



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE CALSEQUESTRINA-2
HUMANA EN CARDIOMIOCITOS.**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Doctor en Ciencias

PRESENTA

Rafael Estrada Avilés.

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg
Facultad de Medicina, UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán.

Ciudad de México, enero de 2020.



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.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecer a toda mi familia por su apoyo y cariño constante.

En especial, agradezco mi padre, quien me ha dado todo siempre, gracias a él soy quién soy. No me alcanzará la vida para agradecerle todo el amor y apoyo que me ha dado.

También agradezco a mi madre, quien me ha amado y apoyado toda la vida. Ha estado ahí siempre que lo he necesitado. Se que podré contar con su amor y cariño toda la vida.

A mis hermanos, Mauricio y Alfredo, quienes siempre se han preocupado por mí y me han ayudado en todo momento.

A mis sobrinos Mónica y Esteban, a quienes quiero mucho y que contarán conmigo siempre.

Quiero agradecer a mi tía Luz, “Luchita”, ella estuvo conmigo siempre y fue como una segunda madre. Jamás olvidaré todo lo que hizo por mí.

Quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio: Jorge Fragoso, Lucía Flores, Lola Hernández, Abigail Guzmán, Eric Hernández, Eduardo Izquierdo, Juan Carlos Gómora, y Gabriela Rodríguez. Con ellos pase muy buenos momentos en el trabajo y con el tiempo se convirtieron en buenos amigos. Me siento afortunado de tener su amistad.

Agradezco a mis amigos y compañeros de Clínica DrEO, Araceli, Frida, Thalía, Aurora y Michelle. Quienes me han apoyado en la culminación de este trabajo

Agradezco a mis amigos.

Sara Albarrán, a quién conocí en el laboratorio y que con el tiempo se volvió una gran amiga y una de las personas que más quiero en la vida. Espero poder disfrutar de su apoyo y compañía por siempre.

Enrique Orozco, mi mejor amigo desde hace tantos años. A quién considero como un hermano más. A pesar de que nuestros caminos se separaron por un tiempo, la vida nos ha reencontrado nuevamente. Espero que esta nueva etapa dure indefinidamente.

Agradezco especialmente a Fernanda. Eres la mejor compañera de vida que podría tener. Tu amor y apoyo me ayudan a ser mejor cada día. Espero compartir contigo todos lo momentos que me restan de vida. No tengo palabras para agradecerte todo lo que haces por mí. Te amo mucho y deseo que sigamos creciendo juntos todos los días.

Agradezco a mi tutor, Ángel Zarain-Herzberg, por todo su apoyo y guía durante la realización de este proyecto.

Agradezco a mi comité tutorial, quienes dedicaron tiempo y esfuerzo en la realización de este trabajo.

Agradezco al CONACyT por la beca que de doctorado No. 57838 que se me otorgo y también por el financiamiento otorgado al Dr. Ángel Zarain (proyecto SEP-CONACyT No. 164413). Sin estos apoyos este proyecto no hubiera sido posible.

Finalmente, agradezco a la UNAM y a todos sus profesores, quienes me enseñaron tanto. Fui uno de los pocos afortunados que tuvo el privilegio de estudiar en esta casa de estudios. Siempre seré orgullosamente universitario.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. El Retículo Sarcoplásmico.....	10
1.2. La homeostasis del Ca ²⁺ en el cardiomiocito.....	11
1.2.1. El canal de Ca ²⁺ tipo L (receptor de dihidropiridina, DHPR).....	13
1.2.2. El canal de liberación de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico o receptor de rianodina (RyR).....	14
1.2.3. Mecanismo de la contracción cardíaca.....	18
1.2.4. La ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA).....	20
1.2.5. El Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ (NCX).....	23
1.3. Estructura y función de calsecuestrina.....	24
1.4. Expresión del gen <i>CASQ2</i>	29
1.5. El papel del Ca ²⁺ en la regulación de la expresión genética en cardiomiocitos.....	33
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS.....	39
4.1. Objetivo General.....	39
4.2. Objetivos Específicos.....	39
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
5.1. Cultivo Celular.....	39
5.2. Ensayos Funcionales.....	40

5.3. Extracción de RNA total y RT-qPCR.....	41
5.4. Mutagénesis de sitio-dirigida.....	41
5.5. Ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA).....	42
5.6. Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP).....	43
5.7. Análisis por Western blot.....	44
5.8. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas (CoIP).....	44
5.9. Análisis de secuencia.....	45
5.10. Análisis estadístico.....	45
6. RESULTADOS.....	47
6.1. La inhibición de la vía calcineurina/NFAT disminuye la expresión de CASQ2 en cardiomiocitos.....	47
6.2. La inhibición de la activación de NFAT reduce la actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCASQ2</i>	49
6.3. La sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3 aumenta la actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCASQ2</i>	52
6.4. El sitio de unión a MEF-2 ubicado a -133 pb es responsable de la transactivación del promotor del gen <i>hCASQ2</i> inducida por NFAT.....	56
6.5. Una interacción directa entre los factores de transcripción MEF-2 y NFAT regulan la expresión del gen <i>hCASQ2</i>	62
7. DISCUSIÓN.....	66
8. CONCLUSIONES.....	75
9. PERSPECTIVAS.....	77
10. REFERENCIAS.....	79
11. APENDICE I: Artículo Publicado.....	86
12. APENDICE II: Otras publicaciones.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figuras.

1.1. El Retículo Sarcoplásmico (SR) en el cardiomiocito.....	11
1.2. Acoplamiento de la excitación-contracción cardíaca.....	12
1.3. El canal de liberación de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico de los cardiomiocitos (RyR2).....	15
1.4. Mecanismo de contracción del músculo cardíaco.....	19
1.5. Estructura cristalina de la ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico.....	21
1.6. Regulación de la actividad de SERCA2a en el corazón.....	23
1.7. Estructura de los monómeros de CASQ.....	26
1.8. Modelo de los cambios estructurales que sufre CASQ en función de la concentración luminal de Ca ²⁺	27
1.9. CASQ2 participa en la regulación de la liberación de Ca ²⁺ por parte del canal RyR2.....	29
1.10. Estructura del gen humano <i>CASQ2</i>	30
1.11. Activación de MEF-2 inducida por CaMKII.....	34
1.12. Activación de la vía Ca ²⁺ /calmodulina-calcineurina-NFAT.....	36
6.1. La inhibición de la actividad de NFAT disminuye la síntesis de mRNA de CASQ2 en cardiomiocitos de rata neonata.....	48
6.2. Efecto de la inhibición de la vía de calcineurina/NFAT en la abundancia de proteína de CASQ2 en cardiomiocitos de rata neonata.....	49
6.3. Análisis de secuencia del promotor del gen <i>hCASQ2</i>	50
6.4. La inhibición de la actividad de NFAT con CsA o INCA-6 disminuyó la actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCASQ2</i>	51
6.5. La inhibición de la vía calcineurina/NFAT no inhibe la actividad transcripcional del pGL3-promotor.....	52
6.6. Sobreexpresión de NFAT en cardiomiocitos de rata neonata.	53

6.7. La sobreexpresión de NFAT incrementa la actividad transcripcional de las construcciones del gen <i>hCASQ2</i>	54
6.8. La inhibición de la vía calcineurina/NFAT inhibe el efecto de transactivación provocado por la sobreexpresión de NFAT.	55
6.9. Análisis de secuencia del promotor del gen <i>hCASQ2</i>	58
6.10. Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética en cardiomiocitos de rata neonata....	58
6.11. La mutagénesis del sitio de unión a NFAT ubicado a -230 pb no cambia la actividad transcripcional de la construcción corta del promotor del gen <i>hCASQ2</i>	59
6.12. Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética en cardiomiocitos de rata neonata....	60
6.13. El sitio de unión a MEF-2 ubicado a -133 pb es responsable de la transactivación del promotor del gen <i>hCASQ2</i> inducida por la sobre-expresión de NFAT.	61
6.14. Los factores de transcripción MEF-2 y NFAT se unen al promotor del gen <i>CASQ2</i> de rata.	63
6.15. Los factores de transcripción MEF-2 y NFAT interactúan entre sí dentro del promotor del gen <i>CASQ2</i>	64
6.16. Mecanismo de regulación transcripcional propuesto para el gen <i>hCASQ2</i> en cardiomiocitos.....	65

Tablas.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para qPCR, mutagénesis, ChIP y EMSA.....	46
--	----

RESUMEN.

Calsecuestrina-2 (CASQ2) es la principal proteína de unión a Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplásmico de los cardiomiocitos. Previamente hemos demostrado que los sitios de unión a los factores de transcripción MEF-2 y SRF dentro del promotor del gen humano *CASQ2* (*hCASQ2*) son funcionales en cardiomiocitos de rata neonata. En este trabajo, investigamos el papel que tiene la vía de calcineurina/NFAT en la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos neonatales.

La inhibición de la desfosforilación de NFAT con ciclosporina-A o INCA-6 (inhibidores de la fosfatasa calcineurina), en cardiomiocitos en cultivo, disminuyó la actividad reportera de luciferasa de dos construcciones (-3102/+146 pb y -288/+146 pb) del promotor del gen *hCASQ2* y los niveles de mRNA endógeno de CASQ2. Asimismo, cardiomiocitos que sobre-expresan NFATc1 o NFATc3 mostraron un incremento de 2-3 veces en la actividad de luciferasa de ambas construcciones del promotor del gen *hCASQ2*. Dicho incremento fue prevenido con el tratamiento con ciclosporina-A. La mutagénesis del sitio de unión a MEF-2 en -133 pb impidió la transactivación de ambas construcciones del promotor *hCASQ2* inducida por la sobre-expresión de NFAT. Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) mostraron un enriquecimiento de NFAT y MEF-2 en la región de -288 a +176 pb del promotor del gen *hCASQ2*. Adicionalmente, se demostró una interacción directa entre las proteínas NFAT y MEF-2 por medio de experimentos de coimmunoprecipitación de proteínas. Nuestros resultados demuestran que NFAT interactúa con MEF-2 unido a su sitio en -133 pb dentro del promotor del gen *hCASQ2*. En conclusión, en este trabajo de tesis, demostramos que la vía de Ca^{2+} -calcineurina/NFAT activa la transcripción del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos neonatales.

ABSTRACT

Calsequestrin-2 (CASQ2) is the main Ca^{2+} -binding protein inside the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes. Previously, we demonstrated that MEF-2 and SRF binding sites within the human *CASQ2* gene (*hCASQ2*) promoter region are functional in neonatal cardiomyocytes. In this work, we investigated if the calcineurin/NFAT pathway regulates *hCASQ2* expression in neonatal cardiomyocytes. The inhibition of NFAT dephosphorylation with cyclosporine-A or INCA-6 (inhibitors of phosphatase calcineurin activation), reduced both the luciferase reporter activity of *hCASQ2* promoter constructs (-3102/+176 bp and -288/+176 bp) and the CASQ2 mRNA levels in neonatal rat cardiomyocytes. Additionally, NFATc1 and NFATc3 over-expressing neonatal cardiomyocytes showed a 2-3-fold increase in luciferase activity of both *hCASQ2* promoter constructs, which was prevented by CsA treatment. Site-directed mutagenesis of the -133 bp MEF-2 binding site prevented trans-activation of *hCASQ2* promoter constructs induced by NFAT overexpression. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays revealed NFAT and MEF-2 enrichment within the -288 bp to +76 bp of the *hCASQ2* gene promoter. Besides, a direct interaction between NFAT and MEF-2 proteins was demonstrated by protein co-immunoprecipitation experiments. Taken together, these data demonstrate that NFAT interacts with MEF-2 bound to the -133 bp binding site at the *hCASQ2* gene promoter. In conclusion, in this thesis work, we demonstrate that the Ca^{2+} -calcineurin/NFAT pathway activates the transcription of the *hCASQ2* gene in neonatal cardiomyocytes.

ABREVIATURAS.

AMPc, adenosin monofosfato cíclico.

β -MHC, cadena pesada de miosina- β .

Ca^{2+} , ión calcio.

CaM, calmodulina.

CN, calcineurina.

CaMKII, proteína cinasa II dependiente de Ca-CaM.

CASQ, calsecuestrina.

CDF, facilitación dependiente de Ca^{2+} .

CDI, inhibición dependiente de Ca^{2+} .

CICR, liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} .

CsA, ciclosporina-A.

CVPT, taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.

$[\text{Ca}^{2+}]$, concentración de Ca^{2+} .

$[\text{Ca}^{2+}]_i$, corriente local de Ca^{2+} .

DHPR, canal de Ca^{2+} Tipo-L; receptor de dihidropiridina.

E-C, acoplamiento de la excitación-contracción.

ER, retículo endoplásmico.

FKBP12.6, proteína de unión a FK506 o calstabilina 2.

hCASQ2, gen humano *CASQ2*.

HDAC, histona desacetilasa.

INCA-6, inhibidor-6 de la asociación de NFAT-calcineurina.

JNC, junctina.

MEF-2, myocyte enhancer factor-2.

NFAT, nuclear factor of activated T-Cells; factor nuclear de células T activadas.

PKA, proteína cinasa dependiente de AMPc.

PLN, fosfolamban.

RyR, canal de liberación de Ca^{2+} del SR sensible a rianodina.

SERCA, ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico.

SMMHC, cadena pesada de miosina de musculo liso.

SR, retículo sarcoplásmico.

SRF, serum response factor; factor de respuesta al suero.

Tn, troponina.

TRD, triadina.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. El Retículo Sarcoplásmico.

El retículo sarcoplásmico (SR) es una forma especializada de retículo endoplásmico (ER) presente en músculo cardíaco y esquelético. Su función primordial es el almacenaje y liberación del Ca^{2+} necesario para el proceso de contracción muscular. En cardiomiocitos, el SR es el principal reservorio de Ca^{2+} intracelular [1]. Estructuralmente, el SR es una red compleja de estructuras membranosas conformadas por túbulos longitudinales interconectados por grandes cisternas. El SR se divide en dos dominios: el SR longitudinal (LSR) y el SR de unión (JSR). El LSR está compuesto de túbulos interconectados que forman una red alrededor de cada miofibrilla. En sus extremos, los túbulos longitudinales se interconectan y forman un saco dilatado denominado cisterna terminal. En esta región existen invaginaciones de la membrana plasmática, conocidas como túbulos-T. En el músculo esquelético, la unión de dos cisternas terminales con un túbulo T forma una *tríada*. En el caso específico del cardiomiocito, solamente se encuentran asociadas una cisterna terminal y un túbulo-T. Esta estructura se conoce como díada y es funcionalmente equivalente a la tríada del músculo esquelético (**Figura 1.1**) [2, 3]. El microdominio formado por la interacción entre el túbulo-T y el JSR se conoce como hendidura de unión o unión diádica. En ella se encuentran proteínas importantes para el manejo del Ca^{2+} en el cardiomiocito, las cuales serán discutidas más adelante [2, 4].

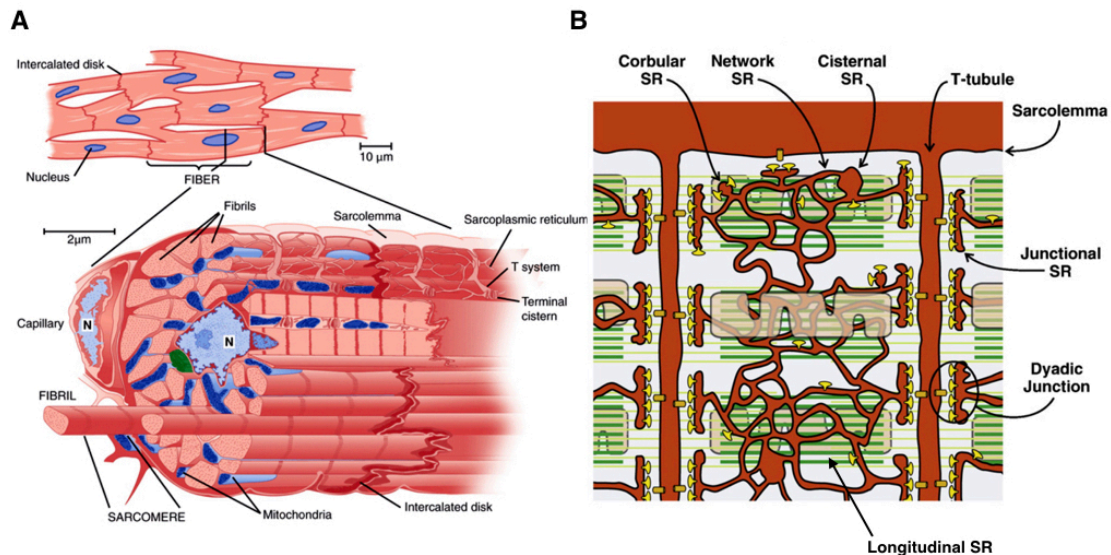


Figura 1.1. El Retículo Sarcoplásmico (SR) en el cardiomiocito. **A)** Diagrama del músculo cardíaco como se vería en microscopía de luz (arriba) y en microscopía electrónica (abajo). Se observa cómo la red formada por el SR rodea a los componentes de la miofibrilla. **B)** Diagrama del SR. Se observa cómo el LSR, formado por una serie de túbulos interconectados, rodea a la miofibrilla. Las invaginaciones de la membrana plasmática (túbulos-T) se asocian estrechamente con el JSR. Al microdominio formado la interacción entre un túbulo-T y el JSR se le conoce como unión diádica o hendidura de unión. En esta región se encuentran proteínas importantes para el manejo del Ca^{2+} en el cardiomiocito. Modificado de Ganong W.F., 1987 [5] y de Bootman M, 2011 [4].

1.2. La homeostasis del Ca^{2+} en el cardiomiocito.

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero intracelular ubicuo. El Ca^{2+} es importante para la regulación de múltiples procesos como: la excitación, la contracción muscular, el metabolismo, la transcripción genética, la proliferación celular, entre muchos otros [6]. La concentración intracelular de Ca^{2+} está determinada por un equilibrio entre los procesos que introducen Ca^{2+} en el citoplasma y los que lo remueven del citoplasma. Estos procesos están coordinados por diversas proteínas como son las proteínas de unión a Ca^{2+} , intercambiadores y bombas de Ca^{2+} ATP-dependientes [6].

En el cardiomiocito, el Ca^{2+} tiene un papel fundamental en la regulación de muchos procesos, por ejemplo: electrofisiología del potencial de acción, el acoplamiento de la excitación-contracción (E-C), el metabolismo energético, la muerte celular (necrosis y

apoptosis) y la regulación transcripcional [7]. Los cardiomiocitos expresan proteínas importantes para el control de la homeostasis del Ca^{2+} . Estas proteínas se encuentran en la membrana plasmática y en el SR [2, 8]. Las proteínas del SR son particularmente importantes para la regulación de la homeostasis del Ca^{2+} de los cardiomiocitos. Cuando un estímulo despolarizante alcanza la membrana plasmática, el Ca^{2+} ingresa al cardiomiocito a través del canal de Ca^{2+} tipo L (DHPR). La entrada de Ca^{2+} produce que el Ca^{2+} almacenado en el SR se libere al citoplasma a través del canal de liberación Ca^{2+} (RyR). El Ca^{2+} liberado desencadena la contracción de la miofibrilla. Para que el cardiomiocito pueda relajarse, la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA2a) bombea el Ca^{2+} de regreso al SR (**Figura 1.2**) [1, 9, 10].

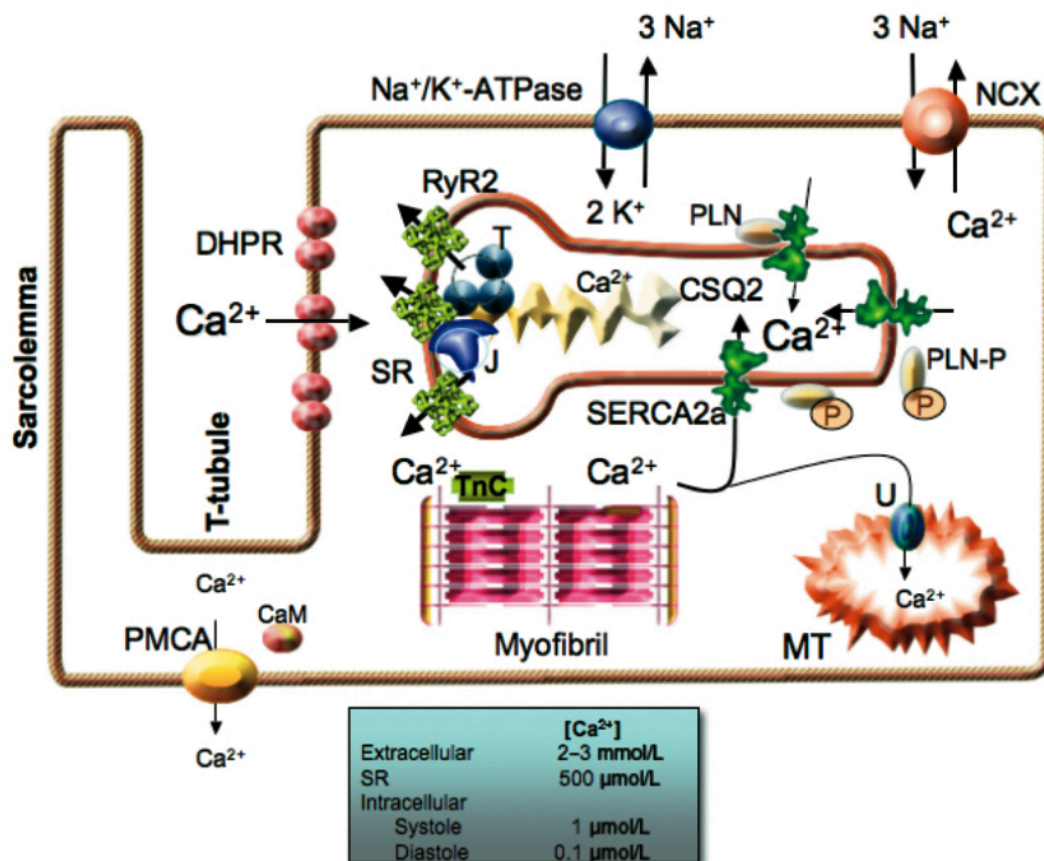


Figura 1.2. Acoplamiento de la excitación contracción cardíaca. Cuando se despolariza la membrana celular del cardiomiocito (sarcolemma), se produce la entrada de Ca^{2+} al citoplasma a través del canal de Ca^{2+} tipo L (DHPR) que se encuentra en el

túbulo T. Esto produce una liberación masiva de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SR) a través del canal de Ca^{2+} del SR (RyR2). El exceso de Ca^{2+} liberado al citoplasma se une al complejo de troponina-tropomiosina, produciendo el entrecruzamiento de los filamentos contráctiles y se desencadena la contracción de la miofibrilla. La acción de la ATPasa de Ca^{2+} del SR (SERCA2a), el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) y la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) regresa la concentración de Ca^{2+} citosólico a su nivel de reposo. Esto permite que la miofibrilla pueda relajarse. La proteína fosfolamban (PLN) es el principal regulador de la actividad de SERCA2a. En su estado desfosforilado, PLN reduce la velocidad máxima (V_{\max}) de transporte de Ca^{2+} de SERCA2a. Cuando PLN está fosforilada se disocia de SERCA2a y se incrementa la velocidad de transporte de Ca^{2+} hacia dentro del SR. Dentro del SR, la proteína de unión a Ca^{2+} calsecuestrina-2 (CASQ2) interactúa con las proteínas transmembrana triadina (T) y junctina (J). El complejo formado por CASQ2-T-J regula la liberación de Ca^{2+} por parte del SR. Modificado de Zarain-Herzberg, 2006 [11]

1.2.1. El canal de Ca^{2+} tipo L (receptor de dihidropiridina, DHPR).

El canal de Ca^{2+} tipo L está embebido en la membrana plasmática del túbulo T y es también conocido como receptor de dihidropiridinas (DHPR). El canal de Ca^{2+} tipo L, es un canal iónico dependiente de voltaje compuesto de 4 subunidades ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ) en una estequiometria de 1:1:1:1. La subunidad $\alpha 1C$ (CaV1.2), expresada en cardiomiocitos, tiene un peso de alrededor de 250 kDa. Estructuralmente tiene cuatro dominios con seis segmentos transmembrana cada uno (S1-S6). Los segmentos S4 de cada uno de los 4 dominios constituyen el sensor de voltaje del canal, mientras que los segmentos S6 forman el poro de Ca^{2+} . La actividad del canal se regula por Ca^{2+} a través de una interacción con la proteína de unión a Ca^{2+} calmodulina (CaM). El canal está unido constitutivamente a CaM mediante un motivo IQ (I=Ile, Q=Gln), presente en la región C-terminal, cercano al poro de la subunidad $\alpha 1C$. Al ser un canal iónico dependiente de voltaje, su apertura se regula por cambios en el potencial de membrana. Cuando el cardiomiocito se despolariza, el potencial de membrana pasa de -80 mV a -40 mV. El canal se abre y permanece abierto durante la fase de meseta del potencial de acción cardíaco. Además del potencial membrana existen otros mecanismos que regulan la apertura del canal. Cuando la concentración local de Ca^{2+}

sobrepasa 100 nM, el Ca^{2+} se une a la CaM asociada al canal, facilitando la apertura del canal. Esto se conoce como facilitación dependiente de Ca^{2+} (CDF). Cuando la concentración local de Ca^{2+} alcanza niveles micromolares, se ocupan todos los sitios de unión a Ca^{2+} de CaM asociada al canal. Cuando esto sucede, se inhibe la apertura del canal. A esto se le conoce como inhibición dependiente de Ca^{2+} (CDI). El canal de DHPR también es regulado por cambios en su estado de fosforilación. Se sabe que la fosforilación mediada por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) (en la Ser478 y Ser479 de la subunidad $\beta 2$; y Ser1928 de la subunidad $\alpha 1C$) y por la proteína cinasa II dependiente de Ca-CaM (CaMKII) (en el C-terminal de $\alpha 1C$) facilitan la apertura del canal [12].

1.2.2. El canal de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico o receptor de rianodina (RyR).

El canal de liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico o canal sensible a rianodina (RyR) está embebido en la membrana del JSR, en las cercanías del canal de Ca^{2+} tipo L. Se conoce así debido a que la rianodina, un alcaloide derivado de plantas, se une al canal con alta afinidad. Existen tres isoformas del canal RyR (RyR1-3) codificadas por genes diferentes. La isoforma RyR1 se expresa en músculo esquelético, la isoforma RyR2 en músculo cardíaco y la isoforma RyR3 en neuronas. El canal RyR2 es canal iónico más grande que se ha descrito. Estructuralmente, cada canal RyR2 está formado por 4 monómeros de la proteína RyR2 (565 kDa) que juntos forman un homotetrámero de 2300 kDa. De los diez segmentos transmembrana del C-terminal, únicamente los dos últimos forman el poro del canal. La mayor parte del canal (aproximadamente el 80%) se encuentra del lado citoplásmico (los primeros 4500 residuos del N-terminal y una porción del C-terminal). El dominio citoplásmico de

cada una de las cuatro subunidades protruye hacia la hendidura de unión. Está porción del canal es claramente visible por microscopia electrónica y se le conoce como los “pies” del canal. El canal RyR2 también funciona como un andamio para múltiples proteínas que regulan la función del canal. Del lado citoplásmico se encuentran unidas la CaM, la proteína de unión a FK506 (FKBP12.6 o calstabin 2), la sorcina, la presenilina 2 (PS2), la PKA, la PDE4 a través de AKAP, la fosfatasa PP1 a través de espinofilina, y la fosfatasa PP2A a través de PR130. Del lado luminal, RyR2 se une a la proteína calsequestrina (CASQ2) a través de las proteínas transmembrana triadina (TRD) y junctina (JNC) (Figura 1.3) [12-14].

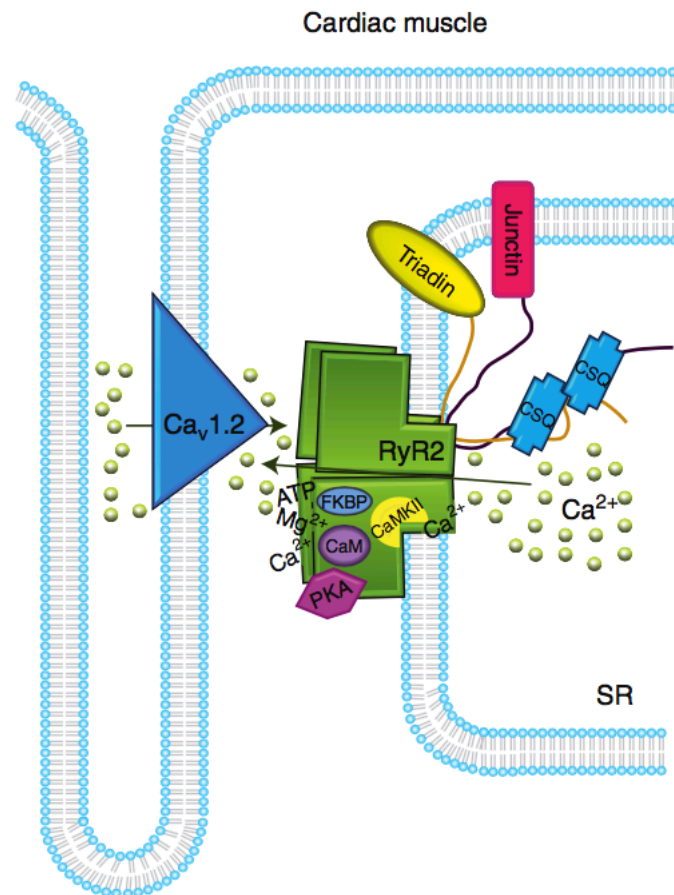


Figura 1.3. El canal de liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico de los cardiomiocitos (RyR2). Se muestra una representación esquemática del canal RyR2. Estructuralmente, el canal es un homotetrámero de 2300 kDa. La porción citoplásmica del canal representa alrededor del 80% de la proteína. A esta porción del canal se le conoce como los “pies” del canal. Además de funcionar como un canal iónico que permite la salida de Ca²⁺ del SR durante los ciclos de contracción, el RyR2 también funciona como un andamio proteico en donde se anclan diversas proteínas

que regulan la actividad del canal (CaM, CaMKII, FKBP, PKA). CASQ2, se encuentra del lado luminal del SR. El complejo formado por CASQ2-Triadina-Junctina interactúa con el RyR2 y regula la actividad del canal. Tomado de Lanner (2010) [13].

Aproximadamente 10-25 canales de Ca^{2+} tipo L (DHPR) y 100-200 canales RyR se agrupan y forman un complejo local de señalización de Ca^{2+} conocido como “*couplon*”. Cuando un estímulo despolariza la membrana plasmática, se produce la apertura del canal de Ca^{2+} tipo L, permitiendo la entrada de Ca^{2+} extracelular. Esto eleva la concentración local de Ca^{2+} desde 0.1 μM hasta 10-20 μM . Esta elevación local en la concentración de Ca^{2+} produce la apertura del canal RyR2 del SR. Una vez activo, el canal RyR2, permite la salida de Ca^{2+} proveniente del SR. Este proceso se conoce como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). La apertura del RyR2 eleva la concentración local de Ca^{2+} a más de 100 μM . Sin embargo, la concentración global de Ca^{2+} únicamente se eleva hasta 1 μM . Aproximadamente, entre 6-20 canales RyR2 se abren en cada couplon en un momento dado. A pesar de que los couplones se encuentran muy cercanos entre sí (1-2 μm), el Ca^{2+} liberado de un couplon no es suficiente para activar a los couplones vecinos. Esto se debe a que la corriente local de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) disminuye conforme se incrementa la distancia. Debido a que los couplones funcionan de manera independiente, se necesita la activación simultánea de los 20,000 couplones que hay en el cardiomiocito. Fisiológicamente, el potencial de acción sincroniza la activación de todos los couplones. Por lo tanto, la activación simultánea de todos los canales de Ca^{2+} tipo L produce una elevación en la $[\text{Ca}^{2+}]$ en todo el citosol relativamente homogénea (hasta 1 μM). Esta elevación global en la $[\text{Ca}^{2+}]$ activa a los miofilamentos y desencadena la contracción cardíaca. Al proceso que relaciona la despolarización de la membrana plasmática con la activación de los

miofilamentos y la contracción cardíaca se le conoce como acoplamiento de la excitación-contracción (E-C) [7, 15].

Para que exista una adecuada homeostasis del Ca^{2+} en el cardiomiocito es necesario regular la activación de la CICR. Para ello, existen mecanismos que regulan la apertura y cierre del canal RyR2. Estos mecanismos funcionan tanto del lado luminal como del lado citoplásmico. En el lado luminal, la proteína caslecuestrina-2 (CASQ2) es la principal reguladora del canal RyR2 (este mecanismo se discute en el apartado 1.3).

Del lado citoplásmico existen múltiples mecanismos que regulan la actividad del RyR2. El primer mecanismo de regulación involucra la concentración de Ca^{2+} en las cercanías del RyR2. En el lado citoplásmico del RyR2 hay dos dominios “EF-hand” de unión a Ca^{2+} . Una vez que el Ca^{2+} se une a uno de estos dominios, se favorece la inactivación del canal mediante la inducción de un estado refractario. El segundo mecanismo de regulación involucra a la proteína CaM. La proteína CaM se une al RyR2 constitutivamente, en su forma libre (ApoCaM) o asociada con Ca^{2+} (Ca^{2+} -CaM). Cuando la concentración de Ca^{2+} es baja (<100 nM), ApoCaM favorece la apertura del RyR2. Cuando la concentración de Ca^{2+} es alta (1 μM), CaM está saturada con Ca^{2+} e inhibe la actividad del RyR2 [16]. Un tercer mecanismo de regulación está mediado por la proteína FKBP12.6 (calstabin-2). La proteína FKBP12.6 está unida al dominio citoplásmico de cada monómero del RyR2. De esta forma, FKBP12.6 estabiliza al RyR2 e impide la generación de arritmias cardíacas, inhibiendo la fuga diastólica de Ca^{2+} a través del canal [17]. Finalmente, la fosforilación del RyR2 catalizada por PKA o CaMKII también regula la actividad del RyR2. La fosforilación de la Ser2808 del RyR2, catalizada por PKA, causa la disociación parcial de la proteína inhibidora FKBP12.6. Por este mecanismo, la

estimulación adrenérgica del cardiomiocito aumenta la liberación de Ca^{2+} del SR [18]. Por otro lado, la PDE4 (fosfodiesterasa-4) asociada al RyR2 inhibe la activación de PKA, degradando el cAMP a nivel local. De esta manera se previene la sobreestimulación adrenérgica del RyR2. En la insuficiencia cardíaca se ha observado una disminución en la expresión de PDE4. La consecuente hiperfosforilación del RyR2 mediada por PKA favorece la salida prematura de Ca^{2+} del SR. Debido a esto, la insuficiencia cardíaca se asocia con disfunción contráctil y presencia de arritmias cardíacas [19]. La fosforilación de la Ser2815, por CaMKII, aumenta la salida de Ca^{2+} del SR durante la diástole sin afectar la unión de FKBP al RyR2 [20]. Es posible que la fosforilación del RyR2 catalizada por CaMKII y PKA tengan efectos similares en la actividad del canal. Sin embargo, el aumento en la actividad del RyR2 producido por PKA es más rápido, mientras que el aumento producido por CaMKII tiene mayor duración [12].

1.2.3. Mecanismo de la contracción cardíaca.

En el cardiomiocito, la principal función del Ca^{2+} liberado por el proceso de CICR es desencadenar la contracción cardíaca. El mecanismo contráctil depende de las proteínas miosina (filamentos gruesos), actina (filamentos delgados), tropomiosina y troponina. La troponina (Tn) está constituida de tres subunidades: troponina I (TnI), troponina T (TnT) y troponina C (TnC). A nivel molecular, la contracción muscular se produce por el deslizamiento de los filamentos delgados sobre los filamentos gruesos. Cuando el cardiomiocito está en reposo, la TnI se une a la actina y a la tropomiosina, impidiendo la interacción entre miosina y actina. Secundario al potencial de acción, se eleva la $[\text{Ca}^{2+}]$ citosólica y el Ca^{2+} libre se une a la TnC. Esto debilita la unión de TnI con la actina y permite el entrecruzamiento de actina y

miosina. Cuando se forma el entrecruzamiento actina-miosina, se produce un cambio conformacional en la cabeza de miosina que mueve el filamento delgado con respecto al grueso. De esta forma se produce el acortamiento de la miofibrilla (**Figura 1.4**) [5].

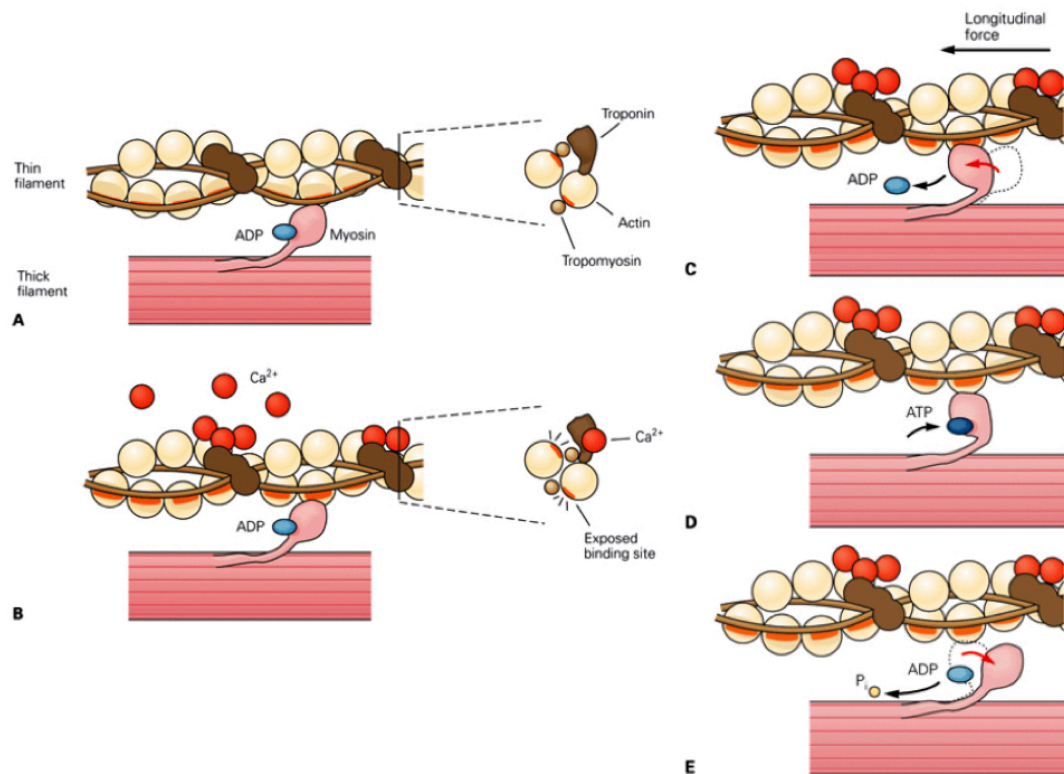


Figura 1.4. Mecanismo de contracción del músculo cardíaco. A) Durante el reposo, las cabezas de miosina tienen unido ADP y están "amartilladas" en relación con los filamentos de actina, los cuales no tienen Ca^{2+} unido al complejo troponina-tropomiosina. B) Cuando el Ca^{2+} se une al complejo troponina-tropomiosina se induce un cambio conformacional en los filamentos de actina que permite a las cabezas de miosina "entrecruzarse" con el filamento de actina. C) Se produce un "golpe de poder"; donde las cabezas de miosina rotan y mueven la actina unida, acortando la fibra muscular (contracción). D) La unión de ATP produce el desprendimiento de la cabeza miosina del filamento de actina. E) La hidrólisis del ATP a ADP produce que la cabeza de miosina regrese a su estado "amartillado" (relajación). Tomado de Ganong W.F. (1987) [5].

Para que la miofibrilla pueda relajarse, el Ca^{2+} tiene que removerse del citosol y regresar a sus niveles de reposo (10-20 nM). Para ello, existen dos mecanismos principales: recaptura de Ca^{2+} por la ATPasa de Ca^{2+} del SR (SERCA2a) y expulsión del Ca^{2+} hacia el medio extracelular por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1). La importancia cuantitativa de cada mecanismo varía entre diferentes especies. Por

ejemplo, en cardiomiocitos de conejo, SERCA2a remueve el 70%, mientras que el NCX1 remueve el 28% del Ca^{2+} necesario para la contracción muscular. En el caso de los cardiomiocitos de rata, SERCA2a remueve el 92% y el NCX1 remueve 7% del Ca^{2+} . En el humano SERCA2a remueve el 60% del Ca^{2+} , mientras que el NCX1 remueve aproximadamente un 40% del Ca^{2+} liberado [21]. Las ATPasas de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) también ayudan a remover el Ca^{2+} del citosol, sin embargo su contribución no es tan importante (aproximadamente 1%) [9].

1.2.4. La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA).

Las ATPasas de Ca^{2+} del retículo sarco(endo)plásmico (SERCAs) pertenecen a la familia de ATPasas de tipo P. Las ATPasas de este tipo transportan cationes a través de las membranas usando la energía del ATP. Las bombas SERCA son codificadas por tres genes diferentes: *ATP2A1-3*. Cada uno de ellos es expresado en un patrón tejido-específico y codifica varias isoformas de la proteína [22]. El gen *ATP2A1* se expresa en músculo esquelético y genera dos isoformas (SERCA1a y 1b). SERCA1a (994 aminoácidos) se expresa en tejidos adultos, mientras que SERCA1b (1001 aminoácidos) se expresa en etapa neonatal. El “*splicing*” diferencial del exón 22 hace que ambas isoformas difieran en su región C-terminal [23]. El gen *ATP2A2* produce tres isoformas (SERCA2a, 2b y 2c) por *splicing* diferencial. Las tres isoformas difieren en su región C-terminal y muestran distintos patrones de expresión. SERCA2a (997 aminoácidos) se expresa principalmente en cardiomiocitos, en músculo esquelético de contracción lenta y en cerebro. SERCA2b (1042 aminoácidos) se expresa de forma ubicua en todos los tejidos [11, 24]. Estructuralmente, SERCA2b tiene un onceavo segmento transmembranal adicional y una región carboxilo-terminal

que se extiende dentro del lumen del retículo endoplásmico (ER). SERCA2c se expresa en tejidos epiteliales, mesénquima y células de la línea hematopoyética [22]. El gen *ATP2A3* codifica seis isoformas diferentes por splicing alternativo (SERCA3a-f). Las isoformas SERCA3a, 3b, 3c y 3e se expresan en la mayoría de los tejidos adultos, principalmente en células del linaje hematopoyético, endotelios y epitelios [22]. SERCA3 siempre se co-expresa con la isoforma ubicua SERCA2b [22, 25]. La isoforma SERCA2a se localiza exclusivamente en la membrana del SR. La proteína consta de 3 dominios citoplásmicos diferentes (N, P y A) y 10 segmentos transmembrana. El dominio A (actuador) funciona como un mecanismo de compuerta que regula la unión y liberación de Ca^{2+} . El dominio N contiene el sitio de unión a ATP. Mientras que en el dominio P, el γ -fosfato del ATP reacciona con la Asp351. Antes de la unión del Ca^{2+} , los tres dominios se encuentran relativamente separados. Después forman una estructura compacta durante el resto de los ciclos de transporte de Ca^{2+} [12]. **(Figura 1.5).**

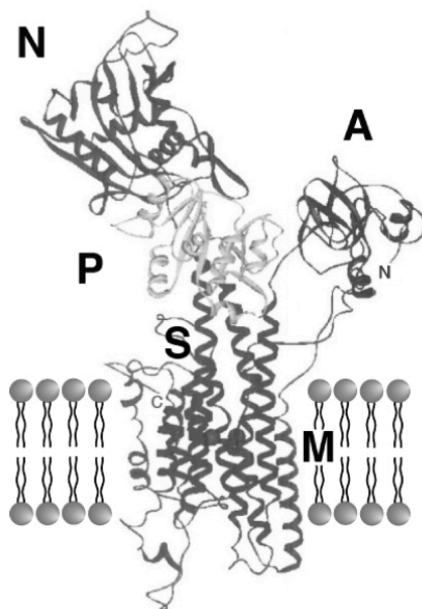


Figura 1.5. Estructura cristalina de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Se muestra la estructura de la bomba SERCA1 de músculo esquelético de conejo. La región citoplásmica de la molécula se organiza en 3 dominios: el dominio de unión a nucleótido N (el cual une ATP), el dominio de fosforilación P (contiene el Asp351) y el dominio “actuador” A. El dominio

transmembrana **M** consta de 10 segmentos que atraviesan la membrana del retículo sarcoplásmico (**M1-M10**). Cuatro de los dominios transmembrana (**M4, M5, M6 y M8**) forman un “bolsillo” de unión a Ca^{2+} . El dominio de “tallo” **S** une los dominios citoplásmicos con los dominios transmembranales. Tomado de Hovnanian A. 2007 [22].

Existen aproximadamente 30,000 bombas/ μm^2 de superficie de membrana en el SR. Debido a esta abundancia en el número de bombas, SERCA2a juega un papel primordial en la señalización por Ca^{2+} en el cardiomiocito [26]. Las bombas SERCA2a catalizan el transporte electrogénico de 2 iones Ca^{2+} por cada molécula de ATP hidrolizada, desde el citoplasma al lumen del SR. Debido a su alta afinidad por Ca^{2+} (K_m de 0.1 μM), las bombas SERCA2a son tan efectivas para regresar la concentración citosólica de Ca^{2+} a sus niveles de reposo. Usualmente únicamente son necesarios dos ciclos de transporte para regresar la concentración de Ca^{2+} a los niveles de reposo [26].

La actividad de SERCA2a se regula por su interacción con la proteína fosfolamban (PLN). PLN es una proteína de 52 aminoácidos y un peso de 6 kD. Estructuralmente, PLN tiene una porción citoplásmica N-terminal y un segmento transmembrana C-terminal. La interacción de PLN con SERCA2a disminuye la afinidad de la bomba por Ca^{2+} . Esto reduce la actividad de la bomba y la recaptura de Ca^{2+} . Cuando PLN se fosforila por PKA (Ser16) o por CaMKII (Thr17) se disocia de SERCA2a y se restaura la afinidad de SERCA2a por Ca^{2+} . Por tanto, aumenta la actividad de la bomba y la recaptura de Ca^{2+} [27]. Entonces, la interacción entre SERCA2a y PLN permite la regulación simpática de la actividad de SERCA2a a través del receptor β 1-adrenérgico. Cuando PLN se fosforila por PKA, la estimulación adrenérgica permite a SERCA2a transportar, de forma más rápida, una mayor cantidad de Ca^{2+} hacia dentro del SR. Este mecanismo regulador de SERCA2a sirve para potenciar la relajación y aumentar la frecuencia cardíaca cuando es necesario [12] (**Figura 1.6**).

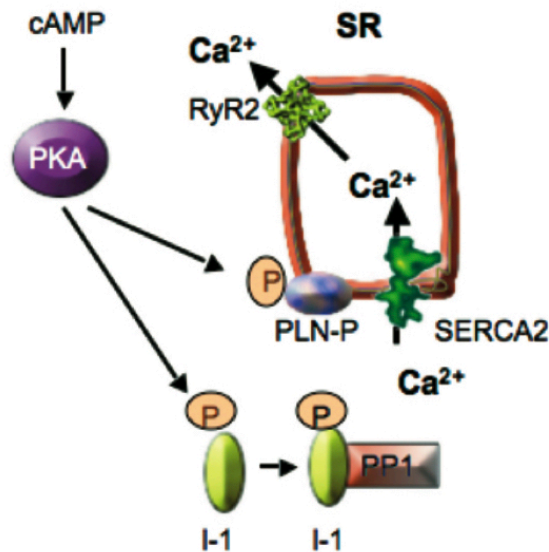


Figura 1.6. Regulación de la actividad de SERCA2a en el corazón. En respuesta a la estimulación del receptor β -adrenérgico, se aumenta la concentración de cAMP. Esto activa a **PKA**, la cuál fosforila directamente a fosfolamban (**PLN**) y al inhibidor I de la proteína fosfatasa (**I-1**). I-1 fosforilado forma un complejo con la proteína fosfatasa-1 (**PP1**) volviéndola incapaz de desfosforilar la forma fosforilada de PLN (**PLN-P**). En su estado fosforilado, PLN se disocia de SERCA2a y se libera la inhibición en la actividad de transporte de Ca^{2+} . Lo anterior resulta en un aumento en la recaptura de Ca^{2+} hacia el SR. De esta forma se aumenta el contenido de Ca^{2+} dentro del SR, así como su posterior liberación a través del canal RyR2. El resultado neto es un aumento de la contractibilidad cardíaca. Modificado de Zarain-Herzberg, 2006 [11].

1.2.5. El Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ayuda a regresar la concentración de Ca^{2+} citosólica a sus niveles de reposo durante la diástole. Existen tres genes para el NCX. El gen NCX1 se expresa en cardiomiocitos y en otros tipos celulares. Los genes NCX2 y NCX3 se expresan en neuronas y músculo esquelético, respectivamente [28]. El NCX1 es un intercambiador electrogénico, transporta 3 iones Na^+ por un ión Ca^{2+} a través de la membrana. La función primaria del intercambiador es la expulsión de Ca^{2+} cuando su concentración citosólica aumenta después de la CICR. Sin embargo,

la dirección del intercambio Na^+ - Ca^{2+} se determina por las concentraciones relativas de ambos iones en el medio y el citoplasma. Entonces el intercambiador puede funcionar en modo reverso, expulsando Na^+ del cardiomiocito [26]. El NCX1 (110 kDa) consta de 993 aminoácidos y nueve segmentos transmembranales. Entre los segmentos cinco y seis, se forma un asa intracelular. En esta región se une el Ca^{2+} con alta afinidad [29]. Además de regularse por las concentraciones relativas de Na^+ y Ca^{2+} , existen otros mecanismos de regulación del intercambiador. La actividad del intercambiador puede ser modulada por Mg^{2+} -ATP, CaM, o fosforilación mediada por PKC. Sin embargo, estos mecanismos de regulación no se entienden por completo [12, 30].

1.3. Estructura y función de calsecuestrina.

En la década de los 70 se identificó una proteína de unión a Ca^{2+} dentro del SR. Debido a su alta capacidad para almacenar Ca^{2+} , se le dio el nombre de calsecuestrina (CASQ). A pesar de no estar anclada directamente a la membrana del SR se encontró que estaba ubicada exclusivamente en las cisternas terminales del SR, en las cercanías del canal de liberación Ca^{2+} RyR y ausente del LSR [31]. La evidencia inicial sugirió que CASQ forma un polímero lineal conforme se incrementan las concentraciones de Ca^{2+} intraluminales. Asimismo, los estudios de microscopía electrónica revelaron que CASQ esta polimerizada a concentraciones de Ca^{2+} intraluminales fisiológicas (alrededor de 1 mM) [32].

La proteína CASQ se expresa exclusivamente en músculo cardíaco, liso y esquelético. En los mamíferos, existen dos isoformas de calsecuestrina (CASQ). Ambas isoformas son codificadas por dos genes diferentes. La isoforma calsecuestrina-1 (CASQ1) es codificada por el gen *CASQ1* (1q21). También conocida como calsecuestrina

esquelética, CASQ1 se expresa exclusivamente en músculo esquelético de contracción rápida y de contracción lenta. La isoforma calsecustrina-2 (CASQ2) es codificada por el gen *CASQ2* (1p13.3-p11). También conocida como calsecustrina cardíaca, CASQ2 se expresa exclusivamente en cardiomiocitos y en menor proporción en músculo esquelético de contracción lenta [33-35].

La calsecustrina-2 (CASQ2) es la principal proteína de unión a Ca^{2+} dentro de las cisternas terminales del SR de los cardiomiocitos [1]. Estructuralmente, CASQ2 tiene un peso aproximado de 40 kDa. Es una proteína altamente ácida, conteniendo una alta proporción de residuos de glutamato y aspartato, ubicados principalmente en su extremo C-terminal. El monómero de CASQ tiene tres dominios idénticos (I, II y III) los cuales tienen una topología similar a la tiorredoxina de *E. coli*. La estructura básica del monómero consiste de una lamina β rodeada de cuatro hélices α , distribuidas dos a cada lado [32] (**Figura 1.7**).

Debido a ello, CASQ2 tiene una alta capacidad para unir Ca^{2+} (40-50 mol Ca^{2+} /mol CASQ) [14]. Dentro del SR, CASQ2 funciona como un buffer de Ca^{2+} , manteniendo la concentración libre de Ca^{2+} en aproximadamente 1 mM [14, 36]. Se calcula que CASQ2 une entre el 50-75% del Ca^{2+} total dentro del SR de los cardiomiocitos [37]. Dentro del SR, a concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} , los monómeros de CASQ adoptan una estructura parecida a la de la tiorredoxina e interactúan entre sí, formando un polímero lineal. El polímero de CASQ forma ramificaciones que crean una especie de matriz proteica. Una serie de aperturas diminutas dentro de esta matriz, forman un canal que conduce el Ca^{2+} hacia el canal de liberación de Ca^{2+} del SR, el canal RyR2 [38] (**Figura 1.8**). El polímero de CASQ forma un complejo multiproteico con las proteínas transmembrana del SR triadina (TRD) y junctina

(JNC). Entonces, la CASQ2 interactúa con el canal RyR2 a través de TRD y JNC. [36].

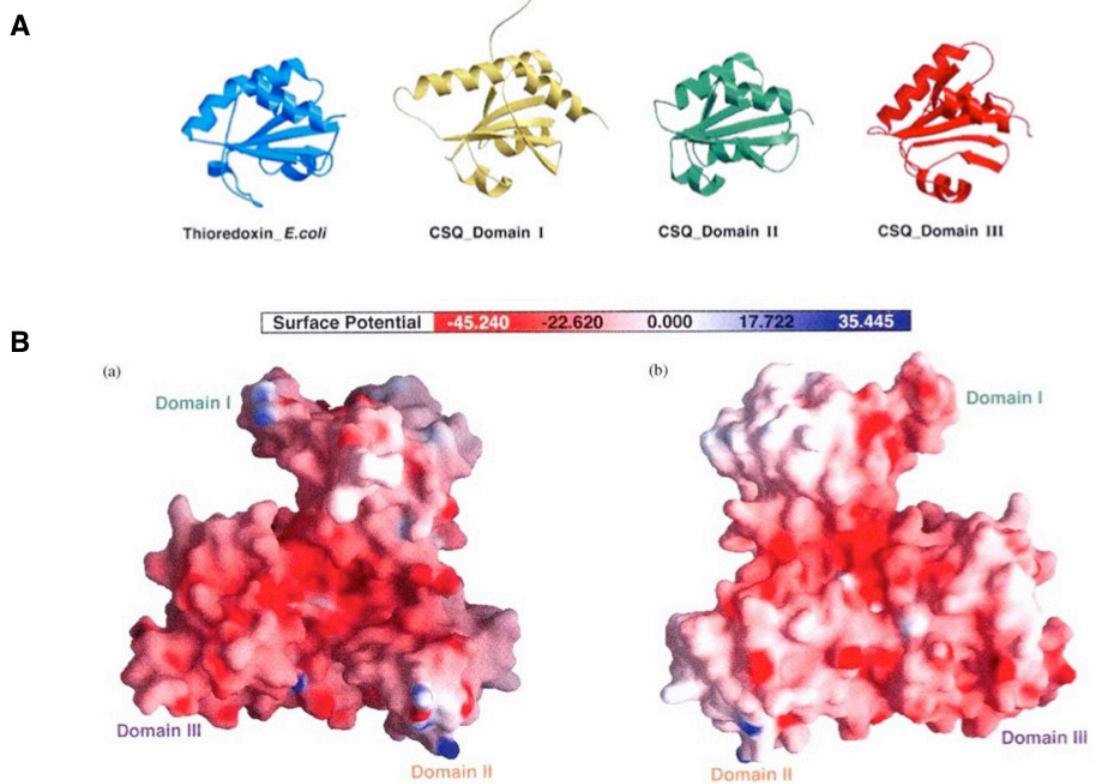


Figura 1.7. Estructura de los monómeros de CASQ. **A)** Comparación de la tiorredoxina de *E coli* con los tres dominios de CASQ. El dominio I comprende de los residuos 12 a 124, el dominio II comprende de los residuos 125 a 228 y el dominio III comprende de los residuos 129 a 352. **B)** Se muestra un modelo de superficie del monómero de CASQ. La distribución de la carga de la molécula se señala con colores; rojo=negativo, azul=positivo, blanco=neutro. A la izquierda se muestra la parte frontal de la molécula, a la derecha se muestra la parte posterior. El dominio 3 corresponde al C-terminal. Se observa un potencial de superficie altamente electronegativo. Tomado de Beard NA, 2004 [14].

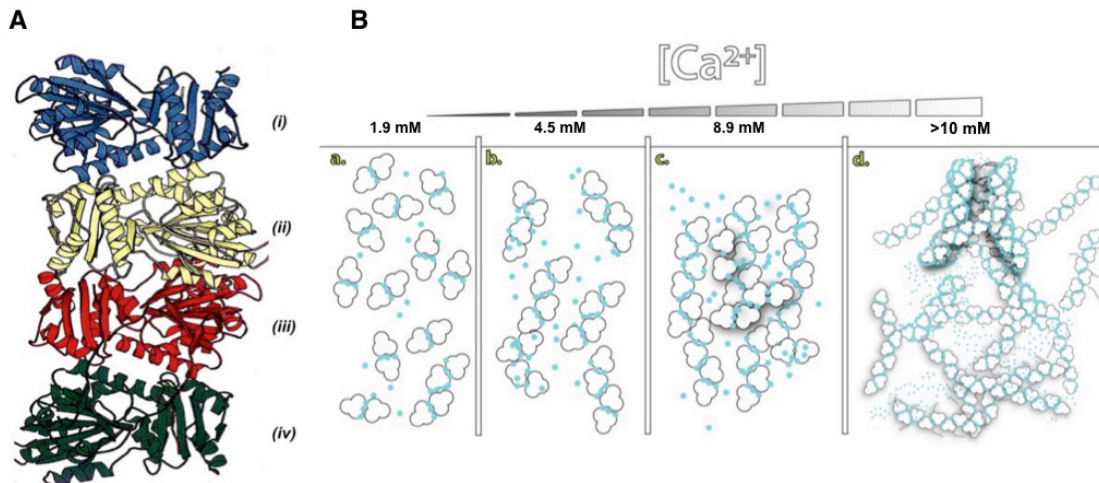


Figura 1.8. Modelo de los cambios estructurales que sufre CASQ en función de la concentración luminal de Ca^{2+} . **A)** Estructura de CASQ. Se muestra la interacción que existe entre cuatro moléculas de CASQ. En ausencia de Ca^{2+} , los monómeros de CASQ presentan una estructura aleatoria. En presencia de pequeñas concentraciones de Ca^{2+} , CASQ adquiere su estructura tipo-tiorredoxina. A mayor concentración de Ca^{2+} los monómeros de CASQ forman interacciones frontal-frontal (moléculas i-ii y iii-iv) y posterior-posterior (moléculas ii-iii). **B)** Diagrama de la conformación de CASQ a diferentes concentraciones de Ca^{2+} . A 1.9 mM se forman las interacciones frontal-frontal entre los monómeros de Ca^{2+} . Aproximadamente a 4.5 mM aparece la interacción posterior-posterior entre las moléculas. A 8.9 mM comienza la formación de polímeros lineales de CASQ. A concentraciones >10 mM se forman polímeros ramificados. Se propone la formación de un canal que conduce el Ca^{2+} hacia el canal de liberación RyR2, facilitando la liberación de Ca^{2+} . Panel A, tomado de Beard NA, 2004 [14]. Panel B, modificado de Sánchez EJ, Lewis KM, Et al; 2012 [38].

En cardiomiocitos, el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólica $^+$ ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) inducida por el potencial de acción, eleva la concentración de calcio de 100 nM hasta aproximadamente 1 μM . Se sabe que durante la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) únicamente se libera entre un 40-60% del contenido total de Ca^{2+} del SR. [37]. Por tanto, la liberación de Ca^{2+} es un proceso autolimitado. Esto sugiere que existe un mecanismo que trabaja para detener la liberación de Ca^{2+} antes de que el SR se vacíe por completo. La evidencia disponible sugiere que la $[\text{Ca}^{2+}]$ dentro del lumen del SR tiene un papel fundamental en el control de la liberación de Ca^{2+} regulando de alguna forma la actividad del canal de liberación de Ca^{2+} RyR2 [39]. Debido a que CASQ2 se localiza en un punto estratégico dentro del SR, se ha propuesto que CASQ participa en la regulación de la liberación de Ca^{2+} proveniente del SR durante el proceso de acoplamiento de la excitación-contracción en músculo esquelético y cardíaco [40].

Como mencionamos previamente, cuando se activa el canal RyR2 del SR, la $[\text{Ca}^{2+}]$ luminal disminuye significativamente. Cuando esto sucede, el complejo formado por CASQ2-TRD-JNC inhibe al canal de liberación de Ca^{2+} (RyR2). Entonces, la actividad del complejo proteico formado por CASQ2-TRD-JNC-RyR2 ayuda a que la $[\text{Ca}^{2+}]$ libre del SR se mantenga en 1 mM. Esto a pesar de que la $[\text{Ca}^{2+}]$ total del SR cambia significativamente entre los ciclos de contracción cardíacos [37, 41] (**Figura 1.9**).

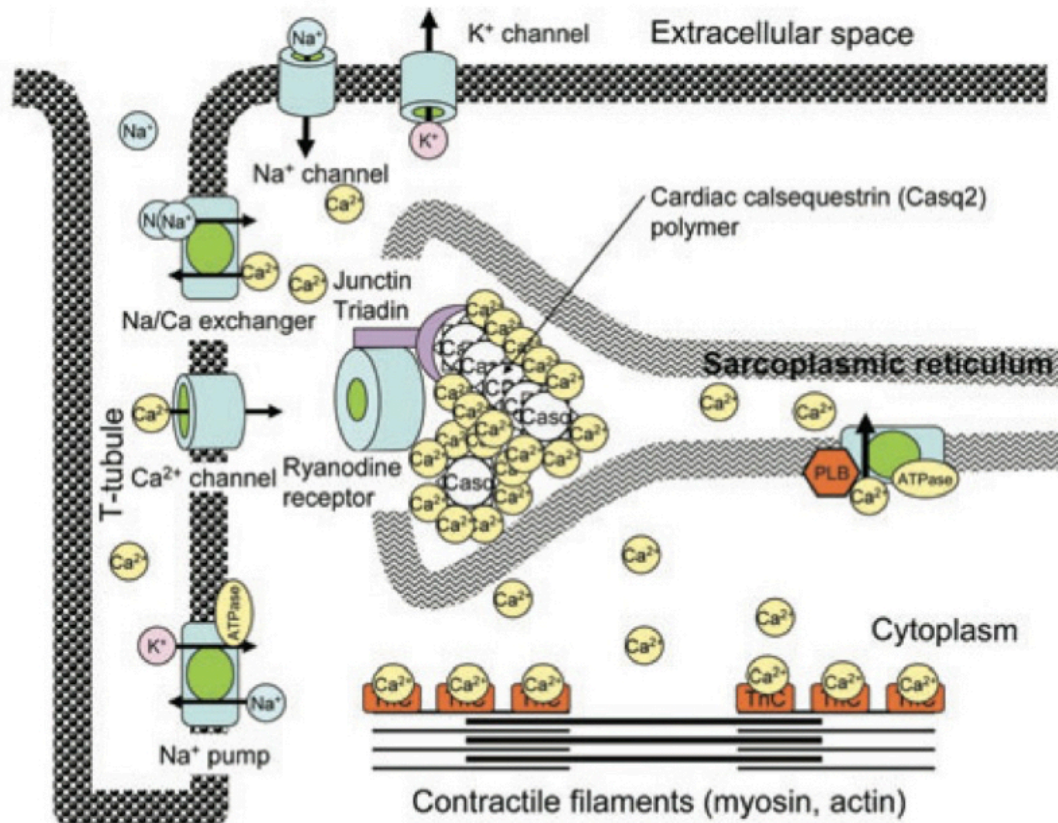


Figura 1.9. CASQ2 participa en la regulación de la liberación de Ca^{2+} por parte del canal RyR2. Cuando se despolariza la membrana celular del cardiomiocito (sarcolema), entra Ca^{2+} al citoplasma a través del canal de Ca^{2+} tipo L (DHPR) del túbulo T, produciendo una liberación masiva de Ca^{2+} a través del canal RyR2. Esto eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} y reduce los niveles de Ca^{2+} dentro del SR en un 40-60%. En las cisternas terminales del SR, la proteína de unión a Ca^{2+} calsecuestrina-2 (CASQ2) interactúa con las proteínas transmembrana triadina (TRD) y junctina (JNC) formando un complejo regulador del canal RyR2. El complejo formado por CASQ2-TRD-JNC inhibe al canal de liberación de Ca^{2+} (RyR2), manteniendo la concentración de Ca^{2+} libre del SR en aproximadamente 1 mM. Tomado de Chopra 2009 [41].

1.4. Expresión del gen *CASQ2*.

La expresión del gen humano *CASQ2* no está completamente descrita. Únicamente existen unos cuantos estudios acerca de la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* en la literatura [33, 35, 42-44]. Como mencionamos previamente, el gen *CASQ2* (1p13.3-p11) codifica la isoforma calsecuestrina-2 (CASQ2). Esta isoforma se expresa exclusivamente en cardiomiocitos y a una menor proporción en músculo

esquelético de contracción lenta. Se encuentra completamente ausente en tejidos no musculares. El gen de *CASQ2* humano consta de 11 exones y 10 intrones que ocupan aproximadamente 68 kb del genoma (**Figura 1.10**).

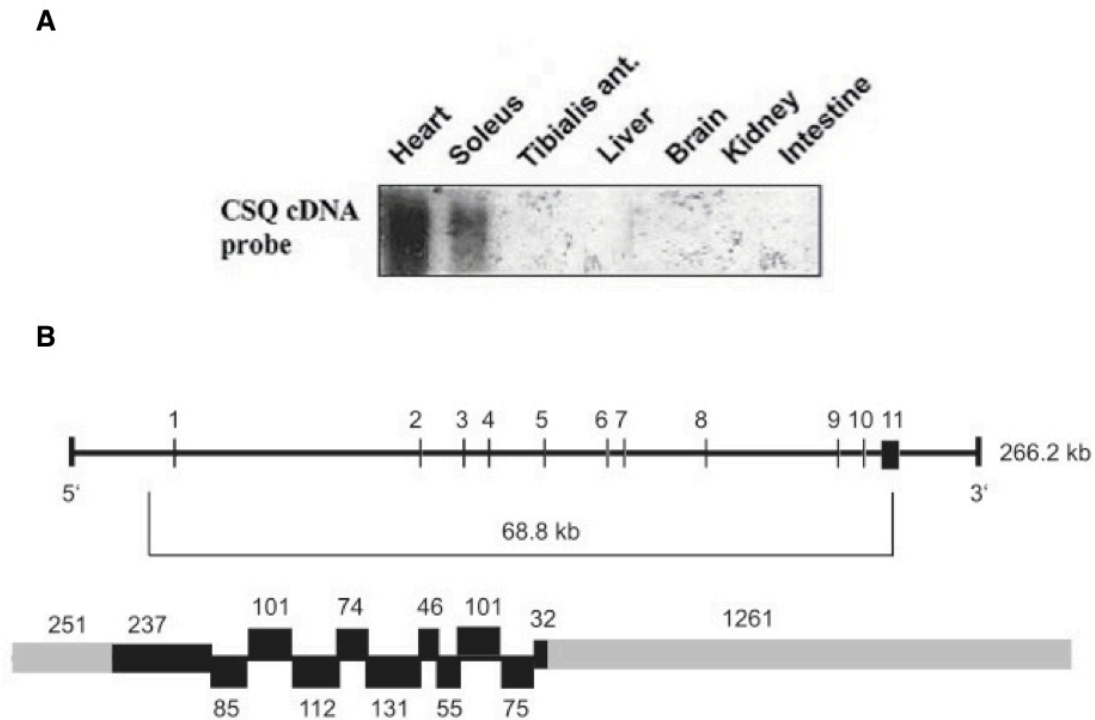


Figura 1.10. Estructura del gen humano *CASQ2*. A) Se muestra un Northern blot representativo analizando la expresión de *CASQ2* en diferentes tejidos de ratón: corazón, músculo sóleo, músculo tibial anterior, hígado, cerebro, riñón e intestino. Se observa la presencia de mRNA de *CASQ2* únicamente en corazón y en músculo esquelético de contracción lenta (sóleo). B) El gen humano *CASQ2* está organizado en 11 exones y 10 intrones que abarcan 68 kb del genoma, produciendo un solo transcrito de mRNA de 2548 nucleótidos. Panel A, tomando de Frank KF, Mesnard-Rouiller L, Et al; 2001 [33]. Panel B, Modificado de Reyes-Juárez, JL; 2007 [42].

Previamente, se demostró que las primeras 288 pb del promotor del gen humano *CASQ2* (*hCASQ2*) están muy conservadas entre especies (Chimpancé 100%, ratón 95%, rata 98%, pollo 87%; con respecto al gen humano). Esta región conservada del promotor contiene una “TATA-box” y sitios de unión para los factores de transcripción MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor-2) y SRF (Serum Response Factor). Los sitios de unión a MEF-2 y SRF se encuentran en las posiciones de -133 pb y -103

pb, respectivamente. Los factores de transcripción MEF-2 y SRF se unen a sus respectivos sitios de unión dentro del promotor del gen *hCASQ2*. Los sitios de unión a MEF-2 y SRF son necesarios para controlar la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos y en la línea celular derivada de músculo esquelético de contracción lenta Sol8. Se ha demostrado que la mutagénesis de estos sitios de unión a MEF-2 y SRF reduce drásticamente la transcripción del gen *hCASQ2* [42].

En un estudio, se reportó que la sobreexpresión del factor de transcripción Egr-1, en la línea celular H9c2, disminuye la expresión del gen *CASQ2* de rata. En ese mismo estudio, también se encontró que el tratamiento con 5-azacitidina y con butirato de sodio disminuye la expresión de *CASQ2* en células H9c2. También se encontró que la inhibición de NFAT, con CsA, disminuyó la expresión del gen *CASQ2* en células H9c2 que sobre-expresan Egr-1 [43].

Se ha encontrado una correlación entre el estrés oxidativo y la expresión del gen *CASQ2*. Cardiomiocitos de rata en cultivo fueron tratados con el agente desacoplante de la fosforilación oxidativa carbonil-cianuro-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona (FCCP). El tratamiento disminuyó los niveles de mRNA endógeno de *CASQ2*. Consistente con este hallazgo, el tratamiento con el agente antioxidante N-acetilcisteína fue previno la reducción de *CASQ2* inducida por FCCP, sin embargo, el mecanismo responsable aún permanece desconocido [45].

Durante mucho tiempo se pensó que la expresión de *CASQ2* no se alteraba en patologías cardíacas, tal como sucede con otras proteínas importantes para la homeostasis del Ca^{2+} del cardiomiocito [46]. Sin embargo, en un modelo de cardiopatía inducida por doxorubicina se observó una reducción en la expresión de *CASQ2* y de otras proteínas involucradas en el control del Ca^{2+} intracelular como RyR2, SERCA2a y su proteína reguladora fosfolambam (PLN) [47]. La

doxorrubicina aumenta la expresión de la proteína Id. Esta proteína es un regulador negativo del factor de transcripción MyoD. Por tanto, el aumento en la expresión de Id resulta en la reducción de la expresión de los genes regulados por MyoD [48]. Dado que MyoD induce la expresión de MEF-2, es posible que la inhibición de MyoD provocada por doxorrubicina sea responsable de la disminuida expresión de CASQ2 en estas condiciones.

Pese a estos hallazgos, aun se sabe poco sobre la expresión del gen *CASQ2* en condiciones patológicas. En un modelo de sobre-expresión de CASQ2, en ratones transgénicos, se observó el desarrollo de hipertrofia cardíaca, inducción de un programa de expresión genética fetal, reducida fracción de acortamiento, aumento en el contenido de Ca²⁺ dentro del SR y reducida liberación de Ca²⁺ del SR con la consecuente alteración de la función contráctil [49]. Por el contrario, la ablación del gen *CASQ2* produce un fenotipo arritmico sin alteraciones en la función contráctil. Cuando CASQ2 está ausente, aumenta la probabilidad de liberación espontánea de Ca²⁺ por el RyR2. Se ha visto que esto último favorece el desarrollo de arritmias ventriculares [41]. El aumento en la liberación espontánea de Ca²⁺ es el mecanismo fisiopatológico responsable de la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT). En esta condición, existen mutaciones en el gen *CASQ2* que insertan codones de terminación prematuros o producen proteínas no funcionales. Dado que CASQ2 funciona como un regulador del RyR2, la ausencia de CASQ2 se asocia con el desarrollo de taquiarritmias ventriculares inducidas por estrés adrenérgico [41, 50].

Lo expuesto anteriormente destaca la importancia del gen *CASQ2* en la fisiología del cardiomiocito. Adicionalmente, los hallazgos disponibles sugieren que la regulación de la expresión del gen *CASQ2* es más compleja de lo que se reportó previamente. Por

tanto, MEF-2 y SRF no son los únicos factores de transcripción que regulan la expresión del gen *hCASQ2* [42].

1.5. El papel del Ca^{2+} en la regulación de la expresión genética en cardiomiocitos.

La concentración citosólica de Ca^{2+} es clave para el control de múltiples procesos celulares [51]. Específicamente, en los cardiomiocitos, el Ca^{2+} regula muchas funciones celulares, como el acoplamiento de la excitación contracción (E-C), la actividad de los miofilamentos, el metabolismo energético, la muerte celular y la expresión genética [7]. Existen dos principales vías de señalización dependientes de Ca^{2+} que regulan la expresión genética en cardiomiocitos: la vía de Ca^{2+} /calmodulina-CaMKII-HDAC-MEF-2 y la vía Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina-NFAT [7].

La proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) participa en la regulación de muchos factores de transcripción como AP-1, SRF, CREB y MEF-2. CaMKII δ es la principal isoforma presente en cardiomiocitos. El splicing diferencial de su mRNA produce dos isoformas distintas: CaMKII δ_B la cual está presente en el núcleo y CaMKII δ_C , localizada en el citosol. CaMKII δ_B activa la transcripción mediada por MEF-2 a través de un mecanismo en el que participa la proteína HDAC clase II (Histona desacetilasa de clase II) [52]. En condiciones basales, MEF-2 está asociado con HDAC II, la cromatina en los alrededores se encuentra condensada y la transcripción genética se reprime. Cuando el Ca^{2+} citosólico se eleva, CaMKII δ_B se activa y fosforila a HDAC II. En su estado fosforilado, HDAC II se disocia de MEF-2. El dominio N-terminal de HDAC II se une a la proteína chaperona 14-3-3 y el complejo 14-3-3-HDAC II se exporta fuera del núcleo. De esta forma MEF-2 puede activar la transcripción genética (**Figura 1.11**) [53].

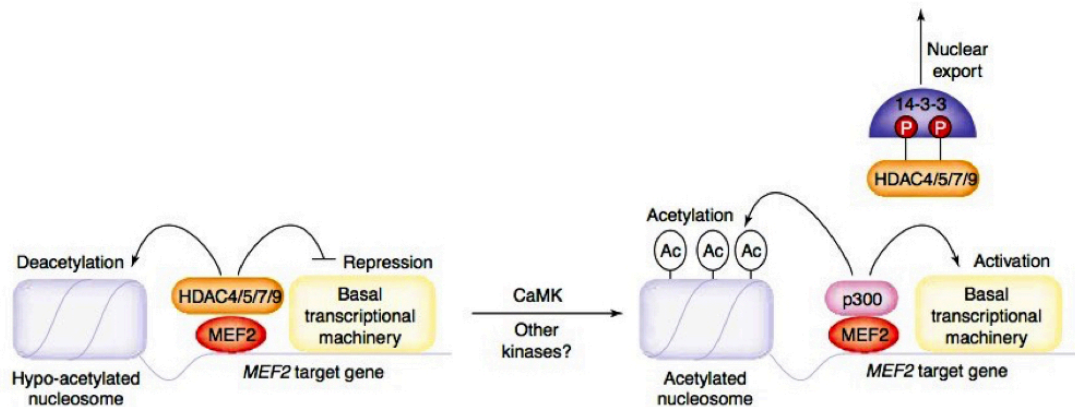


Figura 1.11. Activación de MEF-2 inducida por CaMKII. La asociación de MEF-2 con las HDACs de clase II (4, 5, 6, 7 y 9) produce la desacetilación de los nucleosomas cercanos al sitio de unión a MEF-2, reprimiendo los genes regulados por MEF-2. CaMKII fosforila HDAC, creando sitios de anclaje para la proteína chaperona 14-3-3. La interacción entre HDAC y MEF-2 se interrumpe y HDAC se transloca fuera del núcleo. Posteriormente MEF-2 recluta el co-activador p300, el cual posee actividad de histona-acetiltransferasa y se relaja la cromatina. Esto resulta en la inducción de la expresión de los genes regulados por MEF-2. HDAC II, (Histona desacetilasa de clase II); CaMKII, proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Tomado de McKinsey TA, 2002 [53].

El factor de transcripción MEF-2 se expresa abundantemente en tejidos musculares y en neuronas [53, 54]. Existen diferentes isoformas de MEF-2 codificadas por genes diferentes (MEF-2 A, B, C y D). Todas las isoformas de MEF-2 pertenecen a la familia MADS-box (MCM1, *Agamous*, *Deficiens*, SRF) de factores de transcripción. Estructuralmente, MEF-2 tiene un dominio N-terminal de 56 aminoácidos (MADS-Box) y un dominio MEF-2 específico de 29 aminoácidos. MEF-2 es un factor de transcripción particularmente importante en el control de la expresión genética de las células musculares. Esto se confirma debido a que la mayoría de los genes expresados en células musculares (α -MHC, MCK, miogenina, MyoD, MLC2v, α -actina esquelética) tienen sitios de unión a MEF-2 ([YTA(A/T)₄TAR]) en sus regiones reguladoras [54].

Como mencionamos previamente, la otra vía de señalización mediada por Ca^{2+} importante en los cardiomiocitos es la vía Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina-NFAT. La

calcineurina (CN) es una fosfatasa de serina/treonina, de expresión ubicua, que tiene un papel fundamental en la transducción de señales dependientes de Ca^{2+} . Calcineurina es un heterodímero compuesto de una subunidad catalítica (CN-A) de unión a calmodulina y una subunidad reguladora (CN-B) de unión a Ca^{2+} . Los aumentos sostenidos de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ activan a la calcineurina. Una vez activa, calcineurina desfosforila al factor de transcripción NFAT (factor nuclear de células T activas). En su estado desfosforilado, NFAT se transloca al núcleo celular, donde activa la expresión de sus genes blanco (**Figura 1.12**).

Los factores de transcripción NFAT son proteínas relacionadas a la familia de factores de transcripción Rel/NF κ B. La característica distintiva de los miembros de la familia NFAT es que son regulados por Ca^{2+} y la proteína fosfatasa Ca^{2+} /CaM-dependiente calcineurina. Se han descrito 5 isoformas de NFAT (NFAT 1 a 5). Las primeras cuatro isoformas son reguladas por calcineurina y son expresadas cardiomiocitos [55]. Se ha reportado que una sobre-activación de la vía Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina-NFAT puede inducir un fenotipo hipertrófico en el cardiomiocito [56, 57]. Por tanto, esta vía de señalización es de fundamental importancia para el cardiomiocito.

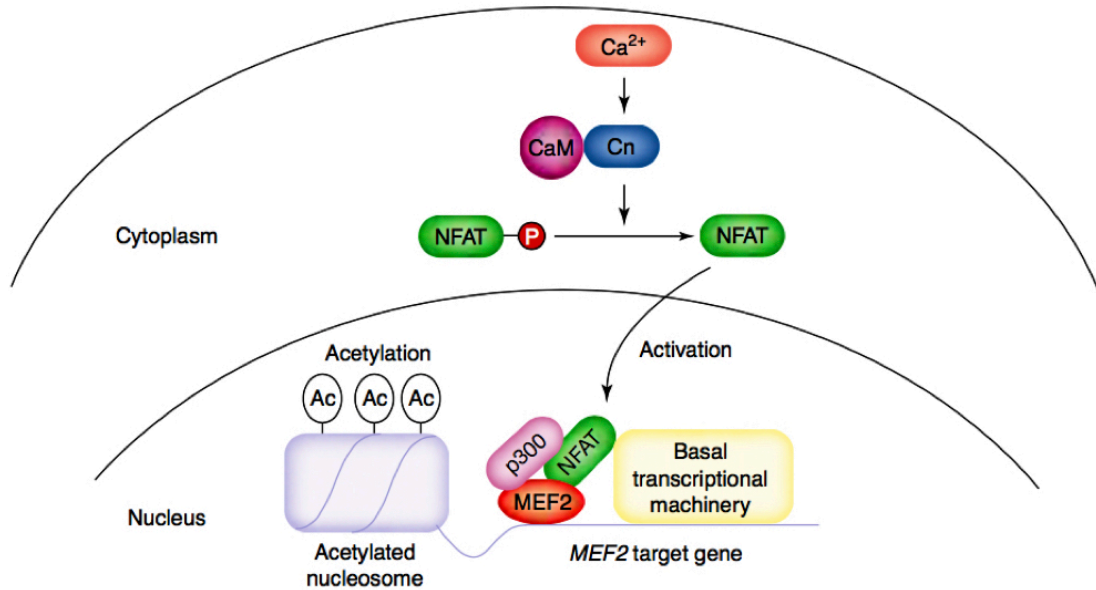


Figura 1.12. Activación de la vía Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina-NFAT. Un aumento sostenido en la concentración de Ca^{2+} activa a la proteína calmodulina (CaM). El complejo de Ca^{2+} /calmodulina se asocia con la fosfatasa calcineurina eliminando el efecto represivo de su dominio autoinhibitorio. Una vez activa, calcineurina desfosforila al factor de transcripción NFAT. En su estado desfosforilado, NFAT se transloca al núcleo celular. Dentro del núcleo NFAT interactúa con otros factores de transcripción, (por ejemplo, MEF-2) y se activa la transcripción genética. Tomado de McKinsey TA; 2002 [53].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El gen humano *CASQ2* tiene un patrón de expresión característico, tanto en cardiomiocitos como en miocitos esqueléticos. Para tener un mejor entendimiento de la regulación de la expresión de este gen es necesario determinar los mecanismos moleculares responsables de controlar su expresión en estos tejidos.

Se sabe que la vía de calcineurina/NFAT es funcional en cardiomiocitos y regula la expresión genética en respuesta a cambios intracelulares en la concentración de Ca^{2+} [58]. El factor de transcripción NFAT (factor nuclear de células-T activadas) regula la expresión de muchas proteínas que se expresan específicamente en músculo, como la β -MHC (cadena pesada de miosina β), la miosina de musculo esquelético y la SMMHC (cadena pesada de miosina de musculo liso) [59-61]. Actuando juntos o por separado, los factores de transcripción MEF-2 y NFAT regulan la expresión de genes importantes que se expresan en células musculares, como la β -MHC, Nur77 y BNP [54, 59, 62-66]. También se sabe que MEF-2 y NFAT pueden interactuar directamente entre sí y regular la expresión genética en linfocitos T [64]. Además, se ha reportado que una interacción entre los factores de transcripción MEF-2 y SRF regula la expresión de α -actina en músculo liso [67].

Previamente nuestro grupo demostró que los factores de transcripción MEF-2 y SRF se unen al promotor proximal del gen *hCASQ2* y son importantes para regular su expresión en cardiomiocitos y en miocitos esqueléticos de contracción lenta [42]. Sin embargo, existen pocos reportes en la literatura sobre la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* [33, 35, 42-44]. Por lo tanto, se desconoce si estos factores de transcripción son los únicos reguladores de la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos.

En el promotor del gen *hCASQ2*, además de los sitios de unión a MEF-2 y SRF, se encuentran potenciales sitios de unión al factor de transcripción NFAT. Como se menciona previamente, se ha demostrado que MEF-2 y NFAT regulan la expresión de múltiples genes de músculo cardíaco y esquelético, a través de interacciones proteína-DNA y proteína-proteína [62, 63].

Actualmente, se desconoce si NFAT regula la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos. Es posible que NFAT regule la expresión de *hCASQ2*, ya sea uniéndose directamente al promotor del gen *hCASQ2* o a través de una interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (como MEF-2 o SRF). Por tanto, en este trabajo estudiamos el papel que tiene la vía de calcineurina/NFAT en la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos.

3. HIPÓTESIS.

La vía de señalización calcineurina/NFAT está activa en cardiomiocitos. Dentro del promotor del gen *hCASQ2* se encuentran sitios de unión a los factores de transcripción NFAT y MEF-2 en las posiciones de -230 pb y -133 pb respectivamente. Es sabido que NFAT puede activar la expresión génica uniéndose directamente al DNA o interactuando con otros factores de transcripción en los promotores de sus genes blanco.

Por lo tanto, la hipótesis propuesta sostiene que el factor de transcripción NFAT activa la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos, uniéndose directamente al promotor del gen *hCASQ2* o bien a través de una interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción unidos directamente al promotor del gen *hCASQ2*, como MEF-2 o SRF.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo General:

El objetivo general de este trabajo es caracterizar el papel que tiene la vía de calcineurina/NFAT en la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Inhibir la actividad de la vía calcineurina/NFAT en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo y evaluar el efecto de dicha inhibición en los niveles de mRNA endógeno de CASQ2 y en los niveles de proteína de CASQ2.
2. Evaluar el efecto de la inhibición de la vía calcineurina/NFAT en la actividad transcripcional de las construcciones del promotor de gen *hCASQ2*.
3. Identificar por medio de análisis de secuencia, la presencia de sitios potenciales de unión a NFAT dentro del promotor de gen *hCASQ2*.
4. Demostrar la interacción directa del factor de transcripción NFAT con secuencias dentro del promotor del gen *hCASQ2* o con otros factores de transcripción unidos al promotor del gen *hCASQ2*.
5. Demostrar la funcionalidad de los sitios potenciales de unión a NFAT dentro del promotor del gen *hCASQ2*.

5. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1. Cultivo celular. Cultivos primarios de cardiomiocitos fueron preparados a partir de corazones de ratas neonatas de 1-2 días de nacidas siguiendo el protocolo descrito previamente [68]. Este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética Institucional de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las células

fueron crecidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco), kanamicina (60 mg/mL) (Sigma-Aldrich), penicilina (10 U/mL) (Gibco), estreptomycin (10 mg/mL) (Gibco), anfotericina B (0.025 mg/mL) (Gibco) y nistatina (10 U/mL) (Sigma-Aldrich).

5.2. Ensayos funcionales. Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata fueron usados para los experimentos de transfección. Los plásmidos que contienen la región promotora del gen *hCASQ2* fueron clonados previamente, por nuestro grupo de investigación, en un vector reportero pGL3-Basic (Promega) [42]. Únicamente se usaron dos construcciones para los experimentos de transfección. La construcción más larga del promotor del gen *hCASQ2* contiene 3102 pb del promotor del gen *hCASQ2* y 176 pb de la región 3' no-traducida del primer exón (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp). La construcción más corta contiene 288 pb del promotor del gen y 176 pb de la región 3' no-traducida (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp). Para los ensayos de sobreexpresión de NFAT, se utilizaron plásmidos de expresión para NFATc1 (pCR4-huNFATc1nuc, plásmido #23988) y NFATc3 (pBS-mNFATc3EE, plásmido #17868) (Addgene). Las células se transfectaron con 0.5 µg de las construcciones del gen *hCASQ2* (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc). Posteriormente se trataron con ciclosporina-A (CsA) (Sigma-Aldrich) por 12 horas o con INCA-6 (NFAT activation inhibitor III, #480403, Calbiochem-Merck). Una vez completado el tratamiento, se midió la actividad de luciferasa en un luminómetro Wallac Victor² 1420 (Perkin-Elmer) utilizando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). La actividad de luciferasa de luciérnaga se normalizó con la actividad de luciferasa de *Renilla* o con la concentración de proteína de la muestra. Para los ensayos de sobreexpresión de NFAT, 0.5 µg de las construcciones del

promotor del gen *hCASQ2* (pGL3- *hCASQ2*prom/Luc), 0.025 µg del plásmido de luciferasa de *Renilla* (PRL-CMV) y 0.5 µg de los vectores de expresión de NFATc1 (pCR4-huNFATc1nuc) o NFATc3 (pBS-mNFATc3EE) fueron transfectados transitoriamente en cardiomiocitos de rata neonata, sembrados en placas de 24 pozos utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células se cosecharon 2 horas después y se determinó la actividad de luciferasa como se mencionó anteriormente.

5.3. Extracción de RNA total y RT-qPCR. Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se trataron con ciclosporina-A (CsA) durante 12 horas o con INCA-6 durante 30 horas. Posteriormente, se aisló RNA total utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen). Posteriormente, 1 µg de RNA total fue sometido a una reacción de transcripción reversa usando la SuperScript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen). Para la reacción de qPCR en tiempo real se usaron 4.6 µL de una dilución 1:8 de cDNA y la SYBR GreenER qPCR Supermix (Invitrogen). El volumen final de reacción fue de 10 µL. El mRNA de GAPDH se utilizó como control de carga. Los niveles de mRNA de CASQ2 se analizaron por el método descrito previamente [69]. En la **Tabla 1** se muestra la secuencia de los primers utilizados para amplificar CASQ2 y GAPDH.

5.4. Mutagénesis de sitio-dirigida. La mutagénesis sitio-dirigida de los sitios de unión potenciales para MEF-2 (a -133 pb), SRF (a -103 pb) y NFAT (a -230 pb) se realizó como se menciona a continuación. Brevemente, 200 ng del plásmido de la construcción corta del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc - 288/+176 bp) se sometieron a una reacción de PCR mutagénico estándar, usando la DNA polimerasa de alta fidelidad *Pfu* Turbo (Thermo Fisher Scientific) y 125 ng de

primers específicos. La secuencia de los primers utilizados para la mutagénesis se muestra en la **Tabla 1**. Los parámetros de reacción del PCR mutagénico fueron los siguientes: 95° C durante 5 min, 18 ciclos (95°C durante 50 segundos, 75° C durante 50 segundos, 68°C durante 5 minutos) y 68°C durante 7 minutos. El volumen de reacción final fue de 50 µL. El producto de reacción se digirió con 10U de la enzima sensible a metilación *DpnI* (New England Biolabs) a 37°C durante 2 horas. Células de *E. coli* DH5α, hechas competentes con el método de cloruro de Ca²⁺, se transformaron con los productos de reacción del PCR mutagénico. Finalmente, los plásmidos se purificaron usando el kit de purificación de plásmidos PureLink (Invitrogen, catálogo K21004-04). Los plásmidos purificados fueron utilizados para ensayos funcionales.

5.5. Ensayos de retardo de movilidad electroferética (EMSA): 4 µg de extractos nucleares de cardiomiocitos de rata neonata fueron incubados con oligonucleótidos radio-marcados con γ -³²P y un anticuerpo específico para MEF-2 (sc-313x). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se muestra en la Tabla 1. Los oligonucleótidos de doble cadena se generaron calentando los oligonucleótidos sentido y anti-sentido a razón de 1:1 en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos, dejándolos enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente los oligonucleótidos de doble cadena se marcaron con [³²-P] utilizando 10 U de polinucleótido cinasa de T4 en presencia de γ -³²P-ATP (>6000 Ci/mmol) para generar las sondas correspondientes. Los complejos de proteína-DNA se generaron incubando extractos nucleares con las diferentes sondas marcadas. Las reacciones de unión se realizaron pre-incubando los extractos nucleares por 40 min a 4° C con amortiguador de unión 5 X (Tris-HCl, 50 mM; glicerol, 20%; NaCl, 250 mM; MgCl₂, 5 mM; EDTA, 2.5 mM; ditiotreitól, 1 mM) y anticuerpo específico. Posteriormente se agregó el

oligonucleótido radio-marcado con γ -³²P y se incubó por 30 min a 4° C. Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida al 5% corridos a 4° C a 30 mA durante 2 horas. Los geles se secaron y se expusieron al filme X-Omat (Kodak). Las bandas se analizaron densitometría usando el programa Image Studio Lite 5.2.5 (LI-COR).

5.6. Ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP). Se usaron cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata para los experimentos de ChIP. La reacción de “cross-linking” se realizó incubando las células con formaldehído al 5% durante 15 minutos. La reacción se detuvo usando glicina (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 0.125 M. Se removió el medio de cultivo de las placas y las células se lavaron con PBS adicionado con PMSF 1 mM. Posteriormente, las células se lisaron con amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 1% y la mezcla de inhibidores de proteasa SigmaFast [Sigma-Aldrich]). Las células se sometieron a 5 ciclos de sonicación de 15 segundos “encendido” 90 segundos “apagado” en un instrumento de sonicación Biorruptor Pico (Diagenode). La inmunoprecipitación se realizó con el kit One-Day ChIP Kit (Diagenode, catálogo C01010081) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cromatina sonicada se incubó con 8 µg de anticuerpo contra MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc.), NFATc3 (M75X sc8321, Santa Cruz Biotechnology Inc.) o SP1 (PEP-2 sc59x, Santa Cruz Bio-technology Inc.) como control negativo. Los oligonucleótidos usados para la reacción de PCR se muestran en la **Tabla 1**. Los ciclos de reacción del PCR fueron los siguientes: 95° C durante 10 min, 40 ciclos (95°C durante 30 segundos, 60° C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos) y 72°C durante 5 minutos. El volumen de reacción final fue de 20 µL.

5.7. Análisis por Western blot. Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata se lisaron con amortiguador RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, desoxicolato de sodio al 1%, Tritón X-100 al 1%, NP-40 al 1%, EDTA 0.3 mM pH 8.0, PMSF 1 mM y la mezcla de inhibidores de proteasas SigmaFast Protease 1X). La concentración de proteína se determinó por un método colorimétrico basado en el ensayo de Bradford, usando el reactivo de proteína Bio-Rad (Bio-Rad, catálogo 500-0006). La absorbancia de las muestras se midió a 595 nm en un luminómetro Wallac Victor² 1420 (Perkin-Elmer). Los lisados de proteína (30 µg) se separaron en geles de acrilamida al 12% y posteriormente fueron transferidos a una membrana de PVDF (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% (Bio-Rad) disuelta en TBST 0.1 % (amortiguador Tris-salino con Tween al 0.1%). Las membranas se incubaron toda la noche, a 4° C, con anticuerpo primario contra NFATc3 (M75X sc8321, Santa Cruz Biotechnology Inc.), MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc.), CASQ2 (EPR4227 ab108289, Abcam) o β-actina (130300, Santa Cruz Biotechnology Inc.). El anti-NFATc3 se diluyó a 2 µg/mL, el anti-MEF-2c se diluyó a 2 µg/750 µL, el anti-CASQ2 se diluyó 1 a 10,000 y el anti-β-actina se diluyó 1 a 5000. Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo (1 a 5000) (Thermo-Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las señales se detectaron usando el reactivo Super Signal West Dura (Thermo-Fisher, catálogo 34075) en un escáner C-Digit Blot (LI-COR). Los datos fueron analizados con el software Image Studio Lite 5.2.5 (LI-COR).

5.8. Ensayos de co-inmunoprecipitación de proteínas (coIP). Se prepararon extractos de proteína de cardiomiocitos de rata neonata usando el amortiguador RIPA. Los extractos fueron inmunoprecipitados toda la noche, a 4°C, con 5 µg de anti-NFAT

(ab 2722 Abcam) o 5 μ g de anti-MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Las proteínas inmunoprecipitadas se recuperaron usando Proteína A Sefarosa CL-4B (17-0780-01, GE Healthcare). Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por Western blot con anti-MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc.) o anti-NFAT (Ab 2722, Abcam). La secuencia de los primers utilizados para la reacción de PCR se muestra en la **Tabla 1**.

5.9. Análisis de Secuencia. El análisis de secuencia se realizó con el software MacVector 6.5.3 (Accelrys), la herramienta BLAST (NCBI) y MathInspector (Genomatix).

5.10. Análisis Estadístico. Los valores se expresan como la media de 3 experimentos independientes \pm error estándar (SEM). Los datos fueron analizados usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) usando ANOVA y las pruebas de comparación múltiple de Bonferroni o Dunnet. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos usados para qPCR, mutagénesis, ChIP y EMSA.

qPCR	CASQ2 Forward: 5'-AGCTTGTGGAGTTTGTGAAG-3' CASQ2 Reverse: 5'-GGATTGTCAGTGTGTCCC-3' GAPDH Forward: 5'-GGAGAAACCTGCCAAGTATGATGAC-3' GAPDH Reverse: 5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCG-3'
Mutagénesis	CASQ2 NFAT -230 bp Mut Forward: 5'-ATTCTTGTCTTGGGCCTTCTGCCTCTTCCCTCTTACCAGTCGGACAGAC-3' CASQ2 NFAT -230 bp Mut Reverse: 5'-GAAGAGGCAGAAGGCCCAAGACAAGAATGTACACGCATGAAATAAGGAGG-3' CASQ2 MEF-2 -133 bp Mut Forward: 5'-CATTGCATGCTGGATCCTCCGCCTGAAACAAC-3' CASQ2 MEF-2 -133 bp Mut Reverse: 5'-GTTGTTTTCAGGCGGAGGATCCAGCATGCAATG-3' CASQ2 SRF -103 bp Mut Forward: 5'-CTGCATCCTAAAAATTTAGTTCC-3' CASQ2 SRF -103 bp Mut Reverse: 5'-GGAACCTAAATTTTTAGGATGCAG-3'
ChIP	Forward: 5'-TGCCCCTTTATTTCACTTGC-3' Reverse: 5'-GGAGGCCAAGCCCTAGATAC-3'
EMSA	MEF-2 Consenso: 5'-GATCGCTCTAAAAATAACCCTGTCG-3' MEF-2 Consenso Mutado: 5'-GATCGCTGTAAACATAACCCTGTCG-3' CASQ2 MEF-2 -133 pb WT: 5'-TGCATGATTTATTTTAGCCTGAAACAAC-3' CASQ2 MEF-2 -133 pb Mut: 5'-CATTGCATGCTGGATCCTCCGCCTGAAACAAC-3' CASQ2 NFAT -230 pb WT: 5' GTACATTCTGTCTTTTTCTTCTGCCTCTTCCCTC-3'

6. RESULTADOS.

6.1. La inhibición de la vía Calcineurina/NFAT disminuye la expresión de CASQ2 en cardiomiocitos.

Como se mencionó anteriormente, el objetivo general del trabajo es caracterizar el papel de la vía de señalización calcineurina/NFAT en la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos. Previamente, se ha descrito que aumentos sostenidos en las concentraciones citosólicas de Ca^{2+} activan a la proteína calcineurina (CN). La CN es una fosfatasa dependiente de Ca^{2+} /calmodulina. Una vez activa, CN desfosforila a NFAT y éste se transloca al núcleo celular. Una vez dentro del núcleo, NFAT incrementa la actividad transcripcional de sus genes blanco [12].

Para comprobar si la inhibición de la vía CN/NFAT reduce la expresión de CASQ2 en nuestras condiciones experimentales, tratamos cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata con ciclosporina A (CsA), inhibidor de CN, durante 12 horas (**Figura 6.1**). Los resultados mostraron que la inhibición de la vía CN/NFAT, inducida por CsA, disminuyó la abundancia de mRNA de CASQ2 en un 50%. Además de NFAT, la fosfatasa CN tiene otras proteínas blanco, sobre las cuales ejerce un efecto [70]. Por lo tanto, decidimos usar el inhibidor de la vía de CN/NFAT, INCA-6. Dicho inhibidor impide la interacción entre calcineurina y NFAT, sin afectar la actividad catalítica de CN. Por lo tanto, INCA-6 inhibe la activación de NFAT sin afectar otros blancos de CN [71]. La inhibición de la activación de NFAT con INCA-6, también disminuyó la abundancia de mRNA endógeno de CASQ2 (**Figura 6.1**). Asimismo, también decidimos evaluar, el efecto de la inhibición de la vía CN/NFAT en la abundancia de proteína de CASQ2. Para ello, tratamos cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata con el inhibidor INCA-6 durante diferentes tiempos. Los resultados no

mostraron una disminución significativa en la abundancia de proteína de CASQ2 con el tratamiento (**Figura 6.2**). Es posible que la vida media larga de la proteína de CASQ2 no nos permitió ver una reducción significativa en la abundancia de la proteína.

No obstante, los resultados de la cuantificación del mRNA de CASQ2 demuestran que la vía de calcineurina/NFAT tiene un papel en el control de la transcripción del gen *CASQ2*.

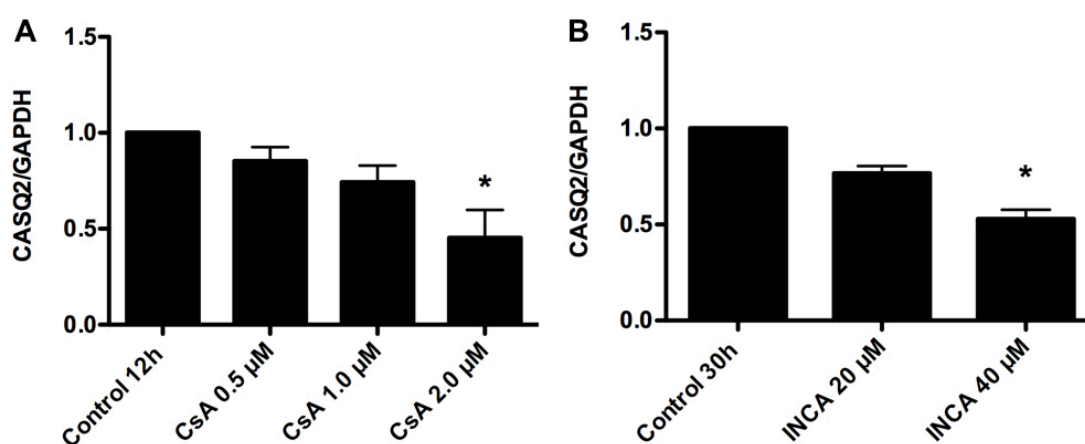


Figura 6.1. La inhibición de la actividad de NFAT disminuye la síntesis de mRNA de CASQ2 en cardiomiocitos de rata neonata. A) Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata fueron tratados con DMSO, como vehículo (Control) o con CsA durante 12 horas. Las células fueron cosechadas y el mRNA de CASQ2 fue cuantificado por PCR en tiempo real. El mRNA de GAPDH fue utilizado como gen normalizador. **B)** Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata fueron tratados con DMSO, como vehículo (Control) o con INCA-6 durante 30 horas. Las células fueron cosechadas y el mRNA de CASQ2 fue cuantificado por PCR en tiempo real. El mRNA de GAPDH fue utilizado como gen normalizador. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos independientes +/- error estándar (SEM). (*) Valores de $p < 0.05$ vs Control.

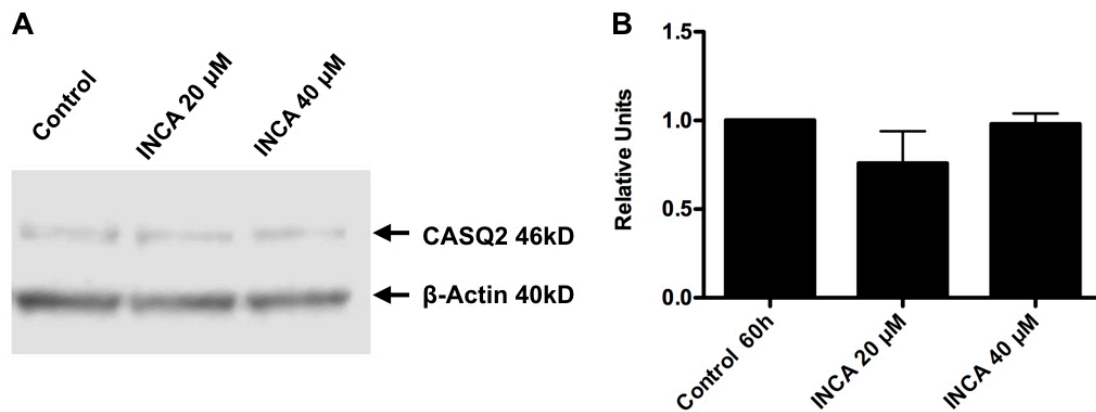


Figura 6.2. Efecto de la inhibición de la vía de calcineurina/NFAT en la abundancia de proteína de CASQ2 en cardiomiocitos de rata neonata. A) Cardiomiocitos de rata neonata fueron tratados con INCA-6 durante 60 horas. Posteriormente, las células fueron cosechadas y se determinó la abundancia de proteína de CASQ2 por medio de Western blot. β -actina se utilizó como control de carga. Se muestra una foto de un gel representativo. B) El análisis densitométrico de experimentos representativos (n=2) se realizó con el software Image-Studio Lite 5.2.5, LI-COR.

6.2. La inhibición de la activación de NFAT reduce la actividad transcripcional de las construcciones del gen *hCASQ2*.

Una vez que se determinó que la inhibición de la activación de NFAT con CsA o con INCA-6 disminuye la síntesis de mRNA de CASQ2 en cardiomiocitos de rata neonata, el trabajo se concentró en determinar el mecanismo responsable de este efecto. Primero, se realizó un análisis *in silico* de la secuencia de DNA del promotor del gen *hCASQ2* en busca de sitios potenciales de unión para el factor de transcripción NFAT. El análisis de secuencia encontró siete potenciales sitios de unión para el factor de transcripción NFAT dentro del promotor del gen *hCASQ2* (Figura 6.3 A).

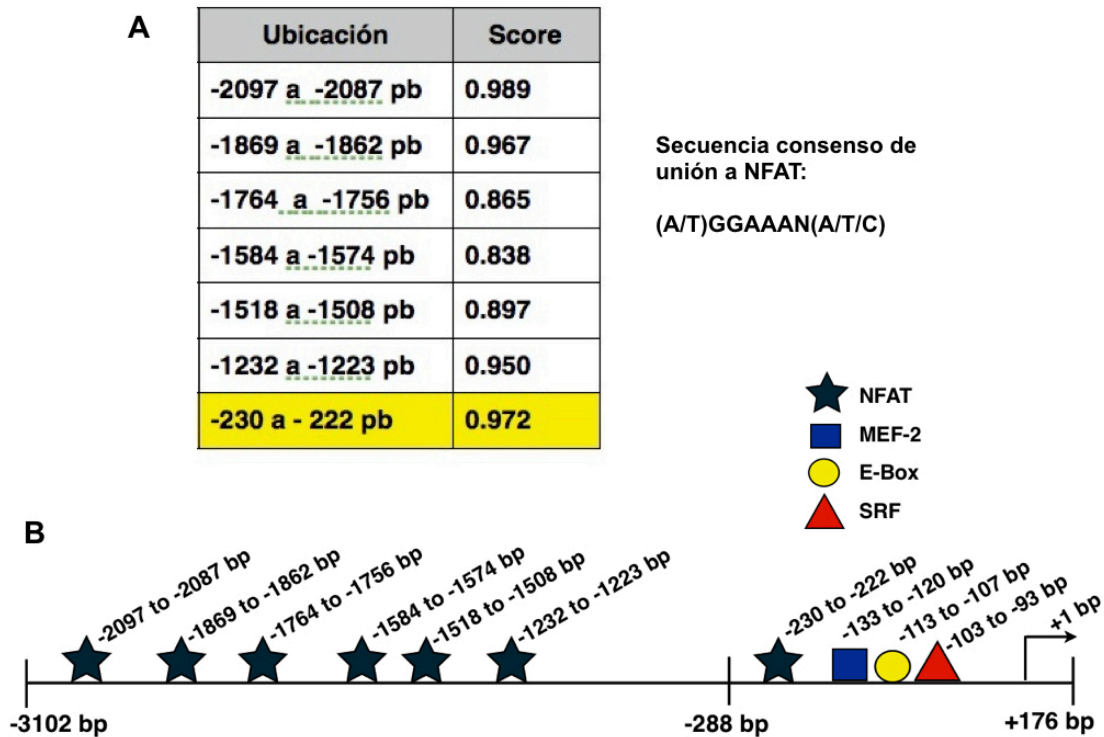


Figura 6.3. Análisis de secuencia del promotor del gen *hCASQ2*. El análisis *in sillico* del promotor del gen *hCASQ2* reveló siete sitios de unión al factor de transcripción NFAT. **A)** Se muestran las posiciones relativas de los sitios de unión a NFAT dentro del promotor del gen *hCASQ2*. También se muestra el puntaje de cada sitio con respecto a la secuencia consenso de unión a NFAT. En amarillo se resalta el sitio de unión ubicado a -230 bp, el cuál se encuentra conservado entre diferentes especies (humano, chimpancé, ratón, perro y pollo). **B)** Diagrama de las construcciones del promotor del gen *hCASQ2* usadas en los ensayos funcionales. Se señalan las fronteras de las dos construcciones del gen *hCASQ2* (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp o pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp). También se muestran esquemáticamente las posiciones de los sitios de unión factores de transcripción relevantes.

Por lo tanto, se investigó si la disminución en la abundancia de mRNA de CASQ2 inducida por la inhibición de NFAT era un efecto mediado transcripcionalmente. Para ello, se realizaron ensayos funcionales con dos construcciones quiméricas del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp o pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp) (**Figura 6.3 B**). Dichas construcciones fueron generadas previamente utilizando un vector reportero pGL3-basic [42]. Ambas construcciones fueron transfectadas en cardiomiocitos de rata neonata. Posteriormente, las células fueron tratadas con CsA o INCA-6, inhibidores de la

activación de NFAT. En concordancia con la cuantificación de mRNA, ambos inhibidores (CsA e INCA-6) disminuyeron la actividad transcripcional de ambas construcciones del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3- *hCASQ2*prom/Luc) (**Figura 6.4**).

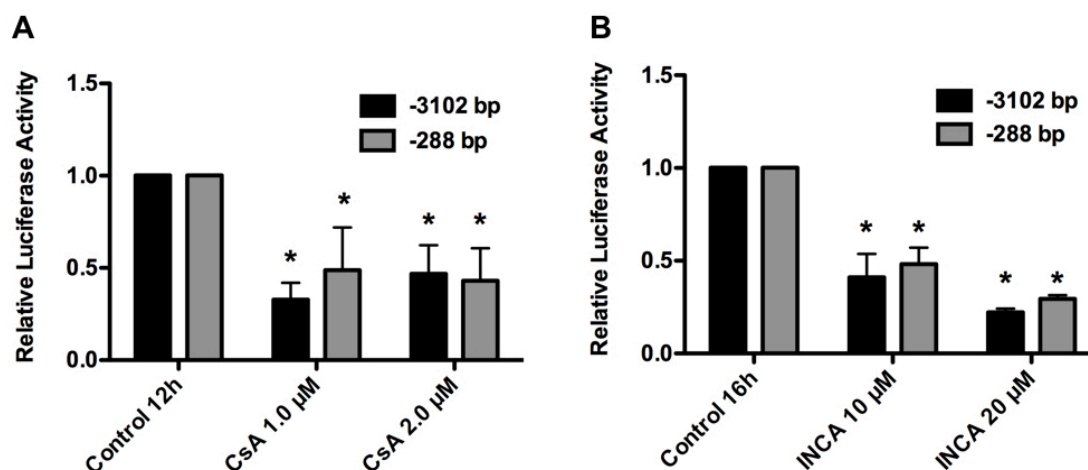


Figura 6.4. La inhibición de la actividad de NFAT con CsA o INCA-6 disminuyó la actividad transcripcional de las construcciones del gen *hCASQ2*. A) Actividad de luciferasa de cardiomiocitos de rata neonata transfectados con la construcción pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp (barras negras) o con la construcción pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp (barras grises) y tratados con vehículo (Control) o con CsA durante 12 horas. B) Actividad de luciferasa de cardiomiocitos de rata neonata transfectados con la construcción pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp (barras negras) o con la construcción pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp (barras grises) y tratados con vehículo (Control) o con INCA-6 durante 16 horas. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos independientes +/- SEM. A la actividad de luciferasa de la condición “Control” se le dio un valor arbitrario de 1. (*) valores de $p < 0.05$ vs Control.

Para comprobar que la disminución de la actividad transcripcional de las construcciones del gen *hCASQ2* inducida por CsA e INCA-6 fuera específico, se realizó el mismo experimento utilizando el vector pGL3-promotor (**Figura 6.5**).

Se utilizó pGL3-promotor como control debido a que este vector es regulado por el promotor de SV40. Por lo tanto, es insensible a la inhibición de la vía de calcineurina/NFAT inducida por CsA e INCA-6. Considerados juntos, los resultados de los ensayos funcionales demostraron que la disminución en la síntesis de mRNA

de CASQ2 inducida por la inhibición de la vía de calcineurina/NFAT es mediada transcripcionalmente.

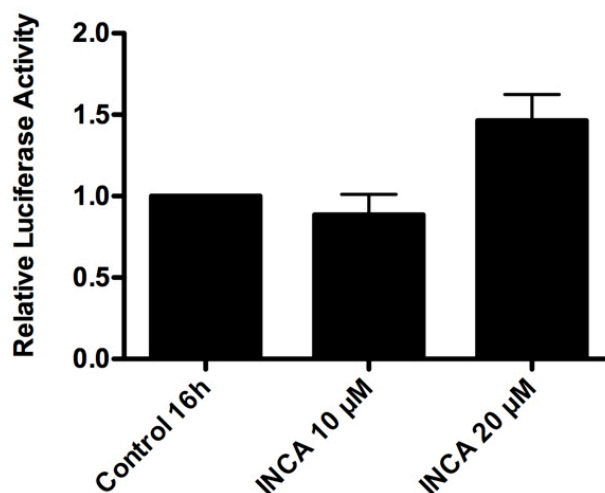


Figura 6.5. La inhibición de la vía calcineurina/NFAT no inhibe la actividad transcripcional del pGL3-promotor. Actividad de luciferasa de cardiomiocitos de rata neonata transfectados con la construcción pGL3-promotor, que contiene el promotor de SV40 (Promega) y tratados con vehículo (Control) o con INCA-6 durante 16 horas. Los resultados se expresan como la media de 3 experimentos independientes +/- SEM. A la actividad de luciferasa de la condición “Control” se le dio un valor arbitrario de 1.

6.3. La sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3 aumenta la actividad transcripcional de las construcciones del gen *hCASQ2*.

Los resultados previos demostraron que la inhibición de la vía de calcineurina/NFAT disminuye tanto la expresión de CASQ2 endógena como la actividad de las construcciones del gen *hCASQ2*. Posteriormente se evaluó si la sobreexpresión de NFAT tenía el efecto opuesto en la expresión del gen *hCASQ2*. Para la sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3 se utilizaron vectores de expresión que contienen el cDNA para la proteína de NFAT (ver sección de Materiales y Métodos). Se transfectaron los vectores de expresión para NFATc1 y NFATc3 en cardiomiocitos

de rata neonata y se comprobó la sobreexpresión de las proteínas NFAT por medio de análisis de Western blot (**Figura 6.6**).

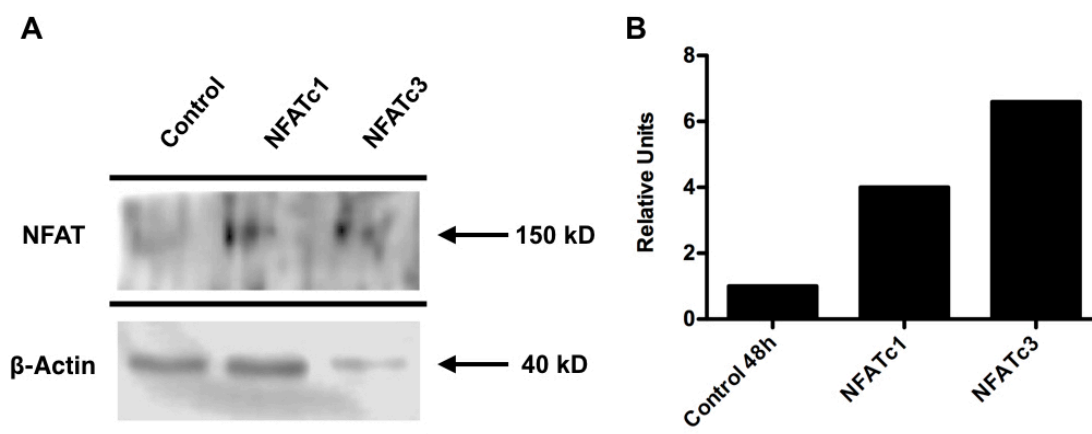


Figura 6.6. Sobreexpresión de NFAT en cardiomiocitos de rata neonata. Para verificar la sobreexpresión de NFAT, cardiomiocitos de rata neonata fueron transfectados con los vectores de expresión para NFATc1 o NFATc3. Después de 48 horas las células fueron cosechadas y la proteína de NFAT fue analizada usando Western blot. **A)** Se muestra una foto de un gel representativo. **B)** Se muestra el análisis densitométrico realizado con el software Image-Studio Lite 5.2.5, LI-COR.

Después de comprobar que NFAT efectivamente se sobre-expresaba en cardiomiocitos, co-transfectamos las construcciones del gen *hCASQ2* junto con los vectores de expresión para NFATc1 o NFATc3. Los resultados mostraron que la sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3 aumenta la actividad transcripcional de ambas construcciones del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3- *hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp o pGL3- *hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp) (**Figura 6.7**). Además, el tratamiento con CsA junto con la sobreexpresión de NFATc1 o NFATc3 impidió el efecto de trans-activación inducida por la sobreexpresión de NFAT en la construcción larga del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3- *hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp) (**Figura 6.8**). Debido a que ambas construcciones del promotor del gen *hCASQ2* respondieron de manera similar a la inhibición de la vía de CN/NFAT y a la sobreexpresión de NFAT,

se concluyó que el elemento de respuesta para este efecto debe estar localizado dentro de la construcción corta del promotor. Dicha construcción contiene la región entre -288/+176 pb del promotor del gen *hCASQ2*. Como se menciona previamente, el análisis de secuencia del promotor reveló un sitio potencial de unión a NFAT, específicamente en la posición entre -230 a -222 pb (Figura 6.3). Por lo tanto, se investigó la funcionalidad de este sitio de unión a NFAT.

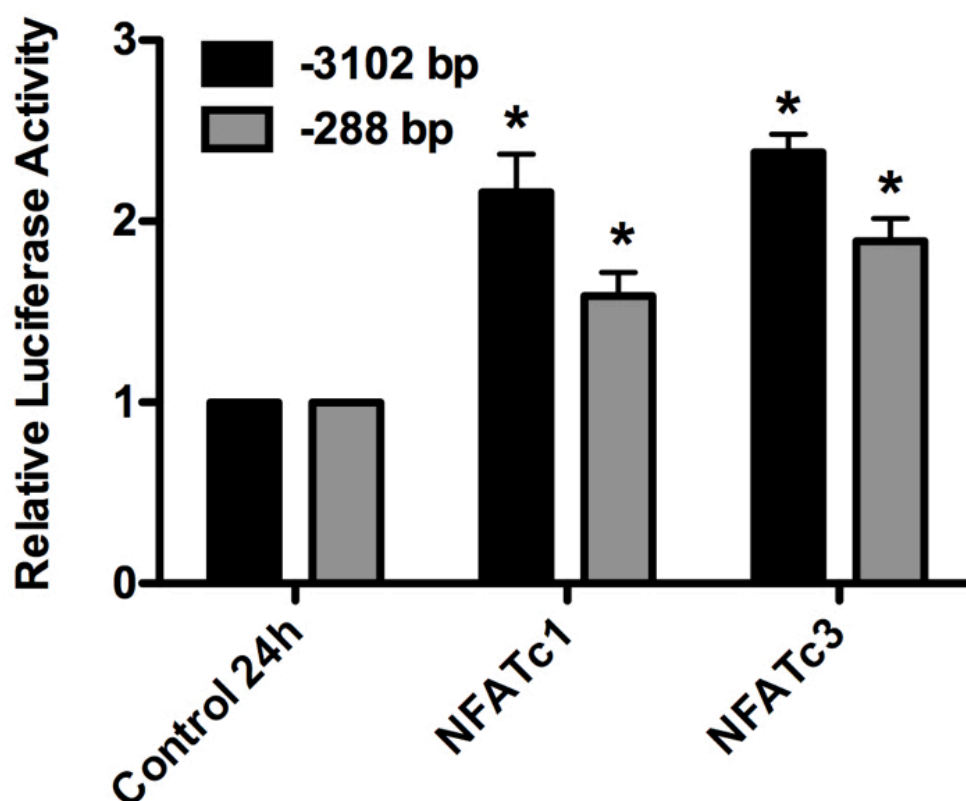


Figura 6.7. La sobreexpresión de NFAT incrementa la actividad transcripcional de las construcciones del gen *hCASQ2*. Se muestra la actividad de luciferasa de cardiomiocitos de rata neonata co-transfectados con pGL3-*hCASQ2*prom/Luc-3102/+176 bp (barras negras) o pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp (barras grises) y los vectores de expresión para NFATc1 o NFATc3. Después de 24 horas se cosecharon las células y se determinó la actividad de luciferasa. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos independientes +/- SEM. A la actividad de luciferasa de la condición “Control” se le dio el valor arbitrario de 1. (*) Valores de $p < 0.05$ vs Control.

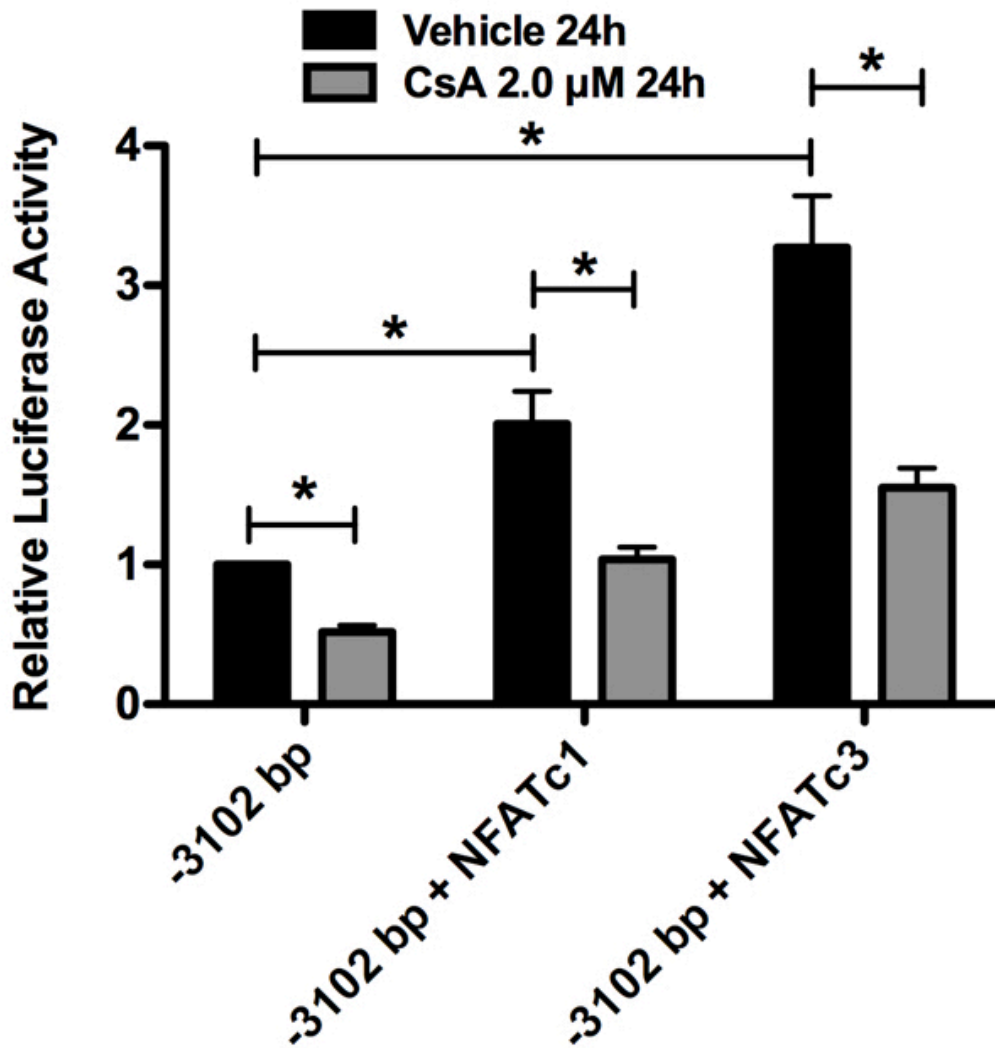


Figura 6.8. La inhibición de la vía calcineurina/NFAT inhibe el efecto de transactivación provocado por la sobreexpresión de NFAT. Se muestra la actividad de luciferasa de cardiomiocitos de rata neonata co-transfectados con pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp (barras negras) y los vectores de expresión para NFATc1 o NFATc3. Las células fueron tratadas con CsA durante 24 horas. Una vez completado el tratamiento, se cosecharon las células y se determinó la actividad de luciferasa. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos independientes \pm SEM. A la actividad de luciferasa de la condición “Control” se le dio el valor arbitrario de 1. (*) Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6.4. El sitio de unión a MEF-2 ubicado a -133 pb es responsable de la transactivación del promotor del gen *hCASQ2* inducida por NFAT.

Los resultados de los ensayos funcionales sugirieron que el factor de transcripción NFAT está involucrado en la regulación del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata. Como se menciona previamente, el análisis *in silico* del promotor del gen *hCASQ2* reveló un sitio potencial de unión a NFAT entre -230 a -222 pb (-230 5'-GTCTTTTCC-3'-222). Dicho sitio de unión se encuentra conservado entre diferentes especies (**Figura 6.9**).

Para investigar si este sitio potencial de unión a NFAT es funcional se realizaron ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSAs) y mutagénesis de sitio dirigido. Para los experimentos de EMSA se utilizaron oligonucleótidos de doble cadena marcados con $\gamma^{32}\text{-P}$ en el extremo-5'. Dichos oligonucleótidos contienen la secuencia del sitio potencial de unión a NFAT ubicado entre -230 a -222 pb del promotor del gen *hCASQ2*. Los resultados de los experimentos EMSA fallaron en demostrar interacción entre el sitio de unión a NFAT ubicado a -230 pb del promotor con alguna proteína dentro del núcleo celular de los cardiomiocitos (**Figura 6.10**).

```

Human          -290      -280
Chimp          TCGAGTTTCCTTC-TCTTCTTT
Dog            TCGAGTTTCCTTC-TCTTCTTT
              GAGCTTATTTCTCTTC-TT
              XhoI

Human          -270      -260      -250      -240      -230
Chimp          GACCTTCTAGCCTCCTTATTTTCATGCGGTGACATTC-TTGT-CTTTTTCCT
Mouse         GACCTTCTAGCCTCCTTATTTTCATGCGGTGACATTC-TTGT-CTTTTTCCT
Dog            ***** ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Chick          GACCTTGCTGGCCTCCTTATTTTC-T-CATGCACA--CGTTCCTCCGCTTTCCT
              TTGTCTTTTTCCT

Human          -220      -210      -200      -190      -180      -170
Chimp          TC-TGCCCTCTTCCCTCTTACCAGTCGGACAGACTGTATCAGCGAATCCCT
Mouse         TC-TGCCCTCTTCCCTCTTACCAGTAGGACAGACTGTATCAGCGAATCCCT
Dog            TC-TGCCCTCTTGTGTC-CTTCTGCCG-CTGACACGCTGCATGGACAAATCCCT
Cow           TCCFACCTCCFCCCT-TTCACCACFCGG-CCGACTGTATCAGCGAATCCCT
Chick          TCCCTCTTACCAGTCGGACAGACTGTATCAGCGAATCCCT
              ** * *****
              TC-TCCCTCTTCC-----CAGCTAGTCCCT

Human          -160      -150      -140
Chimp          CTACAGTGTGCTATCT-----AACTTTTTTATTCATTGC
Mouse         C-ACAGTGTGCTATCTGACTTTTTTTTTTAAAAAAATTTATTCATTGC
Rat           TTTATTCATTGC
Dog            CTACAGTGTGCTATCT-----AACTTTTTTATTCATTGC
Cow           CAACAGGGCCATATCT-----AACTTTTTTATTCATCGC
Chick          C-ATGCTGTGCTATCTGCTCCTTTTAA-----TTCATTGC

Human          -130      -120      -110      -100      -90
Chimp          ATGATTTATTTTGTAGCCTGAAACAACCTGCATCCTAAAAATGGAGTTCCCTA
Mouse         ATGATTTATTTTGTAGCCTGAAACAACCTGCATCCTAAAAATGGAGTTCTTA
Rat           ATGATTTATTTTGTAGCCGAAACAACCTGCATCCTAAAAATGGAGTTCTTA
Dog            ATGATTTATTTTGTAGCCTGAAACAACCTGCATCCTAAAAATGGAGTTCCCTG
Cow           ATGATTTATTTTGTAGCCTGAAACAACCTGCATCCTAAAAATGGAGTTCC-A
Chick          AGGGTTTATTTTGTAGACTGAAACAACCTGCCTTCTAAAAATGGAGTTCCCTA
              MEF2          E-box          CArG-box

Human          -80      -70      -60      -50      -40
Chimp          ATGAGACAGAGGCTGAGCAGAGCTATGTAAGGTATCTGGGGCTTGGCCTCCC
Mouse         ATGAGACAGAGGCTGGG-AGAGCTATGTAAGGTATCTAGGGCTTGGCCTCCC
Rat           ATGAGACAGAGGCTGGG-AGAGCTATGCAAGGTATCTAGGGCTTGGCCTCCC
Dog            ATGAGACAGGGGCTGGGCGAGCTATGCGAGGTATCTGGGGCTGGGCCGCC
Cow           ATGAGACAG-GGCTGGGCGAGCTATGCAAGCTATCTGGGGCTGGGTGGCCC
Chick          ATGACACGGGAGCTGGACACAGCTATGTAAGGTATCCAGGGCTTGGCCTGAC
              TATA-box/MTB

Human          -30      -20      -10      +1      +10
Chimp          AGCCTCCCTAGCTTGGCTGTTTTTCTACTCTCATGCGTGCCTGCGTGCCT
Mouse         AGCC--CGT-GCCTGGCTCTTG-----CTCTG-----
Rat           AGCCTCC-T-GCCTGGCT
Dog            AGCCT
Cow           AGCCT

```

Figura 6.9. Análisis de secuencia del promotor del gen *hCASQ2*. El análisis de la secuencia se realizó usando el software MacVector 6.5.3 y la herramienta BLAST de NCBI. Se observa que los primeros 288 pb del promotor están conservados entre las especies analizadas. Se muestra un sitio potencial de unión a NFAT entre -230 a -222 pb el cual está conservado entre especies. Dentro de esta región también se encuentran los sitios de unión a MEF-2 (-130 a -120 pb) y SRF (-103 a -93 pb). Modificado de Reyes-Juárez, JL; 2007 [42].

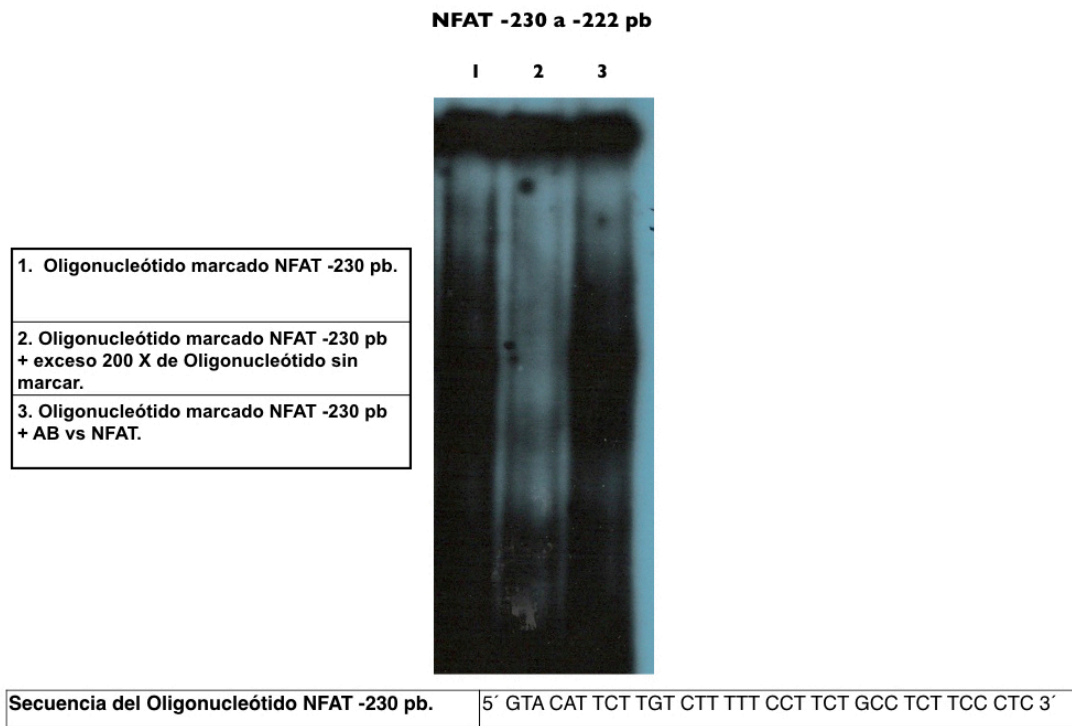


Figura 6.10. Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética en cardiomiocitos de rata neonata. Un oligonucleótido radio-marcado que contiene la secuencia del sitio de unión a NFAT -230 pb del promotor del gen *hCASQ2* fue incubado con extracto nuclear. La identidad de los carriles y la secuencia del oligonucleótido utilizado se muestran en la figura. El sitio de unión a NFAT ubicado entre -230 a -222 pb del promotor del gen *hCASQ2* es incapaz de formar un complejo específico con alguna proteína del núcleo celular de cardiomiocitos de rata neonata.

Los experimentos de EMSA determinan una interacción *in vitro* entre un oligonucleótido y una proteína presente en el núcleo celular. Por tanto, un resultado negativo en este tipo de experimentos no excluye la posibilidad de que un sitio de unión para un factor de transcripción sea funcional *in vivo*. Por este motivo también se realizó mutagénesis de sitio dirigido del sitio de unión a NFAT ubicado a -230 bp. Posteriormente, utilizando ensayos funcionales, se evaluó el efecto de dicha

mutagénesis en la actividad transcripcional de la construcción corta del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp). Los resultados mostraron que la mutagénesis del sitio de unión a NFAT ubicado a -230 bp del gen *hCASQ2* no cambia la actividad transcripcional de la construcción corta del promotor (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp) (Figura 6.11).

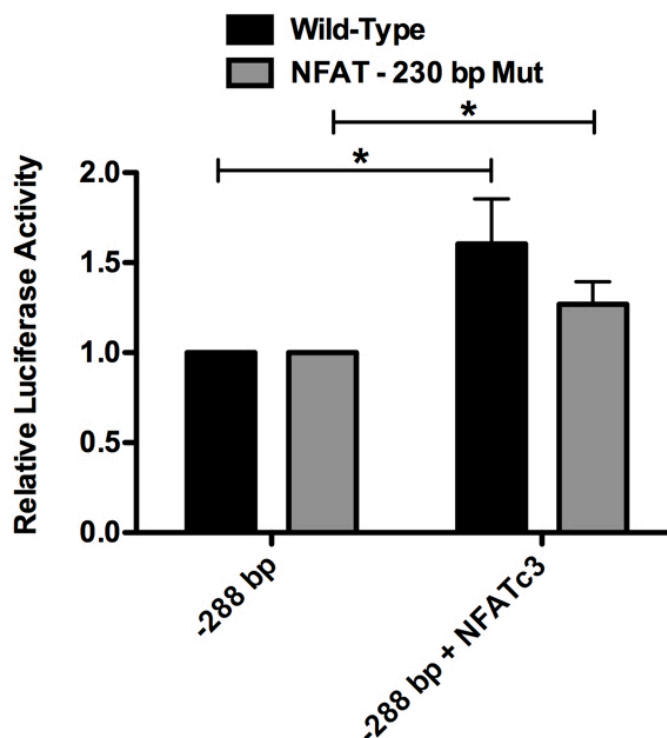
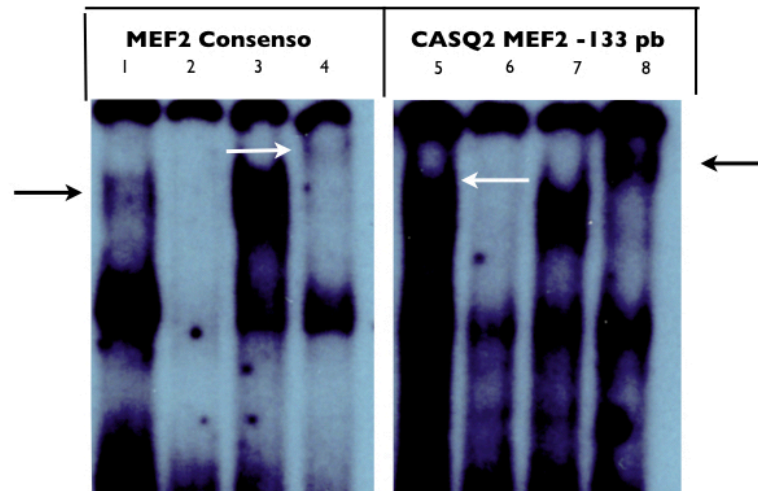


Figura 6.11. La mutagénesis del sitio de unión a NFAT ubicado a -230 pb no cambia la actividad transcripcional de la construcción corta del promotor del gen *hCASQ2*. Cardiomiocitos de rata neonata fueron co-transfectados con el vector de expresión para NFAT y la construcción pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp Wild-Type (barras negras) o con la construcción con el sitio de unión a NFAT -230 pb mutado (barras grises). Después de 24 horas las células fueron cosechadas y se determinó la actividad de luciferasa. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos independientes +/- SEM. A la actividad de luciferasa de la construcción de -288 pb se le dio el valor arbitrario de 1. (*) Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Estos resultados sugieren que no existe una interacción directa entre el factor de transcripción NFAT y su sitio de unión localizado a -230 pb del promotor. Los resultados previos demostraron que la inhibición de la vía de CN/NFAT en cardiomiocitos tiene un efecto negativo en la expresión del gen *hCASQ2*. Por otra

parte, los experimentos de EMSA y la mutagénesis de sitio dirigido no pudieron demostrar la funcionalidad del sitio de unión a NFAT ubicado a -230 pb. Esto sugiere que el mecanismo por medio del cual NFAT regula la expresión del gen *hCASQ2* debe ser independiente de la unión directa de NFAT al promotor del gen. Previamente se demostró que los sitios de unión a MEF-2 y SRF ubicados a -133 pb y a -103 pb, respectivamente, dentro del promotor del gen *hCASQ2* son funcionales en cardiomiocitos de rata neonata [42]. Por medio de experimentos de EMSA, comprobamos que MEF-2 se une a su sitio de unión dentro del promotor del gen *hCASQ2* ubicado a -133 pb (**Figura 6.12**).



1. MEF-2 Sec Consenso	5. MEF-2 -133 pb
2. MEF-2 Sec Consenso + 200X de oligo no marcado	6. MEF-2 -133 pb + 200X de oligo no marcado
3. MEF-2 Sec Consenso Mut + 200X de oligo no marcado	7. MEF-2 -133 pb Mut + 200X de oligo no marcado
4. MEF-2 Sec Consenso + Anticuerpo vs MEF2	8. MEF-2 -133 pb + Anticuerpo vs MEF2

MEF2 Consenso	5'-GAT CGC TCTAAA AATAAC CCT GTC G-3'
MEF2 Consenso Mutado	5'-GAT CGC TGTAAA CATAAC CCT GTC G-3'
CASQ2 MEF2 (-133 a -120 pb)	5'-TGC ATG ATT TAT TTT TAG CCT GAA ACA AC-3'
CASQ2 MEF-2 (-133 a -120 pb) Mutado	5'-CAT TGC ATG CTG GAT CCT CCG CCT GAA ACA AC-3'

Figura 6.12. Ensayo de Retardo de Movilidad Electroforética en cardiomiocitos de rata neonata. El oligonucleótido radio-marcado que contiene la secuencia del sitio de unión a MEF-2 ubicado entre -133 y -120 pb en el promotor del gen *hCASQ2* es capaz de formar un complejo que se compite con exceso molar (200X) de oligonucleótido frío, permanece sin cambio cuando se compite con exceso molar (200X) de un oligonucleótido que tiene el sitio de unión a MEF-2 -133 pb mutado frío y forma un complejo de super-retardo con anticuerpo específico para MEF-2. Como

control positivo se utilizó un oligonucleótido que contiene la secuencia consenso de unión a MEF-2.

Como se mencionó anteriormente, existen interacciones directas entre MEF-2 y NFAT y entre SRF y NFAT. Dichas interacciones son importantes para regular la expresión genética. Debido a ello, se investigó la posibilidad de que NFAT interactúe, ya sea con MEF-2 unido al sitio de -133 pb o con SRF unido al sitio de -103 pb. Para examinar esta hipótesis, se realizó mutagénesis dirigida del sitio MEF-2 a 133 pb y del sitio SRF a -103 pb, en la construcción corta del promotor del gen *hCASQ2*. Posteriormente, se realizaron ensayos funcionales usando esas construcciones mutadas. Los resultados de este experimento demostraron que la construcción con el sitio SRF ubicado a 103 bp mutado aún era transactivada por la sobreexpresión de NFAT. Por otro lado, la construcción con el sitio de unión a MEF-2 ubicado a -133 pb del promotor del gen *hCASQ2* ya no podía ser transactivada por la sobreexpresión de NFAT (Figura 6.13).

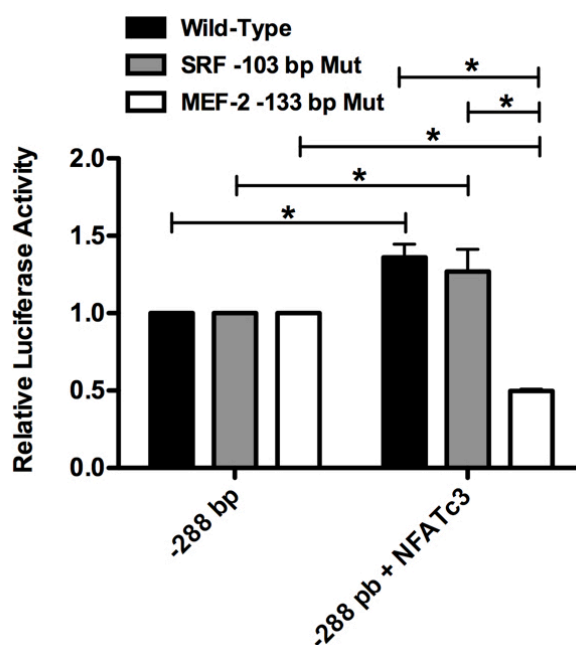


Figura 6.13. El sitio de unión a MEF-2 ubicado a -133 pb es responsable de la transactivación del promotor del gen *hCASQ2* inducida por la sobre-expresión de NFAT. Cardiomiocitos de rata neonata fueron co-transfectados con el vector de

expresión de NFATc3 y con la construcción pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp Wild-Type (barras negras), la construcción con el sitio SRF a -103 pb mutado (barras grises) o con la construcción con el sitio de unión a MEF-2 a -133 pb mutado (barras blancas). Después de 24 horas se cosecharon las células y se determinó la actividad de luciferasa. Los resultados son expresados como la media de 3 experimentos independientes +/- SEM. A la actividad de luciferasa de la construcción de -288 pb se le dió el valor arbitrario de 1. (*) Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

En conjunto, los resultados de la mutagénesis de los sitios de unión a MEF-2 y SRF, sugieren que NFAT interactúa con MEF-2 unido a su respectivo sitio dentro de la región proximal del promotor del gen *hCASQ2*.

6.5. Una interacción directa entre los factores de transcripción MEF-2 y NFAT regula la expresión del gen *hCASQ2*.

Los resultados previos demostraron que la inhibición de la vía CN/NFAT reduce la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata en cultivo. Adicionalmente, la sobreexpresión de NFAT aumenta la actividad transcripcional de las construcciones del promotor del gen *hCASQ2*. Sin embargo, los experimentos de EMSA y la mutagénesis del sitio de unión a NFAT ubicado a -233 pb no demostraron la funcionalidad de este sitio. Contrariamente, la mutagénesis del sitio de unión a MEF-2 ubicado a -133 pb dentro del promotor del gen *hCASQ2* previene la transactivación de la construcción corta del gen *hCASQ2*. Estos resultados sugieren que, en efecto, NFAT regula la expresión del gen *hCASQ2*, pero sin unirse directamente al promotor del gen *hCASQ2*. La interacción de NFAT con algún factor de transcripción unido al promotor del gen *hCASQ2* explicaría como es que NFAT regula la expresión de *CASQ2* sin unirse directamente al DNA.

Se sabe que la interacción entre MEF-2 y NFAT es importante para la expresión de los genes Nur77 y β -MHC [59, 65]. Los resultados presentados sugieren que una

interacción entre MEF-2 y NFAT es importante para regular la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata. Por lo tanto, se evaluó si MEF-2 y NFAT están presentes en la región proximal del promotor del gen *CASQ2* de rata. Para ello se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos contra MEF-2 y NFAT. Los resultados de los experimentos de ChIP mostraron un enriquecimiento tanto de MEF-2 como de NFAT en la región ubicada entre -259 a -21 pb del promotor del gen de *Casq2* de rata (**Figura 6.14**).

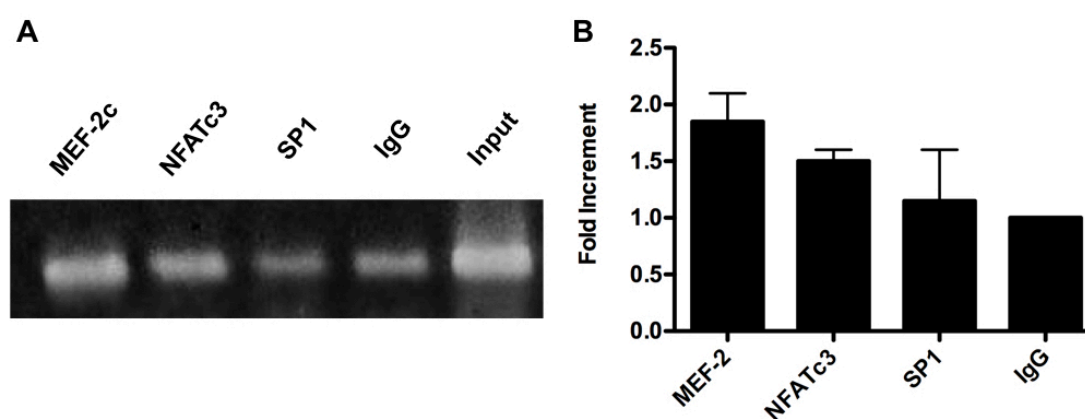


Figura 6.14. Los factores de transcripción MEF-2 y NFAT se unen al promotor del gen CASQ2 de rata. A) Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) del promotor del gen *Casq2* de rata. La cromatina fragmentada fue incubada con anticuerpos contra MEF-2c, NFAT, Sp1 e IgG. Se realizó PCR para amplificar la región entre -259 a -21 pb del promotor del gen *Casq2*. Se muestra una foto de un gel representativo. B) Análisis densitométrico de experimentos representativos ($n=2$) realizado con el software Image-Studio Lite 5.2.5 (LI-COR).

Los experimentos de ChIP nos permiten demostrar que ambos factores de transcripción se encuentran dentro del promotor del gen *Casq2* de rata. Sin embargo, una limitante de esta técnica es que no permite determinar si ambos factores están presentes al mismo tiempo dentro de un promotor. Asimismo, los experimentos de ChIP tampoco permiten demostrar que dos factores de transcripción estén interactuando físicamente entre ellos.

Para demostrar una interacción directa entre MEF-2 y NFAT, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación de proteínas. Los resultados mostraron que MEF-2c y NFATc3 interactúan entre sí (**Figura 6.15**). Nuestros resultados demuestran que NFAT interactúa, físicamente, con el MEF-2 unido a su respectivo sitio de unión (ubicado a-133 pb) dentro del promotor del gen *hCASQ2*. De esta manera se sugiere que NFAT coopera con MEF-2 y activa la transcripción del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata.

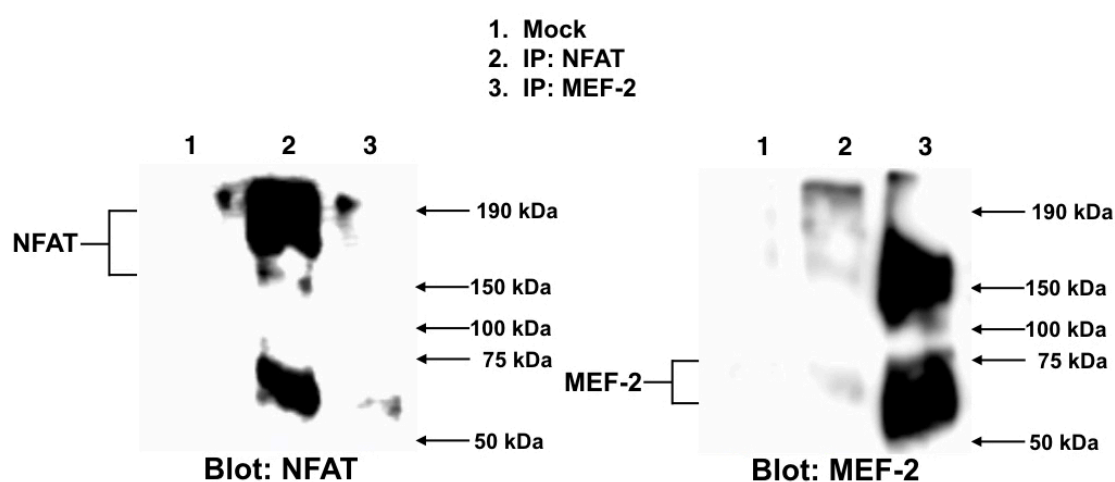


Figura 6.15. Los factores de transcripción MEF-2 y NFAT interactúan entre sí dentro del promotor del gen *CASQ2*. Extractos de proteína total fueron inmunoprecipitados (IP) con anticuerpos contra MEF-2c ó NFAT. Se realizó análisis por western-blot de las proteínas inmunoprecipitadas usando anticuerpos contra MEF-2 o NFAT según se indica. La identidad de las proteínas inmunoprecipitadas es la siguiente: carril 1, Mock (perlas de unión a anticuerpo de Proteína A sefarosa); carril 2, IP contra NFAT; carril 3, IP contra MEF-2.

En resumen, demostramos que la inhibición de la activación de NFAT (con CsA o INCA-6) disminuye la transcripción del gen *hCASQ2* y que la sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3 induce la actividad transcripcional de las construcciones del promotor del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata. Analizados conjuntamente, nuestros resultados demuestran que el mecanismo responsable de

estos efectos se explica por la interacción directa entre MEF-2 y NFAT unidos al promotor del gen *hCASQ2* (Figura 6.16).

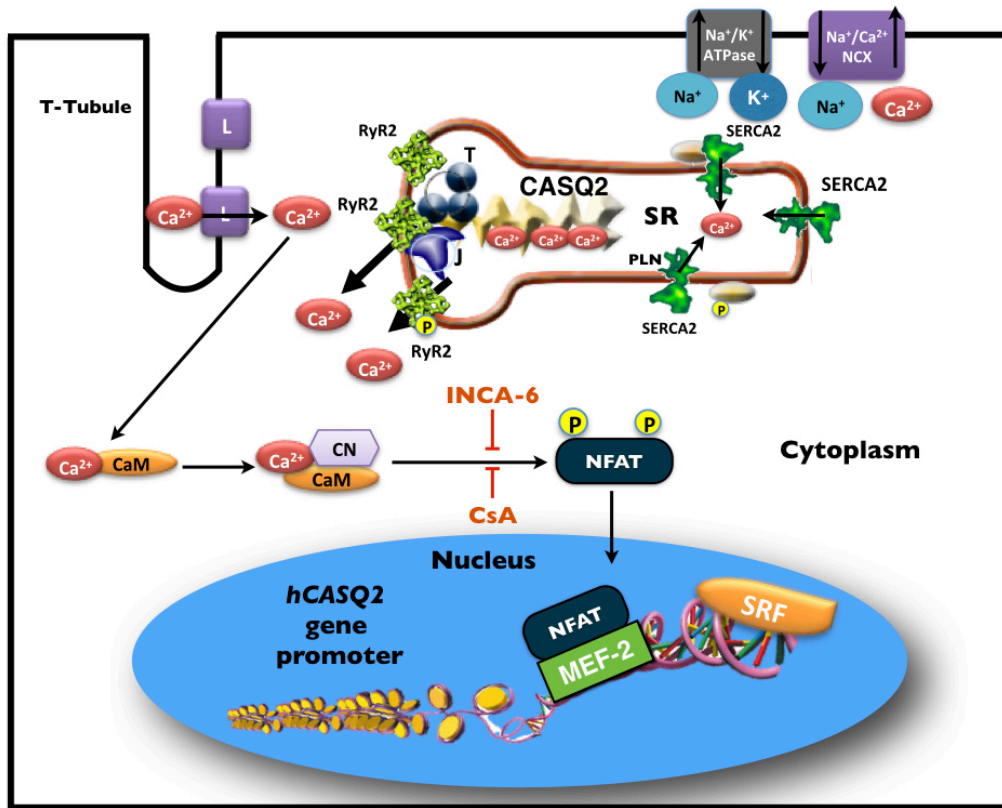


Figura 6.16. Mecanismo de regulación transcripcional propuesto para el gen *hCASQ2* en cardiomiocitos. CASQ2 es la principal proteína de unión a Ca^{2+} dentro del SR. En asociación con las proteínas Triadina (T) y Juntina (J), CASQ2 regula la actividad del canal de liberación de Ca^{2+} (RyR2). El factor de transcripción NFAT interactúa con MEF-2 unido a su sitio de unión a -133 pb dentro del promotor del gen *hCASQ2*. De esta forma NFAT coopera con MEF-2 en la activación transcripcional del gen *hCASQ2*. La inhibición de la activación de NFAT con CsA o con INCA-6 bloquea la activación de NFAT y disminuye la transcripción del gen *hCASQ2*. Abreviaturas: CaM, calmodulina; CN, calcineurina; L, canal de liberación de Ca^{2+} tipo-L; MEF-2, Myocyte Enhancer Factor; NCX, intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; NFAT, factor nuclear de células-T activadas; PLN, fosfolamban; SRF, factor de respuesta al suero; SR, retículo sarcoplásmico.

7. DISCUSIÓN.

En los cardiomiocitos, CASQ2 es la proteína de unión a Ca^{2+} más abundante dentro de las cisternas terminales del SR [14]. La proteína CASQ2 tiene tres funciones fundamentales, primera, gracias a su alta capacidad de unir Ca^{2+} , aumenta el contenido total de Ca^{2+} dentro del SR. Segunda, amortigua las concentraciones de Ca^{2+} libre dentro del lumen del SR a 1 mM. Finalmente, gracias a su localización estratégica dentro del SR, canaliza el Ca^{2+} dentro del poro de canal RyR2 [40]. Durante algún tiempo se pensó que estas eran las únicas funciones de CASQ2. Posteriormente se descubrió que la función de CASQ2 era mucho más compleja [14]. Durante el acoplamiento de excitación-contracción cardíaca, el influjo de Ca^{2+} a través del canal RyR2 eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} hasta 1 μM . Lo cual desencadena la contracción cardíaca [9]. Sin embargo, la liberación de Ca^{2+} debe realizarse únicamente cuando es necesaria para la función del cardiomiocito. Como mencionamos previamente, CASQ2 juega un papel fundamental en la regulación de la liberación de Ca^{2+} por parte del SR. El complejo formado por CASQ2-TRD-JNC ayuda a mantener el periodo refractario que asegura que no se libere más Ca^{2+} del SR durante la diástole cardíaca [41]. La evidencia experimental demuestra que cuando la concentración luminal de Ca^{2+} dentro del SR se incrementa, también aumenta la probabilidad de apertura espontánea del RyR2, con la consecuente liberación prematura de Ca^{2+} . En modelos experimentales se reporta que la reducción en el contenido de CASQ2 en el SR reduce el umbral de concentración de Ca^{2+} al cual se produce la liberación espontánea de Ca^{2+} [72]. Por tanto, CASQ2 funciona como un “freno” molecular que previene la liberación espontánea de Ca^{2+} cuando el retículo está completamente cargado de Ca^{2+} durante la diástole. Por otro lado, durante la liberación de Ca^{2+} por parte del SR, la concentración de Ca^{2+} se reduce

significativamente. En estas condiciones el complejo formado por CASQ2-TRD-JNC inhibe al canal de liberación de Ca^{2+} (RyR2). De esta forma se evita que el SR se vacíe completamente de Ca^{2+} durante los ciclos de contracción cardíacos [37, 41].

Lo expuesto anteriormente demuestra el papel fundamental de CASQ2 en la fisiología del cardiomiocito. Consistentemente, se ha encontrado que mutaciones puntuales de CASQ2 producen una forma autosómica recesiva de taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT). En esta condición se desarrollan arritmias ventriculares en condiciones de estrés o de sobre-estimulación adrenérgica [41]. Las mutaciones descritas insertan codones de parada prematuros o producen formas no funcionales de la proteína [50, 73, 74]. Por lo tanto, la funcionalidad de CASQ2 se ve comprometida. Durante el reposo, la liberación espontánea de Ca^{2+} por parte del SR no se ve afectada. Sin embargo, en condiciones de estrés, la carga de Ca^{2+} del SR se incrementa. En estas condiciones la reducida cantidad de CASQ2 funcional se asocia con un aumento en la liberación prematura de Ca^{2+} . Esto produce la formación de despolarizaciones tardías que desencadenan arritmias cardíacas [41, 74]. Se sabe que del 55-60% de los casos reportados de CPVT se deben a mutaciones de la proteína CASQ2 o del canal RyR2. En los casos restantes aún no se ha encontrado una causa definida [75]. Por tanto, es factible que mutaciones en la región reguladora del gen *hCASQ2* reduzcan la expresión de la proteína de CASQ2, produciendo el fenotipo CPVT. Es por eso por lo que se requiere un mejor entendimiento de la expresión del gen *hCASQ2*.

En la CPVT, el fenotipo se produce por una disminución en la expresión de proteína funcional de CASQ2. También se ha reportado alteraciones en la función del cardiomiocito en la situación opuesta. En un estudio, se generaron ratones transgénicos que sobre-expresaban CASQ2 específicamente en corazón [49]. En este

modelo se encontró que la sobreexpresión de CASQ2 estaba asociada con el desarrollo de hipertrofia cardíaca y la inducción de un programa de expresión genética fetal. En estos ratones se encontraron alteraciones en parámetros funcionales (reducción de la fracción de acortamiento de 46%, reducción en la frecuencia de acortamiento de 60%, reducción en la frecuencia de re-alargamiento en un 60%) que producían un deterioro de la función contráctil [49]. La sobreexpresión de CASQ2 también provocó alteraciones importantes en la homeostasis del Ca^{2+} , como una depresión de un 45% en la amplitud de la corriente de Ca^{2+} y una potenciación en la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína. Esto indica un aumento en el contenido total de Ca^{2+} en el SR [76]. De la misma forma, la sobreexpresión de CASQ2 provocó cambios en la expresión de proteínas importantes para la homeóstasis del Ca^{2+} en el cardiomicito (aumento en la expresión de SERCA2a, PLB y calreticulina) [49]. En otro modelo, se generaron ratones transgénicos utilizando el promotor de la cadena pesada de α -miosina fusionado al gen de CASQ2 canina para sobre-expresar la proteína de CASQ2 [76]. En estas condiciones, los ratones desarrollaban hipertrofia cardíaca concéntrica a las 6-9 semanas de edad, que progresaba a cardiomiopatía dilatada alrededor de las 13 semanas. Finalmente, los ratones morían a las 16 semanas de insuficiencia cardíaca [76-79]. En otro estudio se encontró que la sobreexpresión de CASQ2 producía cardiomiopatía dilatada con una expresión reducida de SERCA2a. En estas condiciones también aumentó la expresión de marcadores de remodelado cardíaco como CARP (cardiac ankyrin repeated protein), glutatión peroxidasa, Dcn (decorina), TSC-36 (TGF- β 1 stimulated clone-36 protein), Magp2 (microfibril-associated glycoprotein-2) y Osf2 (osteoblast-specific factor-2) [80]. Esos hallazgos sugieren que la sobreexpresión de CASQ2 aumenta el contenido de

Ca²⁺ dentro del SR, pero reduce la cantidad de Ca²⁺ liberado por parte del SR, lo anterior provoca una depresión de la función contráctil [49, 76].

A pesar de la importancia de la proteína CASQ2 en la función cardíaca, la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* esta muy poco descrita [33, 42] Los primeros estudios que abordaron la expresión del gen CASQ2 datan de hace más de dos décadas [81, 82]. Se determinó que la isoforma esquelética, o CASQ1 era la mayor forma expresada en músculo esquelético de contracción rápida y lenta. Mientras que la isoforma cardíaca o CASQ2 era expresada primordialmente en cardiomiocitos [81-83]. Los estudios tempranos determinaron que el mRNA de CASQ2 se encontraba exclusivamente en atrios, ventrículos y a una menor proporción en músculo esquelético de contracción lenta (sóleo). Mientras que el mRNA de CASQ2 era indetectable en músculo esquelético de contracción rápida (plantar), en músculo liso y en tejidos no musculares [35]. También se determinó que al inicio de la diferenciación muscular se expresa CASQ2 en músculo esquelético. Posteriormente hay un cambio de isotipo y CASQ1 es la que predomina en el músculo esquelético adulto [35].

Uno de los primeros análisis de la expresión del gen *CASQ2* se realizó con el gen de ratón. Específicamente hablando de la estructura del gen, se encontró que estaba compuesto de 11 exones y 10 intrones, cada uno con un tamaño aproximado de 46 a 234 pb. La región 5' no traducida del gen de ratón contiene muchos sitios de unión a factores de transcripción específicos de células musculares, como MEF-2, MBF-1 y muchas E-Box [33].

Solamente existe un estudio que aborda la regulación del gen humano *CASQ2*. En este estudio se encontró que la región promotora proximal del gen *hCASQ2* se encuentra altamente conservada entre las diferentes especies analizadas. Dentro de esta región se encuentran sitios de unión a los factores de transcripción MEF-2 y SRF.

Utilizando ensayos funcionales y mutagénesis de sitio-dirigida se encontró que los sitios de unión a MEF-2 y SRF eran funcionales tanto en cardiomiocitos como en líneas celulares de músculo esquelético. La conclusión de este estudio fue que la región promotora proximal era necesaria y suficiente para dirigir la expresión del gen *hCASQ2* de forma tejido-específica [42].

Los factores de transcripción MEF-2 y SRF pertenecen a la familia MADS-box (MCM1, *Agamous*, *Deficiens*, SRF). Esos factores de transcripción también regulan la expresión de muchos genes específicos de músculo esquelético como α -MHC, MCK, miogenina, MyoD, MLCv2 y α -actina de músculo esquelético [54]

Como mencionamos previamente, en el cardiomiocito, existen dos vías de señalización controladas por Ca^{2+} : la vía de Ca^{2+} /calmodulina-CaMKII-HDAC-MEF-2 y la vía Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina-NFAT [7]. Estas vías de señalización tienen un papel importante en la regulación de la expresión genética controlada por MEF-2 y SRF [53, 84].

Debido a que MEF-2 puede interactuar directamente con el NFAT, el principal efector de la vía de Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina-NFAT, decidimos profundizar en el papel de esa vía en la regulación de la expresión del gen *hCASQ2* [59, 65]. Los factores de transcripción NFAT están relacionados a la familia de factores de transcripción Rel-NFkB. Las isoformas de NFAT1-4 son expresadas en cardiomiocitos y su actividad puede ser regulada por la acción de la fosfatasa calcineurina, una enzima dependiente de Ca^{2+} /calmodulina para su activación [63]. Cuando los factores de transcripción NFAT se encuentran fosforilados se localizan en el citoplasma. Cuando la concentración citosólica de Ca^{2+} se incrementa en respuesta a un estímulo, Ca^{2+} /calmodulina forma un complejo con calcineurina. Esto produce la activación de calcineurina y la desfosforilación de NFAT. Una vez desfosforilado,

NFAT se transloca al núcleo celular donde activa la expresión de sus genes blanco [55, 70]. Dependiendo de las proteínas con las cuales interactúe NFAT, la actividad de este factor puede inducir o activar la transcripción de sus genes blanco [70]. El principal compañero de NFAT dentro del núcleo celular, es el factor de transcripción AP-1 [85]. La interacción de NFAT y AP-1 es importante para regular la expresión de muchos genes de citocinas importantes para la actividad del sistema inmune [86]. Específicamente hablando de los cardiomiocitos, uno de los principales compañeros de unión a NFAT es el factor de transcripción GATA. La interacción de NFAT3 con el factor GATA4 es importante para el desarrollo del cardiomiocito y la hipertrofia cardíaca [66].

La inhibición de la vía calcineurina/NFAT con CsA en células H9c2 que sobre-expresan Egr-1, disminuyó la expresión de CASQ2 de rata. Posteriormente se determinó que esta reducción en la expresión de CASQ2 era provocada por la unión de Egr-1 al promotor del gen *CASQ2* de rata [43]. Como se mencionó previamente, únicamente los primeros 288 pb del promotor del gen *hCASQ2* tienen homología de secuencia entre la rata y el humano [42]. Debido a que esta región del promotor del gen *hCASQ2* carece de un sitio de unión a Egr-1, se buscó un mecanismo independiente de Egr-1. Nuestros resultados mostraron que la inhibición del factor de transcripción NFAT redujo la transcripción de mRNA de CASQ2 en cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata. De la misma forma, la inhibición de la activación de NFAT también disminuyó la actividad transcripcional de las construcciones quiméricas del promotor del gen *hCASQ2*. El análisis *in silico* del promotor del gen *hCASQ2* reveló un sitio potencial de unión a NFAT en la posición de -230 pb. Sin embargo, ni los resultados de los ensayos de EMSA ni la mutagénesis de sitio dirigido demostraron de forma directa la funcionalidad de este sitio.

Previamente, en células Jurkat, se demostró que NFAT y MEF-2 regulan la expresión de la proteína pro-apoptótica Nur77, interactuando físicamente entre ellos [65]. En otros estudios también se encontró que MEF-2 y NFAT cooperan entre sí para regular la expresión del gen IL-2 en linfocitos T [87].

Debido a que MEF-2 y NFAT interactúan entre sí, se propuso la hipótesis de que NFAT interactúa físicamente con la proteína de MEF-2 unida a su sitio de unión ubicado a -133 pb dentro del promotor del gen *hCASQ2*. Nuestros ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) mostraron un enriquecimiento de MEF-2 y NFAT en la zona de -259 a -21 pb del promotor del gen *hCASQ2*. Adicionalmente, los resultados de los experimentos de co-inmunoprecipitación de proteínas también demostraron una interacción directa entre los factores de transcripción MEF-2 y NFAT en cardiomiocitos de rata neonata. Por lo tanto, los resultados demuestran que, efectivamente, MEF-2 está directamente unido a su sitio dentro del promotor del gen *hCASQ2* (-133 pb) y que NFAT esta interactuando directamente con MEF-2. Lo anterior explica porque la inhibición de la vía de calcineurina/NFAT disminuyó la cantidad de mRNA endógeno de CASQ2 y la actividad transcripcional de las construcciones quiméricas del gen *hCASQ2*. Por tanto, los resultados demuestran que la vía de calcineurina/NFAT regula la transcripción del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata. Entonces, como en el caso de la β -MHC en musculo esquelético o del gen Nur77 en células-T, la interacción entre MEF-2 y NFAT es importante para la regulación de la expresión de CASQ2 en cardiomiocitos [59, 65].

Durante la hipertrofia cardíaca se altera el patrón de expresión génica de los cardiomiocitos, aumentando la expresión de genes fetales y de genes inmediatos tempranos. Asimismo, se produce un aumento en la actividad de los factores de transcripción MEF-2, NFAT, SRF, GATA4, Nkx2-5, entre otros. En concordancia

con lo anterior, se ha propuesto que la interacción entre MEF-2 y NFAT en cardiomiocitos promueve la expresión de genes asociados con la dilatación de las cámaras cardíacas [88]. Así también, se sabe que MEF-2 y NFAT están involucrados en la expresión de marcadores de insuficiencia cardíaca como ANP y BNP, respectivamente [89, 90]. Aunque la cantidad total de CASQ2 no parece cambiar ni en la hipertrofia ni en la insuficiencia cardíaca, se han observado alteraciones en la modificación postraduccional (glicosilación y fosforilación) de la proteína de CASQ2 en un modelo de insuficiencia cardíaca [46, 91-94]. Los cambios postraduccionales en la proteína de CASQ2 pueden alterar el transporte normal de la proteína de CASQ2 hacia el SR y tener un impacto en la homeostasis del Ca^{2+} en los cardiomiocitos [94]. Además de la vía de calcineurina/NFAT, otros mecanismos cooperan para regular la expresión de CASQ2 en cardiomiocitos. Por ejemplo, se sabe que el estrés oxidativo puede tener un efecto en la expresión del gen CASQ2. Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata, tratados con FCCP (carbonil-cianida-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona, mostraron un nivel reducido de mRNA de CASQ2. Dicha disminución puede ser prevenida tratando las células con el agente antioxidante N-acetil-cisteína [45].

Por otro lado, ratones tratados *in utero* con dietilestilbestrol mostraron un aumento de las proteínas del SR involucradas con la homeostasis de Ca^{2+} , como SERCA2a, NCX1 y CASQ2. Este aumento en la expresión de CASQ2 estuvo asociado con una incrementada metilación del promotor del gen de CASQ2 [95]. Adicionalmente, el tratamiento de las células con el inhibidor de la metilación del DNA, 5-azadeoxicitidina, disminuyó la expresión del gen CASQ2 [43]. Esos resultados sugieren que mecanismos epigenéticos pueden tener un papel en la regulación de la

expresión del gen *CASQ2*. Sin embargo, el mecanismo responsable de este efecto debe ser investigado con mayor detalle [43, 95].

8. CONCLUSIONES.

- Cultivos primarios de cardiomiocitos de rata neonata se trataron con los inhibidores de la vía Ca^{2+} -CaM-calcineurina/NFAT CsA o INCA-6. Este tratamiento disminuyó los niveles de mRNA endógeno de CASQ2. Así mismo también se observó una reducción en los niveles de proteína de CASQ2.
- Se realizaron ensayos funcionales en cardiomiocitos de rata neonata utilizando dos construcciones quiméricas del promotor del gen *hCASQ2* (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp y pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp). La inhibición de la vía de Ca^{2+} -CaM-calcineurina/NFAT utilizando CsA o INCA disminuyó la actividad transcripcional de las construcciones del gen *hCASQ2*.
- La sobreexpresión de NFATc1 y de NFATc3 aumentó la actividad transcripcional de las dos construcciones quiméricas del gen *hCASQ2*.
- Ambas construcciones del promotor tenían una respuesta similar a la inhibición de la vía Ca^{2+} -CaM-calcineurina/NFAT y a la sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3. Por tanto, se concluyó que elemento de respuesta a NFAT se encontraba dentro de la construcción corta del promotor del gen *hCASQ2*.
- Los ensayos de retardamiento de movilidad electroforética demostraron que el sitio de unión NFAT ubicado a -230 pb fue incapaz de reclutar a NFAT en las condiciones utilizadas.
- Los experimentos de mutagénesis de sitio-dirigida demostraron que la transactivación del promotor de *hCASQ2* inducida por la sobreexpresión de NFAT se debía a una interacción de NFAT con el MEF-2 unido a su respectivo sitio de unión a -133 pb.

- Los experimentos de ChIP demostraron que existe un enriquecimiento de MEF-2 y NFAT en la región proximal del promotor del gen *CASQ2*.
- Los experimentos de coimmunoprecipitación de proteínas demostraron que las proteínas de MEF-2 y NFAT interactúan físicamente entre ellas en las condiciones analizadas.

En conclusión, en este trabajo demostramos que la inhibición de la actividad de la vía Ca^{2+} -CaM-calcineurina/NFAT (con CsA o INCA-6) disminuyó la transcripción del gen *CASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata. También demostramos que la sobreexpresión de NFATc1 y NFATc3 en cardiomiocitos de rata neonata aumentó la actividad transcripcional del promotor del gen *hCASQ2*. El mecanismo responsable de este efecto es una interacción directa entre MEF-2 y NFAT dentro del promotor del gen *hCASQ2*.

9. PERSPECTIVAS.

Los estudios que abordan la regulación del gen *hCASQ2* se han concentrado en el estudio de las regiones proximales del promotor [33, 42]. Los resultados previos demostraron que la región proximal es necesaria y suficiente para controlar la expresión del gen *hCASQ2* en cardiomiocitos de rata neonata y en líneas celulares de músculo esquelético[42]. Como mencionamos previamente, el gen *hCASQ2* también se expresa en músculo esquelético de contracción lenta (sóleo). Sin embargo, en músculo esquelético se conoce poco sobre como se regula la expresión de este gen, por lo cual se requieren estudios adicionales que aborden este tema.

En estudios previos se demostró que los elementos distales del promotor del gen *hCASQ2* aumentan significativamente la expresión de *hCASQ2* en cardiomiocitos. Mientras que, en músculo esquelético, parece que no tienen funcionalidad o inhiben la expresión del gen [73]. Dentro de esta región existen elementos de unión a factores de transcripción que necesitan ser caracterizados para tener un entendimiento completo de la regulación de la expresión de *hCASQ2*.

Se sabe que las vías de Ca^{2+} -CaM-calcineurina/NFAT y de Ca^{2+} /calmodulina-CaMKII-HDAC-MEF-2 son activas en cardiomiocitos [7]. Estas vías se encuentran sobre-activadas en condiciones de hipertrofia cardíaca [56, 66]. Sin embargo, en los estudios que se han realizado no se han encontrado cambios significativos en la expresión de *CASQ2* en condiciones de hipertrofia [46]. Por tanto, debe existir otros mecanismos de regulación de la expresión de *hCASQ2* que mantienen su expresión estable en estas condiciones.

Estudios recientes han demostrado que la hipermetilación del promotor de *CASQ2* aumenta la expresión de *CASQ2* y que la inhibición de la metilación reduce la

expresión de CASQ2 [43, 95]. Por tanto, es probable que mecanismos epigenéticos sean importantes en el control de la expresión de CASQ2.

10. REFERENCIAS.

- [1] A.E. Rossi, R.T. Dirksen, Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle, *Muscle & nerve* 33(6) (2006) 715-31.
- [2] D. Rossi, V. Barone, E. Giacomello, V. Cusimano, V. Sorrentino, The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains, *Traffic* 9(7) (2008) 1044-9.
- [3] W.B. Van Winkle, M.L. Entman, Comparative aspects of cardiac and skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Life sciences* 25(14) (1979) 1189-200.
- [4] M.D. Bootman, I. Smyrniak, R. Thul, S. Coombes, H.L. Roderick, Atrial cardiomyocyte calcium signalling, *Biochimica et biophysica acta* 1813(5) (2011) 922-34.
- [5] W.F. Ganong, *Review of medical physiology*, 13th ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1987.
- [6] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(7) (2003) 517-29.
- [7] D.M. Bers, Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes, *Annual review of physiology* 70 (2008) 23-49.
- [8] J.A. Birkeland, O.M. Sejersted, T. Taraldsen, I. Sjaastad, EC-coupling in normal and failing hearts, *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ* 39(1-2) (2005) 13-23.
- [9] D.M. Bers, Cardiac excitation-contraction coupling, *Nature* 415(6868) (2002) 198-205.
- [10] D.H. Korzick, Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update, *Advances in physiology education* 27(1-4) (2003) 192-200.
- [11] A. Zarain-Herzberg, Regulation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expression in the hypertrophic and failing heart, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84(5) (2006) 509-21.
- [12] M.C. Schaub, M.A. Hefti, M. Zaugg, Integration of calcium with the signaling network in cardiac myocytes, *Journal of molecular and cellular cardiology* 41(2) (2006) 183-214.
- [13] J.T. Lanner, D.K. Georgiou, A.D. Joshi, S.L. Hamilton, Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release, *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(11) (2010) a003996.
- [14] N.A. Beard, D.R. Laver, A.F. Dulhunty, Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle, *Progress in biophysics and molecular biology* 85(1) (2004) 33-69.
- [15] D.M. Bers, T. Guo, Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1047 (2005) 86-98.
- [16] N. Yamaguchi, L. Xu, D.A. Pasek, K.E. Evans, G. Meissner, Molecular basis of calmodulin binding to cardiac muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor), *The Journal of biological chemistry* 278(26) (2003) 23480-6.
- [17] X.H. Wehrens, S.E. Lehnart, A.R. Marks, Intracellular calcium release and cardiac disease, *Annual review of physiology* 67 (2005) 69-98.
- [18] X.H. Wehrens, S.E. Lehnart, S. Reiken, J.A. Vest, A. Wronska, A.R. Marks, Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(3) (2006) 511-8.

- [19] S.E. Lehnart, X.H. Wehrens, S. Reiken, S. Warriar, A.E. Belevych, R.D. Harvey, W. Richter, S.L. Jin, M. Conti, A.R. Marks, Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias, *Cell* 123(1) (2005) 25-35.
- [20] X. Ai, J.W. Curran, T.R. Shannon, D.M. Bers, S.M. Pogwizd, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure, *Circulation research* 97(12) (2005) 1314-22.
- [21] D.M. Bers, *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*, 2nd ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, 2001.
- [22] A. Hovnanian, SERCA pumps and human diseases, *Sub-cellular biochemistry* 45 (2007) 337-63.
- [23] C.J. Brandl, S. deLeon, D.R. Martin, D.H. MacLennan, Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle, *The Journal of biological chemistry* 262(8) (1987) 3768-74.
- [24] J. Lytton, A. Zarain-Herzberg, M. Periasamy, D.H. MacLennan, Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, *The Journal of biological chemistry* 264(12) (1989) 7059-65.
- [25] L. Dode, C. De Greef, I. Mountian, M. Attard, M.M. Town, R. Casteels, F. Wuytack, Structure of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3 gene. Promoter analysis and alternative splicing of the SERCA3 pre-mRNA, *The Journal of biological chemistry* 273(22) (1998) 13982-94.
- [26] A.N. Martonosi, S. Pikula, The network of calcium regulation in muscle, *Acta biochimica Polonica* 50(1) (2003) 1-30.
- [27] M. Asahi, H. Nakayama, M. Tada, K. Otsu, Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure, *Trends in cardiovascular medicine* 13(4) (2003) 152-7.
- [28] A. Canitano, M. Papa, F. Boscia, P. Castaldo, S. Sellitti, M. Tagliatela, L. Annunziato, Brain distribution of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger-encoding genes NCX1, NCX2, and NCX3 and their related proteins in the central nervous system, *Annals of the New York Academy of Sciences* 976 (2002) 394-404.
- [29] M. Shigekawa, T. Iwamoto, Cardiac Na⁽⁺⁾-Ca⁽²⁺⁾ exchange: molecular and pharmacological aspects, *Circulation research* 88(9) (2001) 864-76.
- [30] B.D. Quednau, D.A. Nicoll, K.D. Philipson, The sodium/calcium exchanger family-SLC8, *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447(5) (2004) 543-8.
- [31] D.H. MacLennan, P.T. Wong, Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68(6) (1971) 1231-5.
- [32] S. Wang, W.R. Trumble, H. Liao, C.R. Wesson, A.K. Dunker, C.H. Kang, Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, *Nature structural biology* 5(6) (1998) 476-83.
- [33] K.F. Frank, L. Mesnard-Rouiller, G. Chu, K.B. Young, W. Zhao, K. Haghghi, Y. Sato, E.G. Kranias, Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene, *Basic research in cardiology* 96(6) (2001) 636-44.
- [34] D. Lee, M. Michalak, Membrane associated Ca²⁺ buffers in the heart, *BMB reports* 43(3) (2010) 151-7.

- [35] M. Arai, N.R. Alpert, M. Periasamy, Cloning and characterization of the gene encoding rabbit cardiac calsequestrin, *Gene* 109(2) (1991) 275-9.
- [36] N.A. Beard, L. Wei, A.F. Dulhunty, Control of muscle ryanodine receptor calcium release channels by proteins in the sarcoplasmic reticulum lumen, *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 36(3) (2009) 340-5.
- [37] S. Gyorke, S.C. Stevens, D. Terentyev, Cardiac calsequestrin: quest inside the SR, *The Journal of physiology* 587(Pt 13) (2009) 3091-4.
- [38] E.J. Sanchez, K.M. Lewis, B.R. Danna, C. Kang, High-capacity Ca²⁺ binding of human skeletal calsequestrin, *The Journal of biological chemistry* 287(14) (2012) 11592-601.
- [39] S. Gyorke, D. Terentyev, Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease, *Cardiovascular research* 77(2) (2008) 245-55.
- [40] D.H. MacLennan, S.R. Chen, Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes, *The Journal of physiology* 587(Pt 13) (2009) 3113-5.
- [41] N. Chopra, B.C. Knollmann, Cardiac calsequestrin: the new kid on the block in arrhythmias, *Journal of cardiovascular electrophysiology* 20(10) (2009) 1179-85.
- [42] J.L. Reyes-Juarez, R. Juarez-Rubi, G. Rodriguez, A. Zarain-Herzberg, Transcriptional analysis of the human cardiac calsequestrin gene in cardiac and skeletal myocytes, *The Journal of biological chemistry* 282(49) (2007) 35554-63.
- [43] A. Kasneci, N.M. Kemeny-Suss, S.V. Komarova, L.E. Chalifour, Egr-1 negatively regulates calsequestrin expression and calcium dynamics in ventricular cells, *Cardiovascular research* 81(4) (2009) 695-702.
- [44] M. Arai, K. Otsu, D.H. MacLennan, M. Periasamy, Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development, *The American journal of physiology* 262(3 Pt 1) (1992) C614-20.
- [45] S.L. Hanninen, J.J. Ronkainen, H. Leskinen, P. Tavi, Mitochondrial uncoupling downregulates calsequestrin expression and reduces SR Ca²⁺ stores in cardiomyocytes, *Cardiovascular research* 88(1) (2010) 75-82.
- [46] S.E. Lehnart, W. Schillinger, B. Pieske, J. Prestle, H. Just, G. Hasenfuss, Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure, *Annals of the New York Academy of Sciences* 853 (1998) 220-30.
- [47] M. Arai, K. Tomaru, T. Takizawa, K. Sekiguchi, T. Yokoyama, T. Suzuki, R. Nagai, Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits, *Journal of molecular and cellular cardiology* 30(2) (1998) 243-54.
- [48] M. Kurabayashi, R. Jeyaseelan, L. Kedes, Doxorubicin represses the function of the myogenic helix-loop-helix transcription factor MyoD. Involvement of Id gene induction, *The Journal of biological chemistry* 269(8) (1994) 6031-9.
- [49] Y. Sato, D.G. Ferguson, H. Sako, G.W. Dorn, 2nd, V.J. Kadambi, A. Yatani, B.D. Hoit, R.A. Walsh, E.G. Kranias, Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice, *The Journal of biological chemistry* 273(43) (1998) 28470-7.
- [50] M. Faggioni, B.C. Knollmann, Calsequestrin 2 and arrhythmias, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 302(6) (2012) H1250-60.

- [51] D.H. MacLennan, Ca²⁺ signalling and muscle disease, *European journal of biochemistry* 267(17) (2000) 5291-7.
- [52] J.W. Gordon, C. Pagiatakis, J. Salma, M. Du, J.J. Andreucci, J. Zhao, G. Hou, R.L. Perry, Q. Dan, D. Courtman, M.P. Bendeck, J.C. McDermott, Protein kinase A-regulated assembly of a MEF2{middle dot}HDAC4 repressor complex controls c-Jun expression in vascular smooth muscle cells, *The Journal of biological chemistry* 284(28) (2009) 19027-42.
- [53] T.A. McKinsey, C.L. Zhang, E.N. Olson, MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death, *Trends in biochemical sciences* 27(1) (2002) 40-7.
- [54] B.L. Black, E.N. Olson, Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins, *Annual review of cell and developmental biology* 14 (1998) 167-96.
- [55] P.G. Hogan, L. Chen, J. Nardone, A. Rao, Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT, *Genes & development* 17(18) (2003) 2205-32.
- [56] J.D. Molkentin, Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs, *Cardiovascular research* 63(3) (2004) 467-75.
- [57] H. Akazawa, I. Komuro, Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy, *Circulation research* 92(10) (2003) 1079-88.
- [58] A. Rinne, N. Kapur, J.D. Molkentin, S.M. Pogwizd, D.M. Bers, K. Banach, L.A. Blatter, Isoform- and tissue-specific regulation of the Ca(2+)-sensitive transcription factor NFAT in cardiac myocytes and heart failure, *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 298(6) (2010) H2001-9.
- [59] J.D. Meissner, P.K. Umeda, K.C. Chang, G. Gros, R.J. Scheibe, Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway, *Journal of cellular physiology* 211(1) (2007) 138-48.
- [60] A. Musaro, K.J. McCullagh, F.J. Naya, E.N. Olson, N. Rosenthal, IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1, *Nature* 400(6744) (1999) 581-5.
- [61] H. Wada, K. Hasegawa, T. Morimoto, T. Kakita, T. Yanazume, M. Abe, S. Sasayama, Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription, *The Journal of cell biology* 156(6) (2002) 983-91.
- [62] P.A. Doevendans, M. van Bilsen, Transcription factors and the cardiac gene programme, *The international journal of biochemistry & cell biology* 28(4) (1996) 387-403.
- [63] R.A. Schulz, K.E. Yutzey, Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development, *Developmental biology* 266(1) (2004) 1-16.
- [64] F. Blaeser, N. Ho, R. Prywes, T.A. Chatila, Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors, *The Journal of biological chemistry* 275(1) (2000) 197-209.
- [65] H.D. Youn, T.A. Chatila, J.O. Liu, Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis, *The EMBO journal* 19(16) (2000) 4323-31.
- [66] J.D. Molkentin, J.R. Lu, C.L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, E.N. Olson, A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy, *Cell* 93(2) (1998) 215-28.

- [67] L.V. Gonzalez Bosc, J.J. Layne, M.T. Nelson, D.C. Hill-Eubanks, Nuclear factor of activated T cells and serum response factor cooperatively regulate the activity of an alpha-actin intronic enhancer, *The Journal of biological chemistry* 280(28) (2005) 26113-20.
- [68] W.C. Claycomb, Culture of cardiac muscle cells in serum-free media, *Experimental cell research* 131(1) (1981) 231-6.
- [69] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research* 29(9) (2001) e45.
- [70] S.H. Im, A. Rao, Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺/calcineurin-NFAT-mediated signaling, *Molecules and cells* 18(1) (2004) 1-9.
- [71] M.H. Roehrl, S. Kang, J. Aramburu, G. Wagner, A. Rao, P.G. Hogan, Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(20) (2004) 7554-9.
- [72] B.C. Knollmann, New roles of calsequestrin and triadin in cardiac muscle, *The Journal of physiology* 587(Pt 13) (2009) 3081-7.
- [73] L. Song, R. Alcalai, M. Arad, C.M. Wolf, O. Toka, D.A. Conner, C.I. Berul, M. Eldar, C.E. Seidman, J.G. Seidman, Calsequestrin 2 (CASQ2) mutations increase expression of calreticulin and ryanodine receptors, causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *The Journal of clinical investigation* 117(7) (2007) 1814-23.
- [74] D. Terentyev, Z. Kubalova, G. Valle, A. Nori, S. Vedamoorthyrao, R. Terentyeva, S. Viatchenko-Karpinski, D.M. Bers, S.C. Williams, P. Volpe, S. Gyorke, Modulation of SR Ca release by luminal Ca and calsequestrin in cardiac myocytes: effects of CASQ2 mutations linked to sudden cardiac death, *Biophysical journal* 95(4) (2008) 2037-48.
- [75] C. Napolitano, S.G. Priori, Diagnosis and treatment of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, *Heart rhythm* 4(5) (2007) 675-8.
- [76] L.R. Jones, Y.J. Suzuki, W. Wang, Y.M. Kobayashi, V. Ramesh, C. Franzini-Armstrong, L. Cleemann, M. Morad, Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin, *The Journal of clinical investigation* 101(7) (1998) 1385-93.
- [77] M.C. Cho, A. Rapacciuolo, W.J. Koch, Y. Kobayashi, L.R. Jones, H.A. Rockman, Defective beta-adrenergic receptor signaling precedes the development of dilated cardiomyopathy in transgenic mice with calsequestrin overexpression, *The Journal of biological chemistry* 274(32) (1999) 22251-6.
- [78] B.C. Knollmann, B.E. Knollmann-Ritschel, N.J. Weissman, L.R. Jones, M. Morad, Remodelling of ionic currents in hypertrophied and failing hearts of transgenic mice overexpressing calsequestrin, *The Journal of physiology* 525 Pt 2 (2000) 483-98.
- [79] V.B. Harding, L.R. Jones, R.J. Lefkowitz, W.J. Koch, H.A. Rockman, Cardiac beta ARK1 inhibition prolongs survival and augments beta blocker therapy in a mouse model of severe heart failure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10) (2001) 5809-14.
- [80] Y. Ihara, Y.J. Suzuki, K. Kitta, L.R. Jones, T. Ikeda, Modulation of gene expression in transgenic mouse hearts overexpressing calsequestrin, *Cell calcium* 32(1) (2002) 21-9.

- [81] B.T. Scott, H.K. Simmerman, J.H. Collins, B. Nadal-Ginard, L.R. Jones, Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning, *The Journal of biological chemistry* 263(18) (1988) 8958-64.
- [82] L. Fliegel, M. Ohnishi, M.R. Carpenter, V.K. Khanna, R.A. Reithmeier, D.H. MacLennan, Amino acid sequence of rabbit fast-twitch skeletal muscle calsequestrin deduced from cDNA and peptide sequencing, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84(5) (1987) 1167-71.
- [83] L. Fliegel, E. Leberer, N.M. Green, D.H. MacLennan, The fast-twitch muscle calsequestrin isoform predominates in rabbit slow-twitch soleus muscle, *FEBS letters* 242(2) (1989) 297-300.
- [84] F.J. Davis, M. Gupta, B. Camoretti-Mercado, R.J. Schwartz, M.P. Gupta, Calcium/calmodulin-dependent protein kinase activates serum response factor transcription activity by its dissociation from histone deacetylase, HDAC4. Implications in cardiac muscle gene regulation during hypertrophy, *The Journal of biological chemistry* 278(22) (2003) 20047-58.
- [85] F. Macian, C. Lopez-Rodriguez, A. Rao, Partners in transcription: NFAT and AP-1, *Oncogene* 20(19) (2001) 2476-89.
- [86] F. Macian, C. Garcia-Rodriguez, A. Rao, Gene expression elicited by NFAT in the presence or absence of cooperative recruitment of Fos and Jun, *The EMBO journal* 19(17) (2000) 4783-95.
- [87] F. Pan, Z. Ye, L. Cheng, J.O. Liu, Myocyte enhancer factor 2 mediates calcium-dependent transcription of the interleukin-2 gene in T lymphocytes: a calcium signaling module that is distinct from but collaborates with the nuclear factor of activated T cells (NFAT), *The Journal of biological chemistry* 279(15) (2004) 14477-80.
- [88] R.J. van Oort, E. van Rooij, M. Bourajjaj, J. Schimmel, M.A. Jansen, R. van der Nagel, P.A. Doevendans, M.D. Schneider, C.J. van Echteld, L.J. De Windt, MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure, *Circulation* 114(4) (2006) 298-308.
- [89] K. Kuwahara, K. Nakao, Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones, *Endocrine journal* 57(7) (2010) 555-65.
- [90] K. Kuwahara, T. Nishikimi, K. Nakao, Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program, *Journal of pharmacological sciences* 119(3) (2012) 198-203.
- [91] Z. Kubalova, D. Terentyev, S. Viatchenko-Karpinski, Y. Nishijima, I. Gyorke, R. Terentyeva, D.N. da Cunha, A. Sridhar, D.S. Feldman, R.L. Hamlin, C.A. Carnes, S. Gyorke, Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(39) (2005) 14104-9.
- [92] R.H. Schwinger, G. Munch, B. Bolck, P. Karczewski, E.G. Krause, E. Erdmann, Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation, *Journal of molecular and cellular cardiology* 31(3) (1999) 479-91.
- [93] A.V. Zima, E. Bovo, S.R. Mazurek, J.A. Rochira, W. Li, D. Terentyev, Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure, *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 466(6) (2014) 1129-37.

- [94] A. Kiarash, C.E. Kelly, B.S. Phinney, H.H. Valdivia, J. Abrams, S.E. Cala, Defective glycosylation of calsequestrin in heart failure, *Cardiovascular research* 63(2) (2004) 264-72.
- [95] R. Haddad, A. Kasneci, I.A. Sebag, L.E. Chalifour, Cardiac structure/function, protein expression, and DNA methylation are changed in adult female mice exposed to diethylstilbestrol in utero, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 91(9) (2013) 741-9.

11. APENDICE I: Artículo publicado.

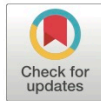
RESEARCH ARTICLE

The cardiac calsequestrin gene transcription is modulated at the promoter by NFAT and MEF-2 transcription factors

Rafael Estrada-Avilés, Gabriela Rodríguez, Angel Zarain-Herzberg*

Department of Biochemistry, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico

* zarain@unam.mx



Abstract

Calsequestrin-2 (CASQ2) is the main Ca^{2+} -binding protein inside the sarcoplasmic reticulum of cardiomyocytes. Previously, we demonstrated that MEF-2 and SRF binding sites within the human *CASQ2* gene (*hCASQ2*) promoter region are functional in neonatal cardiomyocytes. In this work, we investigated if the calcineurin/NFAT pathway regulates *hCASQ2* expression in neonatal cardiomyocytes. The inhibition of NFAT dephosphorylation with CsA or INCA-6, reduced both the luciferase activity of *hCASQ2* promoter constructs (-3102/+176 bp and -288/+176 bp) and the *CASQ2* mRNA levels in neonatal rat cardiomyocytes. Additionally, NFATc1 and NFATc3 over-expressing neonatal cardiomyocytes showed a 2-3-fold increase in luciferase activity of both *hCASQ2* promoter constructs, which was prevented by CsA treatment. Site-directed mutagenesis of the -133 bp MEF-2 binding site prevented trans-activation of *hCASQ2* promoter constructs induced by NFAT overexpression. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assays revealed NFAT and MEF-2 enrichment within the -288 bp to +76 bp of the *hCASQ2* gene promoter. Besides, a direct interaction between NFAT and MEF-2 proteins was demonstrated by protein co-immunoprecipitation experiments. Taken together, these data demonstrate that NFAT interacts with MEF-2 bound to the -133 bp binding site at the *hCASQ2* gene promoter. In conclusion, in this work, we demonstrate that the Ca^{2+} -calcineurin/NFAT pathway modulates the transcription of the *hCASQ2* gene in neonatal cardiomyocytes.

OPEN ACCESS

Citation: Estrada-Avilés R, Rodríguez G, Zarain-Herzberg A (2017) The cardiac calsequestrin gene transcription is modulated at the promoter by NFAT and MEF-2 transcription factors. PLoS ONE 12(9): e0184724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724>

Editor: Derek Laver, Newcastle University, AUSTRALIA

Received: April 17, 2017

Accepted: August 8, 2017

Published: September 8, 2017

Copyright: © 2017 Estrada-Avilés et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grant 164413 to A.Z.-H. and by a Scholarship CONACYT No. 57838 to R.E.-A. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

In cardiomyocytes, the sarcoplasmic reticulum (SR) is the main intracellular Ca^{2+} reservoir. The SR has a main role in the Ca^{2+} homeostasis control of cardiomyocytes [1]. The SR is a complex network of membranous structures constituted by longitudinal tubules interconnected by wide cisterns. Inside the SR there are Ca^{2+} binding proteins that play fundamental roles in the Ca^{2+} homeostasis [2, 3]. The concerted action of the Ca^{2+} -binding protein calsequestrin (CASQ), the Ca^{2+} -release channel (RyR) and the Ca^{2+} -ATPase pump (SERCA) control storage, release, and re-uptake of Ca^{2+} , respectively, regulating contraction and Ca^{2+} homeostasis in skeletal and cardiac muscles [1, 4, 5].

In mammals, there are two calsequestrin isoforms encoded by two different genes. The calsequestrin-1 isoform (CASQ1) is encoded by the *CASQ1* gene (1q21) and is expressed exclusively in fast and slow-twitch skeletal muscles. The calsequestrin-2 (CASQ2) isoform is encoded by the *CASQ2* gene (1p13.3-p11), which is mainly expressed in cardiomyocytes and lesser extent in slow-twitch skeletal muscle [6–8]. The CASQ2 isoform is the main Ca^{2+} binding protein inside the terminal cisternae of SR of the cardiomyocytes [1]. CASQ2 (MW 40 kDa) is a highly acidic protein, mainly in its C-terminal region. Because of this, CASQ2 has a high Ca^{2+} -binding capacity (40–50 mol Ca^{2+} /mol protein) [9]. Inside the SR, CASQ2 acts as Ca^{2+} buffer, maintaining free Ca^{2+} about 1 mM [10, 11]. It is estimated that CASQ2 binds between 50–75% of total Ca^{2+} inside the SR of cardiomyocytes [12]. It has been proposed that CASQ can regulate the SR Ca^{2+} release during excitation-contraction coupling in skeletal and cardiac myocytes [13]. Inside the SR, at physiological Ca^{2+} concentration, CASQ monomers have a thioredoxin-like structure and interact with each other forming a linear polymer. The CASQ polymer forms a structure that creates a kind of matrix. Apertures inside this CASQ matrix form a channel that conducts Ca^{2+} to the RyR Ca^{2+} release channel [14]. CASQ polymer forms a multiprotein complex with the transmembrane proteins triadin (TRD) and junctin (JNC) [15]. In cardiac muscle, during the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release, the SR Ca^{2+} levels decrease by 40–60%. When this happens, the CASQ2-TRD-JNC complex inhibits the RyR2 channel. Therefore, the activity of CASQ2-TRD-JNC-RyR2 complex helps to maintain the SR free Ca^{2+} level at 1 mM despite total SR [Ca^{2+}] changes significantly between contraction cycles [12].

The first 288 bp of the human *CASQ2* gene (*hCASQ2*) promoter are highly conserved among species (100% chimpanzee, 95% mice, 98% rat, 87% chicken compared with the human). This conserved region contains a TATA-box and binding sites for MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor-2) and SRF (Serum Response Factor) transcription factors. We have previously demonstrated that MEF-2 and SRF binding sites within this region are functional in neonatal cardiomyocytes [16]. However, it is unknown if MEF-2 and SRF are the only factors involved in the expression of *hCASQ2* gene. The *hCASQ2* gene expression is poorly understood. Just a few reports concerning the regulation of *hCASQ2* gene expression are found in the literature [6, 8, 16–18].

The calcineurin/NFAT pathway is functional in cardiomyocytes and regulates gene expression mediated by intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) changes [19]. The NFAT (nuclear factor of activated T-cells) transcription factor regulates the expression of muscle specific proteins, such the β -myosin heavy chain (β -MHC), skeletal muscle myosin and smooth muscle myosin heavy chain [20–22]. Acting together or separately, MEF-2 and NFAT regulate the expression of important genes such as β -MHC, Nur77, and BNP [20, 23–28]. It is known that MEF-2 and NFAT can interact with each other and regulate Ca^{2+} -dependent gene expression in T lymphocytes [26]. Besides, it has been reported that an interaction between NFAT and SRF can regulate the expression of the α -actin gene in smooth muscle cells [29].

In this work, we investigated the role of calcineurin/NFAT pathway in the regulation of the *hCASQ2* gene expression. We demonstrated that the inhibition of calcineurin/NFAT pathway reduced the *hCASQ2* gene transcription in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes. Likewise, we demonstrated that NFAT overexpression induced transcription of the *hCASQ2* gene. Our experiments also showed that both MEF-2 and NFAT transcription factors are present in the *CASQ2* gene proximal promoter and they physically interact with each other in neonatal cardiomyocytes.

Materials and methods

Cell culture

Primary cultures of cardiomyocytes were prepared from neonatal rat hearts (1–2 days-old) according to the method previously described [30]. This study has been specifically approved

by the ethics committee Institutional Care and Use Committee (IACUC) of the School of Medicine, National Autonomous University of Mexico. Cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium from Invitrogen, CA, USA) supplemented with 10% bovine fetal serum (Gibco, MA, USA), kanamycin (60 mg/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA), penicillin (10 U/mL) (Gibco, MA, USA), streptomycin (10 mg/mL) (Gibco, MA, USA), amphotericin B (0.025 mg/mL) (Gibco, MA, USA) and nystatin (10 U/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA).

Functional assays

Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were used for transfection experiments. The plasmids containing the promoter region of the *hCASQ2* gene were cloned previously by our group in pGL3-basic (Promega, WI, USA) [16]. Two constructs of the *hCASQ2* gene were used for transfection experiments. The long *hCASQ2* gene promoter construct contains 3102 bp of the *hCASQ2* gene promoter and 176 bp of the 5'-untranslated region of exon one (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp). The short construct contains 288 bp of the promoter region and 176 bp of the 5'-untranslated region (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp) [16]. The expression plasmids for NFATc1 (pCR4-huNFATc1nuc, plasmid #23988) and NFATc3 (pBS-mNFATc3 EE, plasmid #17868) were purchased from Addgene (Cambridge MA, USA). Cultures were transfected with 0.5 µg of *hCASQ2* gene constructs and treated with cyclosporine A (CsA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 12 h or with INCA-6 (NFAT Activation Inhibitor III, catalog number 480403, Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germany) during 16 h. After the treatment had been completed, the luciferase activity was measured using a Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, MA, USA) and the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, WI, USA). Firefly luciferase activity was normalized using *Renilla* luciferase activity or with protein concentration. For NFAT overexpression assays, 0.5 µg of the two pGL3-*hCASQ2*prom/Luc chimeric constructs, 0.025 µg of the *Renilla* luciferase plasmid pRL-CMV, and 0.5 µg of NFATc1 (pCR4-huNFATc1nuc) or NFATc3 (pBS-mNFATc3EE) expression vectors were transiently co-transfected into neonatal rat cardiomyocytes plated in 24-well plates using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, CA, USA). 24 h later, the cells were harvested, and the luciferase activity was determined using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, WI, USA) in a Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, MA, USA). Firefly luciferase activity was normalized using *Renilla* luciferase activity and protein concentration.

Total RNA extraction and qRT-PCR

Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were treated with CsA during 12 h or with INCA-6 during 30 h. Total RNA extraction was made using the TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA). Then 1 µg of total RNA was reversed transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, CA, USA). For real-time qPCR, 4.6 µL of a 1:8 dilution of cDNA and the SYBR GreenER qPCR Supermix (Invitrogen, CA, USA) were used. The final reaction volume was 10 µL. GAPDH mRNA was used as load control. *CASQ2* mRNA levels were analyzed by the method previously described [31]. *CASQ2* and GAPDH primers used for qPCR are listed in S1 Table.

Site-directed mutagenesis

The site-directed mutagenesis of the putative binding sites for MEF-2 at -133 bp, SRF at -103 bp and NFAT at -230 bp was done as follows. Briefly, 200 ng of the short plasmid construct (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp) were subjected to a standard mutagenic PCR reaction with *Pfu* Turbo DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and 125 ng of specific primers. The primers used for site-directed mutagenesis are listed in S1 Table. The

mutagenic PCR reaction parameters were as follows: 95°C for 5 min, 18 cycles (95°C for 50 sec, 75°C for 50 sec, 68°C for 5 min) and 68°C for 7 min. The final reaction volume was 50 μ L. The reaction product was digested with 10 U of methylation-sensitive enzyme *DpnI* at 37°C during 2 h. (New England Biolabs, MA, USA). *E. coli* DH5-*acompetent* cells were transformed with the amplified products. Finally, the plasmids were purified using the PureLink plasmid DNA purification kit (Catalog K2100-04, Invitrogen, CA, USA). The mutated plasmids were used in functional assays.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were used for ChIP experiments. The cross-linking reaction was done using 1% formaldehyde for 15 min. The reaction was stopped with glycine (Sigma-Aldrich, MO, USA) at a final concentration of 0.125 M. Culture medium was removed, and the cells were washed with PBS 1X with PMSF 1 mM. The cells were then lysed with lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 1%, and Sigma Fast Protease Inhibitor Cocktail [Sigma-Aldrich, MO, USA]). The cells were subjected to 5 sonication cycles of 15 sec ON with 90 sec OFF in a Biorruptor Pico (Diagenode, NJ, USA) sonication device. Immunoprecipitation was done with One-Day ChIP Kit (Catalog number C01010081, Diagenode, NJ, USA) following the manufacturer instructions. Sonicated chromatin was incubated with 8 μ g of antibody against MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), NFATc3 (M75X sc8321, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) or Sp1 (PEP-2 sc59x, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) as a negative control. The primers used for PCR reaction are listed in S1 Table. The PCR reaction cycles were as follows: 10 min at 95°C, 40 cycles (30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, 30 sec at 72°C) and 5 min at 72°C. The final reaction volume was 20 μ L.

Western blot analysis

Primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes were lysed with RIPA buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, sodium deoxycholate 1%, Triton X-100 1%, NP-40 1%, EDTA 0.3 mM pH 8.0, PMSF 1 mM, SigmaFast Protease inhibitor Cocktail 1X). Protein concentration was determined by a Bradford-based method using the Bio-Rad protein assay dye reagent (Catalog 500-0006, Bio-Rad CA, USA). The samples absorbance was measured in a Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, MA, USA). Protein lysates (30 μ g) were separated on 12% polyacrylamide gels and transferred to a PVDF membrane (Bio-Rad CA, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk (Bio-Rad CA, USA) dissolved in Tris-buffered saline with 0.1% Tween (TBST 0.1%). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody against NFATc3 (M75X sc8321, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), CASQ2 (EPR4227 ab 108289, Abcam, Cambridge, UK) or β -actin (sc-130300, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Anti-NFAT was diluted to 2 μ g/mL, anti-MEF-2 was diluted to 2 μ g/750 μ L, anti-CASQ2 was diluted to 1:10,000 and anti- β -actin was diluted 1 to 5000. Membranes were incubated with the anti-rabbit secondary antibody (1:5000) (ThermoFisher MA, USA) for 1 h at room temperature. Signals were detected with SuperSignal West Dura reagent (34075, ThermoFisher MA, USA) in a C-Digit Blot Scanner (LI-COR, NE, USA) and analyzed using the Image-Studio Lite 5.2.5 software (LI-COR, NE, USA).

Protein Co-immunoprecipitation assays

Protein extracts of neonatal rat cardiomyocytes were prepared with RIPA buffer. Protein extracts (1 mg) were immunoprecipitated overnight at 4°C with 5 μ g of anti-NFAT (ab 2722, Abcam, Cambridge, UK) or 5 μ g of anti-MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology

Inc., CA, USA) antibodies. Immunoprecipitated proteins were recovered using Protein A Sepharose CL-4B (17-0780-01, GE Health Care, IL, USA). Immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot with anti-MEF-2c (C-21X sc313x, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) antibody.

Sequence analysis

The sequence analysis was made using MacVector 6.5.3 (Accelrys) and BLAST tool (NCBI), and MathInspector (Genomatix).

Statistical analysis

Values are expressed as the mean of three independent experiments \pm SEM (standard error). Data were analyzed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, CA, USA) using ANOVA and multiple comparison tests of Bonferroni or Dunnett. P values < 0.05 were considered as statistical significant.

Results

Inhibition of the calcineurin/NFAT pathway decreases CASQ2 mRNA synthesis in neonatal cardiomyocytes

In order to verify if the inhibition of calcineurin/NFAT pathway reduces the CASQ2 expression in our experimental conditions, we treated neonatal rat cardiomyocytes in culture with CsA during 12 h. The results showed that the inhibition of calcineurin-mediated NFAT activation with CsA decreased the CASQ2 mRNA up to 50% (Fig 1A). Besides NFAT, calcineurin has other molecular targets [32]. Therefore, we used the NFAT activation-inhibitor INCA-6, which specifically inhibits the interaction between calcineurin and NFAT. Thus, INCA-6 inhibits calcineurin/NFAT pathway activation without affecting the other calcineurin targets [33]. The inhibition of calcineurin/NFAT pathway activation with INCA-6 also decreased the CASQ2 endogenous mRNA levels (Fig 1B). However, the inhibition of calcineurin/NFAT pathway, with INCA-6, did not produce a significant reduction in CASQ2 protein levels (Fig 1C and 1D). We presume that the long half-life of CASQ2 did not allow us to see a significant reduction in the protein levels.

Nevertheless, the results of CASQ2 mRNA quantification demonstrate that calcineurin/NFAT pathway might have a role in CASQ2 gene transcription regulation.

Inhibition of NFAT activation reduced transcriptional activity of *hCASQ2* gene constructs

Once we determined that the inhibition of NFAT activation with INCA-6 and CsA decreases CASQ2 mRNA synthesis in neonatal cardiomyocytes, we focused on elucidating the mechanism responsible for this effect. *In silico* DNA sequence analysis revealed seven potential NFAT binding sites in the *hCASQ2* gene promoter (Fig 2A). Therefore, we decided to investigate if the inhibition of CASQ2 mRNA synthesis induced by calcineurin inhibitors INCA-6 and CsA was transcriptionally mediated. For this purpose, we performed functional assays with two chimeric constructs (pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp and pGL3-*hCASQ2*-prom/Luc -288/+176 bp) of the *hCASQ2* gene promoter previously cloned by our group in the pGL3-basic vector [16]. Both constructs were transfected into neonatal rat cardiomyocytes, then the cells were treated with CsA or with INCA-6. In agreement with the CASQ2 mRNA quantification results, both inhibitors (CsA and INCA-6) reduced the transcriptional activity of both pGL3-*hCASQ2*prom/Luc chimeric constructs but had not the same effect on the

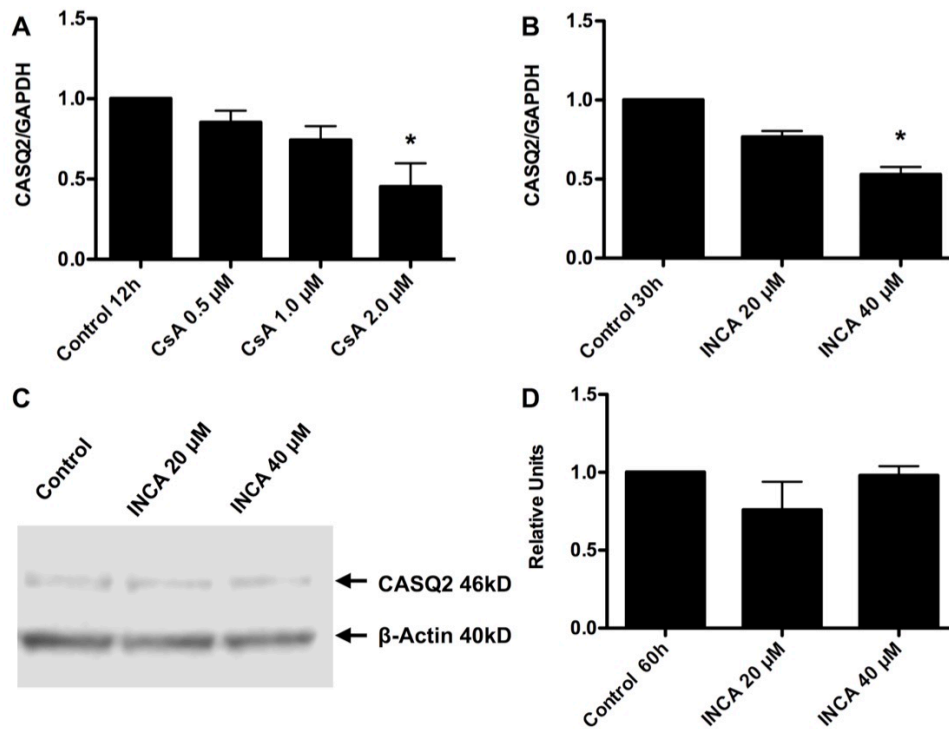


Fig 1. Inhibition of NFAT activity with CsA and INCA-6 decreases CASQ2 mRNA synthesis in neonatal cardiomyocytes. **A)** Neonatal rat cardiomyocytes were treated with DMSO as the vehicle (Control) or CsA for 12 h. The cells were then harvested and CASQ2 mRNA was determined by real-time PCR. GAPDH mRNA was used as normalizing gene. **B)** Neonatal rat cardiomyocytes were treated with vehicle (Control) or INCA-6 for 30 h. The cells were then harvested, and CASQ2 mRNA was determined by real-time PCR. GAPDH mRNA was used as normalizing gene. Results of RT-qPCR data are expressed as the mean of three independent experiments \pm SEM. *p values < 0.05 vs control. **C)** Neonatal rat cardiomyocytes were treated with INCA-6 for 60 h. The cells were then harvested and CASQ2 protein levels were analyzed by Western blot. β -actin protein levels were used for normalization. A picture of a representative gel is shown. **D)** Densitometry analysis of representative experiments ($n = 2$) was made using the ImageStudio Lite 5.2.5 software, LI-COR, NE, USA. (The data showed in the graphs can be found as supporting information in the S1 Dataset file. The complete image of the blot can be found in S1 Fig file).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g001>

pGL3-promoter construct which contains the SV-40 promoter (Fig 2B–2D). Accordingly, the reduction of CASQ2 mRNA synthesis induced by the inhibition of the calcineurin/NFAT pathway is transcriptionally mediated.

Over-expression of NFATc1 and NFATc3 increased transcriptional activity of *hCASQ2* gene constructs

To further characterize the role of NFAT in the transcription of the *hCASQ2* gene, we overexpressed NFATc1 and NFATc3 proteins in neonatal cardiomyocytes and verified the NFAT

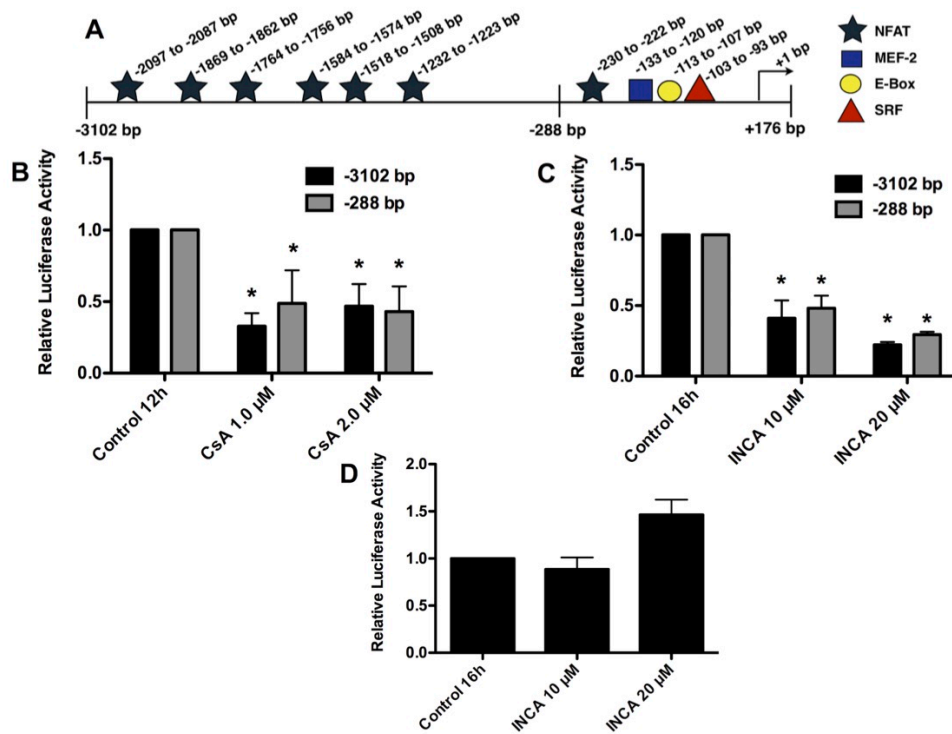


Fig 2. Inhibition of NFAT activity with CsA and INCA-6 reduced the transcriptional activity of the *hCASQ2* promoter constructs. The two *hCASQ2* gene chimeric constructs were transfected into neonatal rat cardiomyocytes cultures. **A)** Diagram of the *hCASQ2* gene promoter constructs. The boundaries of the two *hCASQ2* gene chimeric constructs (-3102/+176 bp and -288/+176 bp) are indicated. As well, the relative locations of potential binding sites for transcription factors found by sequence analysis are shown. **B)** Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes transfected with the pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp construct (black bars) or the pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp construct (gray bars) and treated with vehicle (Control) or with CsA for 12 h. **C)** Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes transfected with the pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp construct (black bars) or the pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp construct (gray bars) and treated with vehicle (Control) or INCA-6 for 16 h. **D)** Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes transfected with the pGL3-promoter construct, containing the SV-40 promoter (Promega) and treated with vehicle or INCA-6 for 16 h. Results are expressed as the mean of three independent experiments +/- SEM. The luciferase activity of the control condition is given the arbitrary value of 1. *p values <0.05 vs control. (The data showed in the graphs can be found as supporting information in the S1 Dataset file).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g002>

overexpression by Western blot (Fig 3A). We evaluated the effect of NFAT overexpression on the transcriptional activity of both *hCASQ2* gene promoter constructs by co-transfecting the long and short pGL3-*hCASQ2*prom/Luc chimeric constructs with the NFATc1 or NFATc3 expression vectors. The results showed that either NFATc1 or NFATc3 overexpression induces the transcriptional activity of both promoter constructs (Fig 3B). Additionally, the CsA treatment together with the overexpression of NFATc1 or NFATc3 prevented the transactivation effect induced by NFAT overexpression on *hCASQ2* gene promoter long construct (Fig 3C).

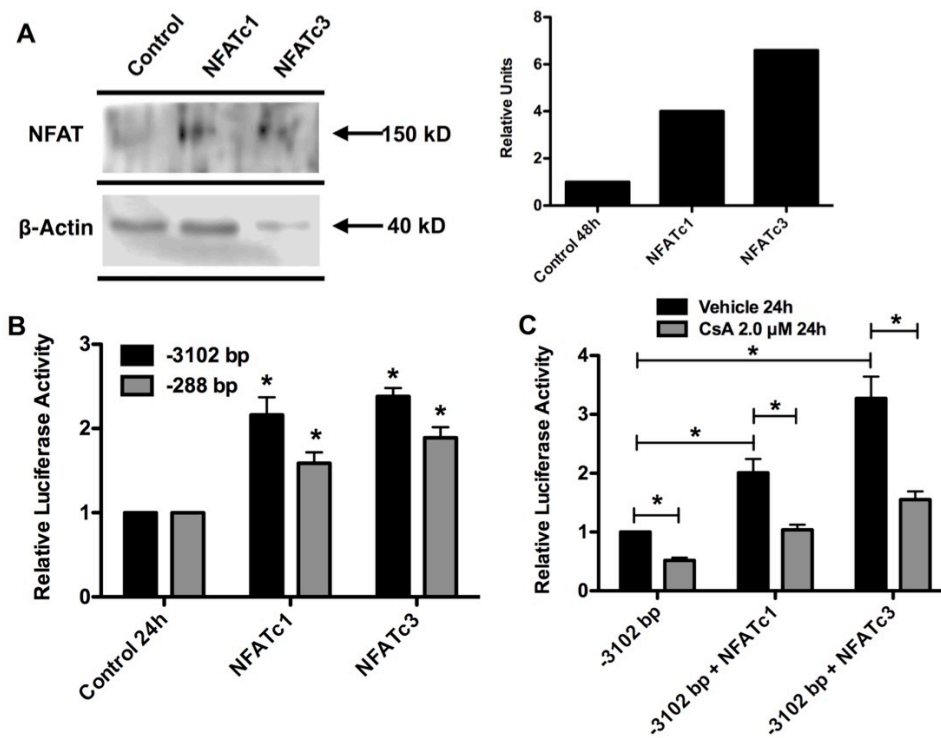


Fig 3. Overexpression of NFAT increased transcriptional activity of *hCASQ2* gene constructs. **A)** To verify the NFAT overexpression, the NFATc1 or NFATc3 expression vectors were transfected into neonatal rat cardiomyocytes. After 48 h, the cells were harvested and NFATc1 and NFATc3 protein levels were evaluated by Western blot. A picture of a representative gel is shown. Densitometry analysis of the blot was made using the Image-Studio Lite 5.2.5 software, LI-COR, NE, USA. **B)** Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes co-transfected with pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp (black bars) or pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp (gray bars) and the NFATc1 or NFATc3 expression vectors. After 24 h, the cells were harvested and luciferase activity was measured. **C)** Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes co-transfected with pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -3102/+176 bp construct and NFATc1 or NFATc3 expression vectors as above. Then, cells were treated with vehicle (black bars) or CsA (gray bars). After 24 h, the cells were harvested, and luciferase activity was measured. Results for functional assays (Fig 3B and 3C) are expressed as the mean of three independent experiments \pm SEM. The luciferase activity of control condition is given the arbitrary value of 1. *p values <0.05 were considered statistically significant. (The data showed in the graphs can be found as supporting information in the S1 Dataset file. The complete image of the blot can be found in S2 Fig file).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g003>

Because both *hCASQ2* gene promoter constructs responded in a similar way to the calcineurin/NFAT pathway inhibition and the NFAT overexpression (Figs 2 and 3), we concluded that the response element responsible for this effect must be located within the short construct. This construction contains the region between -288 bp to +176 bp of the *hCASQ2* gene promoter. Because the sequence analysis of *hCASQ2* gene promoter revealed a potential NFAT binding site within this region, we investigated the functionality of this NFAT site.

The -133 bp MEF-2 binding site is responsible for NFAT-induced transactivation of the *hCASQ2* gene promoter

The results of the functional assays suggest that NFAT transcription factor is involved in *hCASQ2* gene transcription regulation in neonatal cardiomyocytes. As mentioned above, *in silico* DNA sequence analysis of the *hCASQ2* gene promoter revealed a putative NFAT binding site (-230 5'-GTCTTTTCC-3'-222) that is conserved among species (Fig 4). To find out if this putative NFAT binding site is functional, we performed site-directed mutagenesis of this putative NFAT site and evaluated the effect on the transcriptional activity of the pGL3-*hCASQ2*-Luc -288/+176 bp construct by functional assays. The results showed that the mutagenesis of the putative -230 bp NFAT site had no effect on the transcriptional activity of the proximal *hCASQ2* promoter construct, suggesting that there is not a direct interaction of NFAT with the putative NFAT element located in this region (Fig 5A). We have previously demonstrated that MEF-2c binds to the -133 bp *hCASQ2* site located within the promoter region and activates transcription of the gene in neonatal cardiomyocytes [16]. We have also demonstrated that the -103 bp SRF site of the *hCASQ2* gene is functional in neonatal cardiomyocytes [16]. Therefore, in this study, we investigated the possibility that NFAT may interact with MEF-2 at the -133 bp site or with the SRF that binds at position -103 bp. To examine this hypothesis, we generate mutations of the -133 bp MEF-2 and the -103 SRF sites in the short *hCASQ2* gene construct. We performed functional assays using these *hCASQ2* mutated

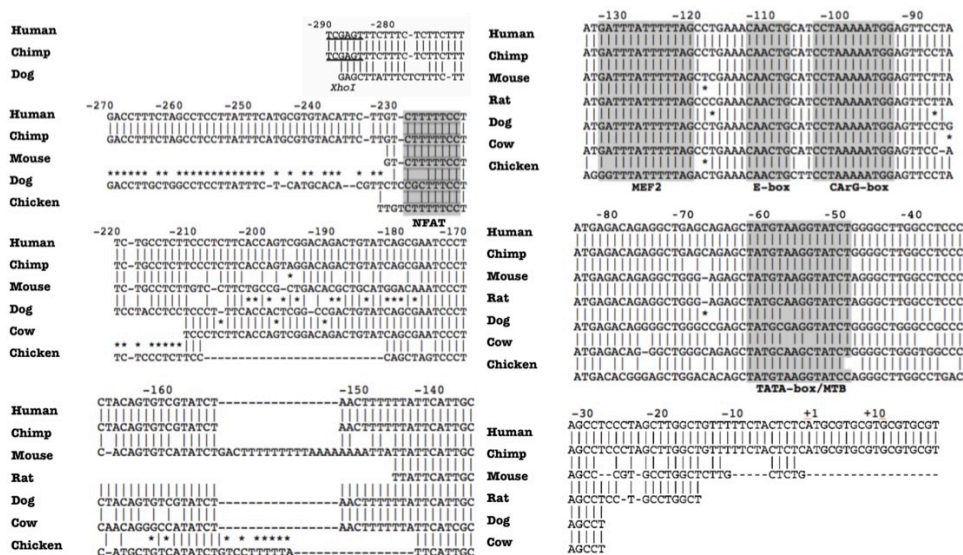


Fig 4. Sequence analysis of *hCASQ2* gene promoter. The sequence analysis was made using MacVector 6.5.3 and BLAST tool from NCBI. The 5'-regulatory region is highly conserved among species. The analysis revealed a potential binding site for NFAT located between -230 to -222 bp, which is conserved among species. Within this region, there are also the binding sites for MEF-2 and SRF transcription factors between -130 to -120 bp and -103-93 bp, respectively (Modified from Reyes-Juarez JL. et al. 2007).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g004>

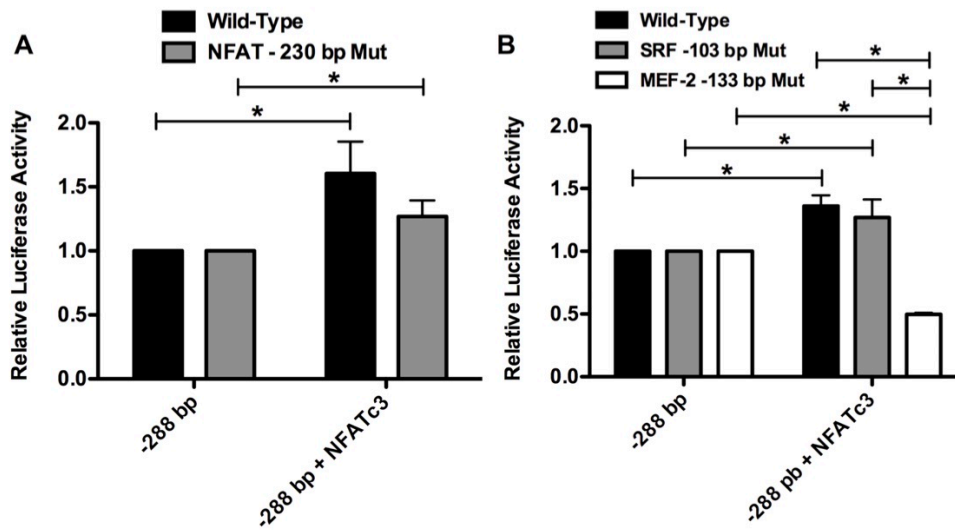


Fig 5. The NFAT-induced transactivation of *hCASQ2* gene promoter is mediated by the -133 bp MEF-2 binding site. A) Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes co-transfected with the pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp wild-type construct (black bars) or the -230 bp NFAT site mutated construct (gray bars) and the NFATc3 expression vector. B) Luciferase activity of neonatal cardiomyocytes co-transfected with pGL3-*hCASQ2*prom/Luc -288/+176 bp wild-type construct (black bars), the -103 bp SRF site mutated construct (gray bars) or the -133 bp MEF-2 site mutated construct (white bars) and the NFATc3 expression vector. After 24 h, the cells were harvested, and luciferase activity was determined. Results are expressed as the mean of three independent experiments +/- SEM. The -288 bp construct luciferase activity is given the arbitrary value of 1. *p values <0.05 were considered statistically significant. (The data showed in the graphs can be found as supporting information in the S1 Dataset file).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g005>

constructs. The results showed that the mutated -103 bp SRF construct was still trans-activated by NFAT overexpression (Fig 5B). On the other hand, we found that the -133 bp MEF-2 mutated construct was no longer trans-activated by NFAT overexpression, suggesting that NFAT may directly interact with MEF-2 bound to the proximal MEF-2 site at -133 bp (Fig 5B).

A direct interaction between MEF-2c and NFATc3 transcription factors regulate expression of the *CASQ2* gene

It is known that interaction between NFAT and MEF-2 is important for the expression of the *Nur77* and the β -MHC genes. [20, 27] Taking together, our overexpression and functional assays strongly suggest that an interaction between NFAT and MEF-2 is important for the regulation of *hCASQ2* gene transcription in neonatal cardiomyocytes. Hence, we evaluated whether both NFAT and MEF-2 are present within the proximal region of *CASQ2* gene promoter. To do so, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays using specific antibodies against MEF-2c and NFATc3. The ChIP assays results showed MEF-2 and NFAT enrichment within the region between -259 to -21 bp of the proximal rat *CASQ2* promoter (Fig 6A and 6B). To demonstrate a direct interaction between MEF-2 and NFAT, we performed protein co-immunoprecipitation. Our results showed that MEF-2c and NFATc3

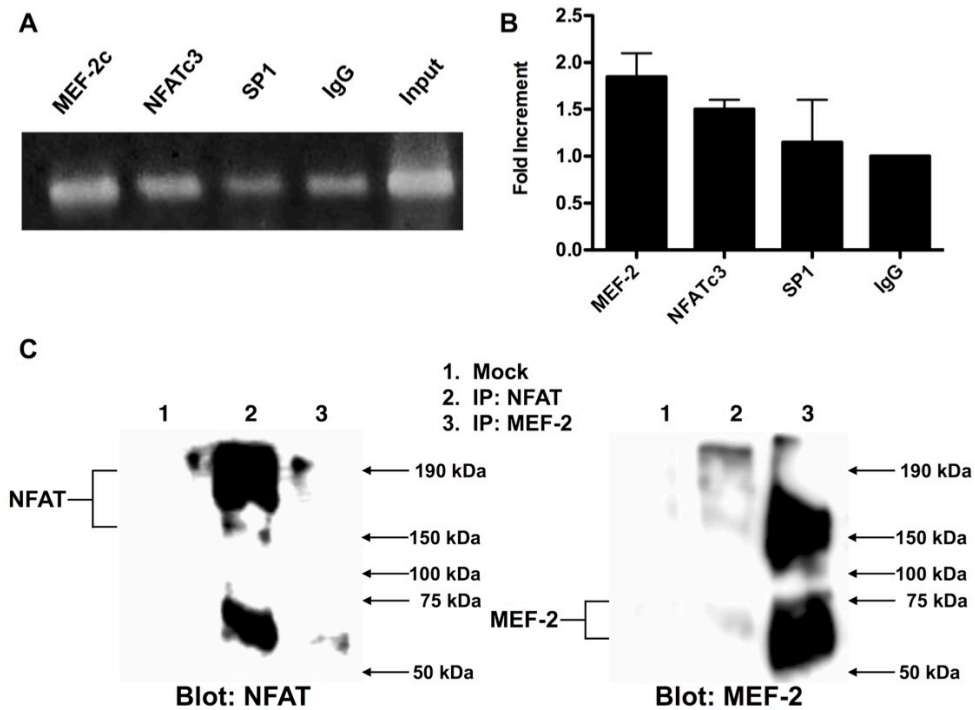


Fig 6. MEF-2 and NFAT transcription factors bind to the CASQ2 gene promoter and interact with each other. **A)** Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay of the rat CASQ2 gene promoter; fragmented chromatin was incubated with antibodies against MEF-2c, NFATc3, Sp1 and IgG. PCR was performed to amplify the region between -259 to -21 bp of CASQ2 gene promoter. A picture of a representative gel is shown. **B)** Densitometry analysis of representative experiments ($n = 2$) was made with the Image-Studio Lite 5.2.5 software, (LI-COR, NE, USA). **C)** Total protein extracts were immunoprecipitated (IP) with anti-NFAT or anti-MEF-2 antibodies as indicated. Western blot analysis of immunoprecipitated proteins was performed using antibody against MEF-2 or NFAT as indicated. The identity of IP proteins is as follows: Lane 1, Mock (Protein A Sepharose antibody-binding beads without antibody); Lane 2, NFAT IP; Lane 3 MEF-2 IP. (The data showed in the graphs can be found as supporting information in the S1 Dataset file. The complete image of the blot can be found in S3 Fig file).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g006>

proteins interact directly with each other (Fig 6C). Taken together, these results demonstrate that NFAT interacts with MEF-2 bound to its -133 bp binding site at the *hCASQ2* gene promoter. In this way, NFAT cooperates with MEF-2 in the transcriptional activation of the *hCASQ2* gene.

In summary, we demonstrate that the inhibition of NFAT activation (with CsA or INCA-6) reduced the transcription of the CASQ2 gene in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes. We also showed that overexpression of NFATc1 and NFATc3 in neonatal cardiomyocytes induced the transcriptional activity of the *hCASQ2* gene promoter constructs and that the mechanism responsible for this effect is explained by the interaction between MEF-2 and NFAT within the *hCASQ2* gene promoter (Fig 7).

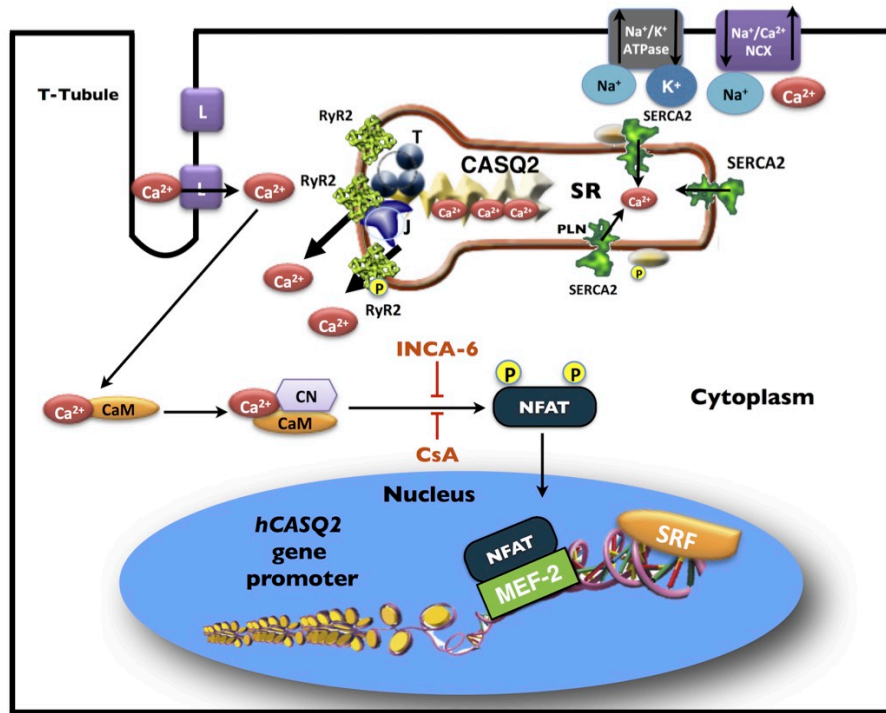


Fig 7. Proposed transcriptional regulation of *hCASQ2* gene in cardiomyocytes. CASQ2 is the main SR Ca²⁺-binding protein. In association with Triadin (T) and Junctin (J) proteins, CASQ2 is capable to regulate the activity of the SR Ca²⁺-release channel RyR2. NFAT transcription factor interacts with MEF-2 bound to its -133 bp binding site at the *hCASQ2* gene promoter. In this way, NFAT cooperates with MEF-2 in the transcriptional activation of the *hCASQ2* gene. Inhibition of NFAT activation with cyclosporine A (CsA) or INCA-6 blocks NFAT activation and down-regulates *hCASQ2* gene transcription. Abbreviations: CaM, calmodulin; CN, calcineurin; L, L-type Ca²⁺ channels; MEF-2, myocyte enhancer factor 2; NCX, Na⁺/Ca²⁺ exchanger; NFAT, nuclear factor of activated T cells; PLN, phospholamban; SRF, serum response factor; SR, sarcoplasmic reticulum.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724.g007>

Discussion

In cardiomyocytes, CASQ2 is the most abundant protein inside the terminal cisternae of the SR. The main function of CASQ2 is to maintain the free SR Ca²⁺ concentration at 1 mM, but also has an important role in the regulation of SR Ca²⁺ release by the RyR2 Ca²⁺ channel in cardiomyocytes [10]. Mutations that insert premature stop codons or mutations that produce a nonfunctional CASQ2 protein result in an increased Ca²⁺ permeability of the RyR2 channel in resting conditions [13]. Phenotypically, this produces the development of ventricular arrhythmias such the cardiac polymorphic ventricular tachycardia [34]. In contrast, transgenic mice that overexpress CASQ2 develop cardiac hypertrophy [35]. CASQ2 overexpression induces a fetal gene expression program that results in impairment of contractile function

with an increased Ca^{2+} content inside the SR but a reduced release of Ca^{2+} during the cardiac excitation-contraction coupling [35, 36]. CASQ2 overexpressing transgenic mice develop dilated cardiomyopathy with reduced SERCA2a expression and increased expression of cardiac remodeling-related proteins such as cardiac ankyrin repeat protein (CARP), glutathione peroxidase, decorin (Dcn), TGF- β 1-stimulated clone-36 protein (TSC-36), microfibril-associated glycoprotein-2 (Magp2) and osteoblast-specific factor-2 (Osf2) [37].

Despite the importance of CASQ2 protein in cardiac physiology, the regulation of the CASQ2 gene expression is poorly understood. Previously, we have demonstrated that MEF-2 and SRF transcription factors bind to the promoter region of the human CASQ2 gene and are important for its transcriptional regulation [16]. MEF-2 and SRF belong to the MADS-box family of proteins (MCM1, *Agamous*, *Deficiens*, SRF). These transcription factors also regulate the expression of many muscle-specific genes such as the α -MHC, MCK, myogenin, MyoD, MLCv2 and skeletal α -actin [24].

Besides MEF-2 and SRF, other transcription factors could regulate the expression of CASQ2 gene. In this work, we investigated the role of NFAT in the regulation of the *hCASQ2* gene expression in neonatal rat cardiomyocytes. The NFAT transcription factors are related to the Rel/NF κ B transcription factors family. The NFAT1-4 isoforms are expressed in cardiomyocytes, and their activity can be regulated by the action of Ca^{2+} /CaM-dependent phosphatase calcineurin [19, 38]. Phosphorylated NFAT is located in the cytoplasm. When the cytoplasmic [Ca^{2+}] is increased, Ca^{2+} /CaM forms a complex with calcineurin, resulting in calcineurin activation and dephosphorylation of NFAT. Dephosphorylated NFAT is translocated into the nucleus where can activate its target genes [38]. The inhibition of calcineurin/NFAT pathway, with CsA, in Egr-1 overexpressing H9c2 cells, decreased the expression of rat CASQ2. This reduced expression of rat CASQ2 was mediated by the Egr-1 binding to the rat CASQ2 gene promoter [17]. As mentioned above, only the first 288 bp of the human CASQ2 gene (*hCASQ2*) promoter have sequence homology between rat and human [16]. Because this region of the *hCASQ2* gene promoter lacks of an Egr-1 binding site, we searched for a mechanism independent of Egr-1.

Our results showed that the inhibition of NFAT activation reduced the transcription of CASQ2 mRNA in primary cultures of neonatal rat cardiomyocytes. In the same way, NFAT activation inhibition also reduced the transcriptional activity of *hCASQ2* gene promoter-chimeric constructs. *In silico* analysis of the *hCASQ2* gene promoter revealed a putative NFAT site located at position -230 bp. However, we did not observe any change in transcriptional activity of the putative -230 bp NFAT mutated construct compared to the wild-type construct. We hypothesized that NFAT interacts with MEF-2 bound to its -133 bp binding-site in CASQ2 gene promoter. Our ChIP assays showed an enrichment of MEF-2 and NFAT within the region of -259 to -21 bp of the *hCASQ2* gene promoter. Previously, in Jurkat cells, it has been demonstrated that MEF-2 and NFAT regulate gene expression by a direct interaction between each other [26, 27]. The results of our protein co-immunoprecipitation assays, also demonstrated a direct interaction between MEF-2 and NFAT transcription factors in neonatal cardiomyocytes. Therefore, our results demonstrate that indeed, MEF-2 is directly bound to its binding site in the promoter (at -133 bp) and that NFAT is physically interacting with bound MEF-2. The above explain why the inhibition of NFAT activation reduced both the transcription of the endogenous CASQ2 gene and the transcriptional activity of *hCASQ2* gene chimeric constructs. Thus, we demonstrated that the calcineurin/NFAT pathway regulates the transcription of the *hCASQ2* gene in neonatal cardiomyocytes. Then, as in the case of the β -MHC gene in skeletal muscle or the *Nur77* gene in T-cells, the interaction between NFAT and MEF-2 is important for the regulation of CASQ2 gene expression in cardiomyocytes [20, 27].

The activity of MEF-2 and NFAT transcription factors is increased in cardiac hypertrophy [39, 40]. It has been proposed that the interaction between MEF-2 and NFAT in cardiomyocytes promote the expression of genes associated with cardiac chambers dilatation [41]. As well, it is known that MEF-2 and NFAT are involved in the expression of heart failure markers ANP and BNP, respectively [42, 43]. Although the total levels of CASQ2 do not appear to be altered in cardiac hypertrophy or heart failure, alterations in the post-translational glycosylation or phosphorylation of CASQ2 protein were observed in a heart failure model [44–48]. This could change the normal targeting of CASQ2 protein into the SR and have an impact on the Ca^{2+} homeostasis of the cardiomyocytes [48].

Besides of calcineurin/NFAT pathway, other mechanisms cooperate to regulate the expression of the *hCASQ2* gene in cardiomyocytes. For instance, oxidative stress could have an impact on the regulation of CASQ2 gene expression. Primary cultures of rat cardiomyocytes treated with FCCP (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazone) showed a reduced level of CASQ2 mRNA, which could be prevented by treatment with the antioxidant agent N-acetylcysteine [49]. Moreover, mice treated in utero with diethylstilbestrol showed up-regulation of SR proteins involved in Ca^{2+} -homeostasis control, such SERCA2a, NCX1, and CASQ2 [50]. This CASQ2 gene up-regulation was associated with an increased methylation of CASQ2 gene promoter [50]. Also, treatment of H9c2 cells with the methylation inhibitor 5-aza-deoxycytidine reduced CASQ2 gene expression [17]. These results suggest that epigenetic mechanisms could have a role in the regulation of CASQ2 gene expression. However, the molecular mechanism responsible for these effects must be investigated in greater detail [17, 50].

In conclusion, we demonstrate that the calcineurin/NFAT pathway regulates the *hCASQ2* gene transcription in neonatal cardiomyocytes through an interaction between MEF-2 and NFAT transcription factors at the *hCASQ2* gene promoter.

Supporting information

S1 Dataset. Dataset from the graphs.

(ZIP)

S1 Fig. Complete and unadjusted image of blot from Fig 1.

(TIFF)

S2 Fig. Complete and unadjusted image of blot from Fig 3.

(TIFF)

S3 Fig. Complete and unadjusted image of blot from Fig 6.

(TIFF)

S1 Table. Oligonucleotides for real-time qPCR, mutagenesis, and ChIP.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank Dr. Juan Santiago-García and Dr. Iván Meneses-Morales for their valuable comments to improve this manuscript. We also thank Dr. Félix Recillas-Targa and Cecilia Gómez Inclán for their valuable technical advice.

Author Contributions

Conceptualization: Rafael Estrada-Avilés, Angel Zarain-Herzberg.

Data curation: Rafael Estrada-Avilés, Angel Zarain-Herzberg.

Formal analysis: Rafael Estrada-Avilés, Angel Zarain-Herzberg.

Funding acquisition: Rafael Estrada-Avilés, Angel Zarain-Herzberg.

Investigation: Rafael Estrada-Avilés, Gabriela Rodríguez, Angel Zarain-Herzberg.

Methodology: Rafael Estrada-Avilés, Gabriela Rodríguez, Angel Zarain-Herzberg.

Project administration: Angel Zarain-Herzberg.

Resources: Gabriela Rodríguez, Angel Zarain-Herzberg.

Supervision: Gabriela Rodríguez, Angel Zarain-Herzberg.

Visualization: Angel Zarain-Herzberg.

Writing – original draft: Rafael Estrada-Avilés, Angel Zarain-Herzberg.

Writing – review & editing: Rafael Estrada-Avilés, Gabriela Rodríguez, Angel Zarain-Herzberg.

References

1. Rossi AE, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*. 2006; 33(6):715–31. Epub 2006/02/16. <https://doi.org/10.1002/mus.20512> PMID: 16477617.
2. Rossi D, Barone V, Giacomello E, Cusimano V, Sorrentino V. The sarcoplasmic reticulum: an organized patchwork of specialized domains. *Traffic*. 2008; 9(7):1044–9. Epub 2008/02/13. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00717.x> PMID: 18266914.
3. Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, Sjaastad I. EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J*. 2005; 39(1–2):13–23. PMID: 16097409.
4. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415(6868):198–205. <https://doi.org/10.1038/415198a> PMID: 11805843.
5. Korzick DH. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update. *Adv Physiol Educ*. 2003; 27(1–4):192–200. PMID: 14627617.
6. Frank KF, Mesnard-Rouiller L, Chu G, Young KB, Zhao W, Haghighi K, et al. Structure and expression of the mouse cardiac calsequestrin gene. *Basic Res Cardiol*. 2001; 96(6):636–44. Epub 2002/01/05. PMID: 11770083.
7. Lee D, Michalak M. Membrane associated Ca²⁺ buffers in the heart. *BMB Rep*. 2010; 43(3):151–7. PMID: 20356453.
8. Arai M, Alpert NR, Periasamy M. Cloning and characterization of the gene encoding rabbit cardiac calsequestrin. *Gene*. 1991; 109(2):275–9. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90621-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90621-H) PMID: 1662658.
9. Protasi F, Paolini C, Canato M, Reggiani C, Quarra M. Lessons from calsequestrin-1 ablation in vivo: much more than a Ca(2+) buffer after all. *J Muscle Res Cell Motil*. 2011; 32(4–5):257–70. <https://doi.org/10.1007/s10974-011-9277-2> PMID: 22130610.
10. Beard NA, Laver DR, Dulhunty AF. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog Biophys Mol Biol*. 2004; 85(1):33–69. Epub 2004/03/31. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2003.07.001> PMID: 15050380.
11. Beard NA, Wei L, Dulhunty AF. Control of muscle ryanodine receptor calcium release channels by proteins in the sarcoplasmic reticulum lumen. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009; 36(3):340–5. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05094.x> PMID: 19278523.
12. Gyorke S, Stevens SC, Terentyev D. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol*. 2009; 587(Pt 13):3091–4. Epub 2009/07/02. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172049> PMID: 19567748; PubMed Central PMCID: PMC2727018.
13. MacLennan DH, Chen SR. Store overload-induced Ca²⁺ release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J Physiol*. 2009; 587(Pt 13):3113–5. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172155> PMID: 19567749; PubMed Central PMCID: PMC2727021.

14. Sanchez EJ, Lewis KM, Danna BR, Kang C. High-capacity Ca²⁺-binding of human skeletal calsequestrin. *J Biol Chem*. 2012. Epub 2012/02/18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.335075> PMID: 22337878.
15. Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 1997; 272(37):23389–97. Epub 1997/09/12. PMID: 9287354.
16. Reyes-Juarez JL, Juarez-Rubi R, Rodriguez G, Zarain-Herzberg A. Transcriptional analysis of the human cardiac calsequestrin gene in cardiac and skeletal myocytes. *J Biol Chem*. 2007; 282(49):35554–63. Epub 2007/10/17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707788200> PMID: 17938175.
17. Kasneci A, Kemeny-Suss NM, Komarova SV, Chalifour LE. Egr-1 negatively regulates calsequestrin expression and calcium dynamics in ventricular cells. *Cardiovasc Res*. 2009; 81(4):695–702. Epub 2008/12/24. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn357> PMID: 19103607.
18. Arai M, Otsu K, MacLennan DH, Periasamy M. Regulation of sarcoplasmic reticulum gene expression during cardiac and skeletal muscle development. *Am J Physiol*. 1992; 262(3 Pt 1):C614–20. PMID: 1372478.
19. Rinne A, Kapur N, Molkenin JD, Pogwizd SM, Bers DM, Banach K, et al. Isoform- and tissue-specific regulation of the Ca(2+)-sensitive transcription factor NFAT in cardiac myocytes and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 298(6):H2001–9. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01072.2009> PMID: 20304816; PubMed Central PMCID: PMC2886636.
20. Meissner JD, Umeda PK, Chang KC, Gros G, Scheibe RJ. Activation of the beta myosin heavy chain promoter by MEF-2D, MyoD, p300, and the calcineurin/NFATc1 pathway. *J Cell Physiol*. 2007; 211(1):138–48. Epub 2006/11/18. <https://doi.org/10.1002/jcp.20916> PMID: 17111365.
21. Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. 1999; 400(6744):581–5. <https://doi.org/10.1038/23060> PMID: 10448862.
22. Wada H, Hasegawa K, Morimoto T, Kakita T, Yanazume T, Abe M, et al. Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription. *J Cell Biol*. 2002; 156(6):983–91. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106057> PMID: 11889139; PubMed Central PMCID: PMC2173472.
23. Doevendans PA, van Bilsen M. Transcription factors and the cardiac gene programme. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996; 28(4):387–403. Epub 1996/04/01. PMID: 9026350.
24. Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998; 14:167–96. Epub 1999/01/19. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.167> PMID: 9891782.
25. Schulz RA, Yutzey KE. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development. *Dev Biol*. 2004; 266(1):1–16. Epub 2004/01/20. PMID: 14729474.
26. Bjaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA. Ca(2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem*. 2000; 275(1):197–209. PMID: 10617605.
27. Youn HD, Chatila TA, Liu JO. Integration of calcineurin and MEF2 signals by the coactivator p300 during T-cell apoptosis. *EMBO J*. 2000; 19(16):4323–31. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4323> PMID: 10944115; PubMed Central PMCID: PMC302027.
28. Molkenin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, et al. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998; 93(2):215–28. PMID: 9568714; PubMed Central PMCID: PMC34459646.
29. Gonzalez Bosc LV, Layne JJ, Nelson MT, Hill-Eubanks DC. Nuclear factor of activated T cells and serum response factor cooperatively regulate the activity of an alpha-actin intronic enhancer. *J Biol Chem*. 2005; 280(28):26113–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411972200> PMID: 15857835.
30. Claycomb WC. Culture of cardiac muscle cells in serum-free media. *Experimental cell research*. 1981; 131(1):231–6. Epub 1981/01/01. PMID: 6160861.
31. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29(9):e45. PMID: 11328886; PubMed Central PMCID: PMC55695.
32. Im SH, Rao A. Activation and deactivation of gene expression by Ca²⁺/calcineurin-NFAT-mediated signaling. *Mol Cells*. 2004; 18(1):1–9. PMID: 15359117.
33. Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG. Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(20):7554–9. Epub 2004/05/08. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401835101> PMID: 15131267.
34. Chopra N, Knollmann BC. Cardiac calsequestrin: the new kid on the block in arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2009; 20(10):1179–85. Epub 2009/07/01. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2009.01531.x> PMID: 19563351.

35. Sato Y, Ferguson DG, Sako H, Dom GW 2nd, Kadambi VJ, Yatani A, et al. Cardiac-specific overexpression of mouse cardiac calsequestrin is associated with depressed cardiovascular function and hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1998; 273(43):28470–7. PMID: 9774476.
36. Jones LR, Suzuki YJ, Wang W, Kobayashi YM, Ramesh V, Franzini-Armstrong C, et al. Regulation of Ca²⁺ signaling in transgenic mouse cardiac myocytes overexpressing calsequestrin. *The Journal of clinical investigation*. 1998; 101(7):1385–93. Epub 1998/04/29. <https://doi.org/10.1172/JCI1362> PMID: 9525981; PubMed Central PMCID: PMC508716.
37. Ihara Y, Suzuki YJ, Kitta K, Jones LR, Ikeda T. Modulation of gene expression in transgenic mouse hearts overexpressing calsequestrin. *Cell Calcium*. 2002; 32(1):21–9. Epub 2002/07/20. S0143416002000969 [pii]. PMID: 12127059.
38. Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev*. 2003; 17(18):2205–32. Epub 2003/09/17. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703.17/18/2205> [pii]. PMID: 12975316.
39. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2003; 92(10):1079–88. Epub 2003/05/31. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000072977.86706.23> PMID: 12775656.
40. Molkenin JD. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(3):467–75. Epub 2004/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.01.021> S0008636304000471 [pii]. PMID: 15276472.
41. van Oort RJ, van Rooij E, Bourajaj M, Schimmel J, Jansen MA, van der Nagel R, et al. MEF2 activates a genetic program promoting chamber dilation and contractile dysfunction in calcineurin-induced heart failure. *Circulation*. 2006; 114(4):298–308. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.608968> PMID: 16847152.
42. Kuwahara K, Nakao K. Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr J*. 2010; 57(7):555–65. PMID: 20571250.
43. Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K. Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *J Pharmacol Sci*. 2012; 119(3):198–203. PMID: 22786561.
44. Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G. Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 853:220–30. PMID: 10603950.
45. Kubalova Z, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Nishijima Y, Gyorke I, Terentyeva R, et al. Abnormal intrastore calcium signaling in chronic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(39):14104–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504298102> PMID: 16172392; PubMed Central PMCID: PMC1236548.
46. Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca²⁺-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31(3):479–91. PMID: 10198180.
47. Zima AV, Bovo E, Mazurek SR, Rochira JA, Li W, Terentyev D. Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure. *Pflugers Arch*. 2014; 466(6):1129–37. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1469-3> PMID: 24515294.
48. Kiarash A, Kelly CE, Phinney BS, Valdivia HH, Abrams J, Cala SE. Defective glycosylation of calsequestrin in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2004; 63(2):264–72. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.04.001> PMID: 15249184.
49. Hanninen SL, Ronkainen JJ, Leskinen H, Tavi P. Mitochondrial uncoupling downregulates calsequestrin expression and reduces SR Ca²⁺ stores in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 2010; 88(1):75–82. Epub 2010/06/08. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq180> PMID: 20525644.
50. Haddad R, Kasneci A, Sebag IA, Chalfour LE. Cardiac structure/function, protein expression, and DNA methylation are changed in adult female mice exposed to diethylstilbestrol in utero. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013; 91(9):741–9. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2013-0014> PMID: 23984849.

12. APÉNDICE II: Otras publicaciones.

Estrada-Avilés, R., Rodriguez G., Zarain-Herzberg A. (2017) The cardiac calsequestrin gene transcription is modulated at the promoter by NFAT and MEF-2 transcription factors. *PLoS One*. 2017 Sep 8;12(9):e0184724. Factor de impacto 2.76.

Zarain-Herzberg A., García-Rivas G. y **Estrada-Avilés, R.** (2014) Regulation of SERCA pumps expression in diabetes. *Cell Calcium*. 56(5): 302-310 ISSN: 0143-4160 Factor de impacto 3.52.

Zarain-Herzberg A., Fragoso-Medina, J. y **Estrada-Avilés, R.** (2014) La bomba de calcio SERCA2 y la calsecuestrina en el corazón: Mecanismos transcripcionales que regulan su expresión. *Mensaje Bioquímico*, 38: 175-196. ISSN-0188-137X.

Zarain-Herzberg A., **Estrada-Avilés, R.** and Fragoso-Medina, J. (2012) Regulation of Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase and Calsequestrin gene expression in the Heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90(8):1017-1028. ISSN: 1205-7541. Factor de impacto 2.13.

Zarain-Herzberg A., Fragoso-Medina, J. and **Estrada-Avilés, R.** (2011) Calcium-regulated Transcriptional Pathways in the Normal and Pathologic Heart. *IUBMB Life*, 63(10); 847-855 ISSN: 1521-6551. Factor de impacto 3.14.