



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

***“EFECTO DEL FACTOR TRANSCRIPCIONAL SOX9 SOBRE LA ACTIVIDAD
DEL PROMOTOR DEL SARCOGLICANO ALFA DURANTE LA MIOGÉNESIS”***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB. JOSÉ MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

Ciudad Universitaria 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Para mis padres
Guillermina y José Manuel*

*Por el fervor con que viven,
por las estrellas en las que sueñan.*

Este trabajo fue realizado bajo la tutoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez en el laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI – IMSS, así como en el Laboratorio de Biología Molecular de la División de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE.

El comité tutorial que asesoró la realización de esta tesis doctoral estuvo conformado por:

Dr. Ramón M. Coral Vázquez
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Dr. Félix Recillas Targa
Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Dr. Rogelio Alonso Morales
Facultad de Medicina. UNAM

El presente trabajo fue apoyado por el Fondo al Fomento a la Investigación (FOFOI) del Instituto Mexicano del Seguro Social con el proyecto número 2005/1/1/197 y por la Asociación Francesa Contra las Miopatías mediante el donativo MNM 2005 Grupo A, Francia.

Durante la realización de este trabajo, José Manuel Hernández Hernández fue becario del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número de matrícula 99092368, y por el CONACyT con el número de registro 189007.

Agradecimientos

A Ramón Coral

Siempre encontraste la forma de compartir conocimientos y experiencias. Hombre generoso y excepcional maestro dedicado a formar nuevas generaciones de hombres y mujeres dedicados a la investigación con gran sentido humano. Gracias por tus consejos, tu amistad y ayuda en todo momento.

A mi familia

Guillermina mi madre, siempre apoyo, nunca desilusión; siempre empuje, nunca cansancio....

José Manuel mi padre, eterno niño de corazón abierto, siempre ilusión como el primer día....

Oscar mi hermano, ejemplo, apoyo y amistad. Por enseñarme el valor de ser uno mismo....

Norma mi hermana, por que nuestros logros son compartidos y las verdaderas enseñanzas no siempre se obtienen en el aula...

Fernando, José Luis y Valeria, por ser la esperanza de un mejor día; la alegría y la motivación para continuar....

A Rocío

Compañera, amiga y cómplice con quien desde siempre comparto la ilusión de construir un sitio mejor, casi como el que existe en nuestros sueños. No sobra agradecerte la paciencia, el amor, las enseñanzas, las alegrías y las tristezas, pues todo es parte de los años mas felices y enriquecedores de mi vida. Esto es tuyo.

A Haydeé Rosas

No sólo una amiga sincera, pero también una crítica, audaz y decidida mujer que inspira y motiva.

A los Ramones

Mi amigos y compañeros de trabajo, por permitirme aprender algo de cada uno de ustedes sin lo cual no sería lo que soy y no habría sido tan divertido. Por sus críticas constructivas y no tan constructivas que contribuyeron a mi formación académica y personal, y por lo que significa pertenecer a un grupo unido y solidario: Paul, Bladi, Gabo, Carlos, Silvia, Alma, Andrea, Bere, Vero, Sergio, Roberto, Jesús, María y Josué, David, Liz, Brallan, y Alhondra también.

A Félix Recillas

Todo con trabajo, reditúa. Investigador excepcional; ejemplo de compromiso, constancia y disciplina. Tus consejos, críticas y ayuda en momentos complicados fueron muy enriquecedores. Muchas gracias.

A Mayra

Por ayudarme con tu experiencia, consejos y tiempo cuando las cosas no eran tan claras. Por que aun en la distancia estuviste al tanto del trabajo y dispuesta a ayudar. Gracias.

A mi jurado de Tesis

Por enriquecer mi trabajo con sus sugerencias, críticas y comentarios.

A mis hermanos

Humberto, Juan Felipe, Bladimir. Por que a pesar de la distancia y el tiempo, siempre existirá la ocasión de, cada uno a su modo, cuestionar, construir y soñar juntos.

A mi familia

Lilia, Jorge, Erin, Rosy, Karen, Victor, Karina, Euri, Arturo, Eli, Omar y Jonatan. Siempre han sido una puerta abierta para mirar hacia la generosidad, la ayuda, el respeto, la confianza, la humildad y la alegría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Cuna de hombres y mujeres que forjan el futuro de un país doliente y esperanzado por un mejor mañana.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
INDICE DE FIGURAS	10
1. INTRODUCCION	14
1.1. El subcomplejo sarcoglicano sarcospán.	14
1.2. Expresión de los Sarcoglicanos.	18
1.3. La función de los factores de transcripción Sox en el músculo esquelético.	24
1.4. TGF- β en el músculo esquelético.	31
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
3. HIPOTESIS	36
4. OBJETIVO	36
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
6. MATERIALES Y METODOS	38
6.1 Cultivos celulares	38
Propagación y diferenciación de células C2C12.	38
6.2 Transfección de células C2C12 y análisis de la actividad del gen reportero luciferasa.	38
6.3 Construcciones y plásmidos.	40
6.4 Aislamiento de RNA y transcripción inversa acoplada a PCR.	41
6.5 Western blot	44
Obtención y cuantificación de extractos proteínicos	44
Ensayo de inmunoelectrotransferencia.	44
6.6 Ensayos de retardo	45
6.6.1. <i>Obtención de extractos nucleares de células C2C12.</i>	45

6.6.2. Marcaje de la sonda. _____	46
6.6.3. Geles de retardo. _____	47
6.7. Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP). _____	48
7. RESULTADOS _____	54
7.1. Sox9 y α -SG presentan un patrón de expresión mutuamente excluyente durante la diferenciación miogénica. _____	54
7.2. Sox9 es un represor de la expresión del gen α -SG. _____	56
7.3. La represión del promotor del gen α -SG es mediada por tres sitios de unión a Sox. _____	61
7.4. El factor transcripcional Sox9 interacciona físicamente con tres sitios de unión en el promotor del gen α -SG. _____	64
7.5. Los sitios de unión a Sox son esenciales para mediar la represión del gen α -SG inducida por Sox9. _____	67
7.6. Sox9 reprime la actividad el promotor del gen α -SG de manera independiente de MyoD. _____	69
7.7. TGF- β regula negativamente la actividad del promotor del gen α -SG e incrementa el potencial de <i>trans</i> -represión del factor transcripcional Sox9. _____	71
7.8. Sox9 y p-Smad3 interaccionan con el promotor del gen α -SG <i>in vivo</i> . _____	77
8. DISCUSIÓN _____	80
9. PERSPECTIVAS _____	90
10. REFERENCIAS _____	93

Lista de Abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
CO ₂	Dioxido de carbono
DGC	Complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina
dNTPs	Dinucleótidos trifosfato
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
KDa	Kilodaltones
MB	Mioblastos
μCi	Microcuries
MEF2C	Factor potenciador miogénico 2C
μg	Microgramo
min	Minutos
ml	Mililitro
μl	Microlitro
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
MT	Miotubo
MyHC	Cadena pesada de la miosina
MYOD	Factor miogénico D
NF1	Factor Nuclear I

°C	Grado centígrado
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de Sales de fosfatos
pmol	Picomol
RNAi	Acido ribonucleico de interferencia
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
SG-SSPN	Complejo sarcoglicano-sarcospán
SOX	Proteína relacionada a SRY (box)
SRY	Factor determinante de testículo
SSPN	Sarcospán
TFIIB	Factor general de transcripción II B
TFIID	Factor general de transcripción II D
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Representación esquemática del DGC en el músculo esquelético.</i>	16
<i>Figura 2. La regulación positiva y negativa de la expresión de los Sarcoglicanos es fundamental para la fisiología muscular.</i>	20
<i>Figura 3. Ensamblaje secuencial del complejo SG-SSPN.</i>	23
<i>Figura 4. Las proteínas Sox pueden unirse al DNA a través del dominio HMG y modular la transcripción de genes blanco.</i>	25
<i>Figura 5. Representación esquemática de la familia de factores de transcripción Sox.</i>	28
<i>Figura 6. Vía de señalización canónica de TGF-β.</i>	33
<i>Figura 7. Aislamiento y clonación de Sox9 de origen murino.</i>	43
<i>Figura 8. Estandarización de condiciones de sonicación y de PCR para inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).</i>	51
<i>Figura 9. α-SG y Sox9 presentan un patrón de expresión diferencial.</i>	57
<i>Figura 10. Sox9 regula negativamente la expresión del gen α-SG en MB C2C12.60</i>	
<i>Figura 11. Sox9 regula negativamente la actividad del promotor del gen α-SG en MB.</i>	62
<i>Figura 12. La actividad del promotor del gen α-SG es regulada positivamente cuando se eliminan sitios de unión a Sox9.</i>	63
<i>Figura 13. Sox9 interacciona in vitro con tres elementos de unión en el promotor del gen α-SG.</i>	66
<i>Figura 14. Los sitios de unión a Sox son requeridos para la represión cooperativa del promotor del gen α-SG por Sox9 y Smad3.</i>	68

Figura 15. La regulación negativa de Sox9 sobre el promotor del gen α -SG es independiente de MyoD. _____	70
Figura 16. TGF- β incrementa el potencial de trans-represión de Sox9 sobre la actividad del promotor del gen α -SG, a través de Smad3. _____	73
Figura 17. La regulación negativa de TGF- β sobre el promotor del gen α -SG es específica del receptor tipo I. _____	74
Figura 18. Sox9 y Smad3 interaccionan <i>in vivo</i> con los elementos de unión a Sox en el promotor del gen α -SG. _____	79
Figura 19. Modelo de represión del promotor del gen α -SG mediado por Sox9. _	89

RESUMEN

La expresión del gen *α-Sarcoglicano (α-SG)*, cuya deficiencia es responsable del desarrollo de la distrofia muscular de cintura tipo 2-D (LGMD-2D), es exclusiva del músculo estriado. Aunque los mecanismos que explican su patrón de expresión han sido parcialmente explicados, se ha explorado poco sobre la regulación transcripcional de *α-SG* en etapas tempranas de la diferenciación muscular. En este estudio mostramos evidencia que demuestra la contribución del factor transcripcional Sox9 a la represión del promotor del gen *α-SG* a través de tres elementos de unión a Sox. Adicionalmente, demostramos que tal efecto represor es independiente del potencial de *trans*-activación que MyoD tiene sobre la expresión de *α-SG*. Nuestras observaciones sugieren que la proteína Smad3 incrementa la actividad represora de Sox9, en un modo dependiente de TGF- β . Con base en estos resultados, proponemos que Sox9 y Smad3 contribuyen de manera muy importante en la inhibición de la expresión de gen *α-SG*, permitiendo el establecimiento de su patrón de expresión durante la diferenciación muscular.

ABSTRACT

α -Sarcoglycan (α -SG) gene is highly expressed in differentiated striated muscle and its disruption causes Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD). Accordingly, the myogenic master regulator MyoD finely modulates its expression. However, the mechanisms preventing α -SG gene expression at early stages of myogenic differentiation remain unknown. In this study we uncovered Sox9, which was not previously known to directly bind muscle gene promoters, as a negative regulator of α -SG gene expression. Reporter gene and chromatin immunoprecipitation assays revealed three functional Sox binding sites that mediate α -SG gene promoter activity repression during early myogenic differentiation. In addition, we show that Sox9-mediated inhibition of α -SG gene expression is independent of MyoD. Moreover, we provide evidence suggesting that Smad3 enhances the repressive activity of Sox9 over α -SG gene expression in a TGF- β -dependent manner. On the basis of these results, we propose that Sox9 and Smad3 are responsible for preventing precocious activation of α -SG gene expression during myogenic differentiation.

1. INTRODUCCION

1.1. El subcomplejo sarcoglicano sarcospán.

El complejo sarcoglicano-sarcospán (SG-SSPN), está constituido por las subunidades α -, β -, γ -, δ -, ϵ - y ζ - Sarcoglicanos (SGs), así como por la proteína tetraspanina sarcospán (SSPN) (Lim y Campbell 1998; Wheeler et al. 2002). Este grupo multimérico de proteínas forma parte del complejo de glicoproteínas asociadas a la proteína distrofina (DGC), cuya deficiencia ocasiona la distrofia muscular de Duchenne/Becker (Hoffman y Kunkel 1989). La distrofina se asocia en su extremo amino terminal con los filamentos de actina del citoesqueleto, y con el distroglicano- β y las sintrofinas (subunidades α y β) mediante su extremo carboxilo terminal. El complejo distroglicano se compone de las subunidades α y β , las cuales atraviesan la membrana de la fibra muscular siendo α -distroglicano localizada en la porción extracelular del complejo, interaccionando con la proteína laminina en la matriz extracelular (Figura 1). A su vez, el complejo distroglicano contacta con el complejo SG-SSPN a través del distroglicano- β (Ervasti y Campbell 1991). Con base en esta disposición del complejo, se ha propuesto que el DGC contribuye a la estabilidad de la membrana muscular durante los procesos repetitivos de contracción y relajación; esto mediante el establecimiento de un puente molecular que une a la porción extracelular con el citoesqueleto (Chan et al. 1998; Coral-Vazquez et al. 1999; Noguchi et al. 2000). De esta forma, la importancia fisiológica de la integridad del DGC reside en el hecho de que la

deficiencia en alguno de sus componentes constituye la causa primaria del desarrollo de diferentes tipos de distrofias musculares. Particularmente, mutaciones en los genes α -, β -, γ - y δ - SGs son la causa primaria del desarrollo de distrofia muscular de cintura de los tipos 2C-2F, conocidas colectivamente como sarcoglicanopatías. Hasta la fecha, no se han descrito enfermedades relacionadas con la deficiencia de ζ -SG, mientras que la deficiencia en ϵ -SG se ha asociado con el desarrollo de la distonia mioclónica (Suh et al. 2006). De forma interesante se ha observado que ratones deficientes de SSPN mantienen la expresión de todos los SGs y no desarrollan distrofia muscular (Lebakken et al. 2000).

El análisis estructural de los SGs predice que las subunidades β -, γ -, δ - y ζ - son proteínas transmembranales del tipo II con un dominio amino terminal intracelular, mientras que α - y ϵ - SGs son proteínas transmembranales del tipo I con un dominio amino terminal extracelular (Rando 2001). Se sabe que los SGs transmembranales tipo II tienen un motivo rico en cisteínas cerca de su extremo carboxilo terminal similar al receptor de EGF ("Epidermal growth factor", de sus siglas en inglés) (Yoshida et al. 2000). Se ha observado que las mutaciones en estas cisteínas reducen la estabilidad de las proteínas maduras (McNally et al. 1996a; Nigro et al. 1996). Por otro lado, cada uno de los SGs posee uno o más sitios consenso de glicosilación los cuales parecen afectar su estructura secundaria y terciaria (Ozawa et al. 1998), así como su oligomerización y transporte hacia la membrana. Aunque los ligandos potenciales de todos los SGs

en la matriz extracelular son desconocidos, se ha reportado que las subunidades γ - y δ - SGs pueden unirse a la filamina 2 que se localiza en el citosol (Thompson et al. 2000).



Figura 1. Representación esquemática del DGC en el músculo esquelético.

La conexión física entre el citoesqueleto y la matriz extracelular mediante el complejo DGC inicia con la unión del dominio amino terminal de la distrofina con la F-actina. El dominio carboxilo de la distrofina se une al DG- β y al complejo citosólico de sintrofinas. A su vez, el DG- β se une al DG- α y al subcomplejo transmembranaral sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN). Finalmente, el distroglicano- α es un receptor para la subunidad $\alpha 2$ de la laminina 2, denominada merosina, localizada en la matriz extracelular. Esto termina con la conexión física entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (Crosbie et al., 1999; Porter, 2000).

Existen evidencias que sugieren que el complejo SG-SSPN participa en procesos de transducción de señales hacia el núcleo (Rando 2001). Un ejemplo de ello son los SGs β -, γ - y δ -, los cuales poseen en su dominio extracelular una secuencia similar a la contenida en el extremo carboxilo terminal del factor de crecimiento epidermal, que pudiera corresponder a un sitio de reconocimiento para un ligando aun no identificado (McNally et al. 1996b). Adicionalmente, mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de α -SG de conejo, se han identificado dos secuencias consenso similares a secuencias presentes en ATPasas y existen evidencias que confirman su funcionalidad. Las secuencias identificadas se localizan en el dominio extracelular de la proteína, y se conservan en conejo, ratón, hámster y humano. Un papel descrito para estas proteínas radica en el control de la concentración de ATP en la superficie de células que expresan receptores para ATP, regulando las señales inducidas por éste. La ausencia de α -SG en el sarcolema puede causar el incremento de ATP en la superficie celular, provocando el aumento en la concentración de Ca^{+2} intracelular y finalmente la muerte celular. Esto representa un mecanismo adicional que contribuye a la necrosis de fibras musculares en las sarcoglicanopatías (Sandona et al. 2004).

Existen evidencias adicionales que sugieren la participación del complejo SG-SSPN en la transducción de señales, las cuales se basan en su interacción con la integrina $\alpha 5\beta 1$. Al estimular la señalización mediada por integrinas, se ha observado un incremento en la fosforilación de serinas y treoninas de los SGs, además el tratamiento de los cultivos celulares con oligonucleótidos antisentido

dirigidos contra α - y γ - SGs, redujo la presencia de proteínas de adhesión focal, lo que sugiere que los SGs participan en la señalización bidireccional y en la regulación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (Yoshida et al. 1998).

1.2. Expresión de los Sarcoglicanos.

Los SGs β -, δ - y ϵ - se expresan en tejidos musculares y no musculares, mientras que α - y γ - SGs se han detectado únicamente en tejido muscular estriado (Straub et al. 1999; Noguchi et al. 2000). Un rasgo característico de las sarcoglicanopatías es que la ausencia primaria de un SG es frecuentemente acompañada por la pérdida o reducción secundaria de otros SGs o de SSPN en las fibras de músculo cardíaco y esquelético (Duggan et al. 1997; Araishi et al. 1999; Coral-Vazquez et al. 1999; Zhu et al. 2001). Interesantemente, la sobreexpresión de γ -SG en el músculo esquelético de ratón, repercute en una distrofia muscular con rasgos histopatológicos muy similares a los observados en el modelo murino deficiente de distrofina y γ -SG (Figura 2) (Zhu et al. 2001). Adicionalmente, la alteración del complejo SG-SSPN por la sobreexpresión de SSPN en el músculo esquelético de un modelo murino, conlleva al desarrollo de un fenotipo de distrofia muscular (Peter et al. 2007), similar al observado por la deficiencia de la proteína laminina (Besse et al. 2003; Guo et al. 2003).

Los datos anteriores resaltan la importancia de la regulación transcripcional de los genes SG, pues indican que además de la activación, la regulación negativa

juega un papel fundamental en la fisiología muscular. Aunado a esto, se ha documentado la importancia de la expresión secuencial y ordenada de los genes SGs, ya que repercute directamente en el ensamblaje del complejo sarcoglicano y su posterior anclaje en el sarcolema. Con respecto a esto, se sabe que los diferentes SGs que conforman el complejo SG-SSPN son sintetizados en el retículo endoplásmico, para ser transportados al aparato de Golgi en donde las proteínas son glicosiladas antes de llegar finalmente a la membrana plasmática como un complejo completamente formado (Figura 3) (Holt y Campbell 1998; Shi et al. 2004). La formación del complejo SG-SSPN comienza con la presencia de dímeros entre β -SG y δ -SG. Durante esta etapa, el β -SG juega un papel primordial funcionando como un factor de iniciación, para lo cual es necesaria la glicosilación en su extremo amino terminal, tras lo cual se incorpora δ -SG formando un complejo nucleador que es esencial para la integración del resto del complejo así como para promover su localización en la membrana celular (Araishi et al. 1999; Hack et al. 2000; Shi et al. 2004). Una vez formado este primer complejo nucleador, δ -SG sufre cambios conformacionales que funcionan como señal de localización membranal así como para la unión con γ -SG, con lo cual finaliza la formación del complejo al incorporarse α -SG (Noguchi et al. 2000).

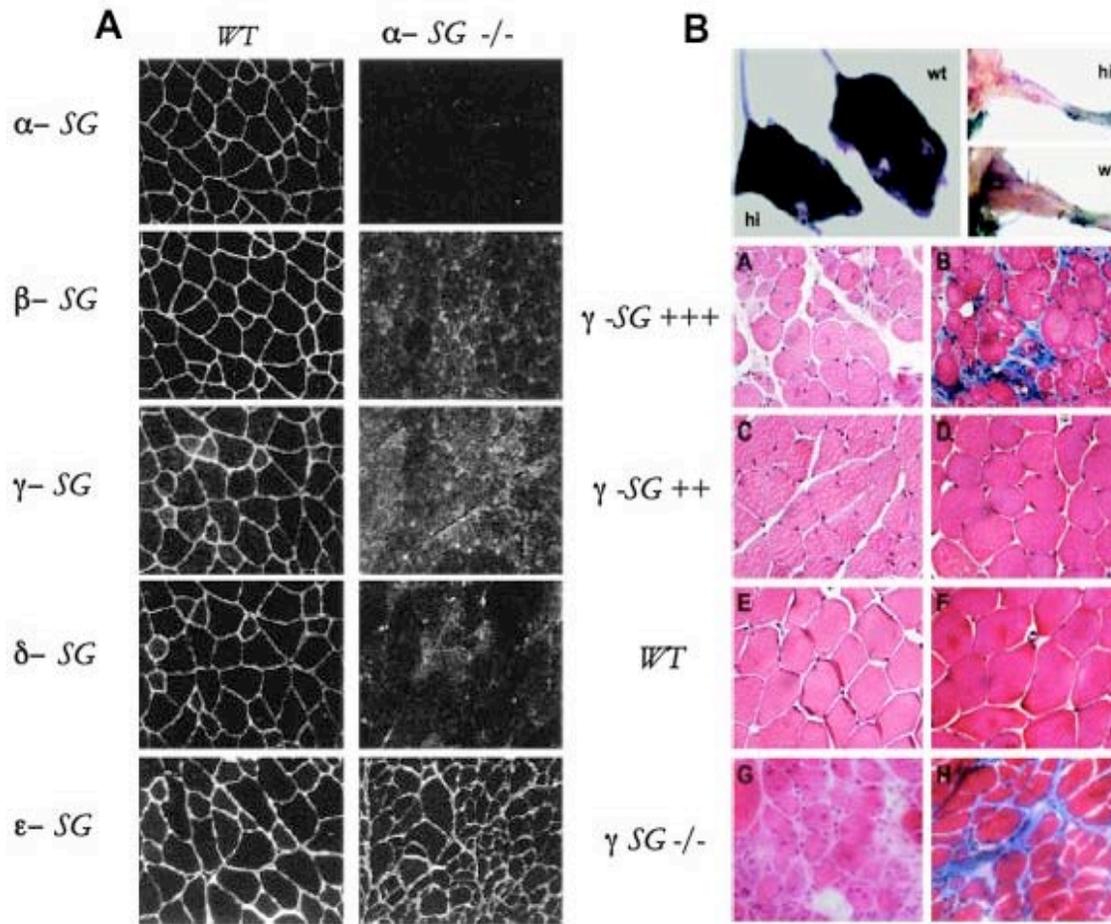


Figura 2. La regulación positiva y negativa de la expresión de los Sarcoglicanos es fundamental para la fisiología muscular.

A) Inmunofluorescencias de α - β -, γ -, δ - y ϵ -SGs en cortes transversales de músculo de un ratón silvestre (WT) y el modelo deficiente en α -SG (α -SG^{-/-}), se observa que la deficiencia primaria de α -SG ocasiona la pérdida de los demás miembros en el sarcolema. Por otro lado, la sobreexpresión de γ -SG (γ -SG⁺⁺⁺) (B) es causa del desarrollo de un fenotipo similar al observado en cortes histológicos de músculo esquelético del modelo deficiente de γ -SG (γ -SG^{-/-}). Tomado de Duclos F. et al., 1998 y Zhu X. et al., 2001.

El gen α -SG es regulado positivamente durante la diferenciación miogénica, donde su cantidad de mRNA incrementa selectivamente hasta 20 veces después de la diferenciación en miotubos (MT), por lo que se ha sugerido fuertemente que la regulación de su expresión se realiza a nivel transcripcional (Liu et al. 1997). Este patrón de expresión de α -SG, ha sido parcialmente explicado por el efecto de los factores transcripcionales NF1 y MyoD sobre la actividad de la región promotora del gen α -SG (Delgado-Olguin et al. 2006; Delgado-Olguin et al. 2008).

La actividad de MyoD sobre el promotor del gen α -SG durante la miogénesis es modulada por la interacción diferencial de un complejo proteínico que incluye al factor MyoD y a los miembros de la maquinaria basal de transcripción TFIIB y TFIID tanto en la región del promotor basal como en el promotor distal, específicamente en la cromatina de MT, mientras que en la cromatina de mioblastos (MB), este complejo se localiza únicamente en la región del promotor distal (Delgado-Olguin et al. 2008).

A pesar de la relevancia fisiológica del control de la expresión de estos genes, se sabe poco a cerca del control transcripcional de los SGs en etapas tempranas de la miogénesis, lo cual es imperativo para entender los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de los patrones de expresión de los genes SGs durante la diferenciación y la regeneración muscular.

Particularmente, el promotor del gen α -SG está compuesto de múltiples elementos de regulación en *cis*, sugiriendo la participación de varios factores de transcripción no relacionados a la familia de factores clásicos musculares como MyoD, Myf5 o MRF4 que pudieran participar de forma importante en los mecanismos de regulación durante la diferenciación muscular.

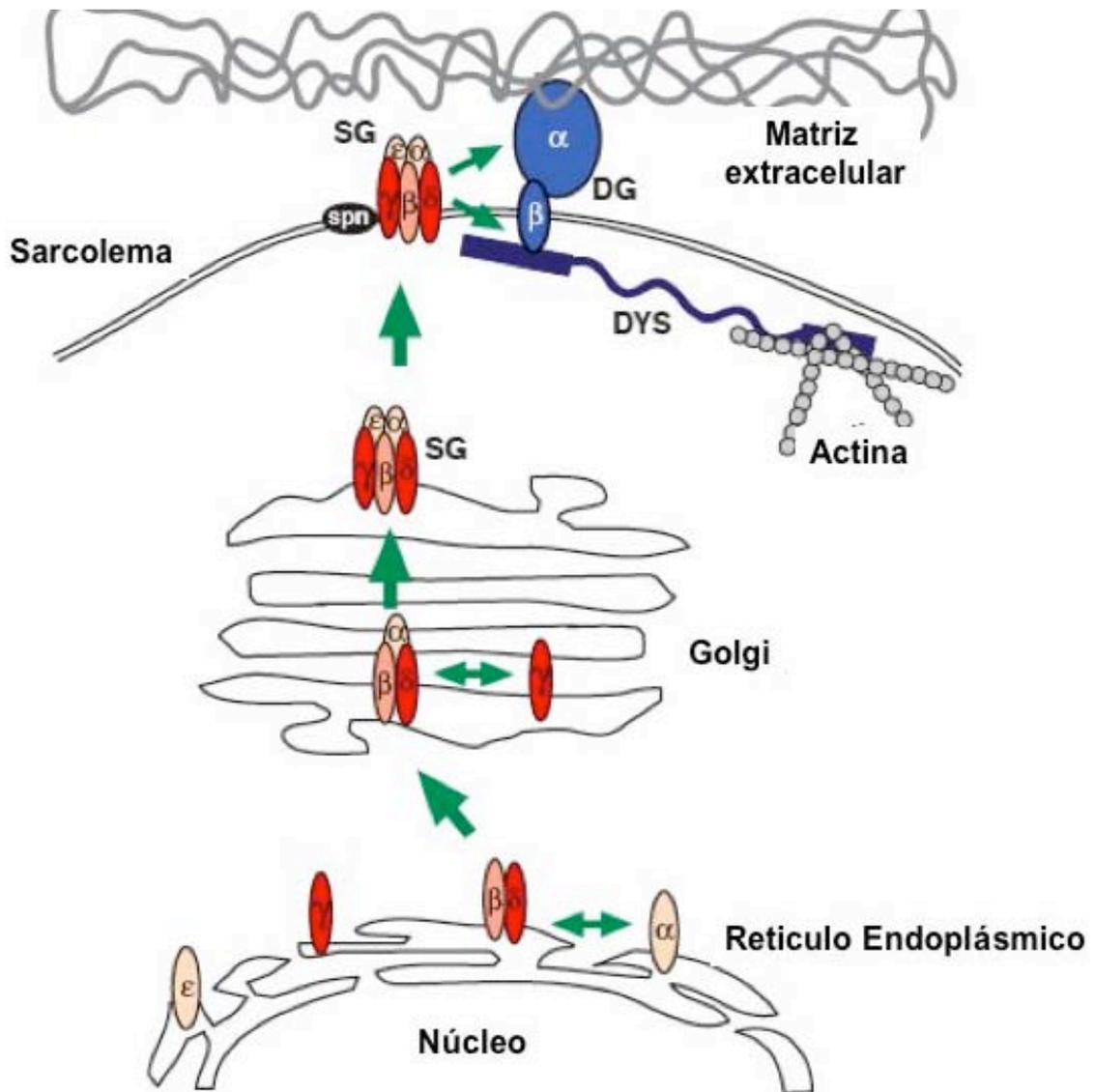


Figura 3. Ensamblaje secuencial del complejo SG-SSPN.

Después de la traducción, los SGs β - y δ - se asocian formando un complejo nucleador. A este heterodímero se une γ -SG, después de lo cual es transportado hacia sarcolema a través del aparato de Golgi, donde se incorporan α y ϵ SGs. Finalmente, una vez anclado en el sarcolema se establecen contactos con sarcospan y el resto del DGC. Tomado de Hack et al., 2000.

1.3. La función de los factores de transcripción Sox en el músculo esquelético.

Los factores Sox forman parte de una amplia familia de genes cuya característica principal es la presencia de un dominio de unión al DNA denominado dominio de alta movilidad electroforética (HMG). Este dominio es altamente conservado entre los miembros de esta familia de proteínas y fue identificado como resultado de la búsqueda de nuevas proteínas con dominios de unión al DNA similares al que se encuentra en el factor determinante de testículo, SRY (Denny et al. 1992). Así, genes que codifican proteínas con más del 50% de similitud a nivel de aminoácidos con el dominio HMG de SRY, son clasificados como genes Sox (SRY box). El dominio HMG es fundamental para la unión al DNA en las secuencias nucleotídicas heptaméricas (A/T)(A/T)CAA(A/T)G, conocidas como elementos de unión a Sox (Wilson y Koopman 2002). Como parte del reconocimiento de esta secuencia, las proteínas Sox se unen en el surco menor y el DNA sufre un cambio conformacional que resulta en un plegamiento de 70 - 80° (Figura 4) (Wegner 1999). De acuerdo con la similitud en la secuencia fuera de los dominios HMG, los genes Sox se han subdividido en los subgrupos A al G (Figura 5) (Kamachi et al. 2000).

Los genes Sox son expresados en distintas fases del desarrollo embrionario, diferenciación y especificación celular, por lo que se les han adjudicado papeles fundamentales en procesos que incluyen la formación del

endodermo, la determinación sexual, la gliogénesis, condrogénesis, hemopoyesis, desarrollo de la cresta neural, desarrollo del cristalino y recientemente regulación de la diferenciación muscular (Beranger et al. 2000; Nobuko Hagiwara 2005; Nobuko Hagiwara 2007).

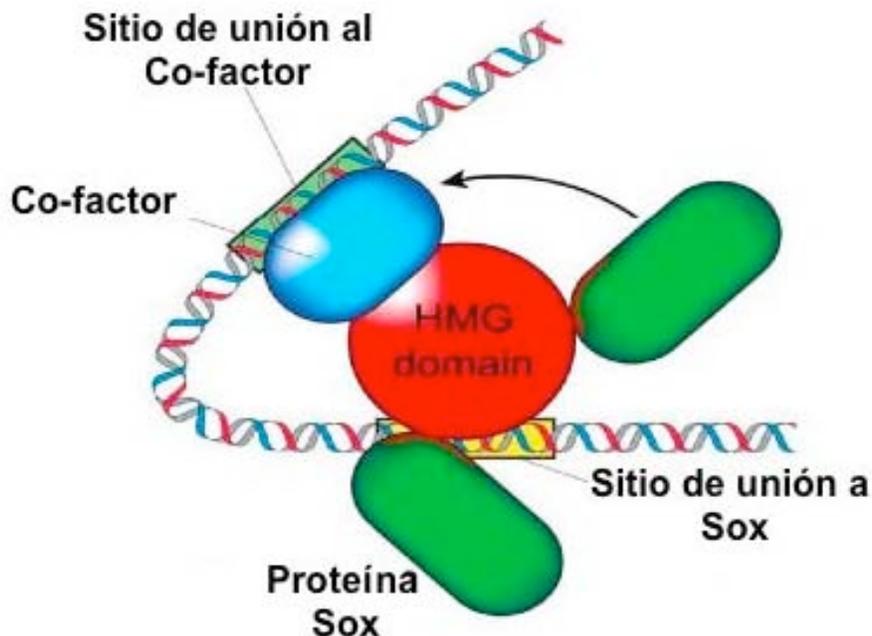


Figura 4. Las proteínas Sox pueden unirse al DNA a través del dominio HMG y modular la transcripción de genes blanco.

Representación esquemática de la unión de las proteínas Sox al DNA a través de su dominio HMG. Las proteínas Sox pueden regular la transcripción a través de interacciones con cofactores relacionados o no a la familia Sox mediante la formación de homo- o heterocomplejos. Tomado de Wilson y Koopman, 2002.

Recientemente se ha documentado la participación de varios miembros de la familia de proteínas Sox en el desarrollo y regulación del músculo esquelético. Sox15 forma parte de la clase G de proteínas Sox; su expresión es ubicua y se ha identificado que la proteína se encuentra particularmente enriquecida en células progenitoras miogénicas. Interesantemente el modelo murino deficiente de Sox15 presenta anomalías en la regeneración muscular (Beranger et al. 2000). Además los mioblastos obtenidos de este modelo presentan alteración en su transcriptoma así como en la progresión del ciclo celular. A nivel molecular, se ha demostrado que Sox15 promueve la expresión del gen *Foxk1*, un marcador específico de células satélite musculares importante en la regulación del desarrollo de poblaciones progenitoras miogénicas y en la regulación de la cinética del ciclo celular a través de la represión transcripcional del inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina p21 (*cdkn1a*) (Hawke et al. 2003).

La proteína Sox6 forma parte de la clase D de proteínas Sox (Figura 5) e inicialmente fue relacionado con el desarrollo de hueso, donde actúa como transactivador del gen de la colágena *2a1* junto con los factores Sox5 y Sox9. Sin embargo, recientemente se le ha adjudicado una función importante en la miogénesis; una mutación en el gen Sox6 que elimina su dominio HMG, ocasiona degeneración del músculo esquelético y cardíaco y la muerte del modelo murino dos semanas después del nacimiento (Hagiwara 2005). A nivel molecular, se ha demostrado que como consecuencia de la ausencia del factor Sox6 existe un incremento significativo en los niveles de mRNA de genes específicos de fibras musculares de contracción lenta, así como una disminución significativa en la

expresión de genes específicos de fibras rápidas, lo cual indica que Sox6 juega un papel fundamental en la especificación del tipo de fibras musculares durante el desarrollo (Nobuko Hagiwara 2007).

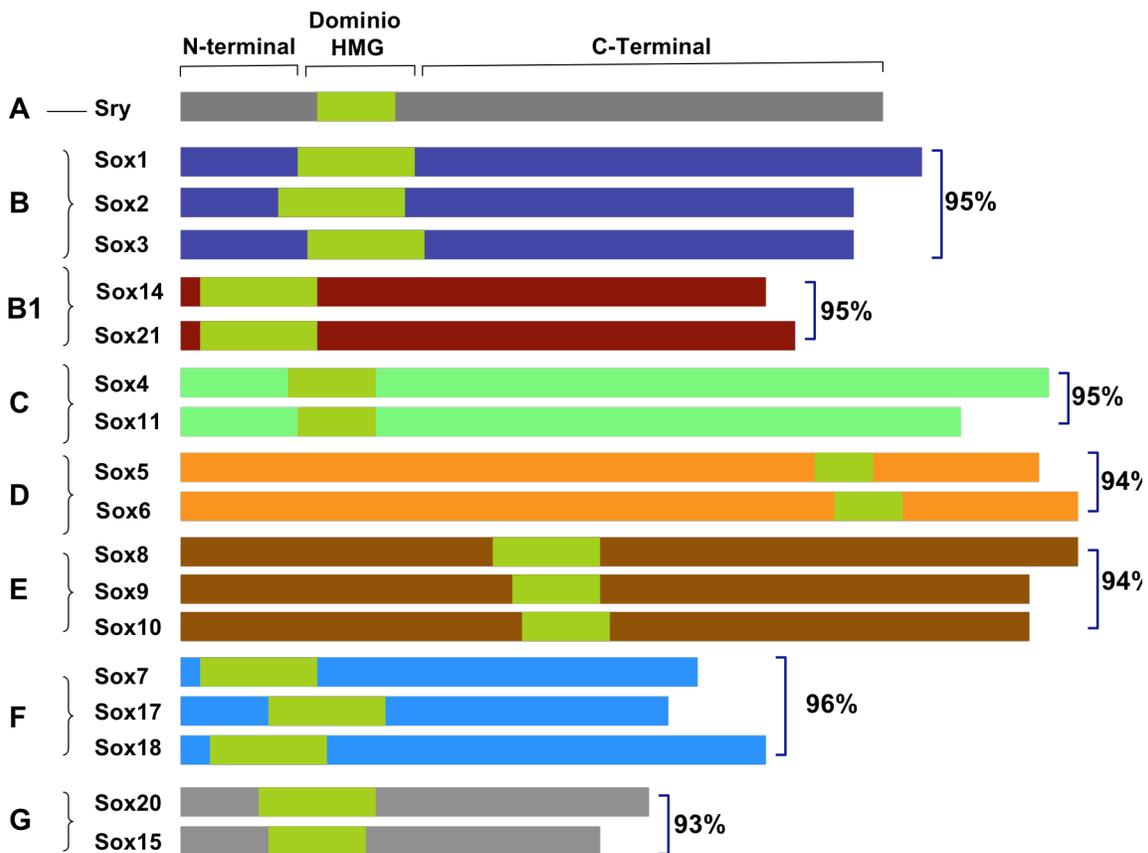


Figura 5. Representación esquemática de la familia de factores de transcripción Sox.

Se muestra la similitud a nivel de aminoácidos entre los componentes de cada grupo, con respecto a su dominio HMG. Se puede observar que los dominios amino y carboxilo, fuera del dominio HMG difieren sustancialmente. Estas secuencias confieren funciones de *trans*-activación o *trans*-represión, así como especificidad de asociación con diferentes co-factores. *Modificado de Kamachi et al., 2000.*

Otras proteínas Sox implicadas en la regulación de la miogénesis son Sox8 y Sox9, los cuales forman parte de la familia E.

Sox8 es el miembro mas recientemente descrito de la clase E de proteínas Sox. Su función no es muy clara pues aunque se ha detectado su expresión durante el desarrollo de varios tejidos como arcos branquiales, sistema nervioso, ojos, testiculos, riñón y extremidades de diferentes especies como el humano, ratón y pollo, la inactivación del gen Sox8 no genera un fenotipo patológico evidente, salvo la reducción en el contenido de tejido adiposo (Sock et al., 2001). Lo anterior sugiere el solapamiento de funciones de los miembros de la clase E de proteínas Sox en los tejidos de colocalización.

Por otra parte, la inactivación de un alelo del gen Sox9 en humanos es la causa del desarrollo de un síndrome de malformación del esqueleto denominado displasia campomelica (Foster et al., 1994). En pacientes masculinos, la displasia campomelica es frecuentemente asociada con reversión sexual XY. De acuerdo con el fenotipo observado, la expresión de Sox9 es mayor en condrocitos y en las células de Sertoli (Kent et al., 1996; NG et al., 1997). Lo anterior es apoyado por el hecho de que cuando se han generado células "stem cell" deficientes en Sox9 para la generación de quimeras, se ha observado una disminución de la población de condrocitos en los ratones quimericos (Bi et al., 1999). El patrón de expresión de Sox9 también incluye zonas del cerebro, placa nasal, pulmón y riñón. Sin embargo, éstos tejidos son raramente afectados en pacientes con displasia campomelica. Por otro lado, se ha descrito la expresión del mRNA de Sox9 en

mioblastos L6 derivados de rata, donde su presencia correlaciona con la expresión del gen de la colágena tipo II, un marcador específico de células condrogénicas (Bi et al., 1999).

Interesantemente estos factores han sido identificados como marcadores de células satélite musculares, su expresión es específica de MB y disminuye a medida que progresa la diferenciación a MT. Aunado a esto, se ha observado que conforme avanza la diferenciación de MT, los factores Sox8 y Sox9 remanentes son localizados fuera del núcleo por medio de una señal de localización nuclear, lo que sugiere una regulación de la actividad de estos factores sobre sus genes o cofactores blanco (Schmidt et al. 2003). De forma interesante la sobreexpresión de estos factores en células C2C12 retrasa la diferenciación de MT, lo cual es acompañado por la alteración de los patrones de expresión del gen músculo específico miosina. Adicionalmente la expresión de miogenina, marcador de músculo esquelético, es inhibida en presencia de Sox8 y Sox9. Lo anterior resulta interesante considerando el hecho de que la región promotora de miogenina carece de sitios potenciales de unión a los factores Sox. Con respecto a esto, se ha propuesto que la represión sobre la expresión de miogenina puede ser a través de: 1) la interacción de los factores Sox y la posible interferencia de la función de los factores reguladores miogénicos, 2) la interacción con factores de la maquinaria basal de transcripción o 3) con la interacción de Sox9 con miembros de la maquinaria de "splicing" (Ohe et al. 2002). Sin embargo un hecho interesante es que hasta la fecha no existen antecedentes de que los factores Sox involucrados en la regulación de la miogénesis, participen en el control de la

expresión de genes reguladores miogénicos o músculo específicos a través de la unión directa con elementos de respuesta a Sox en promotores músculo-específicos.

1.4. TGF- β en el músculo esquelético.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), es conocido como el prototipo de una clase multifuncional de factores de crecimiento que regulan una plétora de eventos clave para el desarrollo de metazoarios como la regulación del crecimiento celular, la proliferación, diferenciación, adhesión celular, migración y apoptosis (Matsumura et al. 1999). La superfamilia de TGF- β consiste de cerca de 50 miembros estructuralmente relacionados, los cuales se subdividen en tres principales familias: el factor de crecimiento transformante (TGF- β), proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) y activinas (Feng y Derynck 2005). La vía de transducción de la señal de la familia de los TGF- β consiste de tres componentes principales (Figura 6): 1) la unión del ligando a su receptor, 2) la activación de receptores de membrana con actividad de serina/treonina cinasa y 3) la participación de mediadores intracelulares (Smads) con funciones asociadas a la regulación transcripcional (Massague 1998). La señalización inicia con la unión del ligando a su receptor de membrana tipo II (Figura 6), el cual se asocia con su correspondiente receptor tipo I formando un complejo de receptores heteroméricos activados el cual transfosforila el receptor tipo I, promoviendo la actividad cinasa del complejo receptor. El complejo receptor activado fosforila a la proteína Smad reguladora, que oligomeriza con una co-Smad, la Smad4. Este oligomero de

Smads es translocado al núcleo donde interacciona con elementos de unión a Smads o con cofactores para regular la transcripción de genes blanco (Jayaraman y Massague 2000). Existe un grupo de Smads inhibitorias (Smad 6 y Smad7) que contrarrestan la actividad de la cascada de señalización mediada por TGF- β , estableciendo un “loop” de retroalimentación negativa (Massague y Chen 2000).

En células de origen muscular en cultivo, la vía de TGF- β inhibe la inducción de la expresión de genes músculo específicos y la formación de miotubos y modula la activación de células satélites (Massague et al. 1986). Investigaciones en este sentido han demostrado que los factores reguladores miogénicos son blanco de la señalización de TGF- β . Liu y cols. demostraron que la Smad3 es importante en la inhibición de MyoD mediada por TGF- β (Liu et al. 2001; Liu et al. 2004), pues documentaron la interacción física de Smad3 con MyoD, inhibiendo la interacción de MyoD con proteínas E, unión fundamental para el reconocimiento de los sitios de unión a MyoD y por lo tanto de sus propiedades de *trans*-activación. Adicionalmente, se ha demostrado que la asociación de Smad3 con el factor transcripcional MEF2C, afecta su función durante la miogénesis a través de dos mecanismos: 1) afectando la interacción de MEF2C con MyoD, la cual es requerida para la expresión de genes musculares transcritos durante la miogénesis tardía y 2) afectando la asociación del coactivador GRIP-1 con MEF2C en promotores musculares blanco (Liu et al. 2001; Liu et al. 2004).

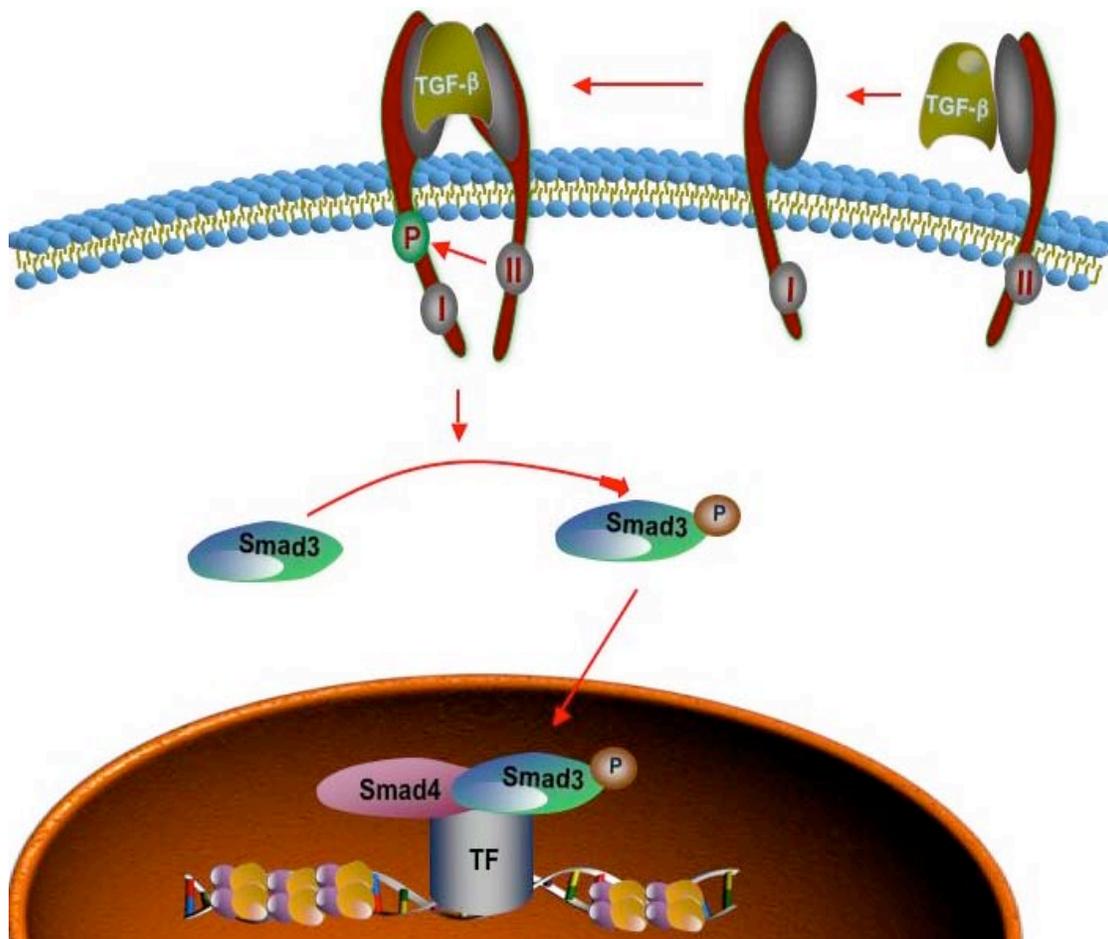


Figura 6. Vía de señalización canónica de TGF-β.

La unión de un miembro de la familia de TGF-β a su receptor tipo II y el reclutamiento del receptor tipo I, promueve la formación de un complejo receptor que implica la fosforilación del receptor tipo I. Una vez activado, el receptor tipo I fosforila la proteína Smad regulada por receptor (Smad3), lo que permite la asociación con la proteína co-Smad (Smad4) y la subsecuente translocación al núcleo. Una vez en el núcleo, el complejo Smad se asocia al DNA directamente o a través de proteínas asociadas (TF) para regular la transcripción de genes blanco. Tomado de Massagué, 1998.

Con base en estos antecedentes y considerando que el promotor del gen α -SG contiene tres elementos de unión a proteínas Sox, en este trabajo centramos nuestros esfuerzos en el estudio de la posible contribución de Sox9 a la regulación negativa del gen α -SG en etapas tempranas de la diferenciación miogénica. Asimismo nos interesó conocer si Sox9 afecta el potencial de *trans*-activación de MyoD, factor transcripcional importante en la regulación positiva del gen α -SG. En este trabajo demostramos que Sox9 contribuye de manera muy importante con la regulación negativa del gen α -SG, mediante la interacción directa con sitios de unión a factores Sox presentes en la región promotora. Interesantemente, demostramos que la vía de TGF- β contribuye a dicha represión a través de la activación de Smad3, el cual coopera con Sox9 para abatir la actividad del promotor del gen α -SG. Estos resultados proveen un nuevo mecanismo para la regulación negativa de la expresión de genes musculares.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los aspectos menos estudiados de los genes que conforman el complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina, es la regulación de la expresión durante el desarrollo y la diferenciación muscular. A nivel transcripcional se conoce que el gen de α -SG es regulado de manera tejido y tiempo específico en músculo cardíaco y esquelético, existiendo una relación directa entre la etapa de diferenciación del músculo esquelético y su transcripción. Considerando las observaciones de que tanto la deficiencia como la sobreexpresión de componentes de dicho complejo son causa de distrofias musculares en varios modelos murinos, y que la exitosa formación del complejo durante la diferenciación depende de la síntesis coordinada de cada subunidad, es evidente la importancia de conocer los mecanismos involucrados en mantener dichos patrones de expresión, pues la identificación de nuevos factores transcripcionales y señales extracelulares implicados en la expresión de los sarcoglicanos, proporcionarán mayor conocimiento del aspecto básico de la fisiopatología de las distrofias musculares y por lo tanto, sentarán bases para el desarrollo de posibles herramientas para el diseño de estrategias terapéuticas en futuros estudios.

3. HIPOTESIS

La expresión del gen *α -sarcoglicano* es regulada negativamente en etapas tempranas de la diferenciación del músculo esquelético, a través del reclutamiento del factor transcripcional Sox9 a tres secuencias de unión al DNA identificadas en su región promotora. Con este razonamiento, la inserción de mutaciones en dichos sitios de unión en el DNA, repercutirá en el incremento en la actividad de la región promotora del gen *α -sarcoglicano*.

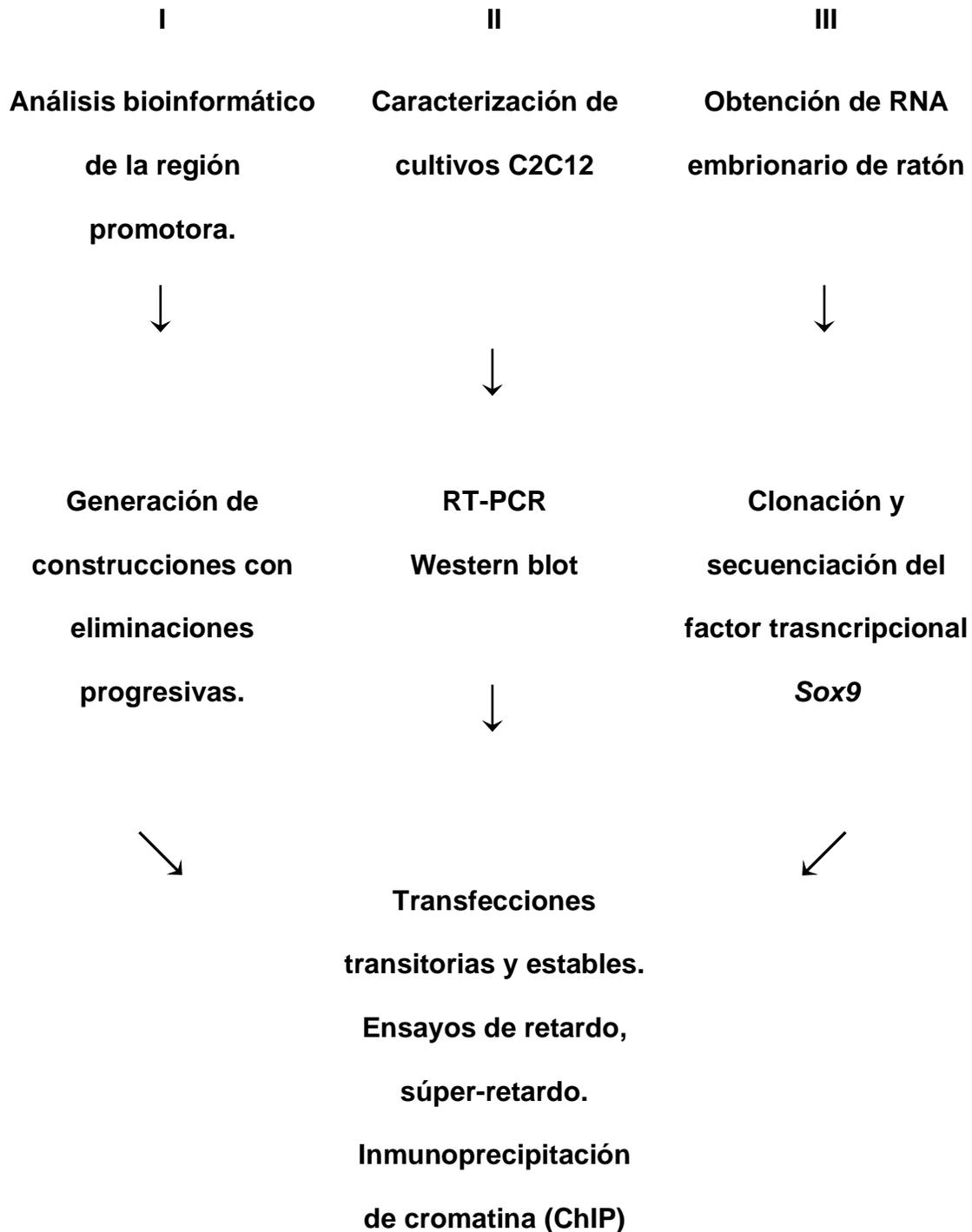
4. OBJETIVO

- ❖ Caracterizar la participación del factor transcripcional Sox9 en la regulación de la expresión del gen *α -SG* durante la diferenciación de la línea celular de origen miogénico C2C12.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Buscar sitios de unión al factor transcripcional Sox9 en el promotor del gen *α -Sarcoglicano*, mediante análisis bioinformático empleando el software MatInspector.
- ❖ Caracterizar bioquímica y molecularmente el modelo C2C12 durante su diferenciación.
- ❖ Aislar y clonar el cDNA del gen Sox9 a partir de RNA embrionario de ratón.
- ❖ Conocer el efecto de la vía de TGF- β en la actividad del promotor del gen *α -SG* en células C2C12.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Cultivos celulares

Propagación y diferenciación de células C2C12.

La línea celular C2C12 derivada de músculo esquelético de ratón (ATCC 1772), fue mantenida en estadio no diferenciado en medio DMEM adicionado con 1% de una mezcla de antibiótico/antimicótico (Gibco) y suplementado con Suero Fetal Bovino a una concentración final del 10%. Cuando las células alcanzaron crecimiento confluyente, se sustituyó el medio de crecimiento por medio de diferenciación constituido de DMEM suplementado con Suero de caballo al 1%. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en presencia de CO₂ al 5%.

6.2 Transfección de células C2C12 y análisis de la actividad del gen reportero luciferasa.

Se sembraron 85,000 células de la línea C2C12 en pozos de 2.5 cm de diámetro, por duplicado. Después de 24 h en medio de crecimiento, las células fueron transfectadas durante 5 horas con 4 µl de lipofectamina 2000 agregando 1 µg de cada construcción del promotor, 100 ng del vector pRL/CMV que contiene a luciferasa de *Renilla reniformis* como gen reportero para la normalización de los datos, así como cantidades definidas de los plásmidos de expresión de los factores transcripcionales Sox9, Smad3, Smad7 o MyoD en un volumen final de

120 μ l para cada uno de los pozos. 24 h después de la transfección se removió el medio de crecimiento y después de lavar cada uno de los pozos con PBS frío los MB fueron cosechados y lisados con 200 μ l de buffer de lisis para determinar la actividad de luciferasa, usando el sistema de ensayo dual de luciferasa (Promega) en un luminómetro TD 20/20 (Turner Desings). Los duplicados fueron inducidos a diferenciación durante cuatro días y la actividad de luciferasa fue determinada en MT.

En algunos experimentos se adicionaron 2 ng/ml de TGF- β (SIGMA) o 5mM del inhibidor específico de la actividad cinasa del receptor tipo I de TGF- β , SB 505124 (SIGMA) (DaCosta Byfield et al. 2004), después de las 5 h de transfección.

Para generar transfectantes estables se transfectaron 10,000 células C2C12 por triplicado con 4 μ l de lipofectamina 2000, 1 μ g de plásmido pcDNA 3-N-Myc-Sox9 ó pcDNA 3-N-Myc linearizado con la enzima XbaI y 300 ng del plásmido pQBI linearizado con la enzima XhoI, este último utilizado como marcador de selección, ya que contiene resistencia a geneticina y la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (GFP). Posterior a la transfección las células se seleccionaron en medio de crecimiento adicionado con 600 μ g/ml de geneticina durante diez días, después de lo cual, se generaron tres poblaciones independientes en las que se analizó la expresión de Sox9 y GFP.

Para la generación de cultivos “Knockdown” de Sox9, se transfectaron células C2C12 con 1 µg del plásmido pSilencerTM-4.1-CMV-Sox9 durante 24 h y una transfección adicional después de 48 h.

6.3 Construcciones y plásmidos.

Para el estudio de actividad del promotor del gen α -SG, se utilizaron construcciones moleculares consistentes en fragmentos de DNA del promotor que fueron clonadas en el sitio Bgl II del vector pGL3 Basic, el cual contiene a luciferasa como gen reportero. Las construcción F1B contiene 2.6 kb correspondientes a la región promotora del gen α -SG y las construcciones F1B_822, F1B_614, F1B_213 y F1B_PB (Delgado-Olguin et al. 2006) correspondientes a fragmentos de DNA que incluyen eliminaciones progresivas de los elementos putativos de unión a Sox.

Los plásmidos F1BMUT213, F1BMUT822, F1BMUT822/213, F1BMUT822/614/213 incorporan mutaciones puntuales que eliminan la secuencia consenso de unión al factor transcripcional Sox9. Dichas construcciones fueron generadas utilizando el sistema QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) siguiendo las instrucciones del proveedor. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la inserción de las mutaciones son: F1BSox_mut822 5'-AGCCACCCGCGAGAATCC-3', F1BSox_mut614 5'-

CGTGGCCGCCGGGCTCAG-3' y F1BSox213_MUT 5'-
ACCCCCGCCGGTCACCAG- 3.

Los plásmidos pCMV5, pCMV5-Smad3 y pCMV5-Smad7 fueron amablemente donados por la Dra. Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular-UNAM). El plásmido pcDNA-N-Myc-Sox9 fue obtenido mediante la clonación del cDNA de Sox9 en los sitios XhoI y XbaI del vector de expresión eucarionte pcDNA-N-Myc a partir de RNA embrionario de ratón de 8.5 dpc como se describe mas adelante.

Para la generación de líneas C2C12 deficientes en el factor transcripcional Sox9, se utilizó el plásmido pSilencerTM-4.1-CMV, amablemente donado por el Dr. Michael S. German (Universidad de California, San Francisco), que codifica para un shRNA de interferencia dirigido contra Sox9 de origen murino (Lynn et al. 2007).

6.4 Aislamiento de RNA y transcripción inversa acoplada a PCR.

Para la obtención del mRNA de Sox9 se purificó RNA total de embriones de ratón de 8.5 dpc utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La concentración y pureza del RNA fueron determinados mediante medición espectrofotométrica a 260/280 nm. Para la síntesis del cDNA, se utilizaron 4 µg de RNA total, hexadeoxinucleótidos aleatorios y 2 U de M-MLV reverso-transcriptasa (Invitrogen) de acuerdo con las

instrucciones del proveedor. Los oligonucleótidos específicos para la amplificación del mRNA de Sox9 fueron: Sox9_Fwd 5'-CCGGGCTCGCGTATGAATCT-3', y sox9_Rvs 5'-TCACCAGACCCTGAGAAGAG-3'. Para analizar la expresión de α , β , γ y δ SGs y SSPN en las líneas C2C12 estables para pcDNA-N-Myc-Sox9 o pcDNA-N-Myc, se emplearon los siguientes oligonucleótidos: α -SG: Fwd 5'-AGAGGCTGCTGCTGCTGATT-3', y Rvs 5'-GAGGTGCCAAGGTGTCATAG-3'; β -SG Fwd 5'-GGTCTGCTGAGGTTCAAGCAAGT-3' y Rvs 5'-GAAACTCGTGCGTCTCATAGTCC-3'; γ -SG Fwd 5'-CCAGAGCCAGCACTTACAGA-3' y Rvs 5'-GAAGAGGGAGTGGTCAGAGA-3'; δ -SG Fwd 5'-TAC GGCTGGAGGAAAAGATG-3' y Rvs 5'-TGGCGTAGAGAGGTTGTAAG-3', y SSPN Fwd 5'-GCTAGTCAGAGACACTCCGT-3', Rvs 5'-GCAGCCCAACACCCACATAA-3. El mRNA de GAPDH se amplificó como control endógeno usando los siguientes oligonucleótidos: Fwd 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3' y Rvs 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'. La mezcla de reacción para PCR se preparó con 2.5 μ l de cDNA, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 2.5 mM de cada dNTP, 200 ng de cada primer, y 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de amplificación con los siguientes pasos: 30 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de alineamiento a 62°C y 30 seg de polimerización a 72°C, y un paso final de 5 min a 72°C. Todos los productos de

amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio.

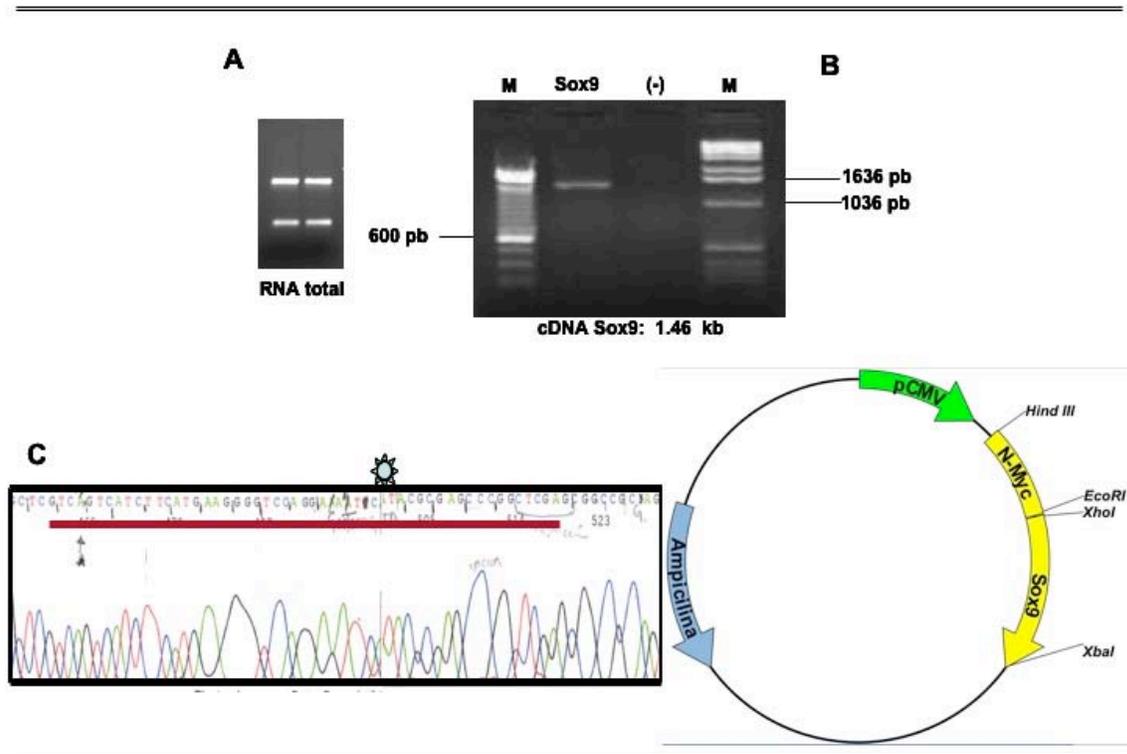


Figura 7. Aislamiento y clonación de Sox9 de origen murino.

A) Corrimiento electroforético de RNA total obtenido de embriones de ratón de 8.5 dpc, el cual se utilizó para sintetizar el cDNA de Sox9 cuyo peso molecular corresponde a 1.46 kb B). Una vez secuenciado el cDNA fue clonado en el vector de expresión pCDNA-N-Myc en los sitios XhoI y XbaI C).

6.5 Western blot

Obtención y cuantificación de extractos proteínicos

Ensayo de inmunoelectrotransferencia.

Los extractos de proteínas totales de MB y MT C2C12, así como de células establemente transfectadas con N-Myc-pcDNASox9 y N-Myc-pcDNA se obtuvieron de la siguiente manera: se eliminó el medio de cultivo de las cajas y se lavaron dos veces con PBS frío. Posteriormente se cosecharon con buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology), suplementado con inhibidores de proteasas (500 µl por cada 10 millones de células). La mezcla se incubó en hielo por 15 min y se homogenizó por 3 min, posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm, separando el sobrenadante en un tubo nuevo. Para cuantificar las proteínas se utilizó el reactivo de Bradford (Biorad) utilizando una curva estándar de 1.5 a 10 µg/ml de albúmina y obteniendo la concentración en un espectrofotómetro.

Se utilizaron 80 µg de cada extracto para el fraccionamiento de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con duodecilsulfato de sodio (SDS); las muestras se resuspendieron en un volumen igual de la solución amortiguadora de muestra (50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 15% SDS, 5% de β-

mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.1% de azul de bromofenol). Posteriormente las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham) y se bloquearon con leche al 5% en una solución de TBS-Tween-20 al 0.5% durante 1 hora a 37°C con agitación constante. El anticuerpo primario se agregó en una dilución 1:200 y se incubó a 4°C durante toda la noche. Las membranas se lavaron 5 veces por 5 min en TBS-Tween-20 al 0.5%. El anticuerpo secundario, acoplado a peroxidasa (Zymed) se adicionó en una dilución de 1:5000 en la solución de bloqueo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante. A continuación se realizaron tres lavados de 5 min cada uno en TBS 1X con 5% de Tween-20. La reacción de revelado se desarrolló con el reactivo Super Signal® West Pico (PIERCE) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-myogenina (M-225), anti-Sox8 (sc-20094), anti-Sox9 (sc-20095), anti-GAPDH (sc-20357), anti-MyHC (sc-20641) de Santa Cruz Biotechnology, y anti- α sarcoglicano (VP-A105) de Vector laboratory.

6.6 Ensayos de retardo

6.6.1. Obtención de extractos nucleares de células C2C12.

Se cosecharon 15×10^6 células lavando con PBS suplementado con inhibidores de proteasas. La pastilla fue resuspendida en 800 μ l de buffer A frío (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM de KCl, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM de PMSF) y la mezcla se incubó en hielo durante 15 min. Se agregaron 50

μl de NP-40 al 10% y se agitó durante 10 seg, posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto. La pastilla de núcleos fue resuspendida en 150 μl de buffer C (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M de NaCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM de PMSF) y los tubos se agitaron durante 15 minutos, se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 min, (Schreiber et al. 1989) almacenando el sobrenadante de extractos nucleares a -70°C hasta su uso.

6.6.2. Marcaje de la sonda.

Se mezclaron 5 pmoles de cada sonda complementaria de cadena sencilla en 10 μl de reacción. Se desnaturalizó a 96°C durante 5 min y posteriormente se alineó durante al menos 1.5 h a temperatura ambiente. La sonda de doble cadena fue purificada posterior a su corrimiento en un gel de acrilamida al 20% teñido con bromuro de etidio. La banda del tamaño correspondiente fue cortada y el producto purificado mediante electroelución en TBE 1X durante 2 horas a 80 volts. Después de la electroelución se cuantificaron las sondas para su marcaje. Para el marcaje se agregaron 1.28 ng de sonda alineada, 10 U de polinucleótido cinasa (Promega), 1 μl de buffer de cinasa 10X, 10 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ en un volumen final de 10 μl. La reacción se incubó por 30 min a 37°C y posteriormente a 60°C por 30 min para inactivar la cinasa. Finalmente la reacción se aforó a 100 μl totales.

Para la purificación de las sondas se utilizaron columnas centricep con sephadex G-50 (SIGMA). Las columnas fueron hidratadas con 500 µl de agua destilada durante 2 h, posteriormente se centrifugó durante 3 min a 3000 rpm y se colocó la reacción de marcaje sobre la columna de sephadex G-50. Se centrifugó bajo las mismas condiciones y el producto eluido se almacenó para los ensayos de retardo.

6.6.3. Geles de retardo.

Para evaluar la interacción del factor de transcripción Sox9 con sus sitios putativos de unión al DNA en el promotor, se realizaron ensayos de retardo utilizando las siguientes sondas: 822WT: 5'-AGCCAAACAATAGAATCC-3', 822MUT: 5'-AGCCACCGCCGGAGAATCC-3', 614WT: 5'-CGTGGAACAATGGCTCAGT-3', 614MUT: 5'-CGTGGCCGCGGGCTCAGTG-3', 213WT: 5'-ACCCATTGTGTGCACCAGGG-3', 213MUT: 5'-ACCCCGCCGGTCACCAGGG-3', donde la secuencia subrayada corresponde al sitio de unión al DNA de los factores Sox. Se mezclaron 8 µg de extractos nucleares, 12 µl de "gel shift buffer" (20 mM HEPES pH 7.9, 50 mM de KCl, 50 mM de MgCl₂, 5% de glicerol, 0.5 mM DTT, 1µg de poly dl-dC y 1 M de DTT), 1 µl de sonda marcada con ³²P (aproximadamente 1.28 ng) en un volumen final de 20 µl. Para inducir la competencia entre el DNA y las proteínas se agregaron 100, 200 y 300 ng de la sonda silvestre sin marcar. Las competiciones

se incubaron en hielo durante 15 min y a temperatura ambiente durante 15 min, posteriormente se agregó la sonda marcada y los tubos se incubaron nuevamente en las mismas condiciones. Posterior a las incubaciones, las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 6 %, y los productos se resolvieron por electroforesis a 140 Volts durante 5 h en TBE 0.5X en cuarto frío. Finalmente el gel fue secado durante 40 min y expuesto a una placa autoradiográfica. Después de 12 h de exposición, la placa fue revelada para evidenciar la formación de complejos DNA-proteína.

Por otra parte se generaron extractos transcripción traducción *in vitro* (TnT), empleando el sistema “Quick coupled Transcription/Translation System” (PROMEGA), de acuerdo con las instrucciones del proveedor, utilizando 500 ng de cada uno de los plásmidos de expresión utilizados. Para los geles de retardo y super retardo se añadieron 8 µl de los extractos TnT, 1 µl de la sonda marcada y 10 µg de anticuerpo específico.

6.7. Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).

El protocolo utilizado en este trabajo se describió anteriormente (Delgado-Olguín et al. 2004) y se realizó con algunas modificaciones. Se sembraron 20×10^6 células C2C12 en cajas de cultivo de 150 mm (CORNING) y se mantuvieron hasta confluencia del 80%. Posteriormente se adicionaron 2 ml de “buffer crosslinking” (11% formaldehído, 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 50 mM HEPES pH 8.0)

directamente al medio de cultivo, en un volumen final de 20 ml de medio para obtener una concentración final de formaldehído al 1%, seguido por una incubación de 10 min a temperatura ambiente. Subsecuentemente se detuvo el entrecruzamiento adicionando 1 ml de glicina 2.5 M, para obtener una concentración final de 125 mM y se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS frío. Los cultivos fueron lisados adicionando 1 ml de “buffer de lisis” (1% SDS, 10 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, PMSF, Aprotinina, Leupeptina y cocktail de inhibidores de proteasas) a cada caja e incubando de 3-5 min a 4°C. Transcurrido el tiempo se cosecharon las células y se transfirió la cromatina a un tubo falcon de 50 ml pre-enfriado en hielo.

El siguiente paso consistió en la sonicación de la cromatina bajo las siguientes condiciones: para MB, 14 pulsos de 30 seg, amplitud 35%; para MT 22 pulsos de 30 seg, amplitud 35% en un sonicador Branson modelo 250 (Figura 8). Una vez sonicada la cromatina, se midió la concentración de las proteínas en el lisado utilizando el reactivo de Bradford y se ajustó la concentración a 1 µg/µl, adicionando buffer de lisis. Se tomaron 400 µl de cromatina, se centrifugaron y el sobrenadante se llevó a un volumen final de 4 ml de una mezcla de 9 partes de “dilution buffer” (1% Tritón X-100, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 20 mM Tris HCl pH 8.0 suplementado con inhibidores de proteasas) y 1 parte del buffer de lisis (en este caso, los 400 µl de cromatina) en un tubo falcon de 15 ml. Se realizó una limpieza de la cromatina previo a la inmunoprecipitación, que consistió en agregar

25 μ l de perlas de proteína A/G durante 2 h a 4°C. Las perlas fueron bloqueadas de la siguiente manera: se mezclaron 0.2 g de proteína A (Amersham protein A sepharose CL-4B) y 100 μ l de perlas de proteína G (GE Healthcare protein G sepharose) en un volumen final de 2 ml consistentes de 9 partes de buffer de dilución y 1 parte de buffer de lisis. A esta mezcla se le adicionaron 100 μ g/ml de BSA y 500 μ g/ml de DNA de esperma de salmón previamente sonificado y cada tubo se mantuvo en rotación durante toda la noche a 4° C. Después de la incubación se retiró el buffer de las perlas y se lavaron dos veces con buffer de dilución. Una vez transcurrido el tiempo de limpieza de la cromatina se centrifugó a 800 rpm a 4°C, se tomó el sobrenadante y se colocó en un falcon de 50 ml.

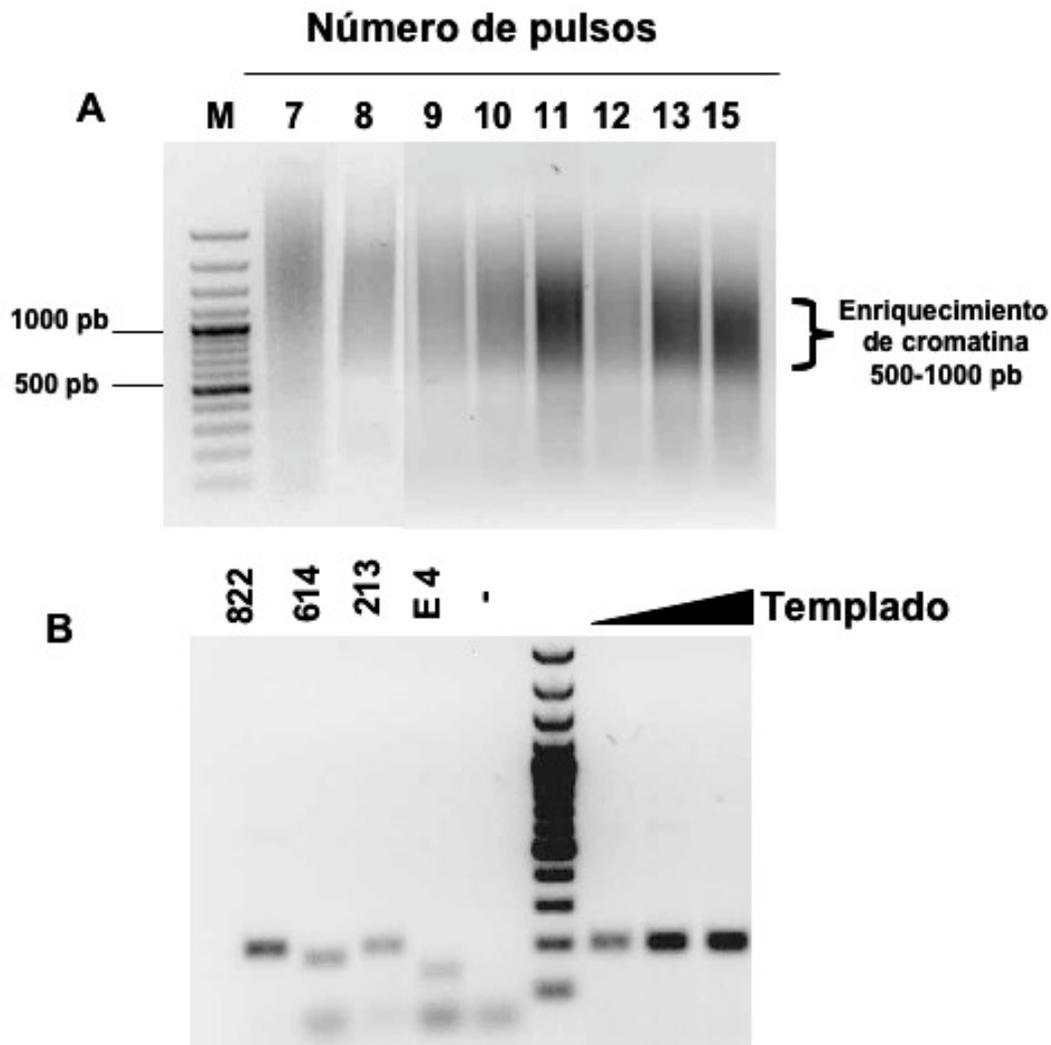


Figura 8. Estandarización de condiciones de sonicación y de PCR para inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).

A) Después de la aplicación de 15 pulsos de 30 segundos, se obtuvo la mayoría de la cromatina en fragmentos de un rango de 500-1000 pb. B) Las amplificaciones se realizaron empleando como templado DNA genómico obtenido de la sonicación de cromatina aislada de mioblastos C2C12. 822: fragmento de DNA de 202 pb, 614: fragmento de 179 pb, 213: fragmento de 205 pb, E4: fragmento del exón 4 de 133 pb. Escalera de 100 pb.

A la cromatina pre-lavada se le adicionaron 4 μg de anticuerpo para llevar a cabo la inmunoprecipitación, dejando rotación a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se agregaron 50 μl de perlas bloqueadas a cada inmunoprecipitación y se incubó durante 2 h a 4°C en un agitador rotatorio. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron los tubos a 2000 rpm durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de “wash buffer” (1% Tritón X-100, 0.1% SDS 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, suplementado con inhibidores de proteasas) y se transfirió a un tubo eppendorf. Posteriormente se lavó tres veces mas con 1 ml de “wash buffer” a 2000 rpm y finalmente se lavó con 1 ml de “final wash” (1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 500 mM NaCl, 2mM EDTA pH 8.0, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, suplementado con inhibidores de proteasas). Para eluir las inmunoprecipitaciones se adicionaron 450 μl de elution buffer (1% SDS, 100 mM NaHCO_3) y 500 $\mu\text{g/ml}$ de proteinasa K y RNasa A y se incubó a 37°C durante 30 min. Adicionalmente se tomaron 400 μl de cromatina sin inmunoprecipitar y se realizó el mismo tratamiento (INPUT). Una vez concluida la incubación, se purificó el DNA utilizando columnas Qiagen mini-elute y se resuspendió con 50 μl de agua estéril para usar como templado para la amplificación por PCR.

Se amplificaron las regiones correspondientes a la region del modulador, las secuencias que contienen los sitios de unión a los factores Sox, así como una región correspondiente al exón 4 del gen de α -SG (Fig. 15A). Cada uno de los

productos de PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 min de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de amplificación con los siguientes pasos: 45 seg de desnaturalización a 94°C, 30 seg de alineamiento a 62°C y 30 seg de extensión a 72°C, y un paso final de 7 min a 72°C. Todos los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

7. RESULTADOS

7.1. Sox9 y α -SG presentan un patrón de expresión mutuamente excluyente durante la diferenciación miogénica.

Los mecanismos mediante los cuales la represión del gen α -SG es mantenida durante las etapas tempranas de la diferenciación muscular han sido poco explorados. Lo anterior es muy importante si consideramos el hecho de que la regulación de los SGs puede ser crítica para el correcto ensamblaje del complejo SG-SSPN y por lo tanto, repercutir en la integridad del sarcolema. Con base en lo anterior, realizamos una búsqueda de posibles elementos que participen en la regulación transcripcional del gen α -SG, utilizando el software MatInspector (Quandt et al. 1995). Entre otros elementos, nuestro análisis reveló la presencia de tres sitios putativos de unión a los factores de transcripción Sox a lo largo de 2.6 kb del promotor del gen α -SG, lo cual resultó muy interesante pues existen reportes previos que señalan a los factores transcripcionales Sox8 y Sox9 como importantes represores de la expresión de genes musculares (Schmidt et al. 2003). Inicialmente analizamos el patrón de expresión del factor transcripcional Sox9 y su relación con la expresión de marcadores de diferenciación miogénica como cadena pesada de la miosina (MyHC), miogenina así como de la proteína α -SG mediante ensayos de inmunodetección. Por inmunofluorescencia indirecta

encontramos fuerte señal del factor Sox9 en MB C2C12 y en MT diferenciados durante 2 días (Fig. 9A). La expresión de α -SG, miogenina y MyHC es regulada positivamente durante la diferenciación muscular, como puede observarse en MT diferenciados y no en MB. Para evidenciar la morfología de las células diferenciadas usamos el marcador de membrana, y miembro del complejo DGC, β -dystroglicano, cuya expresión es ubicua durante el proceso de diferenciación miogénica, además del factor transcripcional MyoD, cuya señal se localiza en el núcleo de MB y MT. Aunado a esto, nos interesó conocer mas detalladamente el patrón de expresión de los factores de transcripción durante la diferenciación muscular; para ello se obtuvieron extractos de proteínas totales de MB y MT C2C12 diferenciados durante 2, 4, 6 y 8 días y realizamos Western blot con anticuerpos específicos para cada proteína. Observamos que la presencia del factor Sox9 es específica de un estadio no diferenciado y, la señal disminuye dramáticamente en el día 4 de diferenciación, lo cual correlaciona con la presencia de la proteína α -SG en este mismo estadio (Fig. 9B). Esto es interesante pues el nivel de actividad del promotor de este gen presenta un máximo de actividad en el día 4 de diferenciación lo cual es un indicio de una posible regulación negativa del factor Sox9 sobre la expresión del gen α -SG . Los marcadores de diferenciación MyHC y miogenina son detectados en mayor abundancia en los últimos estadios de diferenciación analizados, lo que confirma la eficiencia de diferenciación de nuestro modelo celular.

7.2. Sox9 es un represor de la expresión del gen α -SG.

Sabiendo que la presencia del factor transcripcional Sox9 y la expresión del gen α -SG presentan un patrón mutuamente excluyente, nuestra siguiente pregunta fue si el factor transcripcional Sox9 afecta negativamente la expresión del gen de α -SG y de los demás miembros del complejo SG-SSPN en células C2C12. Para ello, analizamos el nivel de expresión de α -, β -, γ -, δ - SGs y de sarcospán, mediante RT-PCR semicuantitativo en RNA obtenido de cultivos establemente transfectados con un vector de expresión que contiene el cDNA del factor Sox9, así como de células control transfectadas con el vector vacío. En la figura 10A se muestra que los niveles de mRNA de α -SG disminuyen un 60% en cultivos de MB que sobre-expresan Sox9, comparados con los cultivos control (Fig. 10A y 10B). Cuando analizamos el mRNA de α -SG en MT establemente transfectados con Sox9, no encontramos diferencias significativas. De forma interesante, observamos una disminución del 50% en los niveles de expresión de sarcospán en MB, mientras que en MT observamos una disminución del 20%. La expresión de δ -SG disminuyó el 20% tanto en MB como en MT.

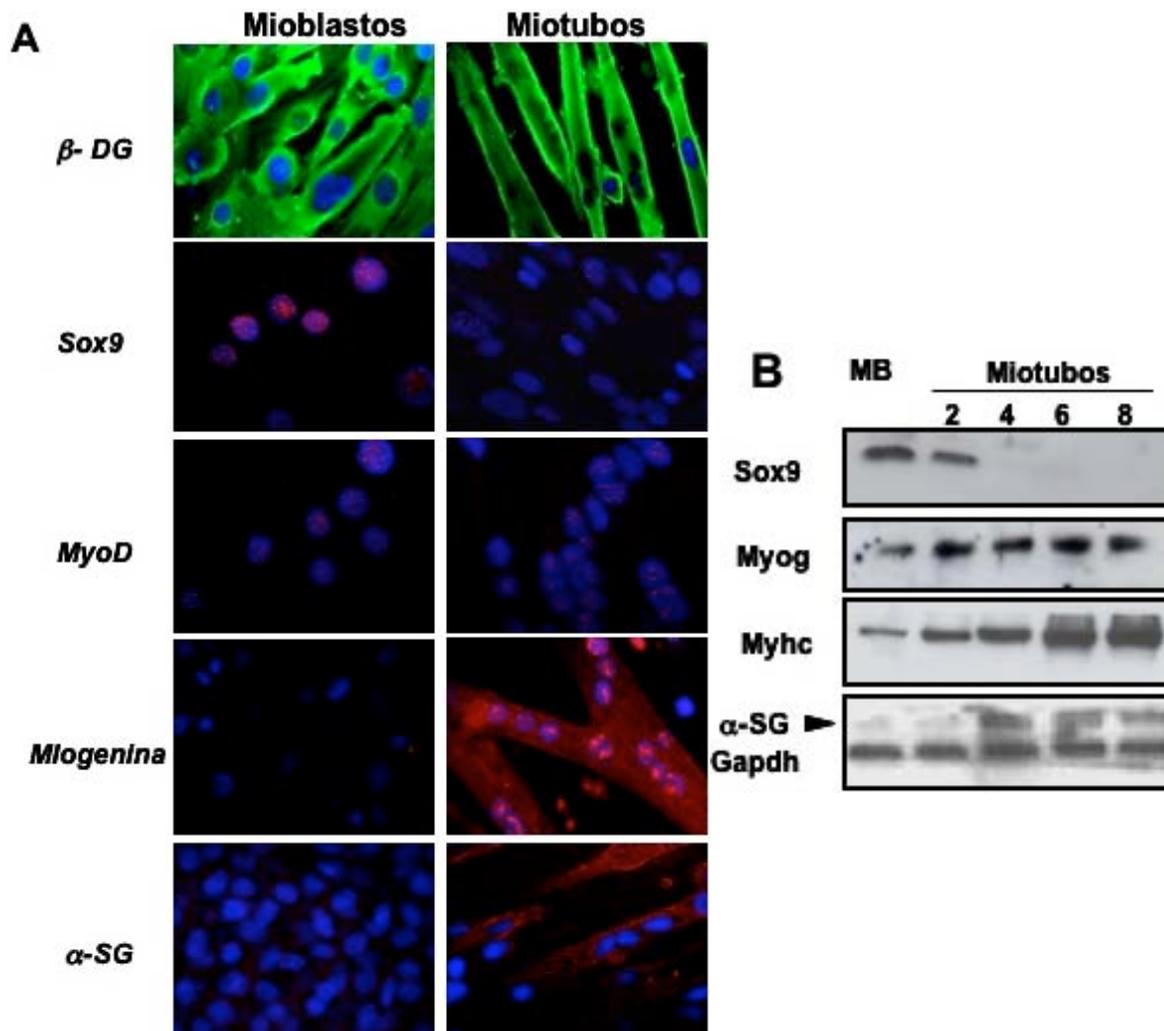


Figura 9. α -SG y Sox9 presentan un patrón de expresión diferencial.

A) Identificación de las proteínas β -DG, Sox9, MyoD, Miogenina y α -SG mediante inmunofluorescencia, en MB (izq) y MT al cuarto día de diferenciación (der). B) El análisis mediante Western blot mostró una disminución de la abundancia de Sox9 después de 2 días de diferenciación y por el contrario, abundante señal en los extractos de mioblastos y miotubos diferenciados por 2 días. Miogenina y MyHC incrementan durante la diferenciación y α -SG es evidente hasta el día 4 de diferenciación. GAPDH fue utilizado como un control de normalización.

Los datos anteriores demuestran que Sox9 tiene un efecto represor de la expresión con un mayor impacto sobre el gen α -SG en MB C2C12.

El siguiente aspecto fue analizar el efecto de la sobreexpresión de Sox9 sobre la actividad del promotor del gen α -SG mediante ensayos funcionales. Para ello realizamos transfecciones transitorias del promotor de 2.6 kb (construcción F1B) en células que expresan de manera estable el factor de transcripción Sox9. Como se muestra en la figura 11A la actividad del promotor del gen α -SG disminuyó en estos cultivos, comparado con los cultivos control. En contraste, la actividad del promotor en MT fue muy similar en ambas condiciones, esto es consistente con los resultados de RT-PCR, donde el mRNA del gen α -SG no cambia significativamente en MT que sobreexpresan Sox9. Estos datos sugieren que la actividad represora mediada por Sox9 sobre el promotor del gen α -SG es específica de etapas tempranas de la diferenciación muscular. Para confirmar lo anterior, analizamos la actividad del promotor del gen α -SG en células C2C12 deficientes del factor Sox9, obtenidas mediante la transfección de un shRNA de interferencia dirigido contra Sox9. Como se puede observar en la figura 11B, la disminución en los niveles peptídicos del factor Sox9 resultó en el aumento de cerca de 2.5 veces la actividad del promotor del gen α -SG, con respecto a la actividad del promotor en células transfectadas con un shRNAi aleatorio, usado como control negativo. Por otra parte, la transfección del shRNAi-Sox9 resultó en la disminución de aproximadamente el 70% de los niveles de la proteína Sox9, con

respecto a lo encontrado en los extractos control. De forma relevante observamos el aumento en los niveles de MyHC y de miogenina como resultado de dicha inhibición. En conjunto, estos datos indican que en etapas tempranas de la diferenciación muscular, Sox9 actúa como un regulador negativo de la expresión del gen α -SG.

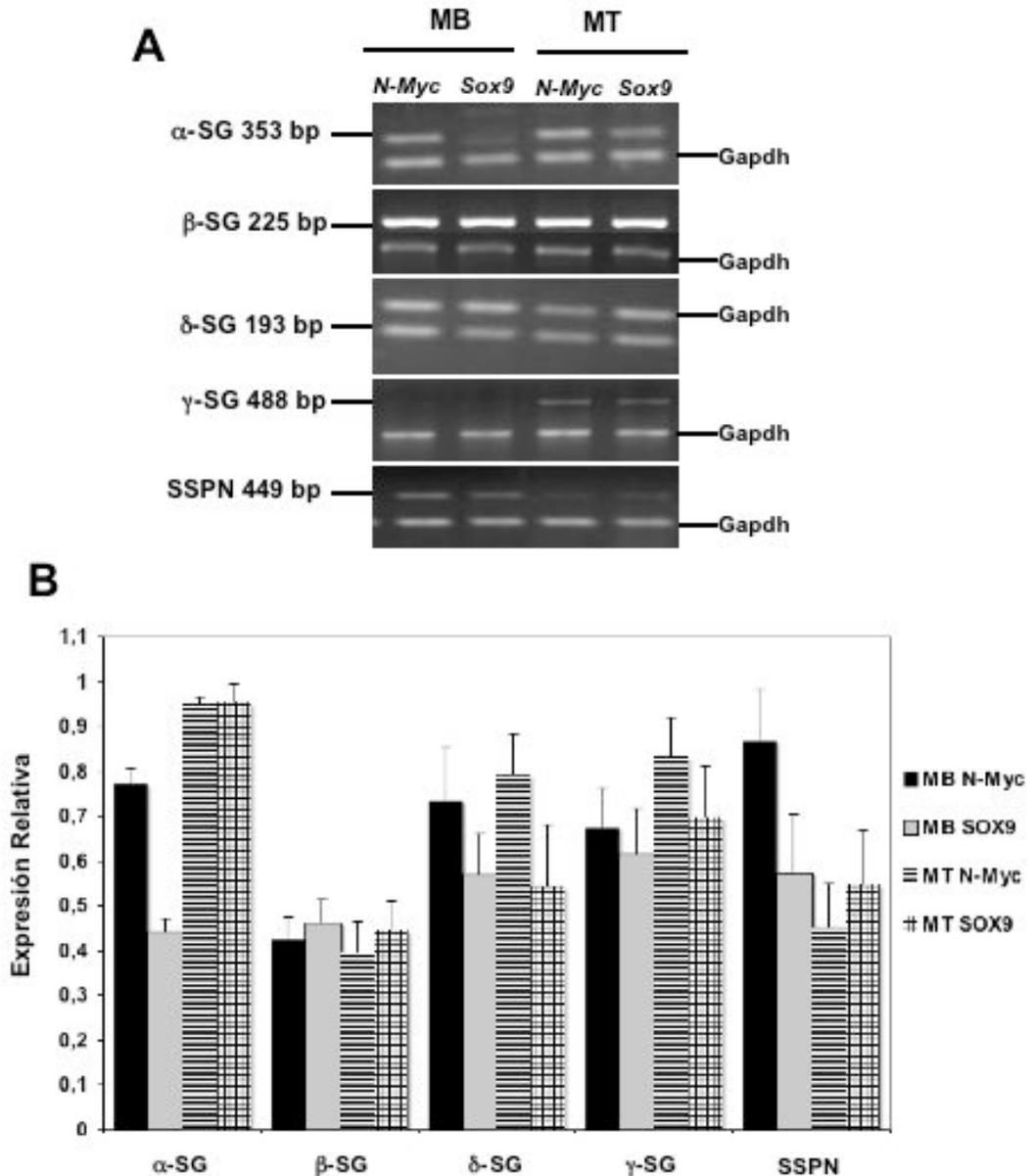


Figura 10. Sox9 regula negativamente la expresión del gen α -SG en MB C2C12.

A) Análisis semicuantitativo de la expresión de los genes α -, β -, γ -, δ - SGs y SSPN mediante RT-PCR, a partir de RNA obtenido de MB y MT establemente transfectados con Sox9 o un plásmido vacío. B) Análisis densitométrico de los niveles de expresión, relativo a la señal de GAPDH, usado como control endógeno.

7.3. La represión del promotor del gen α -SG es mediada por tres sitios de unión a Sox.

Como un primer abordaje para conocer un posible mecanismo por el cual Sox9 reprime la expresión del gen de α -SG, transfectamos células C2C12 con construcciones con eliminaciones progresivas que incluyen los sitios de unión a Sox presentes en el promotor. Como se observa en la figura 12, los tres sitios se localizan a 213 pb, 614 pb y 822 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción.

En MB, la eliminación del sitio 822 provocó un ligero incremento en la actividad del promotor del gen α -SG, sin embargo, cuando se eliminó una región del promotor que contiene el sitio 614, observamos un incremento notable de aproximadamente 4 veces su actividad. La eliminación del sitio 213, dio como resultado el incremento de 6 veces la actividad del promotor. Por lo tanto, los resultados obtenidos de MT transfectados (Fig. 12), nos sugieren un probable efecto regulador de los sitios 822 y 213 sobre el promotor, mientras que el sitio 614 no parece influir en dicha regulación. Es posible que otros factores Sox como Sox6 y Sox15 tengan un efecto en la regulación de α -SG en MT (Beranger et al. 2000; Lee et al. 2004; Nobuko Hagiwara 2005; Nobuko Hagiwara 2007). Los datos mostrados anteriormente, sugieren que las secuencias 822, 614 y 213 median la represión del promotor del gen α -SG a través de Sox9 en MB C2C12.

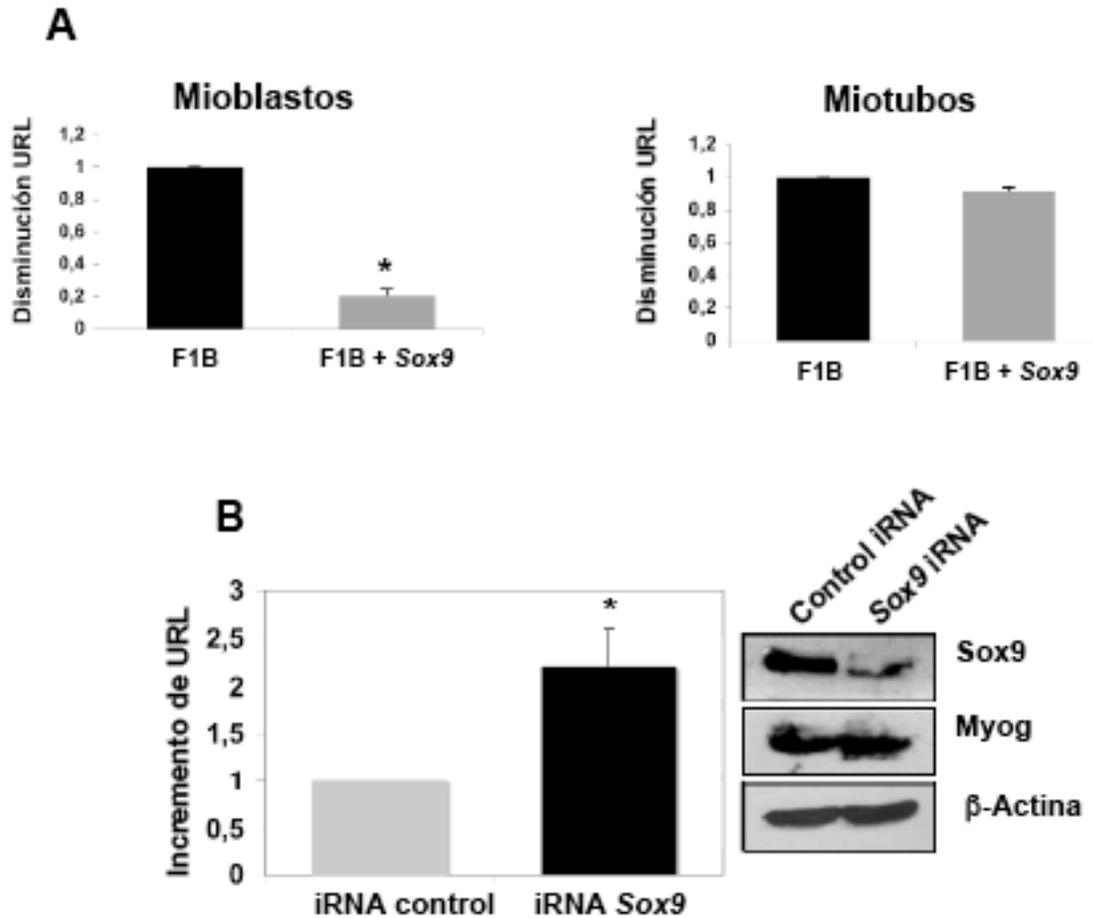


Figura 11. Sox9 regula negativamente la actividad del promotor del gen α -SG en MB.

A) La transfección del cDNA de Sox9 causó la disminución de 5 veces la actividad del promotor (F1B) en MB pero no en MT. B) La transfección de un RNAi contra Sox9, causó el incremento de 2 veces la actividad del promotor, comparado frente a la actividad de F1B cotransfectado con un RNAi aleatorio. El análisis de Western blot demostró la disminución en la concentración de la proteína Sox9 en un 70%, frente a los cultivos control. Consistente con esto, la señal de miogenina y MyHC se observa incrementada específicamente en los cultivos RNAi-Sox9.

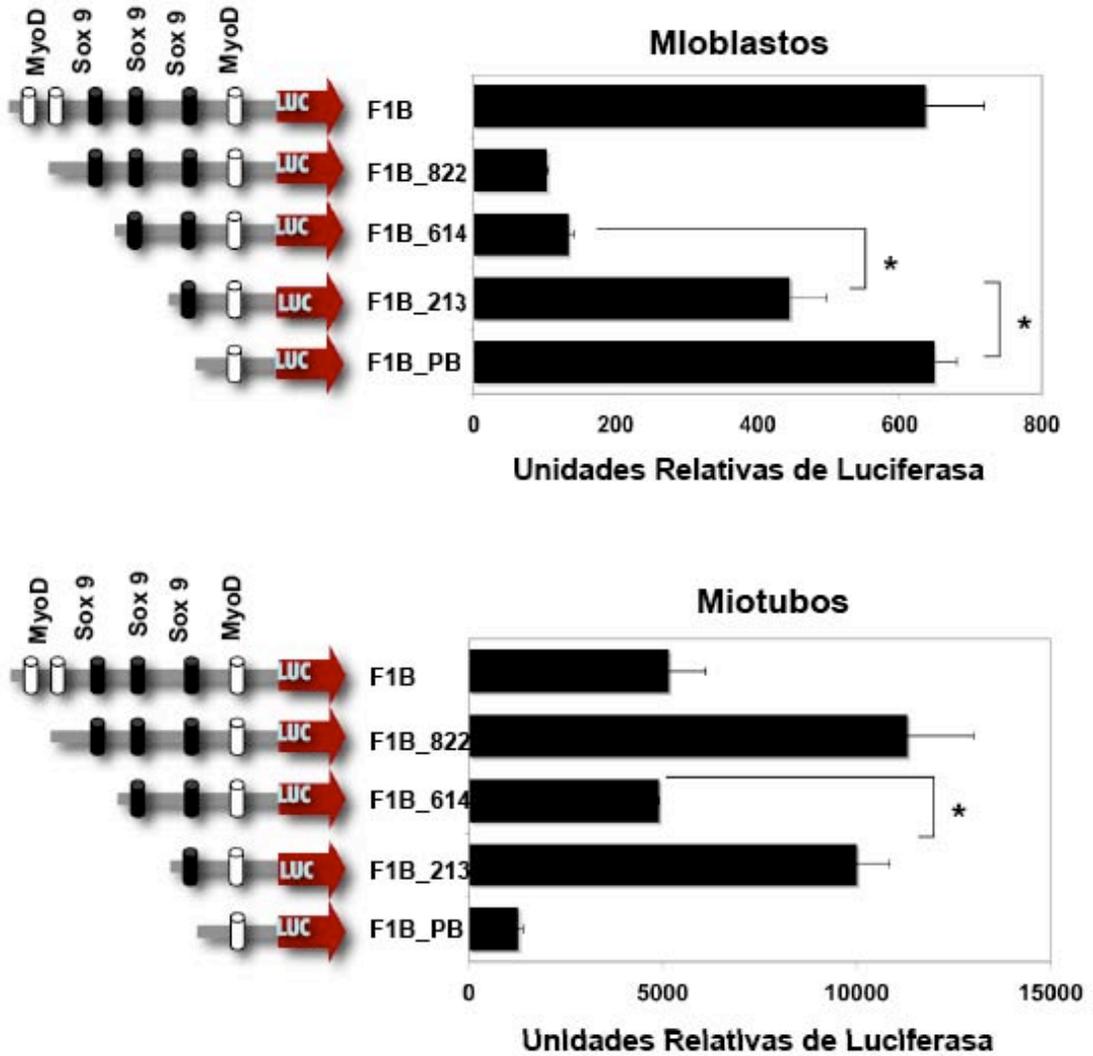


Figura 12. La actividad del promotor del gen α -SG es regulada positivamente cuando se eliminan sitios de unión a Sox9.

La represión del promotor del gen α -SG es mediada por tres sitios en el promotor específicamente en MB. *P<0.05.

7.4. El factor transcripcional Sox9 interacciona físicamente con tres sitios de unión en el promotor del gen α -SG.

Para analizar la funcionalidad de los sitios de unión a Sox presentes en el promotor del gen α -SG, realizamos ensayos de retardo empleando como sondas oligonucleótidos complementarios marcados radiactivamente con [32 P] γ -dATP, las cuales incluyen las secuencias silvestres así como mutaciones en los sitios de unión a Sox correspondientes a los elementos 822, 614 y 213 (Fig. 13C). Como se observa en la figura 13A, las sondas incubadas con extractos nucleares de MB C2C12 (líneas 2, 7 y 12), generaron complejos DNA-proteína, los cuales fueron competidos con la adición de un exceso de sonda silvestre no marcada (Fig. 13A, líneas 3, 8 y 13) mientras que dichos complejos no fueron alterados al adicionar cantidades crecientes de las sondas cuyo sitio de unión a Sox fue mutado (Fig. 13A, líneas 4, 5, 9, 10, 14 y 15). Lo anterior sugiere la presencia de proteínas Sox dentro de los complejos observados con las sondas empleadas. La interacción *in vitro* de Sox9 con los sitios 822, 614 y 213 fue confirmada al observar la generación de complejos como resultado de la incubación de cada una de las sondas con extractos obtenidos mediante ensayos de Transcripción-Traducción *in vitro* (Fig. 13B, líneas 2, 5 y 8), previamente validadas mediante Western blot (Fig. 13D). Aunado a esto, observamos la formación de complejos super-retardados al adicionar un anticuerpo específico anti-Sox9 (Fig. 13B, líneas 3, 6 y 9), mientras que la adición de anticuerpo inespecífico o de un anti-Sox8 (Fig. 13B, líneas 11 y

12), no afecta el corrimiento electroforético de los complejos. Estos resultados indican que el factor transcripcional Sox9 interacciona *in vitro* con los tres sitios de unión presentes en el promotor.

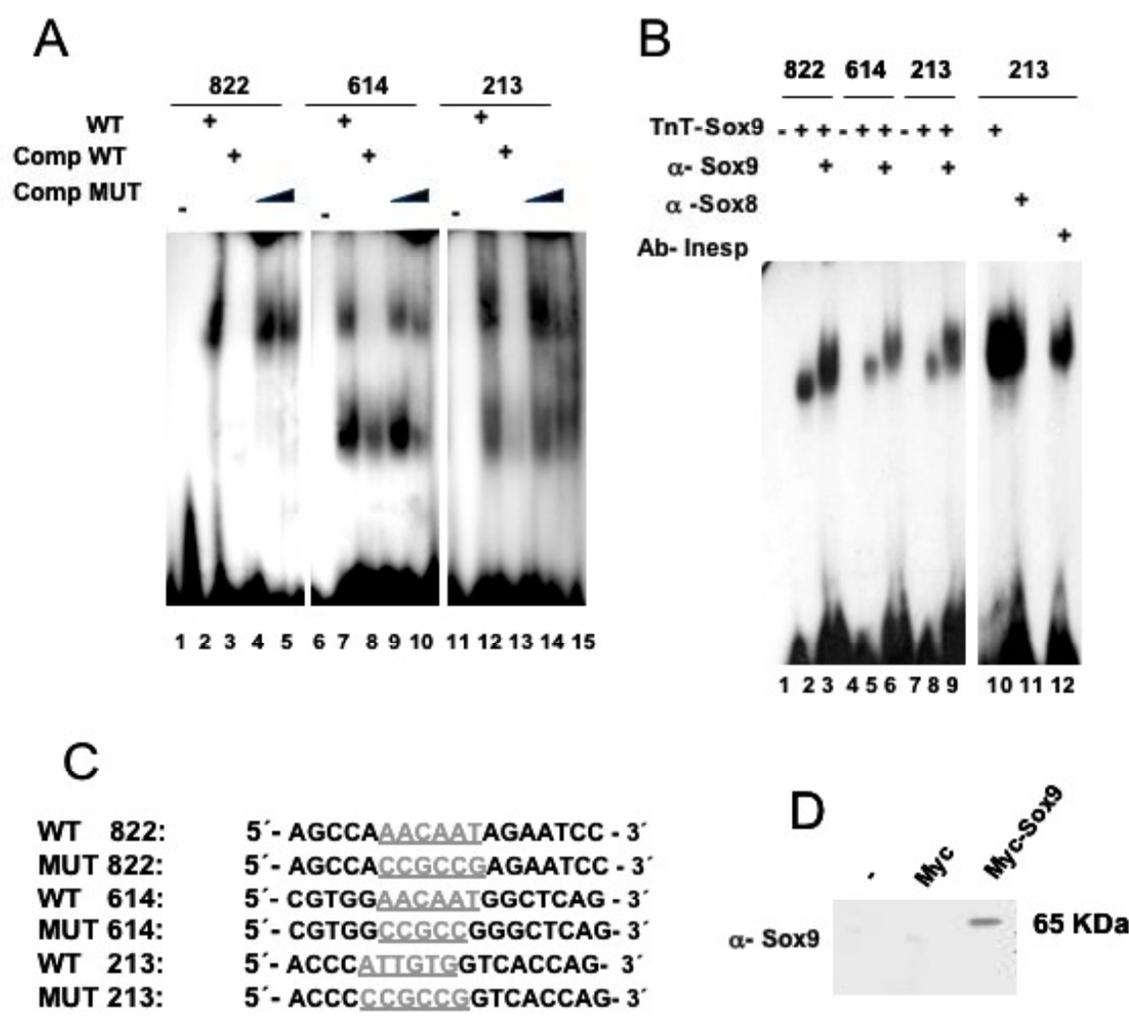


Figura 13. Sox9 interacta in vitro con tres elementos de unión en el promotor del gen α -SG.

A) Ensayo de retardo usando sondas que incluyen los elementos 822, 614 y 213. Las proteínas nucleares de MB C2C12 interactúan con los tres sitios de unión (líneas 2, 7 y 12), formando complejos que son específicamente competidos cuando se añade un exceso de sonda sin marcar (líneas 3, 8 y 13), mientras que la adición de un exceso de sonda mutante, no tiene efecto en la formación de complejos (líneas 4, 5, 9, 10, 14 y 15). Las líneas 1, 6 y 11 corresponden a sondas libres. B) Ensayos de retardamiento usando extractos obtenidos mediante transcripción-traducción *in vitro* de Sox9 (TnT-Sox9) y las sondas 822, 614 y 213 (líneas 2, 5 y 8), los cuales fueron super-retardados por la adición de un anticuerpo anti-Sox9 (líneas 3, 6 y 9) pero no por la adición de un anticuerpo anti-Sox8 o un anticuerpo inespecífico (líneas 11 y 12). C) Se muestran subrayadas las secuencias consenso y mutantes de los sitios de unión a Sox. D) El análisis de Western blot del factor Sox9 obtenido mediante TnT *in vitro* muestra señal específica de 65 kDa correspondiente a Sox9 (Myc-Sox9). No se detectó señal al utilizar un vector sin cDNA del factor Sox9 (Myc) o sin la adición de plásmido (-).

7.5. Los sitios de unión a Sox son esenciales para mediar la represión del gen α -SG inducida por Sox9.

Una vez demostrada la unión in vitro a ciertas secuencias del promotor del gen α -SG, decidimos investigar la contribución de cada uno de los sitios de unión a los factores Sox en el control transcripcional del gen α -SG. Para ello, transfectamos células C2C12 con construcciones del promotor que contienen mutaciones puntuales que eliminan el sitio de unión a Sox en el contexto de la construcción F1B (2.6 kb), la cual dirige la expresión del reportero luciferasa (Fig. 14). Los resultados mostraron que la mutación del sitio 213 causó el incremento de 3.7 veces la actividad de luciferasa (línea 2), comparado con el promotor silvestre (línea 1). La mutación del sitio 822, provocó el incremento de 1.9 veces la actividad de promotor (línea 3), mientras que con la mutación de los sitios 213 y 822 observamos un aumento de 7.8 veces la actividad del promotor (línea 4). De forma interesante, la mutación conjunta de los tres sitios de unión contribuyó al incremento de la actividad del promotor en 20 veces, con respecto al promotor silvestre (línea 5). Estos datos fueron consistentes con el hecho de que la sobreexpresión del factor Sox9, no inhibe de manera significativa la actividad de la construcción triple mutante del promotor, lo que indica que los sitios 213, 614 y 822 son sumamente importantes para inducir la represión del gen α -SG mediada por el factor Sox9.

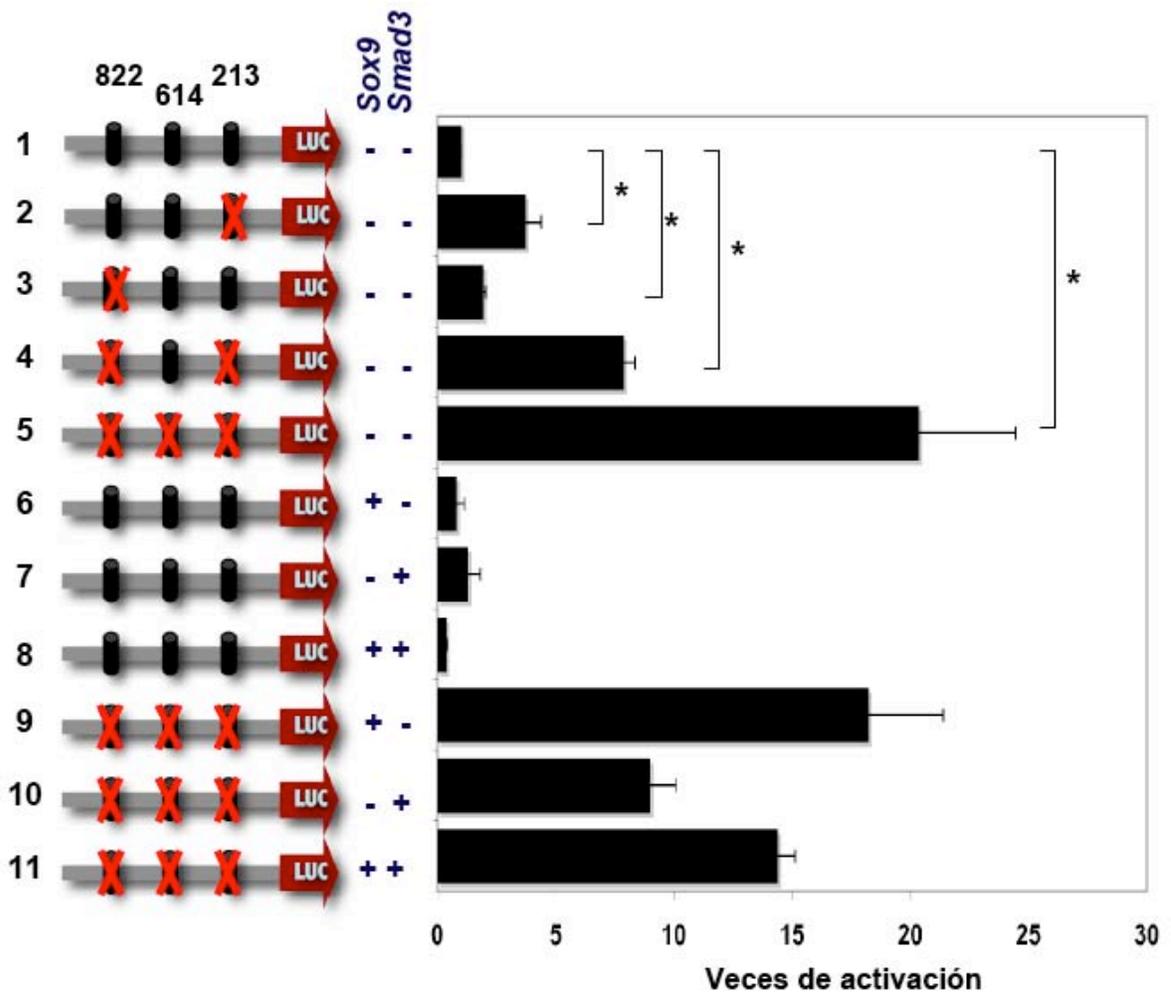


Figura 14. Los sitios de unión a Sox son requeridos para la represión cooperativa del promotor del gen α -SG por Sox9 y Smad3.

Actividad de luciferasa de construcciones donde los sitios 822, 614 y 213 fueron mutados tanto individualmente y en combinación en una serie de construcciones (panel izquierdo), y transfectados en células C2C12 en presencia o ausencia de Sox9 y Smad3.

7.6. Sox9 reprime la actividad el promotor del gen α -SG de manera independiente de MyoD.

Nuestros resultados muestran que el promotor del gen α -SG, el cual contiene sitios funcionales de unión al factor miogénico MyoD (Delgado-Olguín et al. 2006), es regulado negativamente por Sox9. Con base en el hecho de que los factores transcripcionales Sox8 y Sox9 inhiben la actividad del promotor de miogeneina, independientemente de la presencia de sitios de unión a Sox en su promotor y probablemente interfiriendo con el potencial de *trans*-activación de MyoD (Schmidt et al. 2003), nos planteamos la posibilidad de que Sox9 regule negativamente la expresión del gen α -SG al afectar el efecto positivo ya conocido de MyoD. Con esta idea, transfectamos MB C2C12 con plásmidos de expresión de MyoD o Sox9, con construcciones del promotor completo (F1B), el promotor sin sitios de unión a Sox pero con sitios de unión a MyoD (Del_131), y al promotor sin sitios de unión a Sox ni a MyoD (Del_PB) (Fig. 15). Nuestro grupo de trabajo demostró previamente que MyoD *trans*-activa estas tres versiones del promotor (Delgado-Olguín et al. 2006). De acuerdo con nuestros experimentos previos, Sox9 inhibe la actividad de la construcción F1B, mientras que las construcciones Del_131 y Del_PB no responden a la sobreexpresión de Sox9 (Fig. 15, construcciones Del_131 y Del_PB). De forma interesante, Sox9 no contrarresta el efecto activador de MyoD sobre las construcciones Del_131 y Del_PB, las cuales responden positivamente a la sobreexpresión de MyoD. Estos datos apoyan la

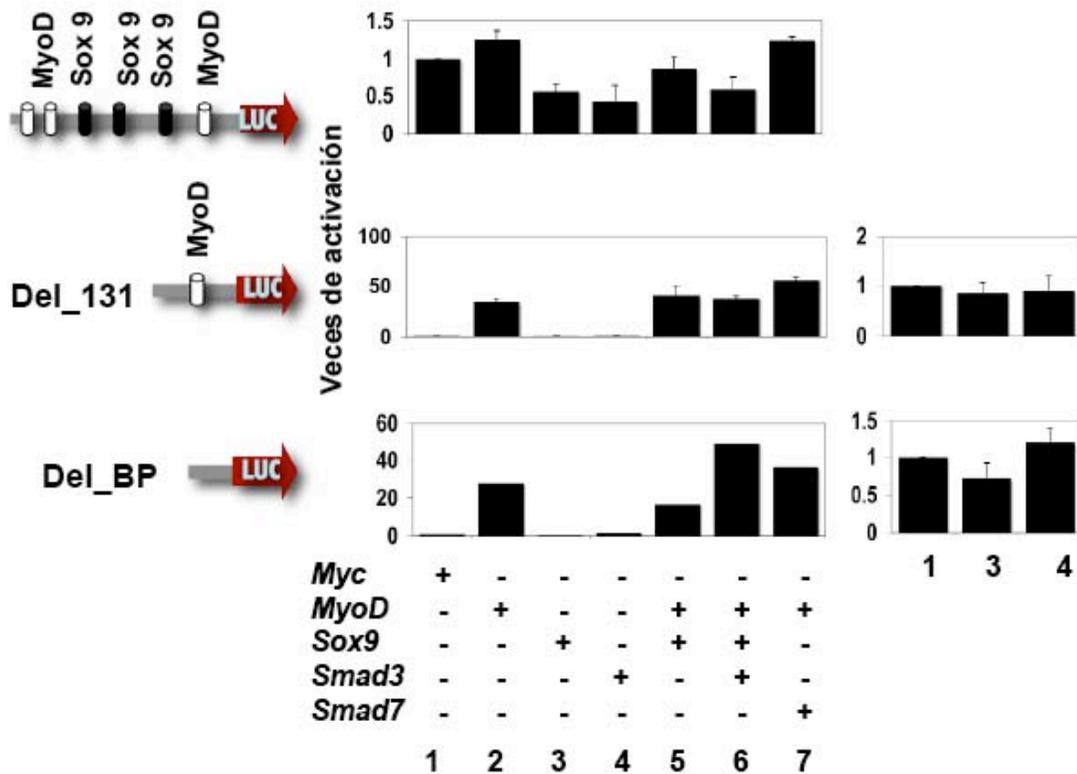


Figura 15. La regulación negativa de Sox9 sobre el promotor del gen α -SG es independiente de MyoD. Cotransfecciones del promotor del gen α -SG (F1B), una construcción con un sitio de unión a MyoD (F1B_131) y el promotor basal (F1B_BP) con diferentes combinaciones de plásmidos de expresión de los factores MyoD, Sox9, Smad3 y Smad7.

hipótesis de que el efecto negativo de Sox9 sobre la actividad del promotor del gen α -SG es mediado por los elementos 213, 614 y 822, y no a través de la inhibición del potencial de *trans*-activación de MyoD.

7.7. TGF- β regula negativamente la actividad del promotor del gen α -SG e incrementa el potencial de *trans*-represión del factor transcripcional Sox9.

Varias líneas de evidencia indican que células mesenquimales indiferenciadas, pueden diferenciarse en condrocitos, osteoblastos, adipocitos y miocitos (Bettex-Galland 1987 ; Iwata 1993; Matsushita et al. 2004). Por otra parte sabemos que la línea celular mioblastica de ratón C2C12, puede ser diferenciada hacia linajes osteogénicos y adipogénicos bajo el estímulo adecuado (Gutierrez J, 2006). Esto sugiere la presencia de algún grado de plasticidad que permanece después de la diferenciación miogénica. Con respecto a esto, se ha reportado que la miogénesis es inhibida por la vía de señalización de TGF- β (Olson et al. 1986; Liu et al. 2004; Matsushita et al. 2004; Zhu et al. 2004), mientras que favorece la diferenciación condrogénica, a través de un mecanismo que involucra la interacción directa de Sox9 y pSmad3 en regiones reguladoras de genes blanco (Furumatsu et al. 2005a). Habiendo demostrado que Sox9 regula negativamente la expresión del gen α -SG, decidimos investigar si la vía de TGF- β contribuye con la regulación negativa de la expresión del gen α -SG a través del factor transcripcional Smad3. Para ello cotransfectamos la construcción F1B con

vectores de expresión de los factores Sox9, Smad3 y Smad7. Como se observa en la figura 16A (líneas 1, 2 y 3) , la actividad de la construcción F1B es reprimida por Sox9 y Smad3, y esta inhibición es mayor cuando cotransfectamos ambos factores (Fig. 16A, línea 5). Es importante mencionar que el análisis *in silico* de la secuencia promotora del gen α -SG no reveló sitios de unión a Smad (SBEs), lo que sugiere que Smad3 pudiera ser reclutada por Sox9. Esta idea es apoyada por el hecho de que tanto Sox9 como Smad3 fueron incapaces de silenciar las construcciones Del_131 y Del_PB, en los cuales se eliminaron los sitios de unión a Sox (Fig. 13B, líneas 1-4). Además de que la versión del promotor con los tres sitios Sox mutantes no es inhibida por Sox9 y discretamente por Smad3.

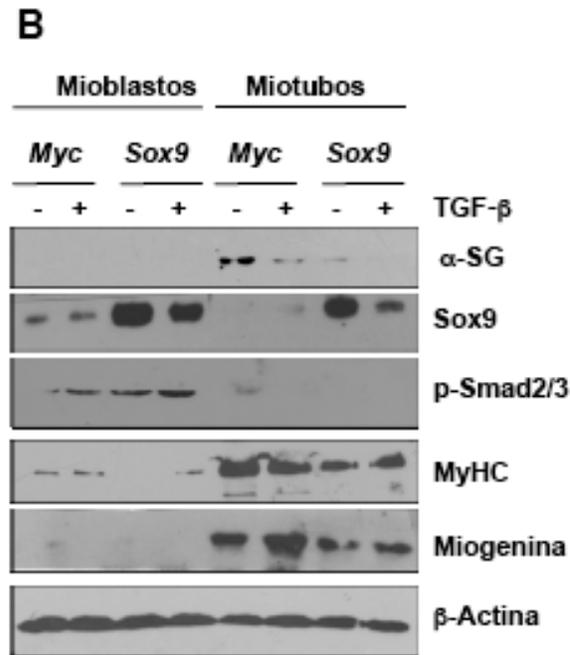
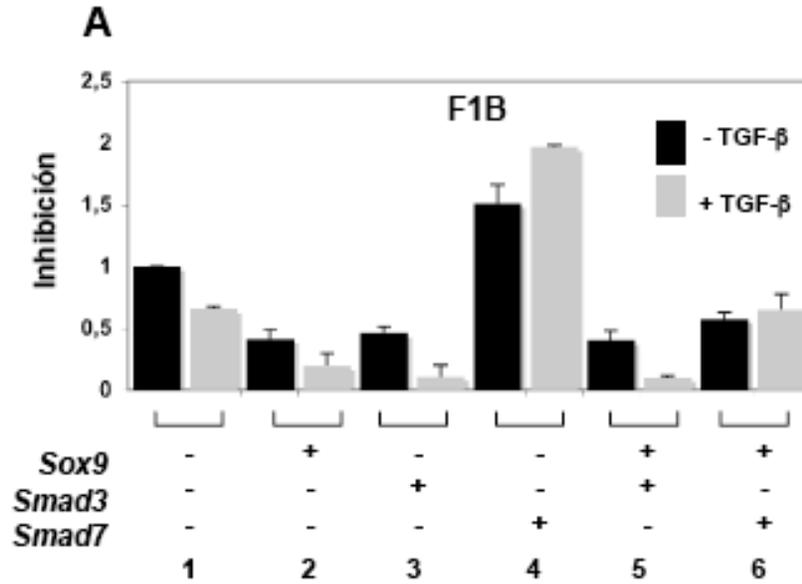


Figura 16. TGF- β incrementa el potencial de trans-represión de Sox9 sobre la actividad del promotor del gen α -SG, a través de Smad3. A) El promotor del gen α -SG (F1B) fue cotransfectado en células C2C12 con plásmidos de expresión de los factores Sox9, Smad3 y Smad7 en presencia (+TGF- β) o ausencia (-TGF- β) de TGF- β . B) Western blot de proteínas obtenidas de células establemente transfectadas con Sox9 o un vector vacío (N-Myc), estimuladas con TGF- β , se muestra la presencia de α -SG, Sox9, p-smad2/3, MyHC, miogenina y b-actina.

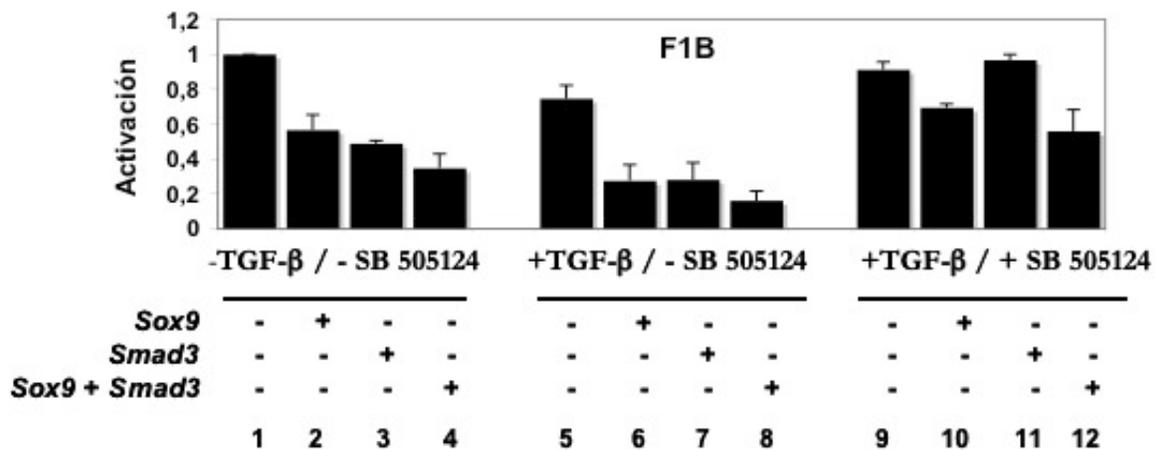


Figura 17. La regulación negativa de TGF-β sobre el promotor del gen α-SG es específica del receptor tipo I. Células transfectadas como se indica en la figura 16A, fueron cultivadas en presencia o ausencia de TGF-β y un inhibidor del receptor tipo I de TGF-β SB55124.

Ya que Smad3 es un efector de la vía de TGF- β (Shi y Massague 2003), decidimos analizar si TGF- β regula negativamente la expresión del gen α -SG. Para ello, cotrasfectamos el promotor completo (F1B) en combinación con plasmidos de expresión de Smad3, Smad7 y Sox9 en presencia o ausencia de TGF- β . La adición de TGF- β a los cultivos celulares, induce un ligero silenciamiento de la actividad de la construcción F1B, probablemente por la activación del Smad3 endógeno (Fig. 16A, línea 1, barra clara). TGF- β incrementó el efecto de represión ejercido por Sox9 y Smad3 sobre F1B observando niveles basales de luciferasa (Fig. 16A, líneas 2, 3 y 5, barras claras). Lo anterior sugiere que TGF- β señala a través de Smad3 y Sox9 para reprimir la actividad del promotor del gen α -SG. Lo anterior es consistente con el hecho de que la sobreexpresión de Smad7, una Smad inhibitoria de la señalización de Smad3 (Shi y Massague 2003), provoca un aumento en la actividad de promotor, siendo mas evidente al adicionar TGF- β al cultivo celular (Fig. 16A, línea 4). Sin embargo, el estímulo de Smad7 no es suficiente para contrarrestar el efecto negativo de Sox9 y Smad3 (Fig. 16A, línea 6).

Con el objetivo de confirmar la participación de Smad3 como efector intracelular de la vía de TGF- β , el cual regula negativamente la expresión del gen α -SG, analizamos los niveles de p-Smad3, de Sox9, α -SG, MyHC y miogenina en cultivos celulares establemente transfectados con Sox9 o cultivos control transfectados con el vector vacío. Como se observa en la figura 16B, la señal de

Sox9 es claramente mayor en MB que sobreexpresan Sox9 con respecto a los cultivos control (Fig. 16B, líneas 3, 4, 7 y 8), mientras que en MT detectamos señal específica de Sox9, únicamente en los cultivos estables (Fig. 16B, líneas 7 y 8). Por otro lado, la señal correspondiente a pSmad3 incrementó en MB después del estímulo con TGF- β (Fig. 16B, líneas 1-4), pero no en miotubos. De forma inesperada, la sobreexpresión de Sox9 parece favorecer la fosforilación de Smad3 específicamente en MB y no en MT (Fig. 16B, líneas 1 y 3). De forma interesante observamos que la activación de TGF- β en miotubos, provoca una dramática disminución en los niveles de la proteína α -SG, llegando a ser indetectable en miotubos que expresan de forma estable el factor transcripcional Sox9. Es importante mencionar que la proteína pSmad3 no fue detectada en miotubos, aún cuando los cultivos fueron estimulados con TGF- β . Lo anterior podría hablar sobre la presencia de vías de señalización independientes de Smads, que medien el efecto de TGF- β en miotubos C2C12.

Para confirmar la participación de la vía de TGF- β en la regulación negativa de la actividad del promotor del gen α -SG, analizamos la actividad de la construcción F1B co-transfectada con Sox9 y Smad3 en presencia del inhibidor SB505124 específico del receptor tipo I (receptores ALK4, ALK5 y ALK7) de TGF- β (T β RI) (DaCosta et al. 2004). Consistente con resultados previos, Sox9 y Smad3 reprimen la actividad del promotor del gen α -SG, efecto que fue exacerbado mediante la adición de TGF- β al medio de cultivo (Fig. 17, líneas 1-8). De manera interesante, esta inhibición mediada por Smad3 fue contrarestanda por la presencia

del inhibidor SB505124, sin embargo, la actividad del promotor no fue completamente restaurada cuando Sox9 fue sobreexpresado o cuando la combinatoria Sox9 y Smad3 fue co-transfectada (Fig. 17, líneas 10 y 12). Lo anterior puede explicarse si consideramos la existencia de vías independientes de TGF- β , que en cooperación con Sox9, reprimen la actividad del promotor del gen α -SG. En resumen, estos datos confirman que la vía de señalización de TGF- β , participa en la regulación de la expresión del gen α -SG.

7.8. Sox9 y p-Smad3 interaccionan con el promotor del gen α -SG *in vivo*.

Sabiendo que Sox9 y Smad3 reprimen la expresión del gen α -SG, investigamos si estos factores son reclutados al promotor del gen α -SG *in vivo*, para lo cual realizamos experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en MB y MT C2C12, empleando anticuerpos anti-Sox9, anti-pSmad2/3, anti-MyoD y anti-IgG como control negativo. El DNA genómico aislado y purificado a partir de la inmunoprecipitación fue empleado como templado para amplificar secuencias del promotor que incluyen los sitios 822, 614 y 213 (Fig. 18A). Como control positivo amplificamos una región que incluye dos cajas E del mismo promotor, las cuales unen al factor MyoD y como control negativo empleamos oligonucleótidos que amplifican una porción del exón cuatro del gen α -SG. Como se muestra en la figura 18B, detectamos que las secuencias 822, 614 y 213 fueron enriquecidas en cromatina de MB inmunoprecipitada con los anticuerpos anti-Sox9

y anti-pSmad3, pero no con el anti-IgG. Consistente con el patrón de expresión de los factores transcripcionales en estudio, no observamos enriquecimiento de cromatina cuando empleamos anticuerpos anti-Sox9, anti-pSmad3 ni anti-IgG en miotubos. Para demostrar la integridad de la cromatina aislada a partir de miotubos C2C12, realizamos la inmunoprecipitación de cromatina usando un anticuerpo específico para MyoD y amplificando una región moduladora que recluta a este factor en ambos estadios de la diferenciación (Fig. 18C). En su conjunto, estos datos confirman un modelo de represión de la expresión del gen α -SG donde sox9 es reclutado a dicho promotor formando un posible complejo represor que contiene también a p-smad3 como respuesta a la vía de señalización de TGF- β de manera específica del estadio de diferenciación en MB C2C12.

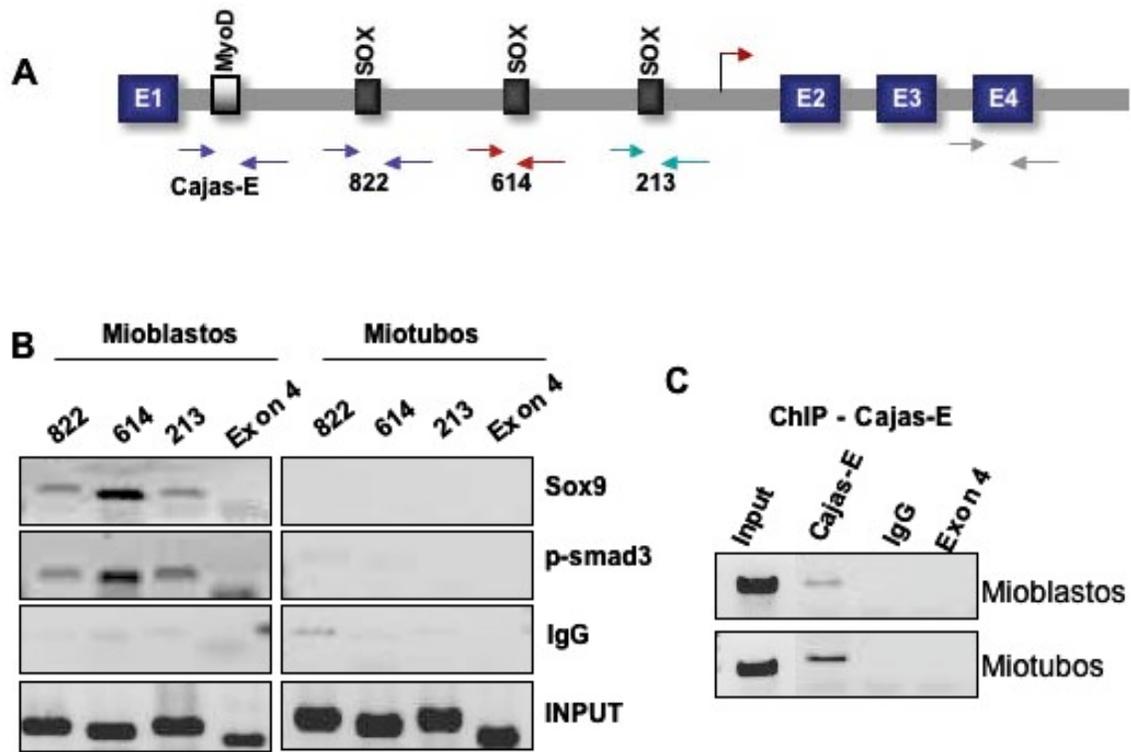


Figura 18. Sox9 y Smad3 interactúan in vivo con los elementos de unión a Sox en el promotor del gen α -SG.

A) Diagrama esquemático del gen de α -SG donde se indica la presencia de sitios de unión a MyoD (cajas-E), los elementos 822, 614 y 213, así como los exones 2, 3 y 4 (E1-4). Las flechas delimitan las secuencias de DNA amplificadas a partir de DNA genómico recuperado de la inmunoprecipitación de la cromatina. B) La cromatina inmunoprecipitada con anticuerpos anti-Sox9, anti-pSmad3 y anti-IgG, fue usada como templado para amplificar por PCR las regiones de DNA indicadas en A. C) Como control positivo se amplificó la región de unión a MyoD.

8. DISCUSIÓN

La expresión del gen α -SG, cuya deficiencia es causa primaria de la distrofia muscular de cinturas tipo 2-D, es finamente regulada durante el proceso de diferenciación del músculo esquelético, encontrándose niveles basales de su mRNA en etapas tempranas de la diferenciación y un pico máximo de expresión en células musculares terminalmente diferenciadas. En un esfuerzo para dilucidar algunos de los factores y las señales extracelulares involucrados en el establecimiento de este patrón de expresión, empleamos un modelo celular de músculo esquelético que emula los procesos de diferenciación que ocurren en la regeneración y diferenciación de la fibra muscular.

Previamente, nuestro grupo de trabajo identificó que el promotor del gen α -SG responde positivamente al ambiente de diferenciación muscular, lo cual ha sido parcialmente explicado por el efecto de los factores transcripcionales de la familia NF-I, así como de MyoD (Delgado-Olguín et al. 2004-2008), quienes participan en la regulación positiva de la expresión del gen α -SG. Sin embargo, los mecanismos involucrados en la represión de la expresión de este gen en etapas tempranas de la miogénesis, han sido poco explorados. Basándonos en reportes recientes que señalan a los factores Sox como importantes reguladores de la diferenciación muscular, nuestros esfuerzos fueron dirigidos al estudio del efecto del factor transcripcional Sox9 sobre la actividad del promotor del gen α -SG.

En este trabajo, proponemos un mecanismo para la represión del gen α -SG en etapas tempranas de la diferenciación muscular. Presentamos evidencia que indica que el factor transcripcional Sox9 puede contactar directamente el promotor del gen α -SG y reprimir su expresión en mioblastos. Sox9 es expresado en etapas tempranas de la diferenciación muscular y su expresión es regulada negativamente conforme la diferenciación muscular avanza. De esta forma, la expresión del gen α -SG es favorecida en la ausencia del estímulo represor de Sox9 en miotubos. Adicionalmente demostramos que la vía de señalización de TGF- β contribuye a la represión de la expresión de α -SG a través de Smad3, el cual parece cooperar con Sox9 para reprimir al gen α -SG.

Un aspecto interesante de nuestros resultados es la demostración de que la inhibición de la expresión del gen α -SG por el factor Sox9 es independiente del factor MyoD, un factor fundamental en la expresión del gen α -SG. Este hallazgo contrasta con la hipótesis de que la represión mediada por proteínas Sox8 y Sox9, es a través de la interferencia de la función de los factores reguladores miogénicos, y no mediante interacción directa con sitios de unión a factores Sox en promotores musculares (Schmidt et al. 2003). De hecho, nuestros resultados muestran que los sitios de unión a Sox en el promotor, son indispensables para mediar la represión por Sox9, como fue demostrado por ensayos de mutagénesis dirigida de los sitios 822, 614 y 213. La contribución de diferentes proteínas Sox a la regulación de genes musculares aun debe ser estudiada, pues se ha descrito que la ausencia del factor Sox8, no contribuye al desarrollo de un fenotipo

muscular (Sock et al. 2001), lo cual puede explicarse por el solapamiento de funciones de proteínas Sox presentes en el músculo esquelético. Del mismo modo, la ausencia del factor transcripcional Sox9 en el modelo murino, no presenta anomalías en el desarrollo del músculo esquelético (Bi et al., 1999). Con respecto a esto, nuestros datos demuestran que después de la mutación de los tres sitios de unión a Sox, la actividad de promotor del gen α -SG fue mayor e incluso aumentó cerca de 20 veces con respecto al promotor silvestre; mientras que la inhibición específica de Sox9 empleando un RNA de interferencia, provocó un aumento de poco más de 2 veces la actividad del promotor. Sin embargo, la sobreexpresión de Sox9 causó la disminución de los niveles de proteína de α -SG, lo cual pone de manifiesto la contribución de Sox9, que en combinación con otros co-represores, regula esta compleja región promotora. Lo anterior pone de manifiesto la posibilidad de la existencia de factores que reconozcan los sitios de unión a Sox, que contribuyan a la regulación de la expresión del gen α -SG.

Con base en la represión del promotor del gen α -SG mediada por tres sitios de unión a Sox, distribuidos a lo largo de 1 kb del promotor, sería importante conocer si la asociación documentada entre Sox9 y Smad3 (Furumatsu et al. 2009) esta asociada al mantenimiento de un estado reprimido en etapas tempranas de la diferenciación muscular, a través de su posible asociación con HDACs y otros cofactores como NF1-C2 y NF1-X2 (Delgado-Olguín et al. 2004), para promover un estado transcripcionalmente no permisivo de la estructura de la cromatina. Una cuestión interesante es si la interacción física conocida entre NF1

y YY1 se encuentra presente en el contexto del promotor del gen α -SG, pues recientemente se ha descrito la presencia de un complejo represor constituido por las proteínas HDAC I, YY1 y la metiltransferasa de histonas EhZ2, perteneciente al grupo de proteínas Polycomb. Este complejo mantiene un estado de represión estable de loci musculares en etapas tempranas de la diferenciación muscular (Carette et al. 2004). Estas investigaciones podrían arrojar información acerca de la dinámica de la estructura de cromatina en este promotor durante la miogénesis.

Por otra parte, en este estudio encontramos que la expresión estable de Sox9 en el cultivo celular, contribuye a la disminución de los niveles de mRNA del gen sarcospan y en menor medida los de δ -SG (Fig. 10). La implicación fisiológica del efecto de Sox9 sobre el ensamblaje del complejo SG-SSPN y por tanto de la integridad de la fibra muscular, debe ser abordado en futuros estudios, pues como se ha mostrado, alteraciones en los niveles de expresión de estos genes, tanto la subexpresión como la sobreexpresión, tienen efectos muy importantes en la fisiología muscular (Zhu et al. 2001, Peter et al. 2007).

Adicionalmente nuestros resultados sugieren que Sox9 regula negativamente la expresión del gen músculo específico α -SG a través de mecanismos alternativos como el reclutamiento de co-represores. Con respecto a esto, nuestros datos implican que Sox9 puede reclutar al factor Smad3, el cual es activado por TGF- β , disminuyendo la actividad del promotor de α -SG. Esto resulta interesante, pues se ha propuesto que la vía mediada por TGF- β , altera la

diferenciación muscular mediante la interacción de los MRFs con Smad3, a través de un motivo dentro del dominio bHLH (Liu et al. 2001; Liu et al. 2004), que le confiere susceptibilidad a la inhibición muscular mediada por la vía de TGF- β . Adicionalmente, se ha demostrado que Smad3 interacciona con MEF2C, impidiendo su relocalización nuclear mediada por GRIP-1, y su posterior reclutamiento al promotor de miogenina. Lo anterior resulta importante, pues ninguno de los modelos anteriores implica la interacción directa de proteínas Smad3 con secuencias de unión en el ADN de blancos músculo específicos. Con respecto a esto, nuestro análisis de la región promotora del gen α -SG, no reveló secuencias de unión a Smad3, a pesar de ello nuestros datos muestran que Smad3 participa en la represión de la expresión del gen α -SG. Adicionalmente, observamos que la represión mediada por Smad3, es fuertemente dependiente de la presencia e integridad de sitios de unión a Sox. Lo anterior es consistente con los datos que demuestran la interacción física de Sox9 y Smad3 en los elementos 822, 614 y 213 del promotor de α -SG, específicamente en cromatina de MB y no en MT, donde Sox9 y Smad3 ya no están presentes en la línea celular estudiada (Fig. 18). Estos datos, en conjunto con la asociación física conocida entre Sox9 y Smad3 (Furumatsu et al. 2005b; Furumatsu et al. 2009), abren la posibilidad de la existencia de un complejo represor constituido al menos por Sox9 y Smad3, el cual puede ser reclutado al promotor del gen α -SG vía Sox9, contribuyendo fuertemente a la represión observada del gen α -SG en MB. De acuerdo con esta hipótesis, la inhibición de la vía canónica de TGF- β mediante el uso del

SB505124, con la consecuente inactivación de Smad3, podrían revertir la influencia negativa de Sox9 y Smad3 sobre el promotor del gen α -SG.

Sox8 y Sox9 han sido localizados exclusivamente en células satélite de las fibras musculares adultas (Schmidt et al. 2003), lo cual nos podría sugerir su participación en el mantenimiento del estado no diferenciado y proliferativo de estas células para prevenir eventos de diferenciación muscular no controlados. Con respecto a esto, sería muy interesante conocer la regulación de la expresión de los genes Sox8 y Sox9 en este ambiente celular. La vía de señalización de Wnt es una de las vías que regula positivamente la síntesis del mRNA de Sox9 tanto en fibroblastos como en condrocitos primarios en cultivo, observándose el establecimiento de un sistema de retroalimentación positiva, donde la expresión de Sox9 es dependiente de la vía de Wnt y viceversa (Kormish et al., 2009). Con respecto a esto, se ha documentado la actividad de la vía de Wnt en células de origen muscular, particularmente en “stem cells” musculares. Se ha observado que la activación de la vía canónica de Wnt inhibe la regeneración y la diferenciación muscular e incrementa la fibrosis (Brack et al., 2007). De acuerdo con lo anterior, es probable que la expresión de los factores Sox en células satélite musculares sea regulada por la vía de Wnt.

Por otro lado, se ha documentado la existencia de un balance entre la vía de señalización de Wnt y la vía de señalización de Notch (Conboy et al., 2003). Notch regula positivamente la activación de células satélite musculares en etapas tempranas del desarrollo, observándose una disminución de la regeneración

muscular en el músculo esquelético de ratones envejecidos o como resultado del incremento en la vía de Wnt (Brack et al., 2007), además del incremento en la concentración de factores de crecimiento como TGF- β en la matriz extracelular del músculo esquelético. Con respecto a esto, se sabe que TGF- β regula negativamente la activación y regeneración de células satélites a través de la unión de pSmad3 en promotores de los genes de proteínas inhibidoras de cinasa dependientes de ciclina p15, p16, p21 y p27 en células satélites, impidiendo la entrada de las células satélites mitóticamente quiescentes, al ciclo celular. Al mismo tiempo se sabe que pSmad3 interacciona con Notch e inhibe su función en la activación de células satélites (Carlson et al. 2008). Estos datos sitúan a la vía de TGF- β a través de Smad3 y Sox9, en el control de células musculares indiferenciadas. Sin embargo, aun queda por resolver si estos factores de transcripción participan en el control de la activación de células satélite en el contexto del músculo esquelético adulto y su posible participación en los procesos distróficos.

Adicionalmente, en este estudio encontramos que el gen α -SG es silenciado en células diferenciadas estimuladas con TGF- β , incluso en ausencia de pSmad3 (Fig. 16). Esto implica que TGF- β puede regular la expresión en células diferenciadas a través de vías independientes a Smad3. De hecho, se ha reportado que la activación de la MAPK-p38 inducida por TGF- β independiente de Smads, contribuye a la represión de la diferenciación miogénica. La inhibición de p38 en etapas tempranas de la diferenciación muscular resulta en un incremento

en la expresión de desmina dependiente del factor músculo específico MRF4, pero no en el incremento de otros marcadores de diferenciación como miogenina o MCK, mostrando que la represión de MRF4 mediada por p38, afecta selectivamente a genes expresados en etapas terminales de la diferenciación muscular (Suelves et al. 2004), o probablemente a genes expresados en tipos específicos de fibra muscular. Debido a que α -SG es expresado durante estadios terminales de la diferenciación y es reprimido por TGF- β , es probable la existencia de una vía alterna constituida por p38, para mediar la represión del gen α -SG. Además de esto, observamos que Smad7 tiene una participación en la regulación positiva del promotor del gen α -SG, aun en presencia de Smad3 y en mayor medida en presencia de TGF- β . Lo anterior es importante pues se sabe que Smad7 regula positivamente la expresión de MyoD en células C2C12 (ref). Sin embargo, es necesario evaluar la participación de Smad7 en la regulación de la expresión del gen α -SG, la identificación de posibles co-activadores que en conjunto, contribuyan a la regulación positiva de la miogénesis.

Finalmente es razonable proponer que el desbalance observado en los procesos de degeneración-regeneración observados en las distrofias musculares, pueda ser parcialmente causado por la liberación local de TGF- β , pues se sabe que los miembros de la familia de los TGF- β están localizados y son activados en la matriz extracelular de los diferentes tejidos, que particularmente en el músculo esquelético, es el principal componente de la membrana basal que envuelve a las miofibrillas y las células satélite asociadas a ellas (Husmann et al., 1996). Por lo

tanto, un incremento en los niveles de TGF- β podría afectar la expresión de genes musculares, entre ellos α -SG, en las células satélite responsables de la regeneración de las fibras musculares.

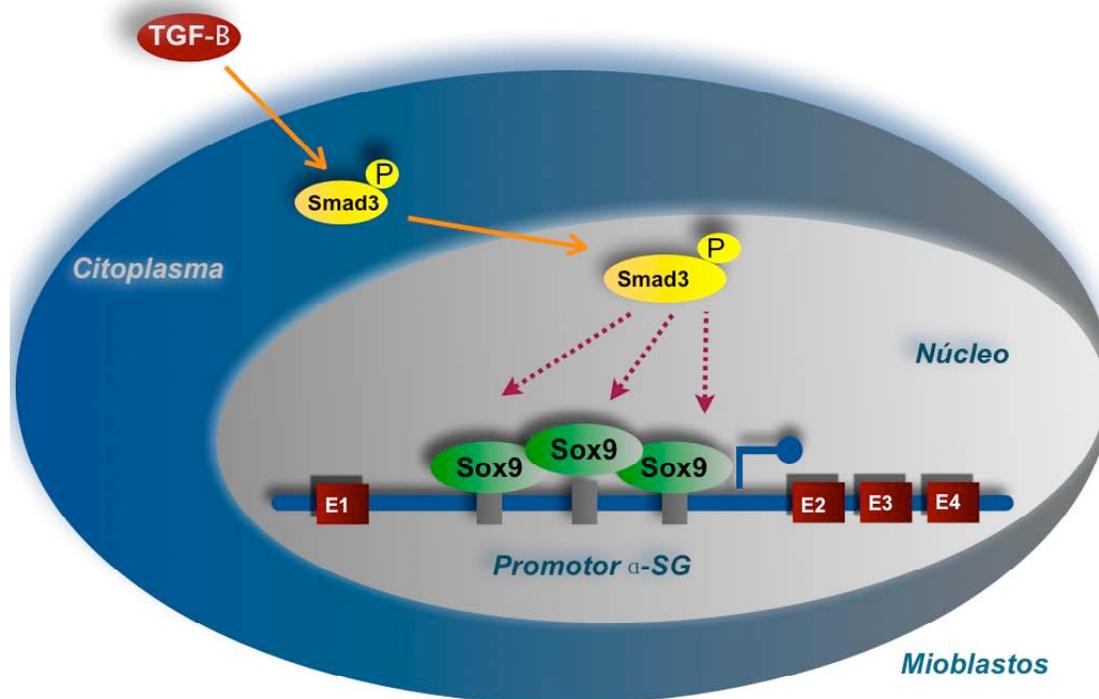


Figura 19. Modelo de represión del promotor del gen α -SG mediado por Sox9.

Sox9 modula negativamente la activación del promotor del gen α -SG a través de su unión con tres sitios de unión a Sox. Después del estímulo con TGF- β , p-Smad3 es reclutado al promotor vía Sox9 para incrementar la represión del promotor en etapas tempranas de la diferenciación muscular.

9. PERSPECTIVAS

Estudio del efecto del factor transcripcional Sox9 en el ensamblaje del complejo sarcoglicano sarcospán en el músculo esquelético.

Como se ha descrito con anterioridad, la presencia de cada uno de los componentes de complejo sarcoglicano sarcospán es importante para la integridad de la membrana de células musculares. Así, la expresión de estos genes es regulada de manera muy importante durante las diferentes etapas del desarrollo y diferenciación muscular. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, sabemos que Sox9 ejerce un efecto inhibitorio de la expresión del gen α -SG en la miogénesis temprana, lo que explica en parte el patrón de expresión de α -SG durante la diferenciación muscular. En este sentido sería importante estudiar si tanto la deficiencia como la sobreexpresión de Sox9 durante la miogénesis tiene implicaciones en la ruta de ensamblaje del complejo, pues se esperaría que en la presencia de un exceso del factor Sox9 se retrasara la expresión de α -SG y por lo tanto su inclusión en la ruta de ensamblaje del complejo. Por otro lado la deficiencia en la expresión de sox9 podría estimular la expresión de α -SG desde etapas tempranas de la miogénesis, lo cual en el sentido de una posible estrategia terapéutica, podría ser útil en el reestablecimiento de éstos complejos en el contexto del músculo distrófico. Adicionalmente, sería importante analizar el efecto que Sox9 tiene sobre otros componentes del complejo, pues como ha sido

reportado en este trabajo, observamos que la expresión de sarcospán y en menor medida δ -SG, son reprimidas por Sox9 durante la diferenciación muscular.

Estudio del efecto de la inhibición de Sox9 y de la ruta de TGF- β sobre la regeneración y diferenciación muscular en el modelo deficiente de α -SG.

Como un esfuerzo para encontrar una alternativa terapéutica para la distrofia muscular, se han empleado inhibidores de desacetilasas de histonas, observando una evidente mejoría a nivel morfológico y molecular en el modelo mdx (Minetti et al. 2006). Adicional a estos esfuerzos, sería importante estudiar una estrategia basada en la inhibición de la señalización mediada por TGF- β en el contexto del músculo distrófico, pues un rasgo histopatológico característico de las distrofias es la generación de fibrosis y proliferación de tejido conectivo inducido principalmente por TGF- β . Sin embargo hasta ahora no se conocían mediadores intracelulares que respondieran a TGF- β diferentes de Smad3, involucrados en la regulación de la expresión de genes pertenecientes al complejo de glicoproteínas asociadas a la distrofina. Como mostramos en este trabajo, la inhibición de la expresión de α -SG es exacerbada por Smad3 activado por TGF- β , lo cual lo convierte en un blanco terapéutico importante. Diferentes estudios encaminados a la inhibición de la fibrosis mediada por TGF- β han demostrado que el uso de anticuerpos anti-TGF- β 1 resulta en la disminución significativa de la fibrosis en ratones mdx, disminución de los niveles de expresión de TGF- β así como la

disminución del proceso de regeneración/degeneración de fibras musculares (Andreetta et al. 2006).

Aunado a lo anterior, es sabido que la familia de los TGF- β inhibe la activación de células satélite musculares, probablemente a través de un mecanismo similar al reportado en este trabajo. Adicionalmente, se ha descrito que el alcaloide halofuginona, funciona como un inhibidor importante de la síntesis de colágena, uno de los principales componentes del tejido fibrótico, y es un inhibidor de la fosforilación de Smad3 mediada por TGF- β en células musculares. En este sentido, se ha reportado la eficiencia de la inhibición de la generación de fibrosis mediante el uso de halofuginona en ratos mdx (Turgeman et al. 2008), dato que en conjunto con los reportados en este trabajo, pueden ser la base de futuras investigaciones en torno a la respuesta de Sox9 sobre la expresión de genes musculares bajo un estímulo con halofuginona.

10. REFERENCIAS

- Andreetta F, Bernasconi P, Baggi F, Ferro P, Oliva L et al. (2006) Immunomodulation of TGF-beta 1 in mdx mouse inhibits connective tissue proliferation in diaphragm but increases inflammatory response: implications for antifibrotic therapy. *J Neuroimmunol* 175(1-2): 77-86.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H et al. (1999) Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 8(9): 1589-1598.
- Beranger F, Mejean C, Moniot B, Berta P, Vandromme M (2000) Muscle Differentiation Is Antagonized by SOX15, a New Member of the SOX Protein Family. *J Biol Chem* 275(21): 16103-16109.
- Besse S, Allamand V, Vilquin J-T, Li Z, Poirier C et al. (2003) Spontaneous muscular dystrophy caused by a retrotransposal insertion in the mouse laminin [alpha]2 chain gene. *Neuromuscular Disorders* 13(3): 216-222.
- Bettex-Galland M WU (1987) Differentiation of L6 myoblastic cells into chondrocytes. *Experientia* 15(6): 610-611.

Bi, W., J. M. Deng, Z. Zhang, R. R. Behringer, and B. de Crombrughe. (1999).
Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* **22**:85–89.

Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. (2007).
Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and
increases fibrosis. *Science*. Aug 10;317(5839):807-10.

Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE, Sartorelli V (2004) The Polycomb
Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal
muscle differentiation. *Genes Dev* 18(21): 2627-2638.

Carlson ME, Hsu M, Conboy IM (2008) Imbalance between pSmad3 and Notch
induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 454(7203): 528-
532.

Chan YM, Bonnemann CG, Lidov HG, Kunkel LM (1998) Molecular organization of
sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 143(7):
2033-2044.

Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. (2003). Notch-mediated
restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science*. 2003 Nov
28;302(5650):1575-7.

Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM et al. (1999) Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98(4): 465-474.

DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, Roberts AB (2004) SB-505124 Is a Selective Inhibitor of Transforming Growth Factor- β Type I Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 65(3): 744-752.

Delgado-Olguín P, Rosas-Vargas H, Recillas-Targa F, Zentella-Dehesa A, de León MBd et al. (2004) NFI-C2 negatively regulates α -sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319(3): 1032-1039.

Delgado-Olguín P, Recillas-Targa F, Rosas-Vargas H, Salamanca F, Coral-Vázquez RM (2006) Partial characterization of the mouse α -sarcoglycan promoter and its responsiveness to MyoD. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1759(5): 240-246.

Delgado-Olguín P, Hernández-Hernández JM, Salamanca F, Recillas-Targa F, Coral-Vázquez RM (2008) Identification of two E-boxes that negatively modulate the activity of MyoD on the α -sarcoglycan core promoter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1779(1): 74-80.

Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P et al. (1992) A conserved family of genes related to the testis determining gene, SRY. *Nucleic Acids Res* 20(11): 2887.

Duggan DJ, Manchester D, Stears KP, Mathews DJ, Hart C et al. (1997) Mutations in the delta-sarcoglycan gene are a rare cause of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2). *Neurogenetics* 1(1): 49-58.

Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66(6): 1121-1131.

Feng XH, Derynck R (2005) Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 659-693.

Foster J.W. , M.A. Dominguez-Steglich, S.Guioli, C. Kwork, PA. Weller, M. Stevanovic, J. Weissenbach and A. J. Schafer. (1994) . Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 327:525-530.

Furumatsu T, Ozaki T, Asahara H (2009) Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(5): 1198-1204.

Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H (2005a) Smad3 Induces Chondrogenesis through the Activation of SOX9 via CREB-binding Protein/p300 Recruitment. *J Biol Chem* 280(9): 8343-8350.

Furumatsu T, Tsuda M, Yoshida K, Taniguchi N, Ito T et al. (2005b) Sox9 and p300 Cooperatively Regulate Chromatin-mediated Transcription. *J Biol Chem* 280(42): 35203-35208.

Guo LT, Zhang XU, Kuang W, Xu H, Liu LA et al. (2003) Laminin [alpha]2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscular Disorders* 13(3): 207-215.

Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT et al. (2000) Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci* 113 (Pt 14): 2535-2544.

Hawke TJ, Jiang N, Garry DJ (2003) Absence of p21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice. *J Biol Chem* 278(6): 4015-4020.

Hoffman EP, Kunkel LM (1989) Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Neuron* 2(1): 1019-1029.

Holt KH, Campbell KP (1998) Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 273(52): 34667-34670.

Husmann I, Soulet L, Gautron J, Martelly I, Barritault D. (1996). Growth factors in skeletal muscle regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.* Oct;7(3):249-58.

Iwata H OS, Sato K, Sato T, Kawamura M. (1993) Bone Morphogenetic Protein-Induced Muscle- and Synovium-Derived Cartilage Differentiation In Vitro. *Clin Orthop Relat Res* 296: 295-300.

Jaime Gutierrez NO, Enrique Brandan, (2006) Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: Role of decorin in cell response to BMP-2. *Journal of Cellular Physiology* 206(1): 58-67.

Jayaraman L, Massague J (2000) Distinct oligomeric states of SMAD proteins in the transforming growth factor-beta pathway. *J Biol Chem* 275(52): 40710-40717.

Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H (2000) Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 16(4): 182-187.

Kent, J., S. C. Wheatley, J. E. Andrews, A. H. Sinclair and P. Koopman. (1996). A male specific role of Sox9 in vertebrate sex determination. *Development*. 122: 2813-2822.

Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. (2009). Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Agosto*, 4.

Lebakken CS, Venzke DP, Hrstka RF, Consolino CM, Faulkner JA et al. (2000) Sarcospan-deficient mice maintain normal muscle function. *Mol Cell Biol* 20(5): 1669-1677.

Lee H-J, Goring W, Ochs M, Muhlfeld C, Steding G et al. (2004) Sox15 Is Required for Skeletal Muscle Regeneration. *Mol Cell Biol* 24(19): 8428-8436.

Lim LE, Campbell KP (1998) The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr Opin Neurol* 11(5): 443-452.

Liu D, Black BL, Derynck R (2001) TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev* 15(22): 2950-2966.

Liu D, Kang JS, Derynck R (2004) TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J* 23(7): 1557-1566.

Liu L, Vachon PH, Kuang W, Xu H, Wewer UM et al. (1997) Mouse Adhalin: Primary Structure and Expression during Late Stages of Muscle Differentiation in Vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 235(1): 227-235.

Lynn FC, Smith SB, Wilson ME, Yang KY, Nekrep N et al. (2007) Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(25): 10500-10505.

Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.

Massague J, Chen YG (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev* 14(6): 627-644.

Massague J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B (1986) Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(21): 8206-8210.

Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y et al. (1999) Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45(6): 751-762.

Matsushita T, Matsui N, Fujioka H, Kubo S, Kuroda R et al. (2004) Expression of Transcription Factor Sox9 in Rat L6 Myoblastic Cells. *Connective Tissue Research* 45(3): 164 - 173.

McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, de Sa Moreira E et al. (1996a) Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 59(5): 1040-1047.

McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bonnemann CG, Fanin M et al. (1996b) Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 5(11): 1841-1847.

Minetti GC, Colussi C, Adami R, Serra C, Mozzetta C et al. (2006) Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat Med* 12(10): 1147-1150.

Ng, L.-J., S. Wheatley, G. E. O. Muscat, J. Conway-Campbell, J. Bowles, E. Wright, D. M. Bell, P. P. L. Tam, K. S. E. Cheah, and P. Koopman. (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* **183**:108–121.

Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A et al. (1996) Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* 14(2): 195-198.

Nobuko Hagiwara BM, Alice Ly, (2005) Slow and fast fiber isoform gene expression is systematically altered in skeletal muscle of the Sox6 mutant. *Developmental Dynamics* 234(2): 301-311.

Nobuko Hagiwara MY, Ann Liu, (2007) Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. *Developmental Dynamics* 236(8): 2062-2076.

Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E (2000) Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur J Biochem* 267(3): 640-648.

Ohe K, Lalli E, Sassone-Corsi P (2002) A direct role of SRY and SOX proteins in pre-mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1146-1151.

Olson E, Sternberg E, Hu J, Spizz G, Wilcox C (1986) Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J Cell Biol* 103(5): 1799-1805.

Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M (1998) From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21(4): 421-438.

Peter AK, Miller G, Crosbie RH (2007) Disrupted mechanical stability of the dystrophin-glycoprotein complex causes severe muscular dystrophy in sarcospan transgenic mice. *J Cell Sci* 120(Pt 6): 996-1008.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucl Acids Res* 23(23): 4878-4884.

Rando TA (2001) The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 24(12): 1575-1594.

Sandona D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R (2004) Characterization of the ATP-hydrolysing activity of alpha-sarcoglycan. *Biochem J* 381(Pt 1): 105-112.

Schmidt K, Glaser G, Wernig A, Wegner M, Rosorius O (2003) Sox8 Is a Specific Marker for Muscle Satellite Cells and Inhibits Myogenesis. *J Biol Chem* 278(32): 29769-29775.

Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucl Acids Res* 17(15): 6419

Shi W, Chen Z, Schottenfeld J, Stahl RC, Kunkel LM et al. (2004) Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on beta- and delta-sarcoglycan. *Muscle Nerve* 29(3): 409-419.

Shi Y, Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113(6): 685-700.

Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bosl MR, Wegner M (2001) Idiopathic Weight Reduction in Mice Deficient in the High-Mobility-Group Transcription Factor Sox8. *Mol Cell Biol* 21(20): 6951-6959.

Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S et al. (1999) epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 274(39): 27989-27996.

Suelves M, Lluís F, Ruiz V, Nebreda AR, Muñoz-Canoves P (2004) Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *EMBO J* 23(2): 365-375.

Suh JH, Huang J, Park YY, Seong HA, Kim D et al. (2006) Orphan nuclear receptor small heterodimer partner inhibits transforming growth factor-beta signaling by repressing SMAD3 transactivation. *J Biol Chem* 281(51): 39169-39178.

Thompson TG, Chan YM, Hack AA, Brosius M, Rajala M et al. (2000) Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* 148(1): 115-126.

Turgeman T, Hagai Y, Huebner K, Jassal DS, Anderson JE et al. (2008) Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul Disord* 18(11): 857-868.

Wegner M (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27(6): 1409-1420.

Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM (2002) Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11(18): 2147-2154.

Wilson M, Koopman P (2002) Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr Opin Genet Dev* 12(4): 441-446.

Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y et al. (2000) Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* 9(7): 1033-1040.

Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M (1998) Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* 273(3): 1583-1590.

Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C (2004) Transforming Growth Factor- β -Induced Inhibition of Myogenesis Is Mediated Through Smad Pathway and Is Modulated by Microtubule Dynamic Stability. *Circ Res* 94(5): 617-625.

Zhu X, Hadhazy M, Groh ME, Wheeler MT, Wollmann R et al. (2001) Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of Sarcoglycan assembly. *J Biol Chem* 276(24): 21785-21790.

JMBAvailable online at www.sciencedirect.com
 ScienceDirect


Sox9 Represses α -Sarcoglycan Gene Expression in Early Myogenic Differentiation

J. Manuel Hernández-Hernández^{1,2,3}, Paul Delgado-Olguín^{1,4},
Verónica Aguillón-Huerta¹, Mayra Furlan-Magaril⁴,
Félix Recillas-Targa⁴ and Ramón M. Coral-Vázquez^{1,2,3*}

¹Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, México, D.F., México

²División de Medicina Genómica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F., México

³Laboratorio Multidisciplinario, Sección de posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México

⁴Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

Received 11 April 2009;
received in revised form
14 July 2009;
accepted 25 August 2009

Alpha sarcoglycan (α -SG) is highly expressed in differentiated striated muscle, and its disruption causes limb-girdle muscular dystrophy. Accordingly, the myogenic master regulator MyoD finely modulates its expression. However, the mechanisms preventing α -SG gene expression at early stages of myogenic differentiation remain unknown. In this study, we uncovered Sox9, which was not previously known to directly bind muscle gene promoters, as a negative regulator of α -SG gene expression. Reporter gene and chromatin immunoprecipitation assays revealed three functional Sox-binding sites that mediate α -SG promoter activity repression during early myogenic differentiation. In addition, we show that Sox9-mediated inhibition of α -SG gene expression is independent of MyoD. Moreover, we provide evidence suggesting that Smad3 enhances the repressive activity of Sox9 over α -SG gene expression in a transforming growth factor- β -dependent manner. On the basis of these results, we propose that Sox9 and Smad3 are responsible for preventing precocious activation of α -SG gene expression during myogenic differentiation.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Edited by M. Yaniv

Keywords: alpha sarcoglycan promoter; dystrophy; skeletal muscle; Sox9; Smad3

*Corresponding author. E-mail address: rmcoralv@prodigy.net.mx.

Abbreviations used: α -SG, alpha sarcoglycan; SG-SSPN, sarcoglycan-sarcospan complex; MRF, myogenic regulatory factor; MB, myoblast; MT, myotube; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; ChIP, chromatin immunoprecipitation; RT, reverse transcription; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; shRNA, short hairpin RNA; p-Smad3, phosphorylated Smad3; T β RI, TGF- β receptor I; IgG, immunoglobulin G; bHLH, basic helix-loop-helix; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

Introduction

Alpha sarcoglycan (α -SG) is a member of the sarcoglycan-sarcospan complex (SG-SSPN), which is constituted by α/ϵ -, β -, γ -, and δ -SGs as well as SSPN.^{1,2} Together with other proteins such as dystroglycans, syntrophins, dystrobrevin, and dystrophin, sarcoglycans form part of the dystrophin-associated glycoprotein complex located in the sarcolemma of cardiac and skeletal muscle cells.³⁻⁵ The physiological relevance of the SG-SSPN complex is highlighted by the fact that mutations in α -, β -, γ -, and δ -SGs cause types 2C-2F autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies, collectively called sarcoglycanopathies. The primary absence of a sarcoglycan is frequently accompanied by the concomitant loss or drastic reduction of the other SGs and SSPN in skeletal and cardiac muscle fibers.⁵⁻⁸ There is evidence suggesting the relevance of SG gene expression fine regulation for proper assembly and localization of the SG-SSPN complex at the sarcolemma. In this regard, overexpression of γ -SG in mouse muscle leads to a muscular dystrophy with similar histopathological features to that observed in both dystrophin-null and γ -SG-null mice.⁸ In addition, disturbance of the SG-SSPN complex by SSPN overexpression in muscle of transgenic mice leads to a severe phenotype⁹ comparable to that caused by laminin deficiency,^{10,11} suggesting that alteration of the equimolar stoichiometry of the sarcoglycans may result in disruption of the entire complex.

α -SG gene expression is exclusive of striated muscle^{4,12} and is finely regulated during myogenic differentiation, where the amount of α -SG transcript is selectively increased after differentiation in myotubes (MTs).¹³ We have partially explained this by the action of MyoD^{14,15} and by nuclear factor I transcription factor function.¹⁶ The activity of MyoD on the α -SG promoter during myogenic differentiation is modulated by differential interaction of a protein complex, including MyoD and the basal transcription factors TFIIIB and TFIID with the core regulatory region and two E-boxes located in the distal promoter.¹⁴ However, little is known about the transcriptional control regulating SG genes in early myogenesis, which is imperative to understand the mechanisms involved in maintaining expression pattern of SG's genes during muscle differentiation and regeneration. Despite this, the α -SG promoter is composed of multiple regulatory elements, suggesting the participation of several transcription factors, unrelated to the MyoD family, that may play important roles in alternative regulatory mechanisms operating during myogenic differentiation.

Members of the superfamily of Sox DNA-binding proteins, which contain a high-mobility-group domain,^{17,18} play important roles in myogenesis.¹⁹⁻²¹ Sox8 and Sox9 negatively affect the activity of the myogenin promoter even in the absence of putative Sox-binding sites and may act as negative regulators of skeletal muscle differentiation. It is not known if the negative influence of Sox proteins over myogenin

promoter is due to interfering with the function of myogenic basic helix-loop-helix proteins.²² Indeed, to the best of our knowledge, Sox transcription factors have not been previously shown to directly interact with muscle gene promoters. Because of that and on account of α -SG promoter containing three putative Sox-binding motifs, we focused on the possible contribution of Sox9 to repressive status of α -SG gene at early myogenic differentiation and if the MyoD transactivation potential was perturbed or not by Sox9.

In this study, we present evidence indicating the important contribution of Sox9 as repressor of the α -SG gene during early myogenic differentiation. The functionality of three putative Sox-binding motifs in the α -SG promoter sequence was further confirmed through reporter gene assays in myogenic cells. In contrast with the assumption that Sox9 represses muscle gene expression by interfering the transactivation potential of myogenic factors, our results indicate that Sox9 inhibits α -SG gene expression independently of MyoD. Additionally, we present evidence indicating that Sox9 corepresses α -SG gene in conjunction with the phosphorylated form of Smad3 (pSmad3) transforming growth factor- β (TGF- β) pathway being mediated.

Results

Sox9 and α -SG present a mutually exclusive expression pattern during myogenic differentiation

The mechanisms by which α -SG gene repression is achieved during early myogenic differentiation remain poorly explored. The relevance of this issue is underscored by the fact that tight regulation of SG gene expression may be critical for proper assembly of the SG complex and for sarcolemma integrity. These facts led us to search for unexplored transcription factors mediating time-specific α -SG gene expression. As a first approach, we looked for putative transcription factor binding sites in the α -SG promoter through bioinformatic analysis with MatInspector software.²³ Among others, the analysis revealed the presence of three potential recognition sites for Sox transcription factors along the 2.6 kb of the promoter. This appeared relevant due to the fact that Sox9 was previously shown to negatively affect myogenin promoter activity, probably by interfering with the function of MyoD but not by direct interaction with DNA regulatory regions.²² Thus, we decided to investigate whether Sox9 may be responsible for suppressing α -SG gene expression. First, we analyzed the temporal expression pattern of Sox9 and α -SG during differentiation of C2C12 cells by Western blot. Myoblasts (MBs) and MBs induced to differentiation for 2, 4, 6, and 8 days were collected. Sox9 was detected in MTs until day 2 of differentiation (Fig. 1a), but it was not evident in the subsequent differentiation stages. α -SG was detected from differentiation days 4-8,

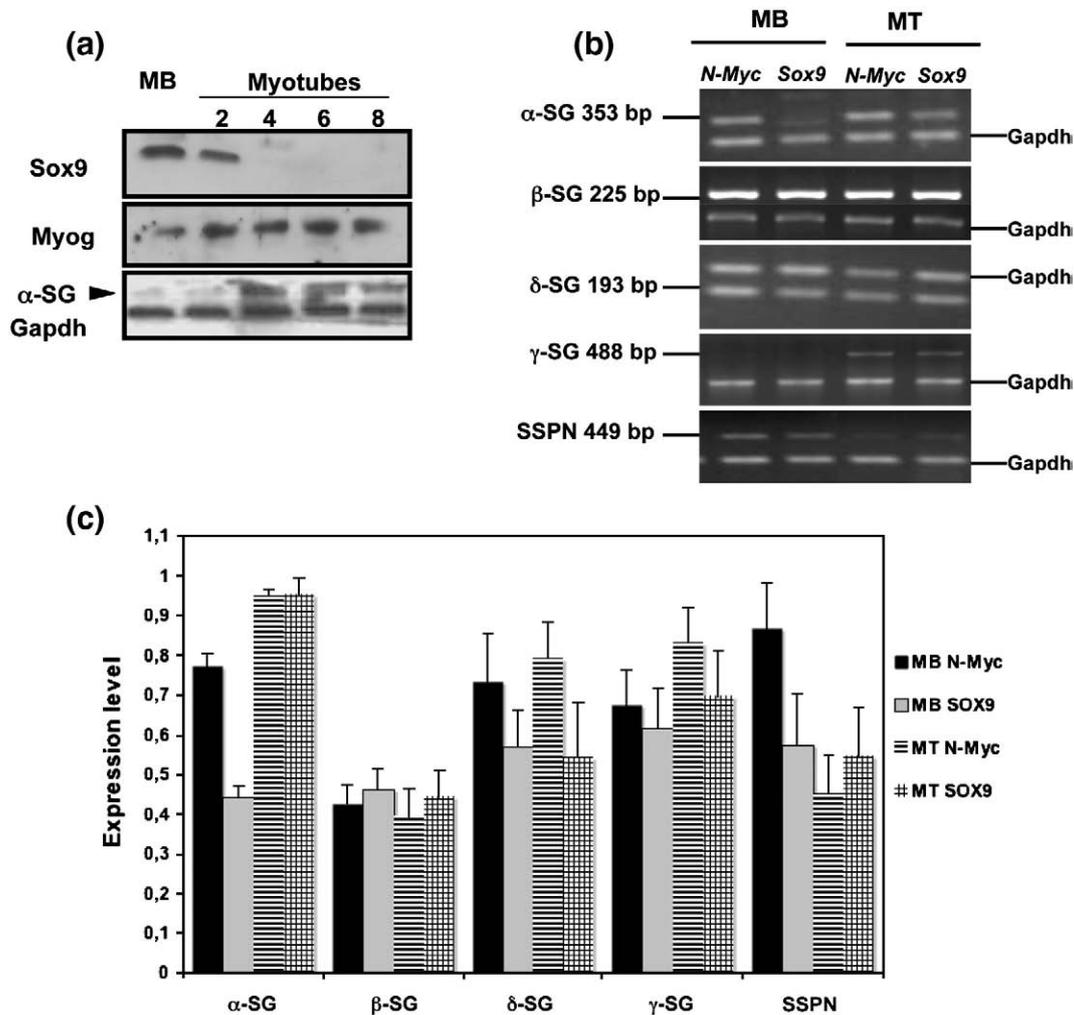


Fig. 1. Sox9 represses α -SG gene expression in MBs. (a) Protein extracts from C2C12 MB and MT at days 2, 4, 6, and 8 of differentiation (2–8) were analyzed by Western blot using antibodies against Sox9, myogenin, α -SG (arrowhead), and GAPDH, whose signal is presented as loading control. Sox9 was detected only in MB and in cells at differentiation day 2. Signals corresponding to myogenin and α -SG increased progressively during differentiation. (b) RNA obtained from MB and MT stably expressing a *Sox9*-encoding cDNA (*Sox9*) or a control plasmid (*N-Myc*) encoding a Myc tag was used for semiquantitative gene expression analysis of α -SG (353 bp), β -SG (225 bp), γ -SG (488 bp), δ -SG (193 bp), and SSPN (449 bp) through RT-PCR. As endogenous control, a 274-bp fragment of GAPDH was amplified. PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis. The presented gel is representative of two independent experiments. (c) Densitometric analysis of expression levels of the indicated genes relative to GAPDH in MB and MT is shown in the lower panels. Bars indicate the mean \pm SD of at least three independent experiments performed in duplicate.

stages at which Sox9 was no longer present (Fig. 1a). As expected, levels of myogenin increased after differentiation induction (Fig. 1a). A similar expression pattern was observed by immunofluorescence assay (data not shown). Interestingly, Sox9 and α -SG showed a mutually exclusive expression pattern during myogenic differentiation.

Sox9 is a repressor of α -SG gene expression

We next tested whether Sox9 negatively affects the expression of the endogenous α -SG gene as well as other SG genes (α -, β -, γ -, and δ -SGs) and SSPN in myogenic cells. We analyzed gene expression through semiquantitative reverse transcription (RT)-PCR on RNA obtained from C2C12 cells stably

expressing a *Sox9*-encoding cDNA (*Sox9*) as well as control cells stably transfected with an empty plasmid (*N-Myc*). Amplification values of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used for normalization data. We observed that α -SG mRNA levels were reduced by 60% in Sox9-overexpressing MB (Fig. 1b, lane 2 and Fig. 1c) as compared with control cells. This result is supported by Western blot analysis, which showed a reduction of α -SG protein in cells overexpressing Sox9 (Fig. 5b, lanes 7 and 8). Furthermore, a 50% decrease in SSPN expression was detected in MB, whereas in MT, it was modestly increased by 20% (Fig. 1b, and Fig. 1c). δ -SG was reduced by 20% in both MB and MT (Fig. 1b and c). These results suggest a repressive activity of Sox9 mainly over the α -SG gene expression in MB.

Sox9 negatively regulates α -SG gene transcription

In order to address whether Sox9 represses α -SG gene transcription in myogenic cells, we transfected a luciferase construct containing the full α -SG promoter (F1B) in C2C12 cells stably expressing a Sox9-encoding cDNA. The activity of the α -SG promoter was notably reduced in Sox9-overexpressing MB as compared with control C2C12 cells stably transfected with an empty vector (Fig. 2a). In contrast, the activity of the promoter in MT was similar under both conditions, suggesting that, indeed, Sox9 suppresses α -SG promoter activity in MB. To further test this hypothesis, we analyzed the activity of the α -SG promoter in cells in which we knocked down Sox9 by transfection of a short hairpin RNA (shRNA) (Fig. 2b). Sox9 deficiency led to a 2.5-fold increase in α -SG promoter activity as compared with the activity of the promoter in cells transfected with a control shRNA (Fig. 2b). Efficient knockdown of Sox9 was confirmed by Western blot (Fig. 2b). These results indicate that Sox9 acts as a negative regulator of α -SG gene transcription in MB. On the other hand, in our

experimental conditions, we did not observe any evident increase in the myogenin signal (Fig. 2b).

Three Sox-binding elements are necessary for α -SG gene repression

As a first approach to understand the mechanism by which Sox9 represses α -SG gene expression, we tested the contribution of Sox-binding elements identified *in silico* to regulate the overall α -SG promoter activity. To this end, we transfected C2C12 cells with a series of luciferase reporter gene constructs harboring progressive deletions that sequentially eliminate the Sox-binding sequences in the α -SG promoter (Fig. 2c). The three Sox-binding elements are located 213 bp, 614 bp, and 822 bp upstream of the transcription start site. They are then referred to as Sox-binding sites 213, 614, and 822, respectively. In MB, deletion of the sequences harboring Sox-binding site 822 caused a modest increment in α -SG promoter activity; however, when the DNA region containing the 614 site was eliminated, a notable 4-fold increased activity was observed (Fig. 2c). Further deletion of the 213 motif

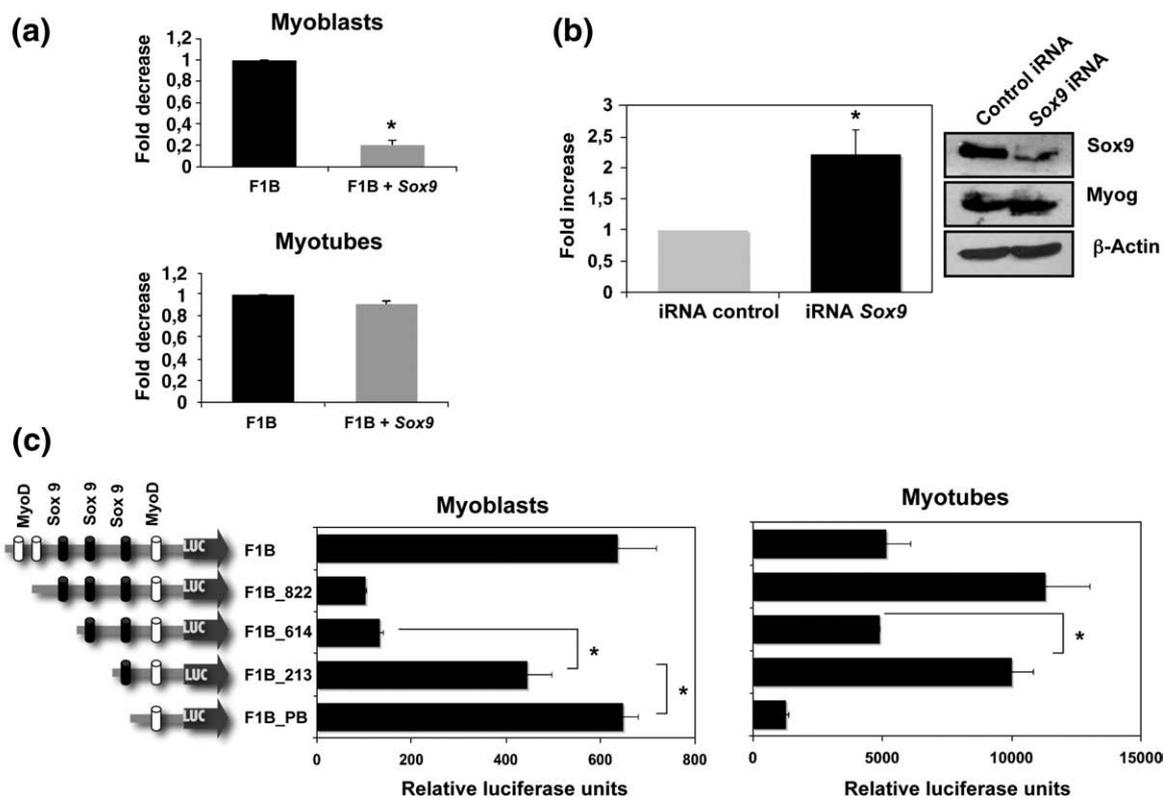


Fig. 2. Sox9 negatively regulates the α -SG promoter in MB. (a) Transfection of Sox9 (F1B+Sox9) caused a 5-fold decrease in α -SG full-length promoter (F1B) activity in C2C12 MB but not in MT. (b) Transfection of an shRNA against Sox9 (Sox9 iRNA) caused a 2.5-fold increase in α -SG full-length promoter activity as compared with cells transfected with a control shRNA. Right panel shows Western blot analyses demonstrating Sox9 knockdown (70%) in cells transfected with a Sox9 iRNA as compared with cells transfected with a control iRNA. β -Actin signals are presented as loading control. (c) Sox-binding elements mediate α -SG promoter repression. The full-length α -SG promoter (F1B) and a series of constructs with serial deletions eliminating two MyoD-binding sites (F1B_822) and Sox-binding sites 822 (F1B_614), 614 (F1B_213), and 213 (F1B_PB), respectively, were transfected in C2C12 cells. Luciferase activity was measured in MB and MT. Values represent the mean \pm SD of at least three independent experiments performed in duplicate. * P <0.05.

rendered an even more pronounced increase of α -SG promoter activity (6-fold). The results obtained from transfected MT suggest that the sequences containing sites 822 and 213 may stimulate α -SG gene promoter activity, whereas deletion in the construct F1B_614 leads to increase the promoter activity, indicating the presence of negative regulatory elements (Fig. 2c). It is possible that the activity of other Sox factors such as Sox6 or Sox15,^{19-21,24} known to positively regulate muscle development, accounts for α -SG promoter activity in MT. Additionally, we must consider the fact that deleted sequences contain additional elements other than Sox-binding sites that might contribute to the regulation of α -SG promoter in MT. These results suggest that sequences containing

the Sox-binding elements 213, 614, and 822 mediate α -SG gene repression in undifferentiated myogenic cells.

Sox9 physically interacts with three Sox recognition motifs in the α -SG promoter

To further examine whether Sox9 binds *in vitro* the Sox recognition elements identified in the α -SG promoter region, we performed electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using as probes [γ -³²P]dATP-labeled complementary oligonucleotides including sequences corresponding to wild type as well as mutated versions of the Sox-binding elements 822, 614, and 213 (Fig. 3). Probes were

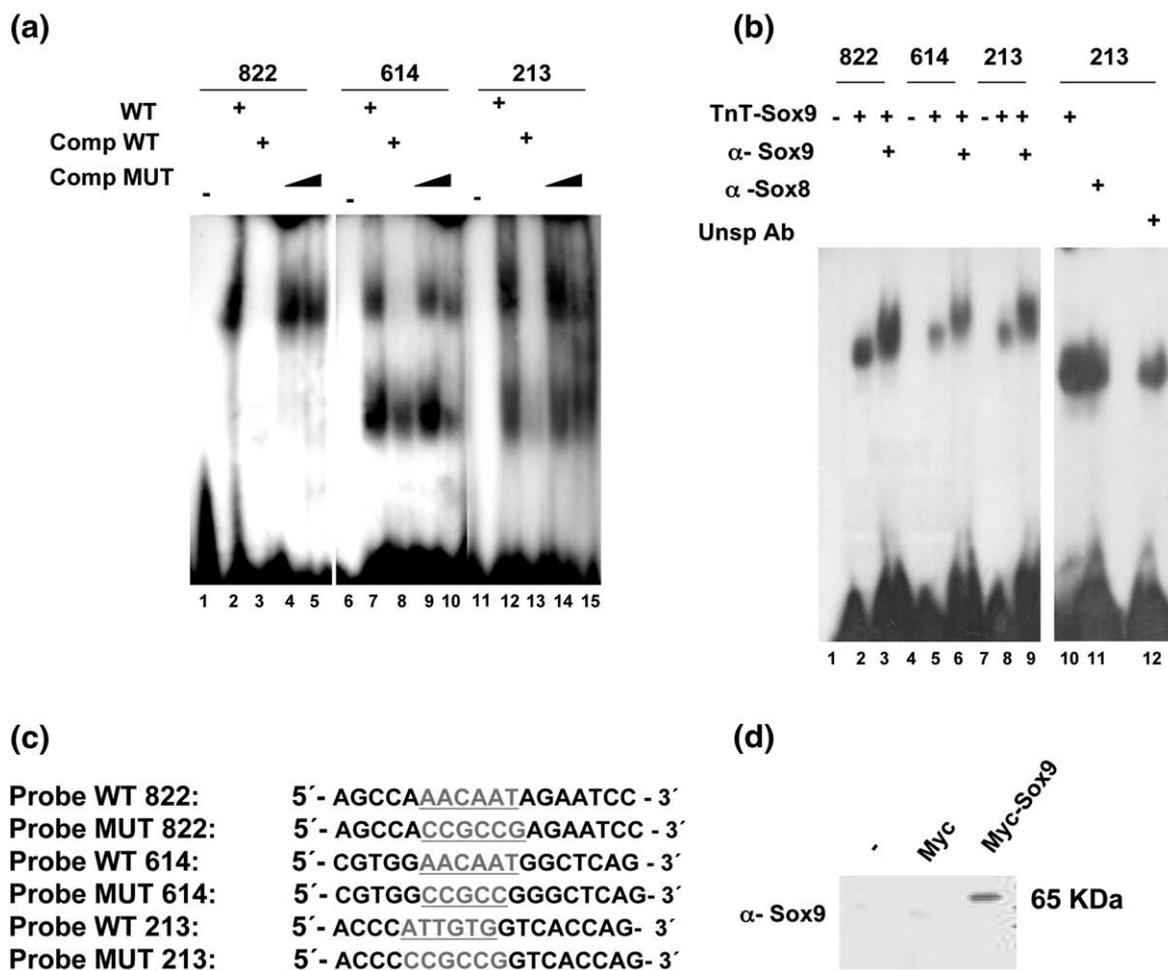


Fig. 3. Sox9 interacts *in vitro* with three Sox-binding elements in the α -SG promoter. (a) Gel-shift analysis with probes including the α -SG Sox-binding elements 822, 614, and 213. Nuclear proteins from C2C12 cells interact with the α -SG Sox-binding elements as revealed by shifted complexes (lanes 2, 7, and 12). Such complexes were abolished upon competition in the presence of a 50-fold excess of unlabeled probes (lanes 3, 8, and 13), whereas competition with increasing amounts of oligonucleotides harboring mutated Sox-binding sequences had little effect on the complexes (lanes 4, 5, 9, 10, 14, and 15). Lanes 1, 6, and 11 correspond to free probe. (b) Gel-shift assay using *in vitro* transcription–translation extracts of Sox9 (TnT-Sox9). Interaction of Sox9 with probes including Sox-binding sites 822, 614, and 213 revealed retarded complexes (lanes 2, 5, and 8), which were supershifted in the presence of an anti-Sox9 antibody (α -Sox9) (lanes 3, 6, and 9) but not an anti-Sox8 or unspecific antibodies (lanes 11 and 12). (c) Wild-type (WT) and mutant (MUT) sequences of the Sox9-binding sites in the α -SG promoter. The core binding sequence is underlined. (d) Western blot analysis of *in vitro* synthesized Sox9 (Myc-Sox9) revealed a specific 65-kDa protein when an anti-Sox9 antibody was used (α -Sox9). Such protein was absent both in control extracts with empty plasmid (Myc) and without Sox9-encoding plasmid (-).

incubated with nuclear extracts obtained from C2C12 MB (Fig. 3a) as well as *in vitro* synthesized Sox9 (TnT-Sox9) (Fig. 3b), and proper synthesis was confirmed by Western blot (Fig. 3d). Probes corresponding to Sox-binding sites 822, 614, and 213 showed retarded complexes when incubated with MB nuclear extracts (Fig. 3a, lanes 2, 7, and 12). Such complexes were abolished upon addition of an excess of unlabeled probes including the wild-type Sox-binding sequences (Fig. 3a, lanes 3, 8, and 13), whereas they were not altered by increasing amounts of probes in which the Sox-binding elements were mutated (Fig. 3a, lanes 4, 5, 9, 10, 14, and 15). These results suggest that Sox proteins could interact with the Sox-binding elements in the α -SG promoter. Subsequently, we sought to determine whether Sox9 is able to interact with such elements (Fig. 3b). Retarded complexes resulted from incubation of probes corresponding to Sox-binding sites 822, 614, and 213 with TnT-Sox9 (Fig. 3b, lanes 2, 5, and 8). In addition, formation of supershifted complexes was favored by addition of an anti-Sox9 antibody (Fig. 3b, lanes 3, 6, and 9), whereas addition of unspecific and anti-Sox8 antibodies had no effect (Fig. 3b, lanes 11 and 12). Our results indicate that Sox9 binds *in vitro* to the three Sox recognition sequences present in the α -SG promoter.

Sox-binding sites are essential for Sox9-mediated inhibition of α -SG gene expression

We proceeded to address the contribution of each Sox-binding motif to the transcriptional control of the α -SG gene (Fig. 4a). For this purpose, we transiently transfected in C2C12 MB a luciferase reporter gene construct containing the full-length α -SG promoter with site-specific mutations disrupting the Sox-binding sites 822, 614, and 213. Disruption of site 213 caused a 3.7-fold increase in luciferase activity as compared with the wild-type promoter (construct F1B) (Fig. 4a, lanes 1 and 2). Mutation of Sox-binding site 822 induced a 1.9-fold increase in luciferase activity (Fig. 4a, lane 3), whereas the effect of the double mutant for Sox-binding sites 213 and 822 caused an increment of 7.8-fold of the reporter gene expression (Fig. 4a, lane 4). The triple mutant for Sox-binding sites 213, 614, and 822 presented a 20-fold increase in luciferase activity as compared with the wild-type promoter (Fig. 4a, lane 5). Furthermore, activity of this construct was not affected by overexpression of Sox9 (Fig. 4a, lane 9), indicating that Sox-binding sites 213, 614, and 822 are all indispensable for Sox9-mediated α -SG gene repression regulation.

Sox9 represses α -SG promoter activity independent of MyoD

Our results show that the α -SG promoter, which contains functional MyoD-binding sites (E-boxes) bound by MyoD *in vivo*,¹⁵ is negatively regulated by Sox9. This finding, in conjunction with the fact that

Sox8 and Sox9 inhibit the activity of the myogenin promoter in the absence of putative Sox-binding elements, and presumably modulating the transactivation potential of MyoD,²² led us to explore whether Sox9 inhibits α -SG gene expression by affecting MyoD activity. To this end, we cotransfected C2C12 MB with cDNAs encoding MyoD or Sox9 (Fig. 4b) with constructs containing the α -SG full-length promoter (F1B), the promoter without Sox-binding sites but with an intact E-box (Del_131), and that without both types of elements (Del_BP), respectively. As previously reported,¹⁵ MyoD transactivated the three versions of the α -SG promoter, although F1B was activated to a lesser extent (Fig. 4b, lane 2). In agreement with our previous experiments, the full-length promoter activity was negatively affected by Sox9 overexpression (Figs. 2a and 4b, lane 3), whereas the α -SG promoter versions Del_131 and Del_BP, in which the three Sox-binding elements were absent, were not responsive to Sox9 (Fig. 4b, lanes 3 and 4). Importantly, Sox9 did not counteract the stimulatory effect that MyoD exerted on the three versions of the promoter (Fig. 4, lanes 2 and 5). Together, these results support the notion that Sox9 negatively regulates α -SG gene expression by directly contacting the Sox-binding motifs and independent of MyoD.

TGF- β increases the trans-repression potential of Sox9 and negatively regulates α -SG promoter activity

Several lines of evidence indicate that undifferentiated mesenchymal cells differentiate into chondrocytes, osteoblasts, adipocytes, and myocytes.²⁵⁻²⁷ C2C12, a mouse myoblastic cell line, can be differentiated into osteogenic and adipogenic lineages upon stimulation with specific inducers.²⁸ This argues in favor of some degree of plasticity that remains before terminal myogenic differentiation. In this regard, the TGF- β signaling pathway inhibits myogenesis^{25,29-31} while favoring chondrogenic differentiation through a mechanism that involves direct physical interaction of phosphorylated Smad3 (p-Smad3) with Sox9 at target gene regulatory regions.³² Having demonstrated that Sox9 negatively regulates the α -SG gene, which is a marker of myogenic terminal differentiation,³³ we decided to investigate whether TGF- β may contribute to the negative modulation of α -SG gene expression through the canonical effector of the TGF- β pathway Smad3. We cotransfected the full-length promoter (F1B) with Sox9, Smad3, and Smad7 expression vectors in MB. The F1B promoter construct was downregulated by Smad3 and Sox9 (Fig. 4b, compare lane 1 with lanes 3 and 4) but is upregulated by Smad7, which has been identified as an inhibitor of Smad3 activity³⁴ (Fig. 4b, lane 7). In contrast, cotransfection of both Sox9 and Smad3 caused a synergistic effect silencing the α -SG promoter (Fig. 5a, lane 5). Sequence analysis did not reveal Smad-binding elements along the α -SG promoter, suggesting that Smad3 may depend on

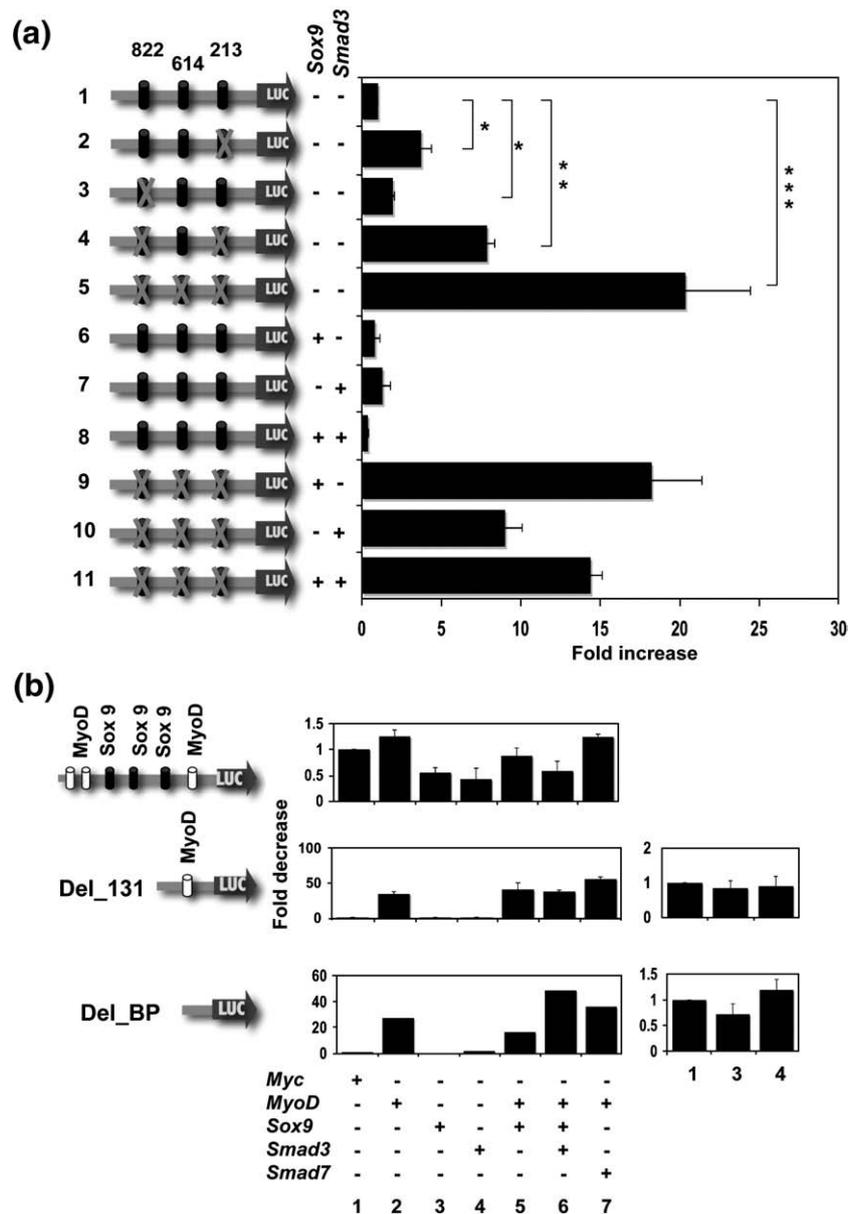


Fig. 4. Sox-binding elements are required for cooperative repression of the α -SG promoter by Sox9 and Smad3. (a) Sox-binding motifs 822, 614, and 213 were mutated (cylinders crossed) either individually or in combination in a series of constructs (left panel), which were transfected into C2C12 in the presence or absence of Sox9- and Smad3-encoding plasmids. Luciferase activities are presented as fold increase over the WT promoter activity (1). Data here and in (b) represent the mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (b) Vectors encoding *MyoD*, *Sox9*, *Smad3* and *Smad7*, as well as an empty plasmid (*Myc*), were cotransfected in different combinations with the full-length α -SG promoter (F1B), with the promoter including a MyoD-binding site (F1B_131) and the core promoter (F1B_BP). Fold changes in luciferase activity are shown. Luciferase activities obtained with the conditions shown in lanes 1, 3, and 4 are presented on the right.

Sox9-mediated recruitment. This hypothesis is supported by the fact that neither Sox9 nor Smad3 was capable of downregulating the α -SG promoter versions in constructs Del_131 and Del_PB in which the Sox-binding sites were eliminated (Fig. 4b, lanes 1–4). Similarly, the full-length α -SG promoter with site-specific mutations disrupting all three Sox-binding sites 822, 614, and 213 was not responsive to Sox9 (Fig. 4a). These results suggest that Sox9 and Smad3 cooperate in the inhibition of α -SG gene expression.

Smad3 is the canonical effector of the TGF- β pathway.³⁴ Thus, we addressed whether TGF- β transduction signals could mediate downregulation of the α -SG gene expression. For this purpose, we cotransfected the F1B promoter construct in combination with *Smad3*, *Smad7*, and *Sox9* in the presence or absence of TGF- β , which was added to the culture media. Addition of TGF- β alone caused decreased promoter activity in MB (Fig. 5a, lane 1), probably due to activation of endogenous Smad3 (Fig. 5b, lanes 1 and 2). Interestingly, TGF- β enhanced the

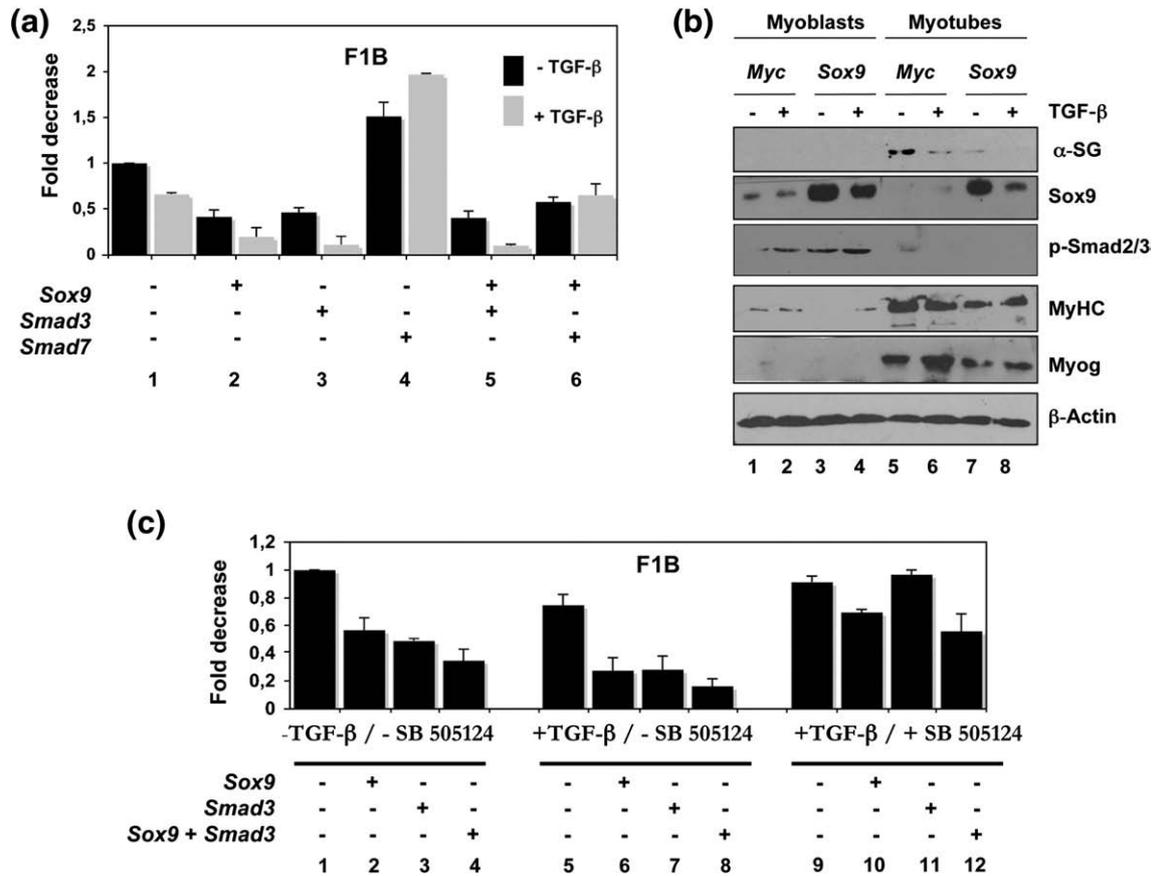


Fig. 5. TGF- β increases the Sox9 trans-repression potential over the α -SG promoter through Smad3. (a) The α -SG full-length promoter (F1B) was cotransfected in C2C12 cells with Sox9-, Smad3-, and Smad7-encoding vectors in the presence (+TGF- β) or absence (-TGF- β) of TGF- β , which was added to the culture media. (b) Western blot analysis on protein extracts obtained from C2C12 cells stably transfected with a Sox9-encoding vector (Sox9) or an empty plasmid (N-Myc), stimulated with TGF- β . The presence of α -SG, Sox9, phosphorylated Smad2/3 (pSmad2/3), MyHC, myogenin, and β -actin was addressed. (c) Cells transfected as indicated in (a) were cultured in the presence or absence of TGF- β and the TGF- β signaling inhibitor SB 505124.

negative effect of Sox9 and Smad3 as shown by promoter repression to basal levels (Fig. 5a, lanes 2, 3, and 5), suggesting that, indeed, α -SG gene expression is negatively regulated by TGF- β pathway through Smad3. This hypothesis is further supported by the fact that overexpression of Smad7, which acts as a Smad3 inhibitor,³⁴ led to stimulation of the α -SG full-length promoter. This stimulatory effect was even more notorious in the presence of TGF- β (Fig. 5a, lane 4). In addition, Smad7 relieved the negative effect exerted by Sox9 over the α -SG promoter, even in the presence of TGF- β (Fig. 5a, lane 6).

We decided to extend our studies to validate Smad3 as an intracellular effector of the TGF- β pathway (Fig. 5b), which targets α -SG gene expression regulation. We analyzed the protein levels of p-Smad3, Sox9, α -SG, MyHC, and myogenin in both MB and MT stably overexpressing Sox9 and control cells stably transfected with an empty vector (pcDNA-Myc). As expected, the Sox9 signal was clearly increased in MB overexpressing Sox9 as compared with control cells (Fig. 5b, lanes 3 and 4),

whereas in MT, Sox9 was only detected in transfected cells (Fig. 5b, lanes 7 and 8). The signal corresponding to p-Smad3 increased upon activation of TGF- β signaling in MB (Fig. 5b, lanes 1–4). Surprisingly, overexpression of Sox9 appeared to favor phosphorylation of Smad3 (Fig. 5, compare lanes 1 and 3). In contrast, p-Smad3 was not detected in MT. These results involve the TGF- β pathway in the repression of the α -SG gene expression by activation of Smad3, which cooperates with Sox9 to downregulate the α -SG gene promoter. This hypothesis is strengthened by the fact that activation of the TGF- β pathway in MT caused a decrease of the α -SG protein (Fig. 5b, lanes 5 and 6), whose levels were dramatically reduced in Sox9 overexpressing cells stimulated with TGF- β (Fig. 5, lanes 7 and 8). MyHC and myogenin signals also decreased in MT overexpressing Sox9 (Fig. 5b, lanes 7 and 8). The presence of Sox9 and TGF- β correlated with a dramatically decreased signal of α -SG protein in MT (Fig. 5b, lanes 7 and 8), despite the fact that pSmad3 was not detected at this stage (Fig. 5b, lanes 5–8). α -SG peak levels are found only in terminally differentiated MT

(Fig. 1a),³³ which explains the absence of signal in MB (Fig. 5b, lanes 1–4). However, our RT-PCR analyses on Sox9-overexpressing MB in which the phosphorylated form of Smad3 is present (Fig. 5b, lanes 2–4) showed decreased levels of the α -SG mRNA (Fig. 1b, lanes 1 and 2). In conjunction, these results support the hypothesis that Smad3 acts as an effector molecule of the TGF- β pathway influencing α -SG gene repression.

We further analyzed the α -SG gene promoter response upon inhibition of the TGF- β pathway. To this end, we stimulated C2C12 MB transiently cotransfected with the α -SG full-length promoter with Sox9 and Smad3 expression vectors in the presence of a specific inhibitor of the TGF- β receptor I serine/threonine kinase (T β RI kinase). Consistent with our previous observations, Sox9 and Smad3 cooperatively repressed α -SG promoter activity, and their effect was exacerbated in the presence of TGF- β (Fig. 5c, lanes 1–8). Importantly, the repression exerted by Sox9 and Smad3, individually and in combination with TGF- β on the α -SG gene promoter, was counteracted with the presence of the T β RI kinase inhibitor SB505124³⁵ (Fig. 5c, lanes 9–11), although luciferase activities were not fully restored whenever Sox9 was transfected (Fig. 5c, lanes 10 and 12). This may be explained by alternative pathways, other than the TGF- β pathway, which, in coordination with Sox9, contribute to negative regulation of α -SG gene expression. These results confirm the involvement of the TGF- β signaling pathway in α -SG gene repression.

Sox9 and p-Smad3 contact the α -SG promoter *in vivo*

To further investigate whether Sox9 and p-Smad3 are recruited to the α -SG promoter *in vivo*, we carried out chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays with C2C12 MB and MT, using anti-Sox9 and anti-pSmad3 antibodies (Fig. 6). For controls, we used anti-MyoD and immunoglobulin G (IgG) antibodies. We used the immunoprecipitated DNA as a template for amplification and primers that include the Sox-binding sites 822, 614, and 213 present in the α -SG promoter. As controls, we also amplified a DNA region including two E-boxes known to bind MyoD in C2C12 MB and MT,¹⁵ as well as a portion of the distal α -SG exon 4 as negative control (Fig. 6a). Sox-binding sites 822, 614, and 213 were enriched from immunoprecipitated chromatin using anti-Sox9 and anti-pSmad3 antibodies, but not with an IgG, in MB (Fig. 6b). As expected, no amplification was obtained from the chromatin of the MT (Fig. 6b). We were unable to identify any immunoprecipitation enrichment using primers amplifying the α -SG exon 4. As previously reported,¹⁵ MyoD was found to interact *in vivo* with two functional E-boxes of α -SG distal promoter and not with exon 4 in MB and MT (Fig. 6c). Together, our results indicate that α -SG gene expression is repressed by the cooperative action of Sox9, which directly contacts the α -SG promoter, and Smad3, which is activated by TGF- β signaling pathway in early stages of muscle differentiation.

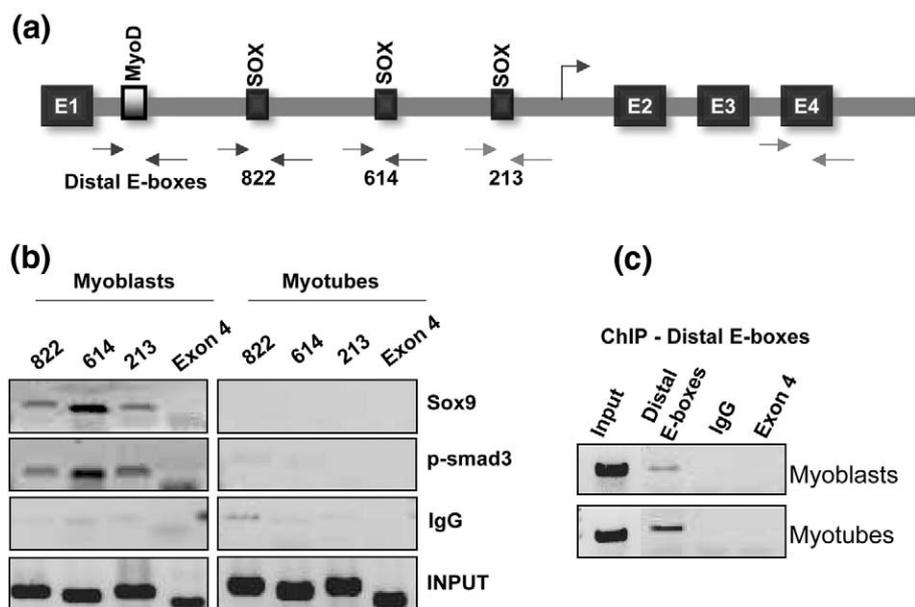


Fig. 6. Sox9 and Smad3 interact with the Sox-binding elements in the α -SG promoter *in vivo*. (a) Schematic diagram of the α -SG promoter indicating the presence of the distal E-boxes as well as the Sox-binding elements 822, 614, and 213. Exons 1, 2, 3, and 4 (E1–E4) are also indicated. Arrows delimit the DNA regions amplified from immunoprecipitated chromatin. (b) Chromatin immunoprecipitated with anti-Sox9, anti-pSmad3, and anti-IgG antibody was used as a template for PCR amplification of the DNA regions indicated in (a). (c) As a positive control for the immunoprecipitation, we amplified a DNA fragment including two distal E-boxes of the α -SG promoter from chromatin immunoprecipitated with an anti-MyoD antibody. PCR products were not obtained from chromatin immunoprecipitated with an IgG.

Discussion

Expression of the α -SG gene, whose deficiency leads to limb-girdle muscular dystrophy type 2D, is regulated during myogenic differentiation. Our group has recently demonstrated the contribution of MyoD as well as NF1 transcription factors in regulating α -SG promoter activity.^{14–16} Because the molecular mechanisms responsible for maintaining transcriptional repression at early myogenic differentiation remain poorly understood, our attention was focused on the role that transcription factor Sox9 has over α -SG gene expression. We present unprecedented evidence indicating that Sox9 can directly contact the α -SG promoter, contributing in this way with the gene expression regulation. α -SG is expressed only during myogenic terminal differentiation, while Sox9 is expressed in MB and is downregulated as differentiation proceeds. Thus, α -SG gene expression could be favored upon absence of the repressive stimuli of Sox9 in MT. Furthermore, we show that TGF- β contributes to α -SG gene repression partially through activation of Smad3, which cooperates with Sox9 in the negative regulation of the α -SG promoter.

An interesting aspect of our results is the demonstration that the inhibition of α -SG gene expression by Sox9 is independent of MyoD (Fig. 4b). This finding contrasts with the prevailing idea that Sox8- and Sox9-mediated downregulation of myogenic gene expression is achieved by interference with the function of myogenic basic helix–loop–helix (bHLH) proteins without direct interaction with DNA.²² Indeed, our results indicate that Sox-binding elements in the α -SG promoter are indispensable for Sox9-mediated gene repression, as demonstrated by site-directed mutagenesis of 213, 614, and 822 motifs (Fig. 4a). The contribution of different Sox proteins to muscle regulation remains to be elucidated since it has been described that in the absence of Sox8, there is no muscular phenotype,³⁶ which could be

explained by overlapping functions of Sox proteins. In this regard, we observed that after mutation of all three Sox-binding sites, the promoter activity was restored and upregulated even up to 20-fold, whereas the inhibition of Sox9 with a specific RNA interference led to a 2.5-fold increase in α -SG promoter activity; nevertheless, overexpression of Sox9 caused a decrease in α -SG protein level, which highlights the contribution of Sox9, which, in combination with others repressors, regulates this complex muscular promoter. The physiological implication of this over the SG–SSPN complex assembly and the muscle fiber integrity must be analyzed in future studies.

In addition, our results suggest that Sox9 could negatively regulate muscle-specific gene expression through alternative mechanisms such as recruitment of corepressors. In this regard, our results imply that Sox9 could recruit Smad3, which is activated by the TGF- β pathway to Sox-binding elements in the α -SG promoter, enhancing its repressive activity (Fig. 7). This model provides an alternative mode of action for TGF- β proteins, which are known as potent inhibitors of terminal myogenic differentiation.^{29,37} It was previously been proposed that TGF- β signaling perturbs myogenic differentiation by interaction of myogenic regulatory factors (MRFs) with Smad3 through a protein motif within the bHLH region of the MRF, conferring susceptibility to TGF- β -induced myogenic inhibition. In addition, Smad3 impairs the transcriptional activity of bHLH factors by disrupting heterodimer assembly on E-boxes of target genes.³⁷ Likewise, Smad3 interacts with MEF2C, impeding GRIP-1-mediated nuclear redistribution of MEF2C and GRIP-1 recruitment to the myogenin promoter. Importantly, none of these models involve direct interaction of Smad3 with its DNA-binding sequence. On the other hand, our computational analysis of the α -SG promoter did not show putative Smad3-specific regions; however, our results show that Smad3 is involved in the repression of the α -SG gene expression. In addition,

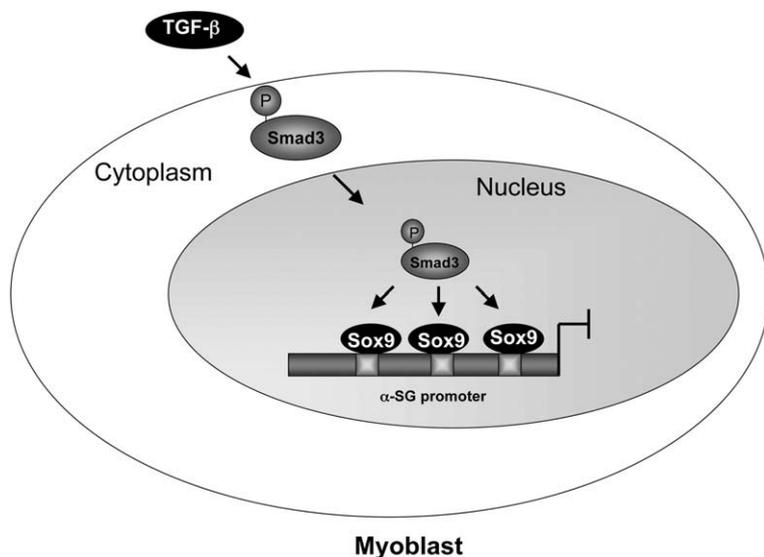


Fig. 7. Model of α -SG gene repression in MB. TGF- β signaling stimulates Smad3 activation by phosphorylation. Upon activation, Smad3 is recruited to the Sox-binding elements in the α -SG promoter via Sox9. Sox9 and Smad3 corepress α -SG gene expression, preventing precocious gene activation in MBs.

Smad3-mediated α -SG gene repression was dependent on the presence of Sox9 and the integrity of the Sox-binding motifs. In agreement, in MB, we showed the interaction of both transcription factors on the 213, 614, and 822 Sox motifs of the α -SG promoter but not in MT. These facts, in conjunction with the known physical association between Sox9 and Smad3,^{38,39} open the possibility of the existence of a repressor complex constituted at least by Sox9 and p-Smad3, which may be recruited to the α -SG promoter via Sox9, thus favoring α -SG gene repression in MB. In accordance with this hypothesis, inhibition of the canonical TGF- β signal pathway and the consequent Smad3 inactivation should relieve the negative influence exerted by Sox9 and Smad3 over α -SG gene expression.

Sox8 and Sox9 have been localized exclusively in satellite cells in adult muscle fibers²² and may thus play a role in maintaining an undifferentiated and proliferative state in these cells to prevent precocious differentiation of these cells. On the other hand, TGF- β regulates regeneration of satellite cells. In addition, p-Smad3 localizes at promoters of p15, p16, p21, and p27 genes in satellite cells upon Notch signaling inhibition.⁴⁰ These facts incorporate TGF- β pathway through Smad3 and Sox9 in the control of undifferentiated muscle cells. However, whether this pathway regulates aspects of adult muscle regeneration remains unexplored. We observed that the α -SG gene is silenced in differentiated muscle fibers stimulated with TGF- β , even in the absence of pSmad3. This implies that the TGF- β pathway may regulate gene expression in differentiated muscle cells through a Smad3-independent pathway. Indeed, TGF- β -induced activation of p38 MAPK, but not Smads, contributes to myogenic gene repression. Inhibition of p38 activity at late stages of myogenic differentiation results in increased MRF4-dependent expression of desmin and α -actin but not MCK or myogenin, showing that p38-mediated repression of the activity of MRF4 selectively affects genes expressed late in differentiation.⁴¹ Because α -SG is expressed during terminal differentiation and is repressed by TGF- β , these facts raise the question whether an alternative pathway involving p38 and inhibition of MRF4 during myogenic differentiation could mediate TGF- β signals for α -SG gene repression.

In conclusion, our results show that Sox9 contributes with repression of muscle gene expression by directly contacting a regulatory region. Furthermore, we show that TGF- β contributes to gene repression partially through activation of Smad3, which cooperates with Sox9 in negative regulation of the α -SG promoter, providing a novel mechanism for suppression of myogenic gene expression.

Materials and Methods

Plasmids and constructs

Construct F1B containing 2.6 kb of the mouse α -SG promoter and constructs F1B_822, F1B_614, F1B_213, and

F1B_PB containing serial deletion fragments of the promoter were previously reported.¹⁵ Plasmids pF1BSox-MUT822, pF1BSoxMUT614, pF1BSoxMUT213, pF1BSox-MUT822/614, and pF1BSoxMUT822/614/213 containing point mutations disrupting the putative Sox9-binding sites were generated using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotides used to introduce the nucleotide substitutions were F1BSox_MUT 822 5'-AGCCACCGCCGAGAATCC-3', F1BSox_MUT 614 5'-CGTGGCCGCCGGGCTCAG-3', and F1BSox213_MUT 5'-ACCCCCGCCGGTCACCAG-3'. Introduction of mutations into the constructs was confirmed by DNA sequencing. Plasmids pCMV5, pCMV5-Smad3, and pCMV5-Smad7 were kindly provided by Marina Macías Silva (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico City). The plasmid pcDNA N-Myc-Sox9 was obtained by cloning the murine *Sox9* cDNA obtained from 8.5 days post-coitum embryonic RNA into the XhoI-XbaI sites of pcDNA-N-Myc plasmid. Integrity of the construct was confirmed by DNA sequencing.

Cell culture, transfection, and reporter gene activity analysis

Mouse myogenic C2C12 cells (American Type Culture Collection 1772) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Differentiation was induced with media supplemented with 1% fetal calf serum, once cells were cultured at a confluent density.

One microgram of each construct was transiently cotransfected with 250 ng of pRL/CMV (Promega, Madison, WI) plasmid used to normalize luciferase activities and defined amounts of Sox9, Smad3, Smad7, or MyoD overexpression plasmids. When required, 2 ng/ml of TGF- β (Sigma, St. Louis, MO) was added to the culture, and T β RI-specific inhibitor SB-505124 (Sigma) was used at a final concentration of 5 mM.

For luciferase assays, C2C12 MBs were harvested 24 h post-transfection. Replicates were induced to differentiation and collected 4 days later. Luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions in a TD-20/20 luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA). For stable transfections, linearized pcDNA-N-Myc-Sox9 or pcDNA-N-Myc was transfected. pQBI-GFP plasmid was transfected as control. Pools of stably transfected cells were selected by culturing in the presence of 600 μ g/ml of geneticin (Gibco) for 15 days. Stable pools were split into three and analyzed for GFP and Sox9 expression.

Sox9 knockdown

Sox9 was knocked down by transient transfection of the plasmid pSilencerTM-4.1-CMV⁴² encoding an shRNA against mouse Sox9. This plasmid was kindly provided by Michael S. German (University of California, San Francisco).

Isolation of total RNA and RT-PCR analysis

RNA extractions from mouse embryos at 8.5 days post-coitum, as well as C2C12 cells, were performed using TRIzol reagent (Invitrogen). cDNA was obtained by RT from 3 μ g of total RNA using random hexanucleotides.

The generated cDNA was used for PCR amplification of Sox9. Oligonucleotides used were Sox9_forward 5'-CCGGGCTCGCGTATGAATCT-3' and Sox9_reverse 5'-TCACCAGACCCTGAGAAGAG-3'. To analyze the expression of α -, β -, γ -, and δ -SGs as well as sarcospan in transfected C2C12 cells, we used the following oligonucleotides: α -SG: forward, 5'-AGAGGCTGCTGCTGCTGATT-3'; reverse, 5'-GAGGTGCCAAGGTGTCATAG-3'; β -SG: forward, 5'-GGTCTGCTGAGGTTCAAGCAAGT-3'; reverse, 5'-GAAACTCGTGCGTCTCATAGTCC-3'; γ -SG: forward, 5'-CCAGAGCCAGCACTTACAGA-3'; reverse, 5'-GAAGAGGGAGTGGTCAGAGA-3'; δ -SG: forward, 5'-TACGGCTGGAGGAAAAGATG-3'; reverse, 5'-TGGCGTAGAGAGGTTGTAAG-3'; and SSPN: forward, 5'-GCTAGTCAGAGACACTCCGT-3'; reverse, 5'-GCAGCCCAACACCCACATAA-3'. We amplified GAPDH for normalization using the following primers: forward, 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'; reverse, 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'.

Isolation of nuclear extracts and EMSA

Nuclear extracts were prepared from MBs and MTs basically as described previously.⁴³ Briefly, 1×10^6 cells were harvested in cold phosphate-buffered saline, centrifuged, and resuspended in 400 μ l cold lysis buffer [10 mM Hepes, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)*N,N'*-tetraacetic acid, 1 mM DTT, and 0.5 mM PMSF]. Cell lysates were incubated on ice for 15 min, and 25 μ l of 10% NP-40 (Fluka, Sigma-Aldrich, Switzerland) was added. The mix was vortexed and centrifuged at 13,000g for 30 s at 4 °C. Subsequently, the pellet containing the nuclei was resuspended in 50 μ l of extraction buffer [20 mM Hepes, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)*N,N'*-tetraacetic acid, 1 mM DTT, and 1 mM PMSF] and vigorously shaken at 4 °C for 15 min. The extract was cleared by centrifugation at 8000g for 5 min at 4 °C. The supernatant was recovered, and the protein concentration was determined by Bradford assay (BioRad, Hercules, CA). Nuclear extracts were stored at -70 °C until use.

For EMSAs, complementary oligonucleotides including the identified Sox-binding sequences were annealed, labeled with [γ -³²P]dATP (Amersham Biosciences, UK), and used as probes. Assays were performed as previously reported.¹⁶ Competition assays were performed with 10 μ g of nuclear extracts in the presence of 10-, 50-, and 100-fold excess of unlabeled probe. In some experiments, EMSAs were carried out using Sox9, obtained with the TnT-Quick Transcription/Translation System (Promega). Supershift assays were performed incorporating to the binding reaction 5 μ g of an anti-Sox9 antibody (sc-17341 X, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). As negative control, the same amount of a rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology) was used.

Oligonucleotides used as probes were as follows: SOX822_WT: GACAAAAGCCAAAGCCAAACAATAG-AATCCCAAGGCTGT, SOX614_WT: AAAACCAAAAGGGCGTGGGAACAATGGCTCAGTGGTTAA, SOX213_WT: AGACGCCAGATAAAACCCATTG-TGGTACCAGGGACAAC, SOX822_MUT: GACAAAAGCCAAAGCCACCGCCGAGAATCCCAAGGCTGT, SOX614_MUT: AAAACCAAAAGGGCGTGG-CGCCGGGCTCAGTGGTTAA, and SOX213_MUT: AGACGCCAGATAAAACCCCGCCGTCACCGG-ACAAC. Only the sense strands are shown. The wild-type and mutated Sox-binding-site sequences are underlined.

ChIP assay

ChIP assays were performed as previously described.¹⁶ In brief, 4×10^7 cells were treated with 1% formaldehyde to cross-link protein-DNA complexes. Cells were lysed in 1% SDS, 10 mM EDTA, pH 8, and 50 mM Tris-HCl, pH 8, with protease inhibitors. Chromatin was sonicated and subjected to immunoprecipitation with 4 μ g of the anti-Sox9 (sc-20095, Santa Cruz Biotechnology) or anti-pSmad3 (sc-11769, Santa Cruz Biotechnology) antibodies. Cross-linking was reversed and DNA was purified by using MiniElute Spin Columns (QIAGEN, Hilden, Germany) and used as template for PCR amplification. Amplified fragments include the Sox recognition sites 822, 614, and 213. Primers used were SOX_822F: 5'-AGAGCAAGACAAAAGCCAAAG-3', SOX_822R: 5'-GTTGTGAAGGTGATCTTGAAC-3', SOX_614F: 5'-GGACTACATGAGAGTGTCTTG-3', SOX_614R: 5'-GAAAGCTAGAAGAGGGAATCG-3', SOX_213F: 5'-AGTCAAAGCAGGCAAACAGAC-3', and SOX_213R: 5'-CTCTTTCCATCCAGAGTGA-3'. As a negative control, a 139-bp DNA fragment of the α -SG exon 4 was amplified with the following oligonucleotides: α -SGE4F: 5'-ACTGTCCGACTCACCTACCA-3' and α -SGE4R: 5'-TGACTTGGTACCCACGATCT-3'. PCR conditions were as follows: 1 cycle at 95 °C for 3 min, 31 cycles at 95 °C for 45 s, 62 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 7 min.

Immunofluorescence and Western blot analysis

For immunofluorescence, C2C12 cells were grown on coverslips treated with collagen type I (Sigma) in 24-well plates. Cells were fixed in methanol at -70 °C for 10 min, blocked with 10% fetal bovine serum, 10% albumin, and 1% TBS Tween and permeabilized with 0.05% Triton X-100. Subsequently, cells were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody. After three washes with phosphate-buffered saline, samples were incubated with secondary antibodies coupled with fluorescein isothiocyanate or carboxymethyl indocyanine-3 for 1 h at room temperature. Samples were washed and mounted in Vectashield-4',6'-diamidino-2-phenylindole medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finally, slides were examined through a fluorescence microscope (Axioplan 2 Imaging Microscope, Carl Zeiss, Germany). Western blot was performed as described elsewhere. Protein was extracted from C2C12 cells using RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology) and quantified by Bradford assay (BioRad). Eighty micrograms of protein was resolved by SDS-PAGE. Antibodies used are anti- α -SG (VP-A105, Vector Laboratories), anti-MyHC (H-300, Santa Cruz Biotechnology), anti-myogenin (sc-576 Santa Cruz Biotechnology), anti-Sox9 (sc-20095, Santa Cruz Biotechnology), anti-MyoD (sc-304, Santa Cruz Biotechnology), anti-GAPDH (sc-20357, Santa Cruz Biotechnology), anti- β -actin (Calbiochem CP01, EMD Biochemicals, San Diego, CA), and anti-pSmad2/3 (sc-11769, Santa Cruz Biotechnology).

Acknowledgements

We thank Haydeé Rosas Vargas and Gabriel Hernández Stengele for helpful comments on the manuscript and members of the Ramón Coral Vázquez laboratory for stimulating scientific discussions and

suggestions. We also thank Georgina Guerrero for her excellent technical assistance.

R.C.-V. was supported by grants from the Association Française contre les Myopathies (MNM 2005, Groupe A) and Instituto Mexicano del Seguro Social grant 2005/1/1/197. F.R.-T. was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN214407) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) through grants 42653-Q and 58767. J.M.H.-H. was supported by CONACyT (189007) and by the Instituto Mexicano del Seguro Social Fellowships awards. M.F.-M. is a fellowship recipient from CONACyT (170087).

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the D. Sc. degree for J.M.H.-H. at Instituto de Investigaciones Biomédicas—Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Lim, L. E. & Campbell, K. P. (1998). The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy. *Curr. Opin. Neurol.* **11**, 443–452.
- Wheeler, M. T., Zarnegar, S. & McNally, E. M. (2002). Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2147–2154.
- Chan, Y. M., Bonnemant, C. G., Lidov, H. G. & Kunkel, L. M. (1998). Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J. Cell Biol.* **143**, 2033–2044.
- Noguchi, S., Wakabayashi, E., Imamura, M., Yoshida, M. & Ozawa, E. (2000). Formation of sarcoglycan complex with differentiation in cultured myocytes. *Eur. J. Biochem.* **267**, 640–648.
- Coral-Vázquez, R., Cohn, R. D., Moore, S. A., Hill, J. A., Weiss, R. M., Davisson, R. L. *et al.* (1999). Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell*, **98**, 465–474.
- Duggan, D. J., Manchester, D., Stears, K. P., Mathews, D. J., Hart, C. & Hoffman, E. P. (1997). Mutations in the delta-sarcoglycan gene are a rare cause of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2). *Neurogenetics*, **1**, 49–58.
- Araishi, K., Sasaoka, T., Imamura, M., Noguchi, S., Hama, H., Wakabayashi, E. *et al.* (1999). Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 1589–1598.
- Zhu, X., Hadhazy, M., Groh, M. E., Wheeler, M. T., Wollmann, R. & McNally, E. M. (2001). Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of Sarcoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* **276**, 21785–21790.
- Peter, A. K., Miller, G. & Crosbie, R. H. (2007). Disrupted mechanical stability of the dystrophin-glycoprotein complex causes severe muscular dystrophy in sarcospan transgenic mice. *J. Cell Sci.* **120**, 996–1008.
- Guo, L. T., Zhang, X. U., Kuang, W., Xu, H., Liu, L. A., Vilquin, J. T. *et al.* (2003). Laminin [alpha]2 deficiency and muscular dystrophy; genotype-phenotype correlation in mutant mice. *Neuromuscular Disord.* **13**, 207–215.
- Besse, S., Allamand, V., Vilquin, J.-T., Li, Z., Poirier, C., Vignier, N. *et al.* (2003). Spontaneous muscular dystrophy caused by a retrotransposal insertion in the mouse laminin [alpha]2 chain gene. *Neuromuscular Disord.* **13**, 216–222.
- Straub, V., Ettinger, A. J., Durbeej, M., Venzke, D. P., Cutshall, S., Sanes, J. R. & Campbell, K. P. (1999). ϵ -Sarcoglycan replaces α -sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **274**, 27989–27996.
- Liu, L., Vachon, P. H., Kuang, W., Xu, H., Wewer, U. M., Kylsten, P. & Engvall, E. (1997). Mouse adhalin: primary structure and expression during late stages of muscle differentiation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 227–235.
- Delgado-Olguín, P., Hernández-Hernández, J. M., Salamanca, F., Recillas-Targa, F. & Coral-Vázquez, R. M. (2008). Identification of two E-boxes that negatively modulate the activity of MyoD on the alpha-sarcoglycan core promoter. *Biochim. Biophys. Acta*, **1779**, 74–80.
- Delgado-Olguín, P., Recillas-Targa, F., Rosas-Vargas, H., Salamanca, F. & Coral-Vázquez, R. M. (2006). Partial characterization of the mouse [alpha]-sarcoglycan promoter and its responsiveness to MyoD. *Biochim. Biophys. Acta*, **1759**, 240–246.
- Delgado-Olguín, P., Rosas-Vargas, H., Recillas-Targa, F., Zentella-Dehesa, A., de León, M. B. d., Cisneros, B. *et al.* (2004). NFI-C2 negatively regulates [alpha]-sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 1032–1039.
- Mertin, S., McDowall, S. & Harley, V. (1999). The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1359–1364.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. & Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet.* **16**, 182–187.
- Beranger, F., Mejean, C., Moniot, B., Berta, P. & Vandromme, M. (2000). Muscle differentiation is antagonized by SOX15, a new member of the SOX protein family. *J. Biol. Chem.* **275**, 16103–16109.
- Hagiwara, N., Ma, B. & Ly, A. (2005). Slow and fast fiber isoform gene expression is systematically altered in skeletal muscle of the Sox6 mutant. *Dev. Dyn.* **234**, 301–311.
- Hagiwara, N., Yeh, M. & Liu, A. (2007). Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. *Dev. Dyn.* **236**, 2062–2076.
- Schmidt, K., Glaser, G., Wernig, A., Wegner, M. & Rosorius, O. (2003). Sox8 is a specific marker for muscle satellite cells and inhibits myogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 29769–29775.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E. & Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4878–4884.
- Lee, H.-J., Goring, W., Ochs, M., Muhlfeld, C., Steding, G., Paprotta, I. *et al.* (2004). Sox15 is required for skeletal muscle regeneration. *Mol. Cell Biol.* **24**, 8428–8436.
- Matsushita, T., Matsui, N., Fujioka, H., Kubo, S., Kuroda, R., Kurosaka, M. & Yoshiya, S. (2004). Expression of transcription factor Sox9 in rat L6 myoblastic cells. *Connect. Tissue Res.* **45**, 164–173.
- Bettex-Galland, M. W. U. (1987). Differentiation of L6 myoblastic cells into chondrocytes. *Experientia*, **15**, 610–611.
- Iwata, H. O. S., Sato, K., Sato, T. & Kawamura, M. (1993). Bone morphogenetic protein-induced muscle-

- and synovium-derived cartilage differentiation in vitro. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **296**, 295–300.
28. Gutierrez, J., Osses, N. & Brandan, E. (2006). Changes in secreted and cell associated proteoglycan synthesis during conversion of myoblasts to osteoblasts in response to bone morphogenetic protein-2: role of decorin in cell response to BMP-2. *J. Cell. Physiol.* **206**, 58–67.
 29. Liu, D., Kang, J. S. & Derynck, R. (2004). TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation. *EMBO J.* **23**, 1557–1566.
 30. Zhu, S., Goldschmidt-Clermont, P. J. & Dong, C. (2004). Transforming growth factor- β -induced inhibition of myogenesis is mediated through Smad pathway and is modulated by microtubule dynamic stability. *Circ. Res.* **94**, 617–625.
 31. Olson, E., Sternberg, E., Hu, J., Spizz, G. & Wilcox, C. (1986). Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. *J. Cell Biol.* **103**, 1799–1805.
 32. Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y. & Asahara, H. (2005). Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J. Biol. Chem.* **280**, 8343–8350.
 33. Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S. & Ozawa, E. (2001). Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene. *Eur. J. Biochem.* **268**, 948–957.
 34. Shi, Y. & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, **113**, 685–700.
 35. DaCosta Byfield, S., Major, C., Laping, N. J. & Roberts, A. B. (2004). SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor- β type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **65**, 744–752.
 36. Sock, E., Schmidt, K., Hermanns-Borgmeyer, I., Bosl, M. R. & Wegner, M. (2001). Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6951–6959.
 37. Liu, D., Black, B. L. & Derynck, R. (2001). TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* **15**, 2950–2966.
 38. Furumatsu, T., Tsuda, M., Yoshida, K., Taniguchi, N., Ito, T., Hashimoto, M. *et al.* (2005). Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **280**, 35203–35208.
 39. Furumatsu, T., Ozaki, T. & Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1198–1204.
 40. Carlson, M. E., Hsu, M. & Conboy, I. M. (2008). Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature*, **454**, 528–532.
 41. Suelves, M., Lluís, F., Ruiz, V., Nebreda, A. R. & Muñoz-Canoves, P. (2004). Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *EMBO J.* **23**, 365–375.
 42. Lynn, F. C., Smith, S. B., Wilson, M. E., Yang, K. Y., Nekrep, N. & German, M. S. (2007). Sox9 coordinates a transcriptional network in pancreatic progenitor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 10500–10505.
 43. Schreiber, E., Matthias, P., Müller, M. M. & Schaffner, W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419.