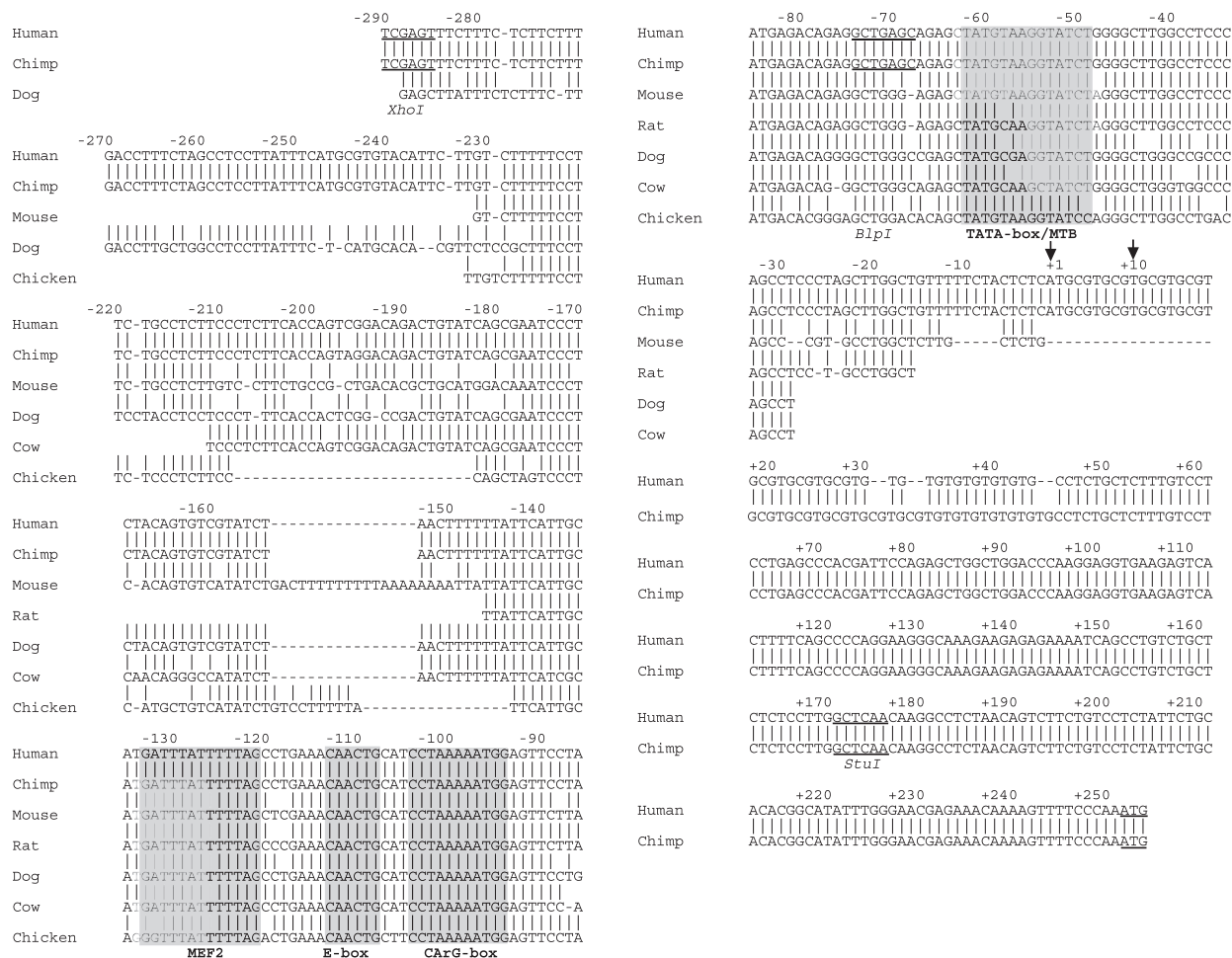


FIGURE 2. DNA sequence analysis of the proximal 5'-regulatory region of the *casq2* genes among species. Nucleotide sequence analysis comparison was performed using the MacVector 6.5.3 program and BLAST algorithm from NCBI. The proximal 5'-regulatory region of the *casq2* gene revealed that the first 180 bp are conserved in human, chimp, mouse, rat, dog, cow, and chicken genomic sequences with just a few mismatches. In this region, we found a putative TATA box, one CARG box, one E-box, and one MEF-2 site. The two transcription initiation sites are indicated with arrows. The BlpI, StuI, and XhoI restriction sites used to generate the -71 and -288 bp constructs are underlined. The ATG translation initiation codon is underlined.

methylsulfonyl fluoride, 1 mM), 10 μ g of nuclear extract, and 1 mg of poly(dI-dC), 100-fold molar excess unlabeled competitor when needed, and γ -³²P-labeled double-stranded DNA oligonucleotides. Supershift antibodies for MEF-2 (sc-313x) and SRF (sc-335x) were purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Sequence Analysis—Sequence analysis was performed with MacVector 6.5.3 (Accelrys), BLAST (NCBI), and MathInspector (Genomatix).

Statistical Analysis—Values are expressed as means of at least 3 independent experiments \pm S.E. Mean values were compared by analysis of variance (SPSS 11) applying the Bonferroni method for multiple comparisons. *p* values <0.05 were considered significant.

RESULTS

Characterization of the Human *casq2* Gene 5'-Regulatory Region—The human genomic clones (RP11-485H8 and RP5-929G5) were analyzed *in silico* with DNA analysis software (NCBI Blast, Genomatix suite and MacVector) to determine

the complete human *casq2* gene structure and its 5'-regulatory region. The analyses revealed that both clones overlap and contain the complete *casq2* gene, integrated with 11 exons and interrupted by 10 introns that span over 68 kb of the genome (Fig. 1A). To determine the transcription initiation site of the human *casq2* gene, primer extension analysis of human CASQ2 mRNA was performed using human heart poly(A)⁺ RNA. Two main extension products (358 and 348 bp) were obtained, mapping two transcription initiation sites at positions 241 and 251 bp upstream from the ATG translation initiation codon (Fig. 1B).

The 5'-regulatory region was analyzed with the MacVector program and Genomatix suite, to identify possible binding sites for transcription factors. In this analysis we identified a highly conserved DNA homology region among several species including the chimp (100%), mouse (95%), rat (98%), dog (98%), cow (93%), and chicken (87%), located between -30 to -140 bp that contains one imperfect TATA box, one MEF-2 site, one E-box, and one CARG box (Fig. 2).

Downloaded from www.jbc.org by on March 29, 2008

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

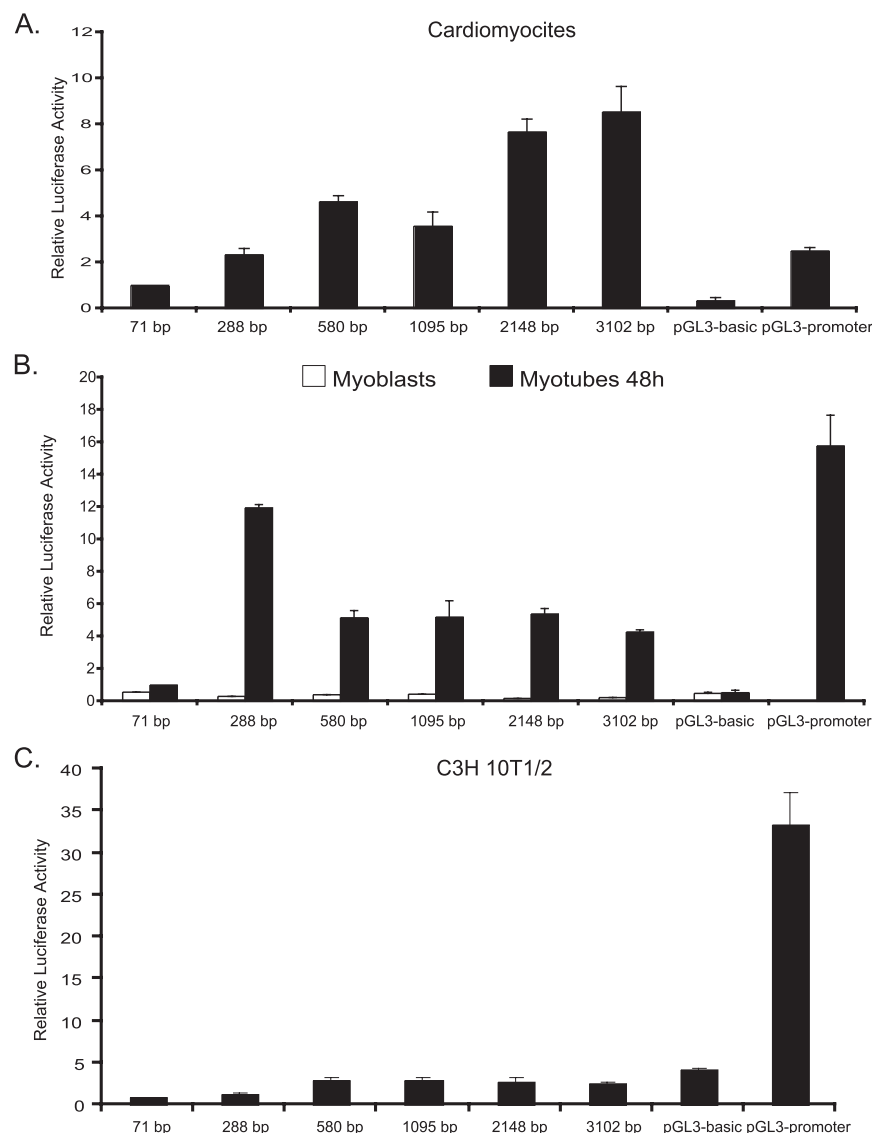


FIGURE 3. Transcriptional analysis of the 5'-regulatory region of the *casq2* gene constructs in cardiac myocytes, Sol8 myotubes, and C3H10T1/2 cells. A, transient transfection assays with six deletion *hcasq2*/Luc constructs containing fragments of the *casq2* gene 5'-regulatory region were carried out in neonatal rat cardiomyocytes as mentioned under "Experimental Procedures." The results are expressed in -fold increments to the activity observed with the -288-bp construct. The pGL3-promoter construct contains the 202 bp of the proximal SV40 promoter; the pGL3-basic is a promoterless construct. The luciferase activity of the *casq2* gene -71-bp construct was used as an arbitrary value of 1. Mean value \pm S.E. B, the same constructs were transfected into Sol8 myoblasts as mentioned under "Experimental Procedures." Myoblast cells were lysed after 24 h and the myotubes after 48 h. The extracts were assayed for luciferase activities. Myoblasts are shown as white bars and myotubes as black bars. The luciferase activity of the *casq2* gene -71-bp construct was used as an arbitrary value of 1. Mean value \pm S.E. C, transient transfection of C3H 10T1/2 cells in culture was performed as mentioned under "Experimental Procedures." The luciferase activity of the *casq2* gene -71-bp construct was used as an arbitrary value of 1. The results are expressed as the mean value of three different experiments assayed by duplicate \pm S.E.

Transcriptional Activity of the *hcasq2* Gene 5'-Regulatory Region in Cardiac and Skeletal Muscle Cells—Six deletion constructs in pGL3-basic containing 3102, 2148, 1095, 580, 288, and 71 bp of the human *casq2* gene 5'-regulatory region and 176 bp of 5'-nontranslated sequence of exon 1 were generated and used for transfection experiments, to identify the basal pro-

moter region and upstream 5'-regulatory sequences of the human *casq2* gene in neonatal rat cardiac myocytes and Sol8 skeletal muscle cells. The transcriptional activity of the different constructs was determined by transiently transfecting them into neonatal rat cardiomyocytes, the skeletal muscle cell line Sol8, and C3H10T1/2 cells. The results obtained by transient transfection in neonatal rat cardiac myocytes showed that the -288-bp construct had a transcriptional activity similar to the one observed with the pGL3-promoter construct (202 bp of the SV40 proximal promoter), which has been described as a strong promoter in muscle. The transcriptional activity observed with the -288-bp construct was 2-fold higher of that observed with the -71-bp construct, which contains only a TATA box, but no other regulatory elements. The -580 and -1095-bp constructs exhibited ~2-fold higher activity compared with the -288-bp construct, the -2148 bp was 3.5-fold higher and the -3102-bp construct had the highest activity, increasing over 3.7-fold relative to the -288-bp construct (Fig. 3A). The promoter-less pGL3-basic plasmid showed only background firefly luciferase activity (Fig. 3A).

In 2-day Sol8 myotubes, the highest transcriptional activity was observed with the -288-bp construct, showed 12-fold more activity than the -71-bp construct, and was similar to that observed with the SV40 promoter construct. The -3102-bp construct had 65% less activity compared with the -288-bp construct. The other intermediate length constructs showed similar activity than the -3102-bp construct. The -71-bp construct activity in myotubes was almost equal to the activity observed on undifferentiated myoblasts with all of the constructs, reflecting basal promoter activity. The pGL3-basic construct had only background activity. (Fig. 3B). In C3H10T1/2 fibroblasts, all the *casq2* gene constructs showed only basal transcriptional activity, similar to the activity of the promoter less construct, whereas the SV40 promoter showed strong transcriptional activity (Fig. 3C).

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

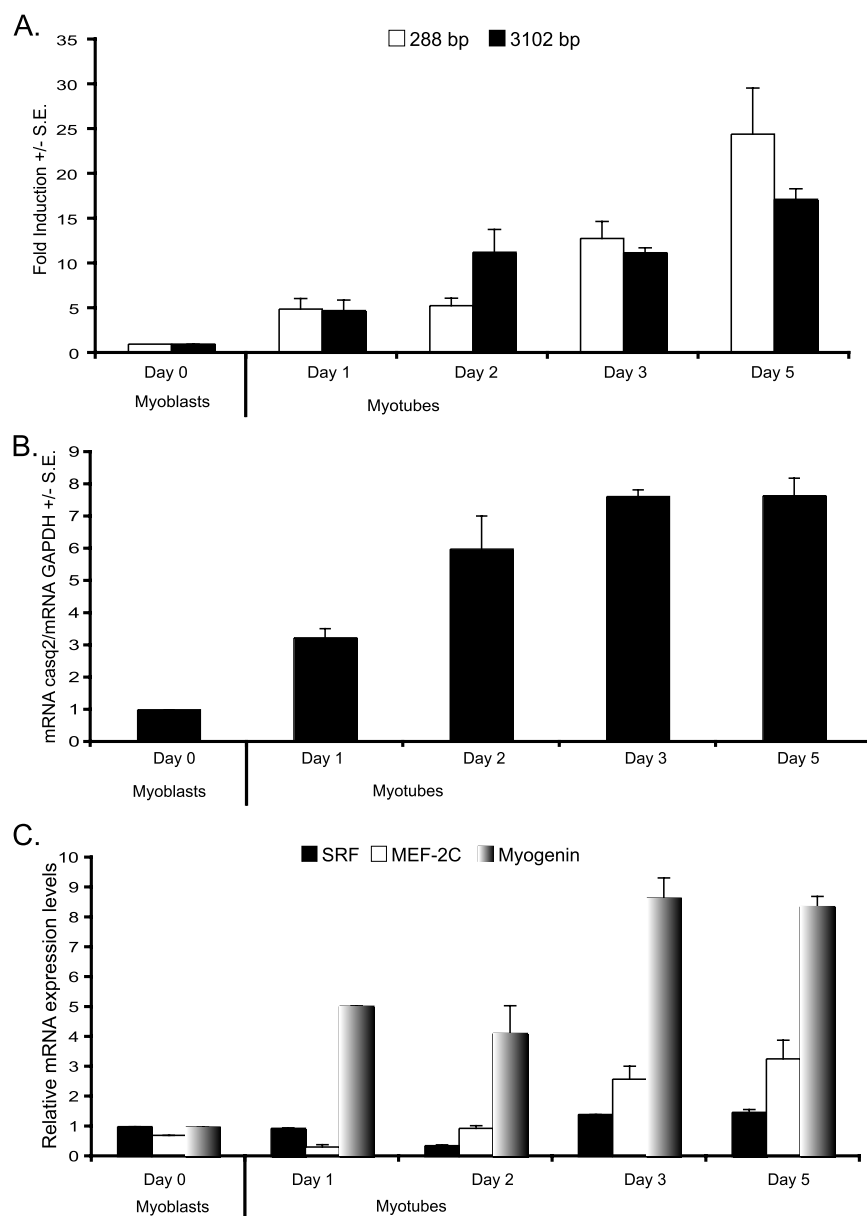


FIGURE 4. Time course of transcriptional activity of the proximal and full-length *hcasq2*/Luc constructs during myogenic differentiation of Sol8 cells. A, stable transfected Sol8 cell lines generated using constructs containing -288 bp (white bars) and -3102 bp (black bars) of the human *casq2* 5'-regulatory region were analyzed for transcriptional activity during the 5 days after induction of myogenic differentiation. Results are expressed in -fold increments relative to the activity in myoblasts. Mean \pm S.E. B, real time RT-PCR, was performed as described under "Experimental Procedures"; levels of *casq2* mRNA were measured during Sol8 skeletal muscle differentiation. Mean \pm S.E. C, real time RT-PCR was used to quantify mRNA levels for myogenin, MEF2C, and SRF during Sol8 skeletal muscle differentiation. Mean \pm S.E.

To analyze the transcriptional activity of the *casq2* gene regulatory region constructs during the course of myogenic differentiation, we generated stable transfectant Sol8 cell lines, which integrated into two cell genome of the chimeric *casq2*/Luc constructs, of which, one contains -288 bp and the other contains -3.1 kb of the 5'-regulatory region. The resulting stable transfectant cell lines were induced to differentiate by serum withdrawal, and the luciferase activity was determined daily during

5 days of myogenic differentiation. The results indicated that both constructs have a very similar pattern of activation, showing increases in the activity level since day 1 of differentiation (Fig. 4A). The pattern of activation of the *casq2* gene constructs was very similar to the pattern of increase of the endogenous level of *casq2* mRNA expression determined by real time RT-PCR (Fig. 4B). The myogenin, MEF2C, and SRF mRNA levels were also quantified by real time RT-PCR. Myogenin mRNA increased since day 1, whereas MEF2C and SRF mRNA increased after 3 days of myogenic differentiation (Fig. 4C).

The Proximal MEF-2 and CARG Box Sites Are Functional in Cardiac Myocytes—Due to the results obtained by transcriptional activation of the chimeric *casq2* gene constructs, which suggest an important role played by the first 288 bp of the 5'-regulatory region in cardiac and skeletal muscle myocytes, we determined the DNA-protein binding capabilities of the putative binding sites (MEF-2, E-box, and CARG box) present in this region. Because MEF-2, basic helix-loop-helix, and SRF transcription factors are present in Sol8 myotubes and have been demonstrated to participate in the regulation of several muscle genes, we decided to perform electrophoretic mobility shift assay studies using synthetic double-stranded DNA oligonucleotides and specific antibodies for MEF2 and SRF for supershift assays (see "Experimental Procedures").

The results showed that the proximal *casq2* gene MEF-2 site was capable of specifically binding a protein present in nuclear extracts of neonatal rat cardiomyocytes, which was of the same size to the one observed with a previously tested MEF-2 consensus oligonucleotide (Fig. 5A). The complex was not competed by the addition of 50–100-fold molar excess of the mutated *casq2* MEF-2 oligonucleotide or the mutated consensus MEF-2 oligonucleotide. The protein contained in the complex was supershifted using a MEF-2 antibody (Fig. 5A). Nuclear extracts of Sol8 myoblasts and myotubes were also tested; both were capable of binding specifically the *casq2* gene MEF-2 oligonucleotide, the signal obtained with myoblasts had

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

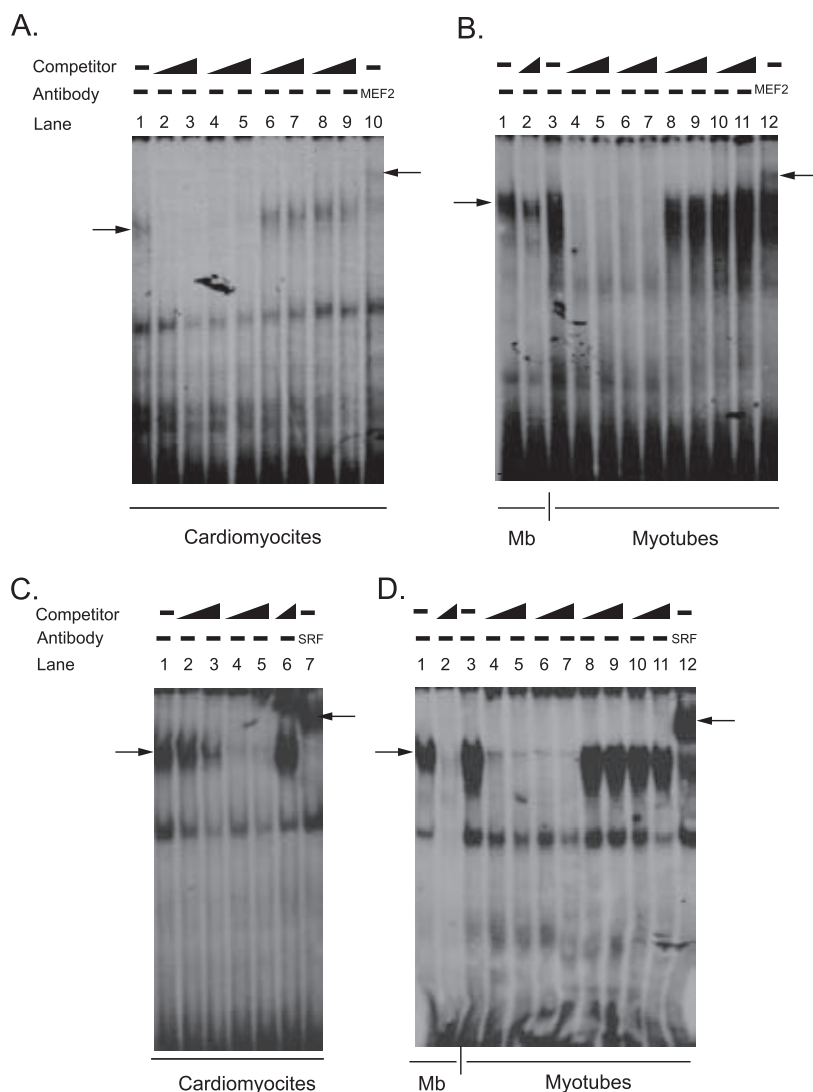


FIGURE 5. DNA binding capabilities of the MEF-2 site and CARg box located on the first 140 bp. A, a double-stranded DNA oligonucleotide containing the *casq2* gene MEF-2 site was incubated with nuclear extracts of neonatal rat cardiomyocytes. The DNA sequences of the oligonucleotides used are indicated in Table 1. The 32 P-labeled wild type *casq2* MEF-2 oligonucleotide formed several DNA-protein complexes with nuclear extracts from cardiomyocytes (lane 1). To test specificity of the complexes observed, 50- and 100-fold molar excesses of the non-labeled wild type *casq2* MEF-2 oligonucleotide (lanes 2 and 3), consensus MEF-2 site (lanes 4 and 5), mutated *casq2* MEF-2 site (lanes 6 and 7), and a mutated consensus MEF-2 site (lanes 8 and 9) were used. The complex formed was also incubated with a MEF-2 antibody (lane 10). B, the same experiment was done with nuclear extracts from Sol8 myoblasts (lanes 1 and 2) and 5-day myotubes (lanes 3–12). The myoblast-formed complexes (lane 1) were competed with a 100-fold excess *casq2* MEF-2 oligonucleotide (lane 2). The myotube complex (lane 3) was competed with 50- and 100-fold excess of unlabeled *casq2* gene MEF-2 site (lanes 4 and 5), MEF-2 consensus (lanes 6 and 7), *casq2* gene mutated MEF-2 (lanes 8 and 9), and consensus mutated MEF-2 (lanes 10 and 11). The complex was preincubated with a MEF-2 antibody (lane 12). C, the 32 P-labeled wild type *casq2* gene CARg box oligonucleotide formed several DNA-protein complexes with nuclear extracts from cardiomyocytes (lane 1). To test specificity of the complexes observed 50- and 100-fold molar excesses of the non-labeled wild type *casq2* CARg box oligonucleotide (lanes 2 and 3), consensus CARg box site (lanes 4 and 5), and 100-fold mutated *casq2* CARg box site (lane 6) were used. The complex formed was also preincubated with a SRF antibody (lane 7). D, the same experiment was done with nuclear extracts from Sol8 myoblasts (lanes 1 and 2) and 5-day myotubes (lanes 3–12). The myoblast-formed complex (lane 1) was competed with a 100-fold excess *casq2* gene CARg box oligonucleotide (lane 2). The myotube complex (lane 3) was competed with 50- and 100-fold excess of unlabeled *casq2* CARg box site (lanes 4 and 5), CARg box consensus (lanes 6 and 7), *casq2* gene mutated CARg box (lanes 8 and 9) consensus mutated CARg box (lanes 10 and 11). The complex was preincubated with a SRF antibody (lane 12). Arrows indicate specific complex positions and supershifted complex. Mb, myoblasts.

a lesser intensity than the one observed with myotubes (Fig. 5B). The complex formed was of similar apparent size to the one observed in cardiac cells. The complex observed with Sol8 nuclear extracts was also supershifted in the presence of the MEF-2 antibody (Fig. 5B).

The proximal *casq2* gene CARg box was also assayed to test its capabilities of binding the transcription factors present in nuclear extracts of cardiomyocytes as well as Sol8 myoblasts and myotubes. The CARg box oligonucleotide formed a complex when incubated with cardiomyocytes nuclear extracts (Fig. 5C). This complex was specifically competed with the addition of the wild type CARg box *casq2* (50–100-fold molar excess) unlabeled probe, or a previously tested consensus CARg box oligonucleotide, whereas it did not change by the addition of the mutated *casq2* gene CARg box oligonucleotide. The protein present in this complex was identified by supershift assay, using a SRF-specific antibody (Fig. 5C). We also assayed the binding capabilities with Sol8 myoblasts and myotube nuclear extracts. The results showed a complex of similar apparent size to the one observed in cardiomyocytes; it also was a specific complex and was supershifted with a SRF antibody. The complex produced by myoblast nuclear extracts was of lesser intensity than the one observed with myotubes (Fig. 5D).

The proximal *casq2* E-box site was also assayed to determine its binding properties. When incubated with cardiomyocytes or Sol8 myoblasts and myotubes nuclear extracts, no DNA-protein complex was observed. The same nuclear extracts were assayed with a consensus E-box sequence (5'-CANNTG-3') and a specific complex was observed (data not shown).

Functional Properties of the MEF-2 and CARg Box Sites—To further understand the role of the MEF-2, E-box, and CARg box sites in the regulation of the human *casq2* gene, we performed site-directed mutagenesis as described under

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

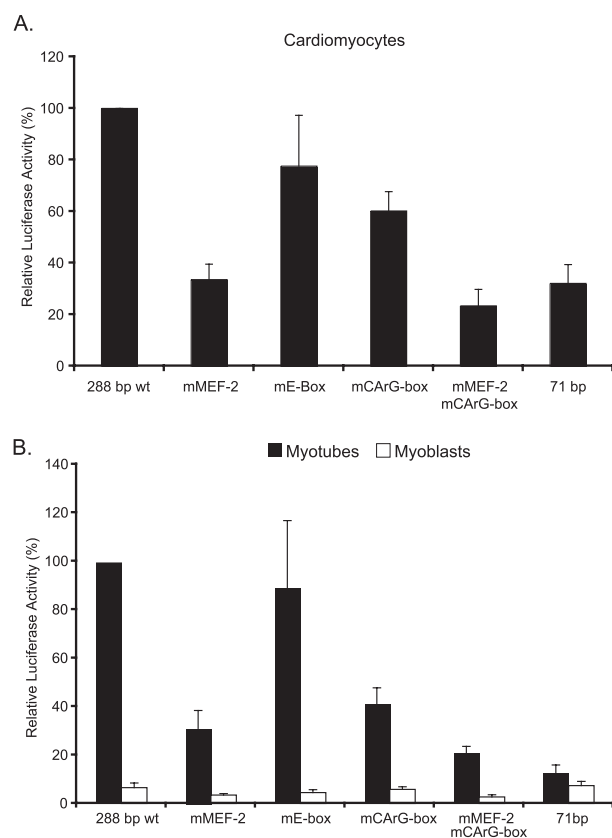


FIGURE 6. Functional analysis of the mutated proximal *casq2* gene MEF-2 site and CARg box in cardiomyocytes and Sol8 cells. A, the mutated constructs of the sites MEF-2, E-box, CARg box, and MEF-2 + CARg box in the -288 bp construct were transfected into cardiomyocytes and assayed for luciferase activities 48 h later as mentioned under "Experimental Procedures." B, the same constructs were transiently transfected into Sol8 myoblasts (white bars) and assayed 24 h later, and into myotubes induced to differentiate for 48 h with DMEM supplemented with 3% HS (black bars) and assayed 48 h later. Results are expressed in percentage change of the activity observed with the wild type -288 bp construct. Mean \pm S.E.

"Experimental Procedures" of the sites previously tested by electrophoretic mobility shift assay.

The four mutated constructs containing the mutations of the MEF-2 site (mMEF-2), E-box (mE-box), CARg box (mCARg box), and MEF-2 and CARg box (mMEF2 + mCARg-box), were transiently transfected into neonate rat cardiomyocytes, and assayed for luciferase activity 48 h later (Fig. 6A). The results showed that the mutation of the MEF-2 site was associated with a 70% reduction of transcriptional activity compared with the wild type construct. The mutation of the E-box showed a nonsignificant reduction of the transcriptional activity. The mutation of the CARg box was associated with a reduction of 40% of transcriptional activity. The construct containing both the MEF-2 and CARg box mutations was associated with a further reduction of the activity up to 80% to that observed with the wild type construct, which was an activity equivalent to that observed with the -71 -bp construct lacking the MEF-2 and CARg box elements and showed only basal promoter activity in all the cell types analyzed.

We performed the same experiment in Sol8 myoblasts (white bars) and myotubes (black bars) (Fig. 6B). The results showed that in myoblasts the level of transcriptional activity of all the *casq2* gene constructs was low and minimally affected by the mutation of the MEF2 CARg box sites. In myotubes the activity of the -288 -bp construct is high, we observed a similar behavior to the one seen in cardiomyocytes, with a reduction of 70% in activity with mMEF-2 construct, a 60% reduction with the mCARg box construct, and a 80% reduction when both the double mutated mMEF-2 and mCARg box construct were assayed. Both cardiomyocytes and Sol8 myotubes, when transfected with the -288 -bp construct containing the mutated MEF-2 and CARg box sites, exhibited very low transcriptional activity, quite similar to that observed with the -71 -bp construct, which has only basal transcriptional activity.

DISCUSSION

Calsequestrin has a major role to maintain the calcium homeostasis in the striated muscle cells, also the data regarding its specific tissue expression and absence of changes on its expression associated with pathological conditions, evidences the existence of a fine regulation of its expression. The results presented in this work are the first attempt to understand the transcriptional regulation of the expression of the *casq2* gene.

The DNA sequence analysis of the human *casq2* gene 5'-regulatory region, compared with the regulatory region of this gene in other species (chimp, mouse, rat, cow, dog, and chicken), reveals that the only region that has a high homology among them is contained within the -30 to -140 -bp region upstream from the main transcription initiation site. Upstream from this region only a few small isolated sequences (20–30-bp long) display homology among mammalian *casq2* genes, but not with the chicken *casq* gene (data not shown). This observation is also relevant when one considers that avians only have one *casq* gene, which is expressed in fast- and slow-twitch skeletal and cardiac muscles. Also, this highly conserved proximal promoter region contains one MEF2, one E-box, and one CARg box putative DNA that are of relevance for gene expression in skeletal and cardiac muscle cells.

The functional results we report demonstrate that the first 288 bp of the human *casq2* gene 5'-regulatory region are capable of directing the expression of the *casq2*/Luc constructs in neonatal rat cardiomyocytes and myotubes of the mouse Sol8 cell line; but not in C3H10T1/2 fibroblasts. The results also showed that the -288 -bp *casq2* gene construct drive a similar expression in Sol8 myotubes and in neonatal rat cardiomyocytes. The construct containing 3.1 kb of 5'-regulatory region increased transcriptional activity relative to the 288-bp construct (4-fold) in cardiac myocytes. In contrast, in Sol8 myotubes the 288 bp had the higher transcriptional activity, which is similar to the activity of the SV40 promoter construct, but constructs containing longer sequences showed 50–60% less transcriptional activity. The above results agree with the *casq2* mRNA and protein tissue expression pattern, where CASQ2 has been shown to be abundantly expressed in cardiac muscle, but only to a minor extent in slow-twitch skeletal muscle (17, 27). These results also demonstrate that the first 288 bp are necessary and sufficient to confer a striated muscle-specific

Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene

expression, and that DNA elements located between 1.1 and 2.14 kb may function as an enhancer with specific activity in cardiac myocytes, and may have a negative role in the regulation of transcription in skeletal muscle. The results obtained with the stable transfected Sol8 cell lines showed a similar pattern of induction of transcriptional activity of the -288 - and -3102 -bp *casq2* gene constructs during skeletal muscle differentiation, which also followed a similar pattern to the level of expression of endogenous *casq2* mRNA. Interestingly, the expression of MEF-2C and SRF mRNA was induced during Sol8 muscle differentiation increasing from myoblasts to myotubes 3- and 1.5-fold, respectively.

By DNA sequence analysis of the highly conserved *casq2* gene proximal 5'-regulatory region, we identify three putative binding sites for transcription factors relevant in the regulation of cardiac and skeletal muscle-specific genes (MEF-2, E-box, and CArG box). The proximal putative MEF-2 and E-box elements share high homology with the consensus sequences for these sites (17). Although, the CArG box sequence present in the *casq2* gene (CC(A/T)₇GG), is not a canonical site (CC(A/T)₆GG), previously a CArG box site with the same configuration of the one present in the *casq2* gene regulatory region has been described and demonstrated to be functional in the cardiac α -myosin heavy chain gene (21). Therefore, we further analyzed the role of these muscle regulatory elements on the regulation of the *casq2* gene. The results demonstrate that the MEF-2 and CArG box sites are capable of binding the MEF-2 and SRF, respectively; whereas the E-box site did not bind any protein present in the nuclear extracts of cardiomyocytes, C3H10T1/2 cells, as well in Sol8 myoblasts and myotubes.

Because of these results, we decided to focus our work on analyzing the function of the proximal MEF-2, E-box, and CArG box sites, to understand their role in the tissue-specific regulation of the *casq2* gene. We generated mutants for these three sites by site-directed mutagenesis. The functional studies demonstrate that the MEF-2 and CArG box mutations decrease the transcriptional activity of the -288 -bp human *casq2* gene construct, 70 and 40%, respectively. The DNA protein binding studies confirmed that the mutated sites were unable to bind MEF-2 and SRF. However, mutation of the putative E-box site did not change the transcriptional activity confirming the results showing the absence of protein binding. The mutation of both the MEF-2 site and CArG box on the same construct decreases the transcriptional activity to basal level on both cell types (cardiac, skeletal), similar to that observed with the -71 -bp construct, which is devoid of both elements.

The results indicate that MEF-2 and SRF have a very important role in regulating the expression of the *casq2* gene in skeletal and cardiac muscle. Mutation of both sites leaves only basal promoter activity, which may be directed by the TATA-like box present in this region. We must also consider that DNA elements present upstream from -288 to -580 bp and from -1095 to -3.1 kb have a significant role in regulating the expression of the *casq2* gene in cardiac muscle, where these regions show an increase of the activity compared with the -288 -bp construct. DNA sequence analysis of the -288 to -3.1 kb region shows the presence of several putative MEF-2,

E-box, NFAT, and GATA-4 binding sites (data not shown); the transcription factors that bind to these sites have been mentioned in the regulation of several cardiac and skeletal muscle genes. The presence of several E-box sites in this region may play an important role, because previously it has been reported by DNA microarray analysis that the *casq2* gene is regulated in skeletal myotubes by myogenin (28).

In this study, we show that the transcription factors MEF-2 and SRF play a significant role in the regulation of the *casq2* gene. However, it is difficult to assume that these are the only factors involved in its regulation because it is well documented that both MEF-2 and SRF are activated via Ca^{2+} -regulated pathways, like calcineurin for MEF-2 (29–31) and CaM kinase II for SRF (32, 33). When this data is considered along with previous reports that show no changes on the expression of CASQ2 in cardiac pathological states, which imply abnormal intracellular Ca^{2+} concentrations, it suggests that non- Ca^{2+} -regulated pathways may be involved on the regulation of the expression of the *casq2* gene (2, 10). Therefore, we believe that other transcriptional mechanisms must be involved in the regulation of the expression of *casq2* gene, and have to be studied in more detail.

The transcriptional regulation of the *casq2* gene is similar to previous publications on cardiac-specific genes like the cardiac troponin C, cardiac α -actin, and cardiac α -myosin heavy chain genes. The regulatory mechanisms for these genes consist of a basal promoter with the proximal regulatory region activating the transcription in the adult slow-twitch skeletal muscle and cardiac muscle, being sufficient to have striated muscle-specific expression (21). Also in genes with cardiac-specific expression, in the distal regulatory region are enhancers that confer cardiac expression (21, 34, 35). Recently, it was proposed that a larger enhanceosome complex mediates the cardiac-specific expression, where several transcription factors like GATA4, SRF, MEF-2, NFAT, and HAND2, interact with each other through indirect mechanisms that involve transcriptional scaffolding molecules. The co-activator p300/CBP has been proposed as one of the molecules involved in the formation of the cardiac-specific enhanceosome (29, 36, 37).

The MEF-2 and SRF factors belong to the MADS family of transcription factors, and are capable of interacting with a large number of transcription factors and cofactors through the MADS DNA binding domain. MEF-2 has been mentioned several times as regulating the transcription of cardiac, skeletal, and smooth muscle genes (38, 39). The SRF factor has been particularly involved in the regulation of smooth muscle genes, although it has also been associated with some cardiac and slow-twitch skeletal muscle genes (40–42). Both factors have the possibility of acting as positive or negative regulators when they bind to DNA, which is dependent of the recruitment of positive or negative transcriptional co-regulators. In recent years the myocardin family of transcription factors, especially myocardin-related transcription factors A/B, have been associated with the regulation of cardiac genes (43–46), by interactions with the SRF, potentiating the effect of these factors. Thus, it is possible that some of these cofactors contribute with SRF to regulate expression of the *casq2* gene. The MEF-2 factor has been mentioned to interact with basic

helix-loop-helix transcription factors (47, 48), even when the E-box site present on the first 140 bp did not show binding capabilities, it is still possible that basic helix-loop-helix factors acting as cofactors of MEF-2 and are involved in regulating the *casq2* gene expression.

In summary, in this work we have demonstrated that the 5'-regulatory region of the human *casq2* gene has a high homology with other species on the first 180 bp, where only one MEF-2 and one CARg box binding sites are present. These sites are functional and interact with MEF-2 and SRF transcription factors present in cardiac myocytes and Sol8 myotubes. Mutation of the MEF2 or CARg box sites leads to a diminished transcriptional activity in neonatal rat cardiomyocytes and Sol8 myotubes in culture. Remarkably, when both sites are mutated simultaneously the transcriptional activity of the -288-bp construct decreases to basal level, indicating that the MEF2 and CARg box sites are necessary for transcription of the *casq2* gene. We demonstrated that the first 288 bp of the 5'-regulatory region of the *casq2* gene are necessary and sufficient to regulate the expression in skeletal myotubes and cardiomyocytes, but not in non-muscle cells. The results suggest that, the regions between -288 and -580 bp and from -1095 to -3102 bp have a role as cardiac-specific enhancers, whereas in skeletal muscle do not play a positive role, but possibly a negative regulatory role. Further studies are still needed on the distal regulatory elements to have a more complete understanding of the muscle-specific transcriptional regulation of the *casq2* gene.

REFERENCES

1. Franzini-Armstrong, C., Protasi, F., and Ramesh, V. (1999) *Biophys. J.* **77**, 1528–1539
2. MacLennan, D. H. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 5291–5297
3. Beard, N. A., Laver, D. R., and Dulhunty, A. F. (2004) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **85**, 33–69
4. Beard, N. A., Sakowska, M. M., Dulhunty, A. F., and Laver, D. R. (2002) *Biophys. J.* **82**, 310–320
5. Yang, A., Sonin, D., Jones, L., Barry, W. H., and Liang, B. T. (2004) *Am. J. Physiol.* **287**, H1096–H1103
6. Park, H., Park, I. Y., Kim, E., Youn, B., Fields, K., Dunker, A. K., and Kang, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 18026–18033
7. Wang, S., Trumble, W. R., Liao, H., Wesson, C. R., Dunker, A. K., and Kang, C. H. (1998) *Nat. Struct. Biol.* **5**, 476–483
8. Park, H., Wu, S., Dunker, A. K., and Kang, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16176–16182
9. Park, K. W., Goo, J. H., Chung, H. S., Kim, H., Kim, D. H., and Park, W. J. (1998) *Gene (Amst.)* **217**, 25–30
10. Lehnart, S. E., Schillinger, W., Pieske, B., Prestle, J., Just, H., and Hasenfuss, G. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **853**, 220–230
11. Sato, Y., Ferguson, D. G., Sako, H., Dorn, G. W., 2nd, Kadambi, V. J., Yatani, A., Hoit, B. D., Walsh, R. A., and Kranias, E. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28470–28477
12. Kontula, K., Laitinen, P. J., Lehtonen, A., Toivonen, L., Viitasalo, M., and Swan, H. (2005) *Cardiovasc. Res.* **67**, 379–387
13. Postma, A. V., Denjoy, L., Hoortje, T. M., Lupoglazoff, J. M., Da Costa, A., Sebillon, P., Mannens, M. M., Wilde, A. A., and Guicheney, P. (2002) *Circ. Res.* **91**, e21–26
14. di Barletta, M. R., Viatchenko-Karpinski, S., Nori, A., Memmi, M., Terentyev, D., Turcato, F., Valle, G., Rizzi, N., Napolitano, C., Gyorke, S., Volpe, P., and Priori, S. G. (2006) *Circulation* **114**, 1012–1019
15. Terentyev, D., Nori, A., Santoro, M., Viatchenko-Karpinski, S., Kubalova, Z., Gyorke, I., Terentyeva, R., Vedamoorthyrao, S., Blom, N. A., Valle, G., Napolitano, C., Williams, S. C., Volpe, P., Priori, S. G., and Gyorke, S. (2006) *Circ. Res.* **98**, 1151–1158
16. Yano, K., and Zarain-Herzberg, A. (1994) *Mol. Cell. Biochem.* **135**, 61–70
17. Frank, K. F., Mesnard-Rouiller, L., Chu, G., Young, K. B., Zhao, W., Haghghi, K., Sato, Y., and Kranias, E. G. (2001) *Basic Res. Cardiol.* **96**, 636–644
18. LaPointe, M. C. (2005) *Peptides* **26**, 944–956
19. von Harsdorf, R., Edwards, J. G., Shen, Y. T., Kudej, R. K., Dietz, R., Leinwand, L. A., Nadal-Ginard, B., and Vatner, S. F. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 1294–1304
20. Dhar, M., Mascareno, E. M., and Siddiqui, M. A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 18490–18497
21. Molkenin, J. D., Jobe, S. M., and Markham, B. E. (1996) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 1211–1225
22. Wang, G., Yeh, H. I., and Lin, J. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 30595–30603
23. Morin, S., Charron, F., Robitaille, L., and Nemer, M. (2000) *EMBO J.* **19**, 2046–2055
24. Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R. J., and Nemer, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 5687–5696
25. Cripps, R. M., and Olson, E. N. (2002) *Dev. Biol.* **246**, 14–28
26. Pfaffl, M. W. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, e45
27. Arai, M., Alpert, N. R., and Periasamy, M. (1991) *Gene (Amst.)* **109**, 275–279
28. Blais, A., Tsikitis, M., Acosta-Alvear, D., Sharan, R., Kluger, Y., and Dynlacht, B. D. (2005) *Genes Dev.* **19**, 553–569
29. Meissner, J. D., Umeda, P. K., Chang, K. C., Gros, G., and Scheibe, R. J. (2007) *J. Cell Physiol.* **211**, 138–148
30. Wu, H., Rothermel, B., Kanatous, S., Rosenber, P., Naya, F. J., Shelton, J. M., Hutcheson, K. A., DiMaio, J. M., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., and Williams, R. S. (2001) *EMBO J.* **20**, 6414–6423
31. Beylkin, D. H., Allen, D. L., and Leinwand, L. A. (2006) *Dev. Biol.* **294**, 541–553
32. Nelson, T. J., Balza, R., Jr., Xiao, Q., and Misra, R. P. (2005) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **39**, 479–489
33. Wamhoff, B. R., Bowles, D. K., McDonald, O. G., Sinha, S., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V., and Owens, G. K. (2004) *Circ. Res.* **95**, 406–414
34. Lemonnier, M., and Buckingham, M. E. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 55651–55658
35. Azakie, A., Lamont, L., Fineman, J. R., and He, Y. (2005) *Am. J. Physiol.* **289**, C1522–C1534
36. Gregoire, S., Xiao, L., Nie, J., Zhang, X., Xu, M., Li, J., Wong, J., Seto, E., and Yang, X. J. (2007) *Mol. Cell Biol.* **27**, 1280–1295
37. Dai, Y. S., Cserjesi, P., Markham, B. E., and Molkenin, J. D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 24390–24398
38. Black, B. L., and Olson, E. N. (1998) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 167–196
39. Bodmer, R., and Venkatesh, T. V. (1998) *Dev. Genet.* **22**, 181–186
40. Belaguli, N. S., Sepulveda, J. L., Nigam, V., Charron, F., Nemer, M., and Schwartz, R. J. (2000) *Mol. Cell Biol.* **20**, 7550–7558
41. Chen, C. Y., Croissant, J., Majesky, M., Topouzis, S., McQuinn, T., Frankovsky, M. J., and Schwartz, R. J. (1996) *Dev. Genet.* **19**, 119–130
42. Balza, R. O., Jr., and Misra, R. P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 6498–6510
43. Creemers, E. E., Sutherland, L. B., McAnally, J., Richardson, J. A., and Olson, E. N. (2006) *Development* **133**, 4245–4256
44. Pipes, G. C., Creemers, E. E., and Olson, E. N. (2006) *Genes Dev.* **20**, 1545–1556
45. Zhang, X., Azhar, G., Zhong, Y., and Wei, J. Y. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 55626–55632
46. Wang, D. Z., and Olson, E. N. (2004) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 558–566
47. Berkes, C. A., and Tapscott, S. J. (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 585–595
48. Morin, S., Pozzulo, G., Robitaille, L., Cross, J., and Nemer, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 32272–32278

Downloaded from www.jbc.org by on March 29, 2008

