



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL mRNA A y mRNA B DEL GEN ALFA  
SARCOGLICANO DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL RATÓN Y  
REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN  
MIOGÉNICOS Y CARDIOGÉNICOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A :**

**Q.F.B. BLADIMIR ROQUE RAMÍREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR**

**DR. JESÚS CHIMAL MONROY  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS**

**DR. FÉLIX RECILLAS TARGA  
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**

**Ciudad Universitaria, abril de 2015**



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.



*A mi hija*

*Nenzil Andrea Roque Contreras*

*Aire y vela de este barco*

Este trabajo estuvo bajo la tutoría del Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y fue realizado en el laboratorio de Biología del Desarrollo de la Unidad de Investigación Biomédica del Hospital 20 de Noviembre, ISSSTE; y en el laboratorio de Biología del Desarrollo del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El comité tutorial encargado de asesorar esta tesis estuvo conformado por:

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

Dr. Jesús Chimal Monroy  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

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

Este proyecto contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de proyecto 132284, y durante su desarrollo, el estudiante fue becario de tiempo completo del CONACYT con el número de registro 218300.

<b>CONTENIDO</b>	
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.- Complejo de proteínas sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN).....</b>	<b>12</b>
<b>1.2.- Regulación transcripcional del gen <i>Sgca</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.- Desarrollo embrionario del músculo esquelético .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.- Desarrollo embrionario del corazón .....</b>	<b>22</b>
<b>2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>3.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.- OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>29</b>
<b>5.- MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>5.1.- Animales.....</b>	<b>30</b>
<b>5.2.- Extracción de RNA y ensayos de RT-PCR .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3.- Generación de ribosondas e hibridación <i>in situ</i> .....</b>	<b>32</b>
<b>5.4.- Cultivos celulares .....</b>	<b>34</b>
<b>5.4.1.- Cultivo primario de células satélites.....</b>	<b>34</b>
<b>5.4.2.- Cultivo de células C2C12 y fibroblastos 10T1/2.....</b>	<b>35</b>
<b>5.5.- Inmunifluorescencia.....</b>	<b>36</b>

5.6.- Construcciones y plásmidos.....	36
5.7.- Transfección de células C2C12 y 10T1/2.....	37
5.8.- Ensayos de luciferasa .....	38
5.9.- Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) .....	38
5.10.-Análisis estadístico .....	39
6.- RESULTADOS.....	41
6.1.- El mRNA B es mas abundante que el mRNA A durante el desarrollo embrionario del ratón .....	41
6.2.- Patrón de expresión diferencial del mRNA A y mRNA B del gen <i>Sgca</i> durante el desarrollo embrionario del ratón. ....	44
6.3.- El promotor A y promotor B del gen de <i>Sgca</i> son regulados por MyoD, miogenina y Sox9 durante la diferenciación de células C2C12. ....	51
6.4- Factores de transcripción cardiogénica modulan la actividad promotor A y promotor B del gen de <i>Sgca</i> . ....	56
7.- DISCUSIÓN .....	59
8.- PERSPECTIVAS.....	67
9.- BIBLIOGRAFÍA .....	69

## ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
Baf60c	Factor C asociados a Brg/Brm
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DGC	Complejo de glicoproteínas asociados a distrofina
dNTPs	Dinucleótidos trifosfato
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblasto
FHF	Primer campo cardiogénico
Gapdh	Glicerandehido 3-fosfato-deshidrogenasa
Gata-4	Factor 4 de unión a secuencia GATA
MB	Mioblastos
Mef2c	Factor potenciador miogénico
MPC	Células precursoras miogénicas
μg	Microgramo
mL	Mililitro
μl	Microlitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MyoD	Factor miogénico D
NF1	Factor Nuclear 1
Nkx2.5	Factor Nk 2 homeobox 5
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases

PBS	Amortiguante de Sales de Fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SHF	Segundo campo cardiogénico
SG	Sarcoglicano
SG-SSPN	Complejo sarcoglicano sarcospan
Sox9	Proteína relacionada a SRY número 9
Tbx-5	Factor de transcripción T-box
TFIIB	Factor general de la transcripción II B
TFIID	Factor general de la transcripción II D

---

**INDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

Figura 1. Complejo de Glicoproteínas Asociado a Distrofina (DGC).....	13
Figura 2. Deficiencia de $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG).....	14
Figura 3. Localización del promotor A (pA) y promotor B (pB) del gen <i>Sgca</i> .....	17
Figura 4. Origen embrionario del músculo esquelético.....	18
Figura 5. Vías de señalización miogénica.....	19
Figura 6. Linaje miogénico y oleadas de diferenciación.....	20
Figura 7. Sitios de unión a MRFs sobre el promotor A y promotor B del gen <i>Sgca</i> .....	22
Figura 8. Desarrollo cardíaco embrionario.....	23
Figura 9. Regulación transcripcional región-específica durante la morfogénesis cardíaca (E9).....	25
Figura 10. Potenciales sitios de unión a factores de transición cardiogénicos.....	26
Figura 11. Estructura y expresión del gen <i>Sgca</i> en músculo cardíaco y músculo esquelético.....	42
Figura 12. Expresión del gen <i>Sgca</i> en etapas E9.25 y E10.5 del desarrollo murino.....	45
Figura 13. Expresión del gen <i>Sgca</i> en etapas E12 y E13 del desarrollo murino.....	47
Figura 14. El gen <i>Sgca</i> es expresado en musculo esquelétido de E15.5, E17 y E18.8.....	48

Figura 15. El gen *Sgca* es expresado en musculo caídaco de E15.5, E17 y E18.8..... 49

Figura 16. Expresión del gen *Sgca* en interdígito, lengua y estómago.....50

Figura 17. Modulación de los promotores A y B del gen *Sgca* durante la diferenciación de células C2C12.....54

Figura 18. Factores de transcripción cardiogénicos, principalmente Gata-4, inducen la transcripción del gen *Sgca* en tejido cardíaco embrionario.....57

Tabla 1..... 40

Tabla 2..... 51



## RESUMEN

La distrofia muscular de cintura tipo 2 D (LGMD2D) es un desorden progresivo causado por mutaciones en el gen de alfa sarcoglicano (*Sgca*). En el ratón, el gen *Sgca* contiene dos promotores que regulan la expresión de dos mRNAs diferentes (A y B), que codifican para la misma proteína que es principalmente expresada en el músculo estriado adulto. Sin embargo, el patrón de expresión de este gen durante el desarrollo embrionario no ha sido explorado y la regulación del mismo por factores de transcripción miogénicos y cardiogénicos ha sido parcialmente estudiada. En este trabajo reportamos que durante el desarrollo embrionario, el mRNA A y mRNA B del gen *Sgca* se expresan en músculos hipaxiales, corazón, estómago, lengua y células mesenquimales que rodean la porción dorsal de las somitas; por otra parte, el mRNA B fue exclusivamente expresado en la notocorda, en la base del tubo neural y en los interdigitos de las extremidades. *In vitro*, MyoD y miogenina regulan positivamente la transcripción del mRNA B durante la miogénesis esquelética, mientras que el mRNA A fue activado solo por MyoD en el músculo esquelético diferenciado. En adición, *in vivo*; Gata-4 se une al promotor B en el tejido cardíaco y junto con Mef2c modulan al promotor del mRNA B en fibroblastos 10T1/0. Por otro lado, Nkx2.5 y miocardina pueden activar al promotor del mRNA A. Así, el patrón de expresión de los dos mRNAs del gen de *Sgca* durante el desarrollo embrionario puede ser explicado por la modulación diferencial a la que están sometidos sus promotores.

## ABSTRACT

Type 2D limb-girdle muscular dystrophy (LGM2D) is a progressive disorder caused by mutations in the alpha sarcoglycan gene *Sgca*. In mice, the *Sgca* gene contains two promoters that regulate the expression of two different mRNAs (A and B), which encode for the same protein that has been mainly observed in adult striated muscle. However, their gene expression pattern during embryonic development has not been explored and their regulation by myogenic and cardiogenic transcription factors has been partially studied. During embryonic development mRNA A and B of *Sgca* gene were initially detected in hypaxial muscles, heart, stomach, tongue and mesenchymal cells, which surround the dorsal region of the somites; moreover, mRNA B was exclusively expressed in the floor plate and notochord and in the interdigits of limbs. *In vitro*, MyoD and myogenin regulated positively the transcription of mRNA B during skeletal myogenesis, whereas mRNA A was activated only for MyoD in differentiated skeletal muscle. In addition, Gata-4 together with Mef2c may regulate the expression of mRNA B in heart development, whereas Nkx2.5 and Myocardin may activate expression of mRNA A in the differentiated cardiomyocyte. Thus expression of both mRNA of *Sgca* gene during embryonic development may be explained by differential regulation of both mRNAs by myogenic and cardiogenic factors.

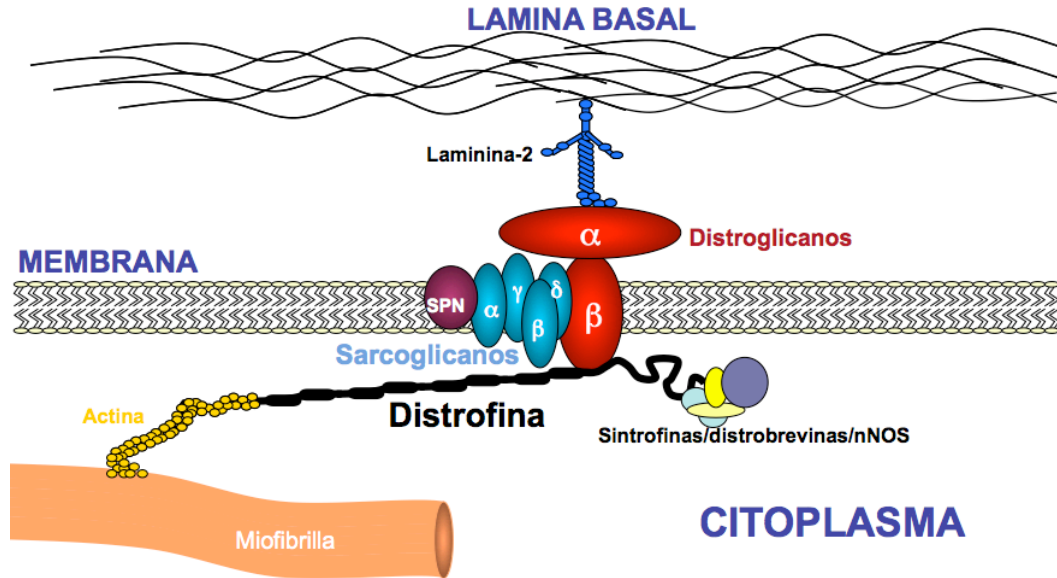
## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1.1.- Complejo de proteínas sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN)

A partir del descubrimiento del gen que codifica para la proteína distrofina (Koenig et al., 1987), cuya deficiencia está relacionada con la distrofia muscular de tipo Duchenne/Becker, se han realizado diversos estudios bioquímicos que han permitido identificar a un gran número de glicoproteínas ligadas íntimamente a la proteína distrofina, formando el complejo denominado complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC, dystrophin glycoprotein complex) (Figura 1). Este complejo multimérico se encuentra presente en diferentes tejidos como son músculo esquelético, cardíaco y liso (Campbell et al., 1995; Yoshida et al., 1990; Straub et al., 1999). Se ha propuesto que el DGC confiere estabilidad a la fibra muscular y une la matriz extracelular con el citoesqueleto ofreciendo protección a la fibra muscular durante el proceso de contracción, además de participar en procesos de señalización (Ervasti et al., 1993; Yang et al., 1995; Ort et al., 2000).

De acuerdo a las características bioquímicas, el DGC se subdivide en tres subcomplejos; el primer subcomplejo ubicado a nivel subsarcolemal esta formado por las proteínas distrofina, las sintrofinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , la  $\alpha$ - distrobrevina y la sintetasa de óxido nítrico neural (nNOS) (Kampbell et al., 1995; Hashida-Okumura et al., 1999; Piluso et al., 2000). Tanto las sintrofinas como las distrobrevinas están unidas al extremo carboxilo terminal de la distrofina. El segundo subcomplejo del DGC está compuesto por  $\alpha$ -dístroglicano ( $\alpha$ -DG) y  $\beta$ -dístroglicano ( $\beta$ -DG).  $\alpha$ -DG se une a  $\alpha$ -2-laminina en la matriz extracelular e interactúa con  $\beta$ -DG que es una

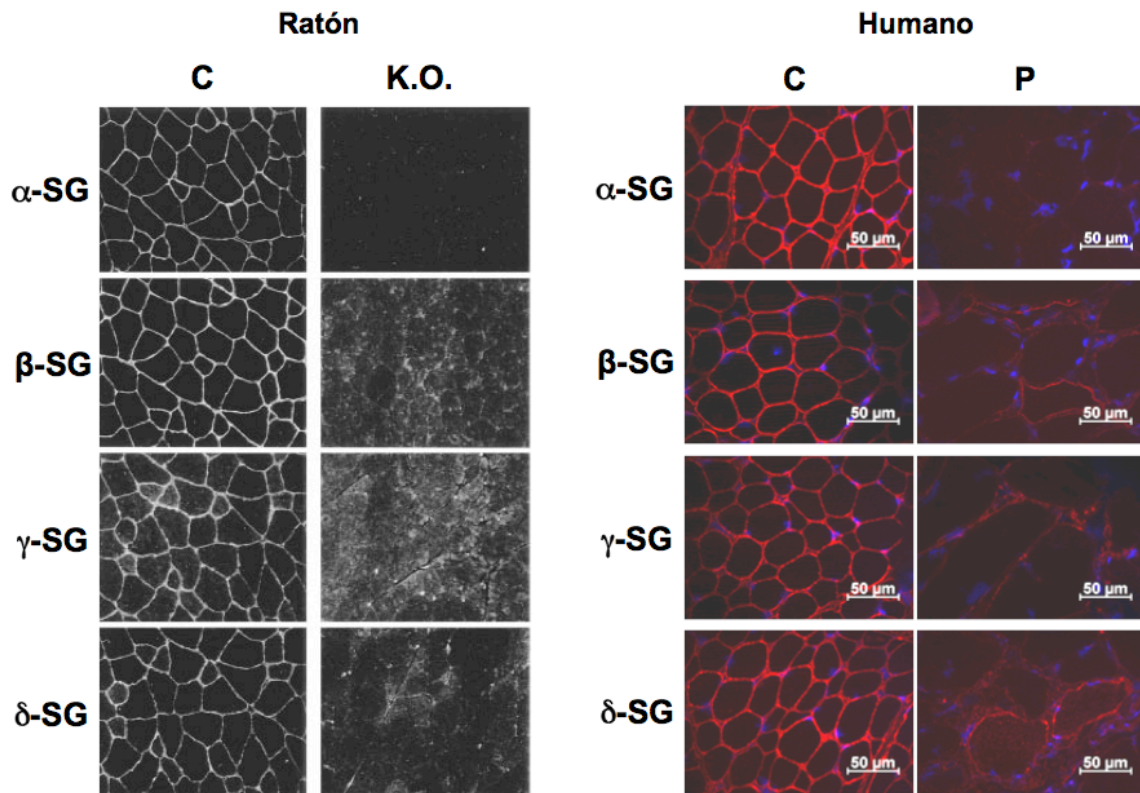
proteína transmembranal,  $\beta$ -DG se une a la distrofina a nivel intracelular que a su vez se une a los filamentos de actina (Durbeej et al., 2002).



**Figura 1. Complejo de Glicoproteínas Asociado a Distrofina (DGC).** El DGC forma un puente molecular entre la matriz extracelular y el citoesqueleto. Confiere estabilidad a la membrana de la fibra muscular durante los procesos de contracción, y la deficiencia de alguna proteína miembro del DGC genera distrofias musculares. El complejo está constituido por  $\alpha 2$  laminina;  $\alpha$  y  $\beta$  distroglicanos;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  sarcoglicanos y la proteína sarcospan (SPN); la proteína distrofina; sintrofinas, distrobrevinas y la sintasa de óxido nítrico neural.

El tercer subcomplejo denominado sarcoglicano-sarcospán (SG-SSPN) está constituido por un grupo de proteínas transmembranales llamadas sarcoglicanos (SG's)  $\alpha$ -/ $\epsilon$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ - y la proteína sarcospán. Se ha observado que mutaciones en los genes que codifican para estos SG's, específicamente  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -SG, generan distrofias musculares autosómicas recesivas denominadas sarcoglicanopatías que en ocasiones se acompañan de afecciones cardíacas (Piluso et al., 2000). En estas patologías la ausencia de alguno de estos SG's desestabiliza el complejo y genera la reducción o pérdida secundaria de los otros

SG's y de sarcospán (Mizuno et al., 1995; Ozawa et al., 1998; Coral-Vazquez et al., 1999) (Figura 2). Además de esto, se observó, en modelos animales, que la sobreexpresión de  $\gamma$ -SG genera un daño a la fibra muscular muy similar al presentado cuando la misma proteína se encuentra deficiente (Zhu et al., 2001), esto sugiere que tanto la activación como la regulación negativa de estos genes juegan un papel importante en la función celular. Debido a esto, se sugiere que la expresión de los genes SG's está sometida a procesos transcripcionales altamente regulados.



**Figura 2. Deficiencia de  $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG).** Inmunohistoquímicas que muestran la deficiencia secundaria de  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  sarcoglicano en la membrana de la fibra muscular por ausencia primaria de  $\alpha$ -SG en paciente (P) humano (panel de la derecha) y en el modelo murino knock out (K.O.) del gen *Sgca* (panel de la izquierda). Modificado de Duclos F, et al., 1998 y Roque-Ramírez B. 2006 (Tesis lic. UNAM).

En músculo estriado se han descrito dos complejos SG-SSPN; uno formado por  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -SG, y otro por  $\epsilon$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -SG. Ambos complejos pueden coexistir en el mismo tejido (Duclos et al., 1998); no obstante, el complejo que contiene  $\epsilon$ -SG es el único descrito en músculo liso (Ling et al., 1999; Matthew et al., 2004), lo cual indica que la expresión de la proteína  $\alpha$ -SG es específica del músculo estriado. Adicionalmente, se ha observado que pacientes con mutaciones en el gen de *Sgca* y ratones nulos para la esta proteína rara vez presentan daño al corazón (Piccolo et al., 1995). La ausencia de afección cardiaca puede explicarse en parte por presencia del complejo alterno que contiene a la proteína  $\epsilon$ -SG que es homóloga a  $\alpha$ -SG en un 62% (Hack et al., 2000). En este sentido, el ratón doble mutante para  $\alpha$ -SG y  $\epsilon$ -SG desarrolla distrofia muscular y cardiopatía dilatada (Lancioni et al., 2011). Además de esto, se ha reportado que la ausencia de  $\alpha$ -SG en células precursoras miogénicas (MPC) genera la deslocalización de la membrana celular del FGFR1 disminuyendo la proliferación celular y, consecuentemente, el compromiso miogénico de estas células (Cassano et al., 2011).

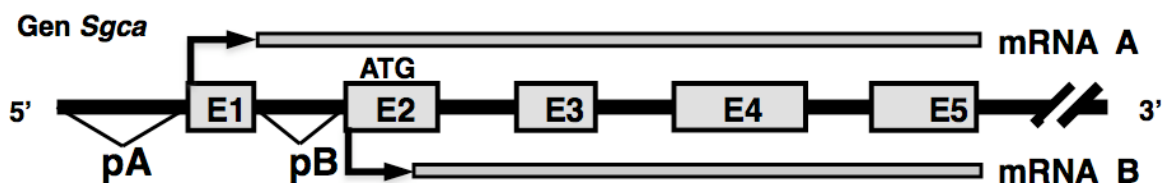
Por otro lado, la proteína  $\alpha$ -SG es altamente conservada entre especies, dos sitios consenso para glicosilación y dominios extracelulares ricos en cisteína se conservan en ratón, humano, hámster y conejo (Liu et al., 1997). Adicionalmente, se le han identificado en su dominio extracelular secuencias consenso similares a secuencias presentes en ecto-ATPasas y existen evidencias que confirman su funcionalidad. Así mismo, se ha propuesto que  $\alpha$ -SG participa en el control de la concentración de ATP en la superficie celular; por lo mismo, la

ausencia de ésta proteína en el sarcolema puede causar el incremento de ATP en la superficie de la fibra muscular provocando aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular y en consecuencia la muerte de la fibra muscular, contribuyendo así, con la fisiopatología de la sarcoglicanopatías provocada por la deficiencia de  $\alpha$ -SG (Betto et al., 1999; Sandona et al., 2004).

### **1.2.- Regulación transcripcional del gen *Sgca***

La expresión tejido específico del gen *Sgca* y su participación en la fisiología del músculo estriado, incrementa la importancia de los mecanismos de regulación de este gen. En este sentido, Wakabayashi-Takai et al. (2001) describieron la presencia de dos promotores en la región 5' del gen *Sgca* de ratón (Figura 3). Uno de estos promotores (Promotor B, ubicado río abajo del exón 1) es activado durante la diferenciación de células precursoras miogénicas a miotubos, por otro lado, el otro promotor (Promotor A, ubicado río arriba del exón 1) mostró una discreta activación en este mismo proceso de diferenciación. Además de esto, estudios realizados por nuestro grupo de trabajo con el promotor B durante la diferenciación de células C2C12, muestran que este promotor contiene secuencias de modulación positivas y negativas; en este sentido, nosotros reportamos que los factores de transcripción NFI-C2 y NFI-X2 modulan negativamente la actividad del promotor B del gen *Sgca* en células C2C12 no diferenciadas (Mioblastos) (Delgado-Olguín et al., 2004). Aunado a esto, se observó que la actividad transcripcional de este promotor es fuertemente modulada por elementos distales que contienen secuencias E-box que ejercen una influencia negativa sobre el

potencial de activación del factor transcripcional MyoD en la región core del promotor B (Delgado-Olguin et al., 2008). Aunado a lo anterior, nuestro grupo también mostró que el factor de transcripción Sox9 inhibe la actividad transcripcional del promotor B en mioblastos de células C2C12, efecto que es incrementado por Smad3 de manera dependiente de TGF- $\beta$  (Hernández-Hernández et al., 2009). Por otro lado, Delgado-Olguín et al (2006) mostraron que MyoD incrementa la actividad transcripcional del promotor B durante la diferenciación de células C2C12. Todos estos estudios muestran la importancia de la regulación del gen *Sgca* por la actividad del promotor B durante la diferenciación de células C2C12. En contraste, parece ser que la influencia del promotor A sobre la regulación del gen *Sgca* durante proceso de diferenciación miogénica es muy leve (Wakabayashi-Takai et al., 2001).



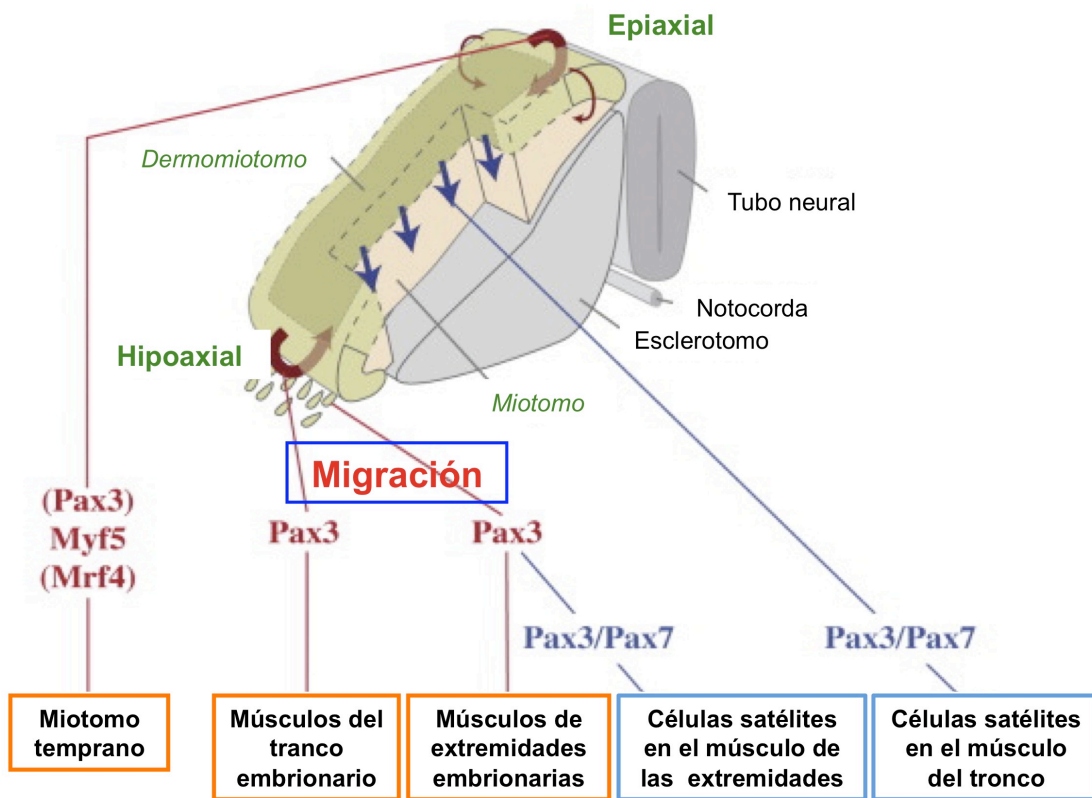
**Figura 3. Localización del promotor A (pA) y promotor B (pB) del gen *Sgca*.** El pA se localiza río arriba del exón 1 mientras que el pB se ubica río debajo del mismo exón. Cada promotor induce la transcripción de un mRNA (A y B) que contienen el mismo inicio de la traducción, en consecuencia ambos mRNA's codifican para la misma proteína.

La proteína  $\alpha$ -SG se expresa exclusivamente en el músculo cardiaco y músculo esquelético adulto; por lo tanto, es posible que ambos promotores modulen la expresión del gen *Sgca* de manera diferente en estos tejidos e incluso desde etapas tempranas del desarrollo embrionario.



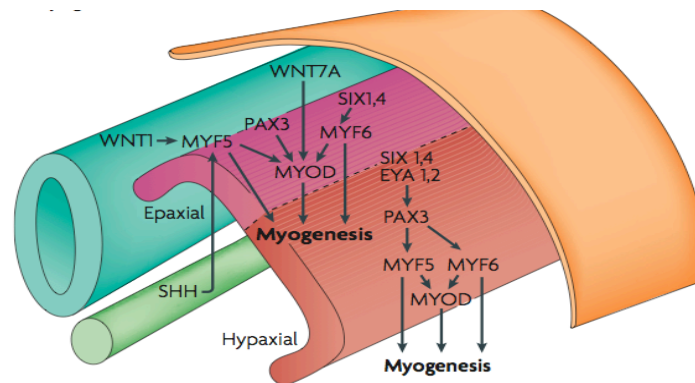
### 1.3.- Desarrollo embrionario del músculo esquelético

En vertebrados, el músculo esquelético se deriva de células progenitoras miogénicas originadas del dermomiótomo epitelial que a su vez se delamina para dar origen al miótomo. El miótomo medio da origen a los músculos internos del tronco, mientras que el miótomo y dermomiótomo lateral migran para generar los músculos hipoaxiales que incluyen; músculos intercostales, abdominales, superficiales del tronco, diafragma, lengua y de las extremidades (Ordahl et al., 1992) (Figura 4).



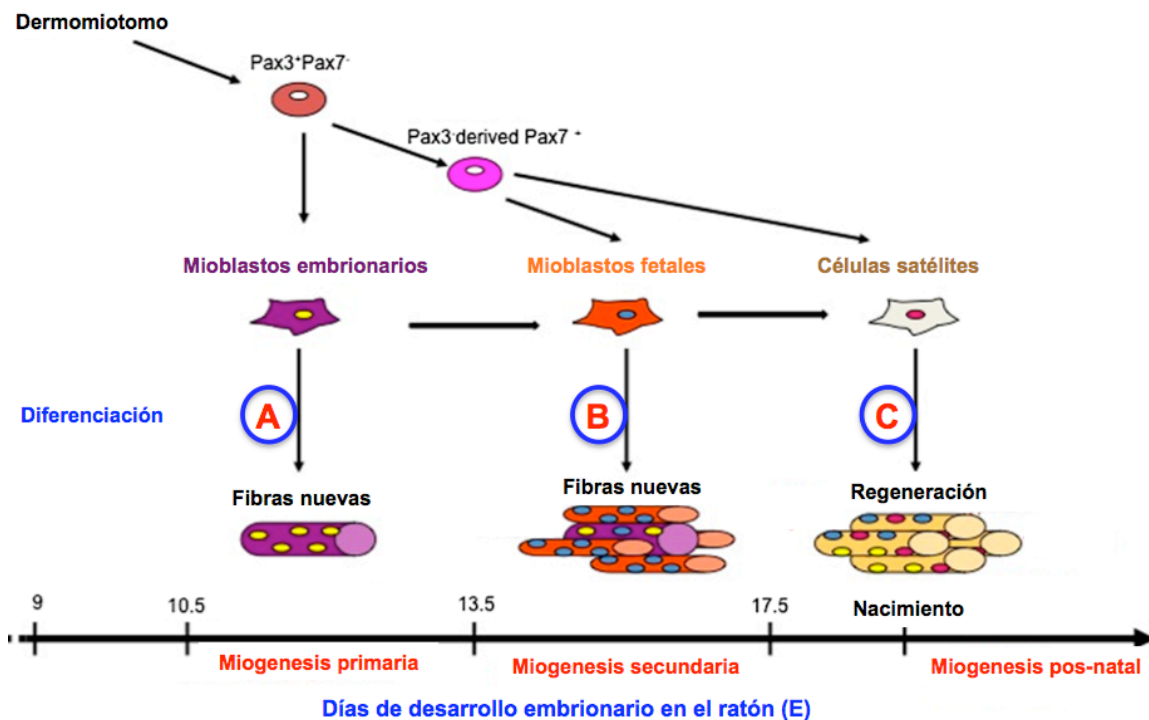
**Figura 4. Origen embrionario del músculo esquelético.** Los factores de transcripción Pax7 y Pax3 modulan la migración de las células precursoras miogénicas (CPM). Los músculos del tronco y de las extremidades así como las CPM residentes en esos músculos migran desde el miótomo y dermomiótomo hipoaxial. En tanto que las CPM residentes del tronco migran del miótomo medio. Modificado de Buckingham 2009.

Por otro lado, marcadores de especificación miogénica como los factores de transcripción Myf5, MyoD, miogenina y Myf6 (MRF4) juegan un papel muy importante en el desarrollo del músculo esquelético. La función de estos factores de regulación miogénica (MRFs) está ampliamente estudiada. Se ha descrito que ratones deficientes de Myf5 o MyoD presentan un desarrollo normal del músculo (Braun et al., 1992; Rudnicki et al., 1992), mientras que el ratón doble mutante Myf5-MyoD presenta ausencia total de células miogénicas (Rudnicki et al., 1993). Lo anterior indica que Myf5 y MyoD tienen una función redundante en el programa miogénico. Adicionalmente, se ha descrito que Six1, Six4, Eya1, Eya2, Pax3 y Pax7 entre otros, modulan la cascada de señalización río arriba de los MRFs, teniendo una función muy importante en el proceso de especificación miogénica que incluyen delaminación del dermomioto, migración, proliferación y diferenciación del músculo (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Grifone et al., 2005; Grifone et al., 2007) (Figura 5).



**Figura 5. Vías de señalización miogénica.** En el tejido hipoaxial embrionario, los factores de transcripción Six 1 y 4; Eya 1 y 2; Pax3 y los reguladores maestros miogénicos MyoD, Myf5 y Myf6, son capaces de inducir la diferenciación del músculo esquelético. Proteínas Wnt desde el tubo neural y Sonic Hedgehog (Shh) desde la notocorda modulan río arriba esta cascada de señalización. Tomado de Bryson-Richardson and Currie 2008.

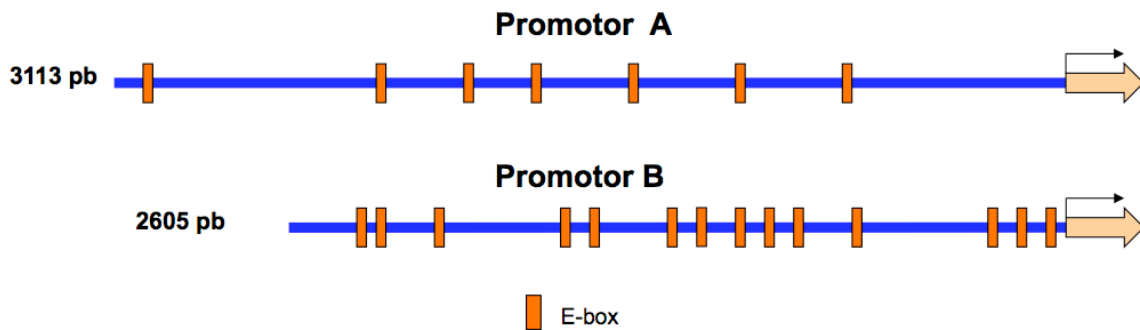
Durante el desarrollo del músculo esquelético en el ratón, se pueden distinguir dos oleadas secuenciales de formación de fibras musculares (fusión de mioblastos); una denominada embrionaria o miogénesis primaria que es necesaria para establecer el patrón básico de los músculos y que se lleva a cabo entre el estadio E10.5 y E13.5, y una miogénesis fetal o miogénesis secundaria caracterizada por el crecimiento y maduración de los esbozos musculares así como también por el inicio de la inervación muscular. Esta segunda oleada miogénica se presenta entre el estadio E13.5 y E17.5 (Kelly and Zacks, 1969; Rossi and Messina 2014) (Figura 6).



**Figura 6. Linaje miogénico y oleadas de diferenciación.** Las CPM que migran del dermomiótomo hipoaxial (Pax3<sup>+</sup>/Pax7<sup>-</sup>) experimentan dos oleadas consecutivas de diferenciación durante el desarrollo embrionario teniendo como resultado la formación de fibras musculares nuevas. La primera oleada mediada por los mioblastos embrionarios inicia en E10.5 (A), y la segunda oleada mediada por los mioblastos fetales comienza alrededor de E13.5 (B). Después del nacimiento, la regeneración muscular está mediada por las células satélite presentes en la periferia de las fibras musculares (C). Modificado de Rossi and Messina 2014.

En este sentido, ratones deficientes de miogenina o doble mutantes para MyoD-Myf6 desarrollan una severa hipoplasia resultado de defectos en la miogénesis secundaria lo que sugiere la existencia de diferentes poblaciones miogénicas dependientes de miogenina o de MyoD y Myf6, proteínas necesarias para llevar a cabo una diferenciación normal de músculo esquelético (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993; Venuti et al., 1995; Rawlset al., 1998; Valdez et al., 2000). Las fibras musculares que suelen dañarse después del nacimiento, son regeneradas por células satélites que se encuentran en la periferia de las fibras musculares, la fusión de estas células satélites a las fibras dañadas también está regulada por los MRFs y los factores de transcripción antes mencionados, Pax7 y Pax3.

La adecuada diferenciación del músculo esquelético implica la expresión de los todos los genes involucrados en la maduración del mismo, esto conlleva la expresión de genes que participan en vías de señalización temprana y en procesos propios de la contracción muscular, en los que participa  $\alpha$ -SG. La expresión en músculo esquelético de  $\alpha$ -SG sugiere que el gen *Sgca* está sometido a finos mecanismos de regulación transcripcional, en este caso por los MRFs. En este sentido, un análisis *in silico* (MatInspector: [www. genomatix.de/](http://www.genomatix.de/)) muestra la existencia de potenciales sitios de unión a MRFs denominados E-box (CANNTG) sobre ambas secuencias promotoras (A y B) del gen *Sgca* (Figura 7).



**Figura 7. Sitios de unión a MRFs sobre el promotor A y promotor B del gen *Sgca*.** El análisis por computadora sugiere una alta densidad de sitios E-box (CANNTG) sobre ambos promotores. Los MRFs (MyoD, miogenina, Myf5 y Myf6) pueden regular la actividad transcripcional en el músculo esquelético a través de estas secuencias consenso.

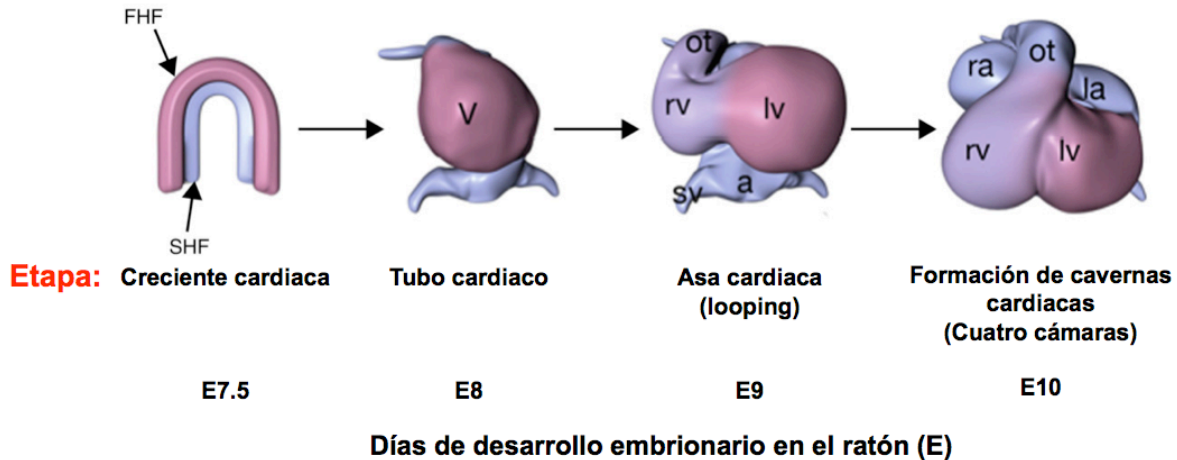
La alta densidad de E-box sobre los promotores del gen *Sgca* sugieren una actividad transcripcional positiva en el músculo esquelético desde etapas tempranas del desarrollo embrionario, momento en el cual ocurren el compromiso miogénico de los nichos celulares que en etapa adulta participan en la reparación de las fibras, como sucede en las distrofias musculares.

#### 1.4.- Desarrollo embrionario del corazón

Hoy en día, las señales que rigen el destino celular cardiogénico, la diferenciación cardiaca y la morfogénesis cardiaca siguen siendo muy estudiadas. Muchas enfermedades que aquejan a la población infantil y adulta están asociadas a fallas de este órgano multiestructural, el corazón. Las malformaciones congénitas del corazón son el defecto de nacimiento más común en humanos y se presenta en aproximadamente el 1% de la población mundial (Hoffman and Kaplan, 2002). En este sentido, conocer las vías que regulan la cardiogénesis

desde estadios tempranos del desarrollo permite plantear nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Por lo anterior, ha surgido una visión molecular que permite explicar los procesos celulares que desembocan en un corazón morfológicamente maduro (Buckingham et al., 2005).

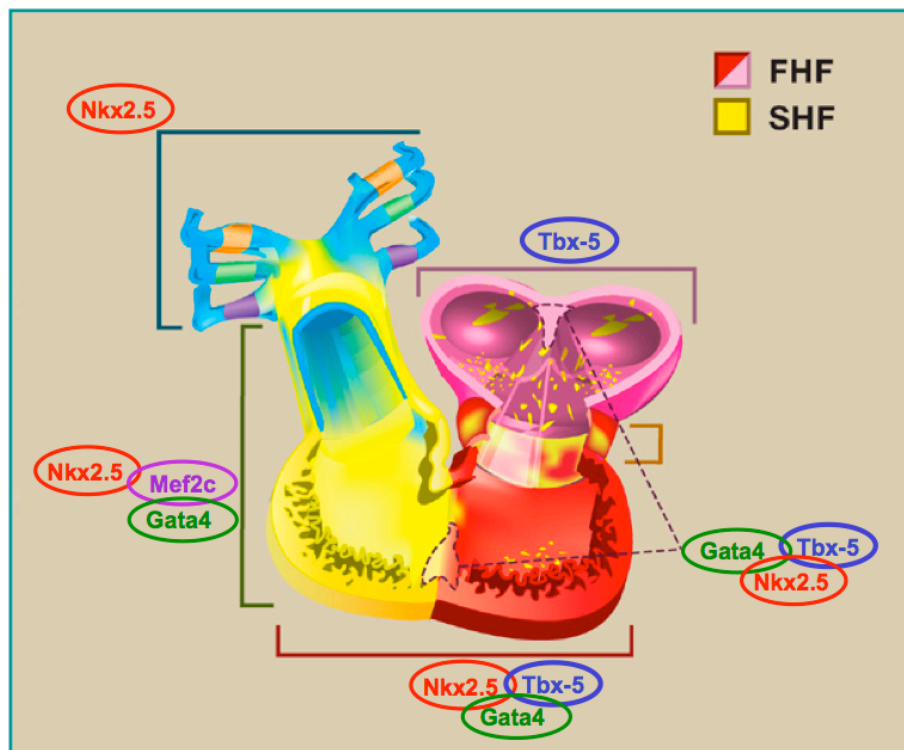
Las diferentes estructuras de un corazón morfológicamente maduro se originan de distintos campos cardiogénicos. El primer campo cardiogénico (FHF) está ampliamente estudiado, en el ratón aparece en estadio E7.5 (15 días de gestación en humano) y forma una estructura denominada creyente cardíaca, que alrededor del estadio E8 (20 días en humano) se fusiona en su porción media para formar el tubo cardíaco primitivo constituido por una capa interna de células endocárdicas y una externa de células miocárdicas que se comunican entre sí (Buckingham et al., 2005) (Figura 8). Estudios de linaje celular indican que este FHF sirve como andamiaje sobre el cual migra un segundo campo cardiogénico (SHF) que contribuye a formar los esbozos de las futuras cavernas cardíacas (Figura 8). Este segundo campo cardiogénico se identifica por la expresión del factor de transcripción *Isl1* (Cai et al., 2003). En este sentido, muchos factores transcripcionales que se expresan en el FHF también se expresan en el SHF (Zeisberg et al., 2005).



**Figura 8. Desarrollo cardíaco embrionario.** En etapa de creciente cardíaca (E7.5) dos poblaciones celulares pueden distinguirse: el primer campo cardiogénico (FHF) y el segundo campo cardiogénico (SHF). Ambas poblaciones celulares se fusionan en E8 para dar origen a tubo cardíaco que posteriormente iniciará un proceso de torsión (E9) que culminará con los esbozos de las cuatro cámaras cardíacas (E10). Ventrículo derecho (rv); ventrículo izquierdo (lv); aurícula derecha (ra); aurícula izquierda (la); tracto de salida (ot); seno venoso (sv). Modificado de Bruneau 2010.

Desde estadios tempranos del desarrollo embrionario, un amplio grupo de factores de transcripción dirigen el destino celular cardiogénico y la subsecuente morfogénesis cardíaca, tales como: Nkx2.5, Gata4, Mef2c, Tbx5, entre otros, (Srivastava, 2006) (Figura 9). En este sentido, se sabe que la deficiencia de Nkx2.5 es letal para los embriones murinos en estadio de E9.5 evidenciando la importancia de este factor de transcripción en etapas tempranas de la cardiogénesis (Lyons et al., 1995; Tanaka et al., 1999). Por otro lado, la deficiencia de Gata4 causa defectos en la septación atrial y ventricular (Garg et al., 2003). Del mismo modo, modelos murinos deficientes del factor transcripcional Tbx5 muestra carencia de miocitos atriales sugiriendo un rol crucial de este factor de transcripción en el destino celular de la SHF (Bruneau et al., 2001). Adicionalmente, Nkx2.5, Gata4 y Tbx5 interactúan para formar complejos

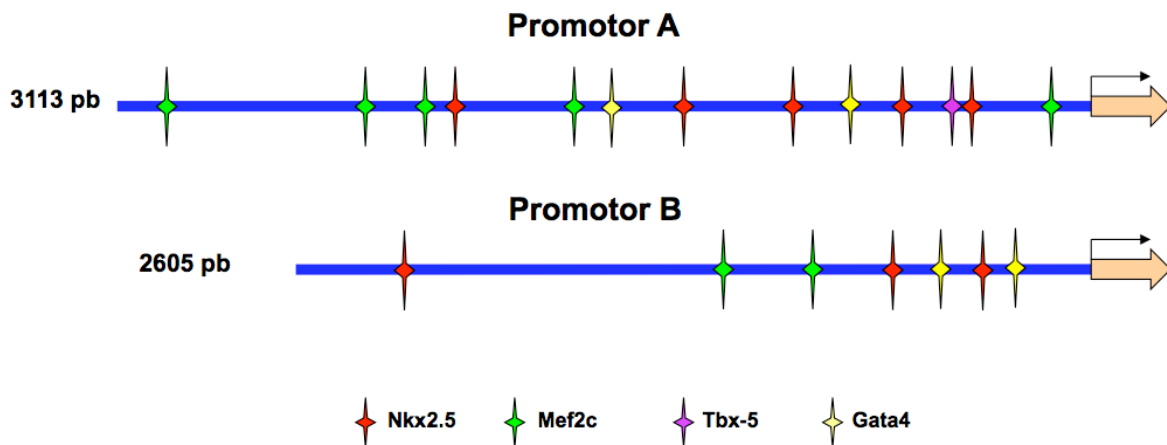
transcripcionales que regulan la expresión de genes cardiogénicos, la disrupción de este complejo conlleva defectos en la septación cardiaca atrial y ventricular (Garg et al., 2003). Otros factores de transcripción con miocardina, Mef2c y la proteína nucleadora Baf60c interactúan con los factores de transcripción antes mencionadas para modular la expresión génica en el tejido cardiaco conformando así una red transcripcional que modula la morfogénesis cardiaca en estadio embrionario (Bruneau et al., 2010).



**Figura 9. Regulación transcripcional región-específica durante la morfogénesis cardiaca (E9).** Factores de transcripción como Gata4, Nkx2.5, Tbx-5 y Mef2c interactúan en diferentes zonas del corazón embrionario para dirigir la morfogénesis del corazón. La deficiencia de alguno de estos factores de transcripción altera las vías de señalización que conllevan a un corazón morfológicamente maduro. Nkx2.5, Gata4 y Tbx-5 pueden interactuar en la región ventricular y en el tabique interatrial e interventricular; Nkx2.5 y Mef2c pueden interactuar en las estructuras originadas del segundo campo cardiogénico, mientras que Tbx-5 regula principalmente la morfogénesis atrial. Por su parte Nkx2.5 actúa en casi todas las estructuras cardiacas incluyendo el seno venoso. FHF: Primer campo cardiogénico; SHF: Segundo campo cardiogénico. Modificado de Srivastava 2006.



El análisis de las secuencias promotoras del gen *Sgca* muestran potenciales sitios de unión a factores transcripcionales cardiogénicos (Figura 10), esto aunado al hecho de que la proteína  $\alpha$ -SG se expresa en el tejido cardiaco adulto, sugiere que estos factores de especificación cardiogénica puedan estar modulando la expresión del gen *Sgca* en estadios tempranos del desarrollo cardiaco.



**Figura 10. Potenciales sitios de unión a factores de transición cardiogénicos.** El análisis de las secuencias promotoras del gen *Sgca* indica que ambos promotores (A y B) presentan secuencias de unión a Nkx2.5, Mef2c y Gata4 en diferente cantidad. Solo el promotor A muestra un sitio de unión a Tbx-5.

Con base en los antecedentes mencionados, en este trabajo nos enfocamos en determinar el patrón de expresión del mRNA A y mRNA B del gen *Sgca* durante el desarrollo embrionario del ratón. Así mismo, mediante ensayos de transfección en modelos celulares, evaluamos la capacidad moduladora de factores de transcripción específicos de músculo esquelético y músculo cardiaco sobre la actividad del promotor A y promotor B del gen *Sgca* de ratón.

## 2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Clínicamente, las distrofias musculares se clasifican de acuerdo al grupo muscular afectado. La deficiencia de proteínas miembro del sub-complejo sarcoglicano genera sarcoglicanopatias denominadas distrofias musculares de cintura (LGMD) que afectan básicamente los músculos de la cintura escapular y cintura pélvica, y en ocasiones al tejido cardiaco. El deterioro muscular en esta patología se debe al reemplazo del músculo por tejido conectivo y adiposo. La edad de inicio de las manifestaciones clínicas es variable y se desconoce la razón de ello. En un esfuerzo por entender la fisiopatología de la distrofia muscular generada por la ausencia de la proteína  $\alpha$ -SG (LGMD2D), en este trabajo analizamos la regulación transcripcional del gen *Sgca* durante el desarrollo embrionario del músculo esquelético y cardiaco. Conocer dichos mecanismos en el contexto espacio-tiempo permitirá sentar bases moleculares que coadyuven a futuras terapias génicas enfocadas al tratamiento de las distrofias musculares de tipo LGMD2D.

### **3.- HIPÓTESIS**

El gen *Sgca* de ratón se expresa desde estadios tempranos del desarrollo embrionario en tejido precursor del músculo estriado, así mismo, existe una modulación diferencial del promotor A y promotor B del gen *Sgca* mediada por factores de transcripción músculo esquelético y músculo cardiaco específicos.

#### 4.- OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón de expresión del mRNA A y mRNA B del gen *Sgca* durante el desarrollo embrionario murino, así como los factores de transcripción implicados en su regulación transcripcional.

##### Objetivos particulares

- Analizar los niveles de expresión del gen *Sgca* durante el desarrollo embrionario del ratón.
- Determinar el patrón de expresión del mRNA A y mRNA B del gen *Sgca* durante el desarrollo embrionario murino.
- Analizar el efecto de factores de transcripción MyoD, miogenina y Sox9 sobre la actividad del promotor A y promotor B del gen *Sgca* durante la miogénesis de células C2C12.
- Evaluar el efecto de los factores de transcripción cardiogénicos Nkx2.5, Gata4, Mef2c, Tbx-5, Baf60c y miocardina sobre la actividad del promotor A y promotor B del gen *Sgca* en fibroblastos embrionarios 10T1/2.

## **5.- MATERIAL Y METODOS**

### **5.1.- Animales**

Los procedimientos realizados en los animales cumplieron los requerimientos que en la materia determinan la NOM-062-ZOO-1999 ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO, SAGARPA; y la GUÍA PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO, National Research Council:

El diseño y realización de los procedimientos con base en su relevancia para la salud humana y animal, el avance del conocimiento y el bien de la sociedad.

- El uso de las especies, calidad y número apropiados de animales.
- El evitar o reducir al mínimo la incomodidad, estrés y dolor, siempre y cuando sea compatible con una buena ciencia.
- El uso apropiado de sedación, analgesia y anestesia.
- El establecimiento de metas y objetivos en el experimento.
- Brindar un manejo apropiado a los animales, dirigido y realizado por personas calificadas.
- La conducción de experimentos en animales vivos sólo por, o bajo la, estricta supervisión de personas calificadas y con experiencia.

Todos los residuos biológicos derivados del estudio se manejarán de acuerdo a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos.

Todos los experimentos se realizaron en embriones y especímenes adultos de ratón de la cepa CD1 proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y el bioterio de la Escuela Superior de Medicina del IPN. Se obtuvieron embriones de 9.25 días poscoito (E9.25), E10.5, E12, E13, E14 E15.5, E17 y E18.5.

## **5.2.- Extracción de RNA y ensayos de RT-PCR**

Para extracción del RNA total de tejidos embrionarios (Corazón y músculo esquelético de E9.25, E10.5, E12, E14 E15.5, E17 y E18.5.), adulto y cultivos celulares (línea celular C2C12 y cultivo primario de células satélites), se utilizó TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) acorde a las especificaciones del proveedor. Después de la extracción, se generó cDNA partiendo de 3µg de RNA total usando el Kit first-strand synthesis (Invitrogen) que contienen la enzima transcriptasa reversa. Por RT-PCR se analizó la expresión de los genes *Sgca* (mRNA A y mRNA A+B), *MyoD*, *myogenina*, *Sox9*, *Pax7* y *Pax3* para los cuales se utilizaron los primers mostrados en la tabla 1. La mezcla de reacción para cada PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µl usando el FastStart High Fidelity PCR System . Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Un periodo de pre-incubación a 95 °C por 3 min seguido por 34 ciclos, cada ciclo consistió en un

periodo de 30 seg de desnaturalización a 95 °C seguidos por un tiempo de alineamiento de los primers de 30 seg a 65 °C y un periodo de extensión de 30 seg a 72 °C. Por último un periodo de extensión final de 7 min a 72 °C.

Los ensayos de qRT-PCR se realizaron en un LightCycler 480 II Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) y se utilizó SYBR Green-based (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) para detectar la amplificación del cDNA. En este caso las condiciones de amplificación fueron las siguientes: preincubación de 5 min a 95 °C seguido de 40 ciclos; cada ciclo consistió de 10 seg de desnaturalización a 95 °C, 10 seg de alineamiento a 72 °C y 15 seg de extensión a 72 °C; y una extensión final de 7 min a 72 °C. En todos los casos para normalizar los valores de la RT-PCR se amplificó el gen de Gapdh.

### **5.3.- Generación de ribosondas e hibridación *in situ***

Las ribosondas fueron generadas por clonación de dos fragmentos del cDNA del gen de *Sgca* en el plásmido pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI) utilizando los primers  $\alpha$ -173 F/R y  $\alpha$ -447 F/R (Tabla 1). Después de secuenciar y verificar la orientación de los fragmentos clonados, el plásmido fue cortado con las enzimas Nco I o Pst I (New England Biolabs, Ipswich, MA) con una consecuente transcripción *in vitro* para obtener la ribosonda antisentido y sentido. Las ribosondas fueron generadas en presencia de digoxigenin-UTP (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) usando las enzimas T7 or SP6 RNA polymerase (Invitrogen). Después de la transcripción las ribosondas fueron precipitados con

etanol usando tRNA de levadura (Invitrogen) como acarreador.

Para la detección de los mRNA's del gen de  $\alpha$ -SG se usaron dos ribosondas, la primera;  $\alpha$ -SG-173 hibrida con el exón 1 del mRNA A que lo identifica exclusivamente, y la ribosonda  $\alpha$ -SG-447 que hibrida desde el exón 2 hasta el exón 6 de ambos mRNA's (A y B). Esta última ribosonda, al hibridar con ambos mRNA's, puede darnos información exclusiva del mRNA B solo cuando no se observa señal con la ribosonda  $\alpha$ -SG-173. Las hibridaciones *in situ* en cuerpo completo fueron realizadas en embriones (E9.25, E10.5, E12 y E13), así como también en corazones y extremidades fetales (E15.5, E17 y E18.5) usando ribosonda antisentido y sentido en todos los experimentos con modificaciones menores del protocolo mostrado por Chimal-Monroy y cols., 2002. Brevemente: Los embriones y el tejido fetal fueron fijados toda la noche con paraformaldehído al 4% preparado en fresco. Después de este periodo de fijación los especímenes fueron deshidratados en metanol:PBT (PBS al 0.1% de Tween-20) a diferentes proporciones del alcohol (25%, 50%, 75% y 100%). Al final de la deshidratación los especímenes fueron guardados a -20 °C hasta su uso. Después de la deshidratación y preparación de la ribosonda, los especímenes se rehidrataron en concentraciones seriadas de metanol:PBT (75%, 50%, 25% y PBT) para su posterior tratamiento con proteinasa K (35  $\mu$ g/mL). Los tiempos de incubación con proteinasa K fueron los siguientes: 10 min a 0 °C, seguidos por 20 min a 10 °C, y finalmente, dependiendo de la etapa de desarrollo del espécimen, un periodo de 20 a 40 min a 15 °C. La hibridación con la ribosonda fue hecha a 65 °C mientras que los lavados de la misma se realizaron a at 68 °C. La señal de la hibridación



fué visualizada con el sustrato de la fosfatasa alcalina BM purple (Roche). El tiempo de revelado de la señal fue desde 4 horas para los embriones mas pequeños, hasta 7 días para algunos tejidos fetales. Después de fotografiar los especímenes, éstos fueron cortados en vibratomo a 70  $\mu\text{m}$  para observar con mejor detalle la estructura embrionaria en donde se localizó la señal de la ribosonda.

Para las hibridaciones *in situ* hechas en corte, después de la deshidratación de los especímenes con methanol:PBT, corazones y extremidades embrionarias fueron embebidas en parafina. Posteriormente con el uso del microtomo se realizaron cortes de 10 $\mu\text{m}$  en los cuales se hibridó las ribosonda antisentido y sentido toda la noche a 65 °C. Después de los lavados de la ribosonda (65 °C), los cortes fueron incubados con anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina y revelados con sustrato BM purple.

## **5.4.- Cultivos celulares**

### **5.4.1.- Cultivo primario de células satélites**

La obtención de células precursoras miogénicas de músculo esquelético se realizó como previamente describe Gharaibeh y cols., (2008) con modificaciones menores. Brevemente; el músculo esquelético se obtuvo de las extremidades superiores e inferiores de ratones de entre 14 y 20 días de edad. Las células fueron extraídas por una serie de disociaciones enzimáticas a 37°C en agitación; 0.2% de collagenasa tipo II (Invitrogen) fpor 1 h, 2.4 u/ml de dispasa (Invitrogen)

por 45 min, y 0.1% de trypsin-EDTA (Invitrogen) por 30 min. Después de la disociación enzimática, el producto de la digestión enzimática fue pasado por una malla de 40µm para separar las células satélites del resto del tejido muscular. Las células obtenidas se resuspendieron en medio de proliferación (DMEM/F10 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) (Invitrogen), 10% de suero de caballo (SH) (Invitrogen), 0.5% de extracto de embrión de pollo (EEC) (US Biológica), y 1% de Penicilina-streptomina (Invitrogen)). Posteriormente la suspensión celular fue sembrada en cajas tratadas con colágena para favorecer su adhesión. El enriquecimiento de la población miogénica se realizó por resiembra como lo indica Lu y cols. 2008, usando la velocidad de adhesión de las células satélites como factor principal de separación. Para inducir la diferenciación de estas células miogénicas, se cambió el medio de crecimiento por medio de diferenciación (DMEM suplementado con 5% de SFB y 1% de penicilina-streptomina) durante 6 días.

#### **5.4.2.- Cultivo de células C2C12 y fibroblastos 10T1/2**

Las líneas celulares C2C12 y 10T1/2 son derivadas de ratón y adquiridas en ATCC (No. 1772 y 226 respectivamente). Ambas líneas celulares fueron mantenidas en proliferación en medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% de penicilina-streptomina (Invitrogen). Para inducir la diferenciación de las células C2C12 se cambió el medio de crecimiento por medio de diferenciación (DMEM suplementado con 1% de suero de caballo y 1% de penicilina-streptomina) por 6 días (Miotubos de día 6 = MT6). Todos los cultivos celulares

fueron incubados a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **5.5.- Inmunofluorescencia**

Mediante una inmunofluorescencia indirecta se observó la capacidad de de las células satélites para generar miofibras diferenciadas. El cultivo de células satélites se indujo a diferenciación durante seis días, posteriormente, las células se fijaron con metanol durante 10 minutos a -20 °C. Para permeabilizar la membrana, las células se lavaron tres veces en PBS-T por 10 minutos y se incubaron con 0.2% de Tritón X-100 en PBS durante 5 minutos. En seguida, se incubaron en solución bloqueadora ( 5 % de BSA y 5% de SFB en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con anticuerpo primario contra la proteína distrofina (Dys) (Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:100 durante toda la noche a 4°C. Subsecuentemente, se lavaron tres veces en PBS-T por 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario (Alexa 488, Molecular Probes) en una dilución 1:200 en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de este periodo, las células se lavaron tres veces con PBS-T. Finalmente las células fueron incubadas con DAPI durante 10 min y analizadas en un microscopio de epifluorescencia (Olympus, BX51WI), equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus America, Inc.).

### **5.6.- Construcciones y plásmidos**

La región 5' que flanquea al exón 1 del gen *Sgca* de ratón (promotor A) fue

amplificada y clonada río arriba del gen reportero luciferasa en el sitio *KpnI* del plásmido pGL3-Basic (Promega), dicha región clonada abarca el sitio de inicio de la transcripción a partir del exón 1 (-3113/+28 bp). Para generar esta construcción se utilizaron los primers pA3113 F/R (Tabla 1). La integridad de la construcción fue confirmada por secuenciación, y nombrada pA3113LUC. La construcción pB2605LUC abarca al promotor B (intrón 1) del gen  $\alpha$ -SG de ratón que contiene al sitio de inicio de la transcripción a partir del exón 2 (2605/+4 bp). Esta construcción fue reportada previamente como FB1 por Delgado-Olguin y cols., 2006. La construcción pQBI-MyoD y pMyogenina, que codifican para las proteínas MyoD y miogenina, fueron amablemente donados por el Dr. Bulmaro Cisneros (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, México D.F.). El plásmido pcDNA N-Myc-Sox9 que codifica para Sox9 fue previamente reportado por nuestro grupo de investigación (Hernández-Hernández et al., 2009), y los plásmidos que codifican para las proteínas Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c and myocardin fueron proporcionados por el Dr. Benoit G. Bruneau (Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA).

### **5.7.- Transfección de células C2C12 y 10T1/2**

Para cada medición de la actividad luciferasa se sembraron de manera independiente; 100,000 células C2C12 ó 500,000 células 10T1/2 en pozos de 2.5 cm de diámetros (cajas de 6 pozos) por duplicado. Después de 24hrs en medio de crecimiento, las células fueron transfectadas durante 5hrs con la siguiente mezcla: 4 $\mu$ L de lipofectamina 2000 (Invitrogen), 1 $\mu$ g de construcción promotora

(pA3113LUC ó pB2605LUC) y 150ng del vector pRL/CMV que codifica para la luciferasa de *Renilla reniformis* utilizada como control de transfección. Además la mezcla contenía 500ng de vector que codificaba para el factor de transcripción que se deseaba analizar, según el caso; MyoD, miogenina, Sox9, Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c ó myocardin. Todo esto en un volumen final de 120 $\mu$ L por cada pozo. Una vez cumplida las 5hrs de transfección, se reemplazó la mezcla de transfección por medio de crecimiento, cambiando este último cada 24hrs hasta la cosecha de cultivo y su posterior medición de la actividad luciferasa.

### **5.8.- Ensayos de luciferasa**

Las células C2C12, previamente transfectadas, fueron cosechadas como mioblastos (MB) a las 24hrs o como miotubos con 2 y 4 días de diferenciación (MT2 y MT4 respectivamente), mientras que los fibroblastos 10T1/2 fueron cosechados 48h pos-transfección. La actividad luciferasa fue medida usando el Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega), de acuerdo a las instrucciones de la hoja técnica en un luminómetro modelo TD-20/20 (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA).

### **5.9.- Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Se obtuvieron corazones de fetos de ratón en E17, una vez extraído el tejido, inmediatamente se congeló en nitrógeno líquido hasta su utilización. La cromatina fue obtenida con el kit: Magna ChIP G Tissue Kit (Millipore) siguiendo

todas las recomendaciones de la hoja técnica. Una vez verificada la integridad y tamaño de los fragmentos de cromatina, se procedió a la inmunoprecipitación de la misma utilizando 5µg de anticuerpo anti-Gata4 (Santa Cruz Biotechnology) o anti-IgG (Santa Cruz Biotechnology). Después de revertir el entrecruzamiento del inmunoprecipitado, se procedió a purificar el ADN para su análisis por PCR. Dos fragmentos del promotor B que contienen sitios de unión al factor de transcripción Gata-4 (-200pb and -573pb) fueron amplificados con los primers Gata4-200 F/R y Gata4-573 F/R (Tabla 1). Como control negativo se utilizó exón 4 del gen  $\alpha$ -SG usando los primers  $\alpha$ -SGE4 F/R (Tabla 1). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo at 95 °C por 3 min, 34 ciclos a 95 °C por 30s, 63 °C por 30s, 72 °C por 30s, y una extensión final a 72 °C por 7 min.

#### **5.10.-Análisis estadístico**

La prueba estadística utilizada para comparar las diferencias en los ensayos de transfección fue la U de Man Whitney, usando un valor de  $P < 0.05$ .

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados en los ensayos de RT-PCR y PCR

PRIMERS	Forward	Revers
<b>RT-PCR</b>		
<i>α-SG A</i>	5'-atggaaacctgaactgagacat-3'	5'-taggtgtaaagttgtctgctgg-3'
<i>α-SG A+B</i>	5'-ggcagcagcagtaacttgatac-3'	5'-ctgtgacctcgatgacttggtac-3'
<i>MyoD</i>	5'-ccccgacggctctctctgct-3'	5'-tcactttgctcaggcggcgg-3'
<i>Miogenina</i>	5'-cacagcgcctcctgcagtcc-3'	5'-cgctgggctgggtgtagcc-3'
<i>Sox9</i>	5'-gggctcgcgtatgaatctcct-3'	5'-gaccaccccgattacaagtac-3'
<i>Pax7</i>	5'-gactccggatgtggagaaaa-3'	5'-gagcactcggctaatacgaac-3'
<i>Pax3</i>	5'-attccttcgaacgcagacag-3'	5'-accgtggttggtcagaagtc-3'
<i>Gapdh</i>	5'-atccatcaccatctccag-3'	5'-tgtggtcatgagtcctcca-3'
<b>PCR pA3113LUC</b>		
<i>pA3113</i>	5'gcgcggtacctactggagtgctgacagatga3'	5'gcgcggtacctgtgccagatcaccttgatatac3'
<b>PCR Ribosondas</b>		
<i>α-173</i>	5'-aatgcctgtctgtgagcct-3'	5'-gaatgtccaagcaaagatgtc-3'
<i>α-447</i>	5'-ggcagcagcagtaacttgatac-3'	5'-ggcagcacctcctccacatcat-3'
<b>PCR ChIP</b>		
<i>Gata4-200</i>	5'-caaagcaggcaaacagacaa-3'	5'-ctgactctggggtggacact-3'
<i>Gata4-573</i>	5'-cacacagagtcctgggttca-3'	5'-gctggcctcaaacatgctat-3'
<i>α-SGE4</i>	5'-actgtccgactcacctacca-3'	5'-tgacttggtacccacgatct-3'

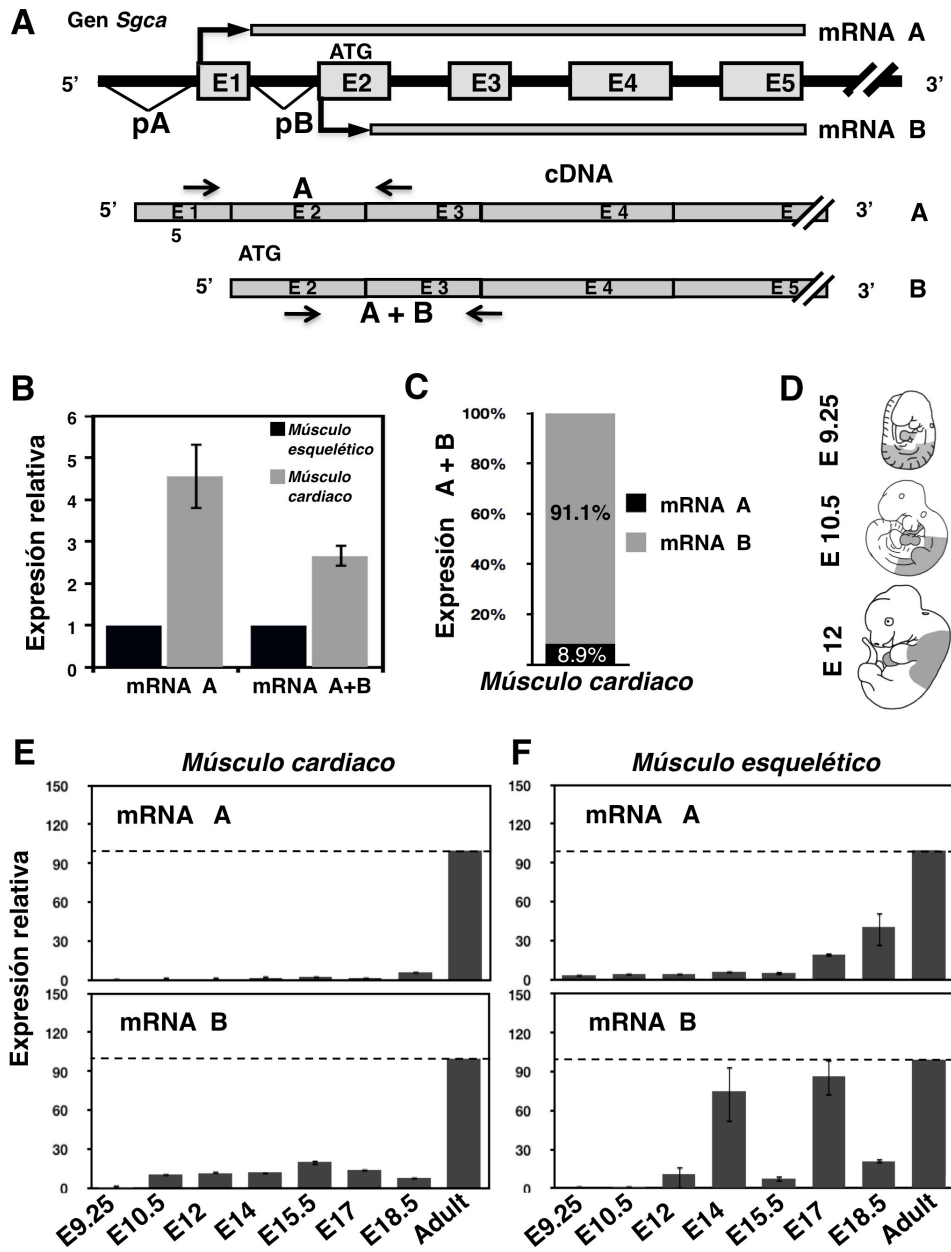
## 6.- RESULTADOS

### 6.1.- El mRNA B es mas abundante que el mRNA A durante el desarrollo embrionario del ratón

En humanos y en ratón, la proteína  $\alpha$ -SG es expresada exclusivamente en el músculo estriado diferenciado (Mizuno et al., 1993; Yamamoto et al., 1994; McNally et al., 1994; Duclos et al., 1998); por otro lado, en embriones humanos de cuatro semanas el mRNA del gen *Sgca* es detectado en células precursoras cardiacas y del musculo esquelético (Fougerousse et al., 1998). En este sentido, para determinar los niveles de expresión del gen *Sgca* en el músculo estriado, realizamos ensayos de qRT-PCR en diferentes etapas del desarrollo embrionario y en el ratón adulto. Para analizar los mRNAs originados del gen *Sgca* de ratón (Wakabayashi-Takai et al., 2001), diseñamos dos pares de primers; el primero detecta específicamente al mRNA mas largo que contiene al exón 1 no codificante (mRNA A), y el segundo par de primers identifica ambos mRNAs (mRNA A y mRNA B) debido a que el mRNA B es contenido dentro de la secuencia del mRNA A (Figura 11A). El análisis de qRT-PCR mostró que los mRNA A y mRNA A+B son mas abundantes en el tejido cardíaco que en el músculo esquelético en estadio adulto (Figura 11B).

Para determinar la contribución del mRNA A a los valores totales de mRNA A+B, restamos el valor de  $\Delta$ CP de mRNA A al valor  $\Delta$ CP de mRNA A+B (Figura 11C). La subtracción se hizo entre valores  $\Delta$ CP obtenidos en el mismo tejido para ambos mRNAs.





**Figura 11. Estructura y expresión del gen *Sgca* en músculo cardíaco y músculo esquelético.** **A:** Localización de los promotores A y B (pA y pB) en la región 5' del gen *Sgca*. El pA induce la expresión del mRNA A y el pB dirige la transcripción del mRNA B; la posición de los primers para la qRT-PCR en los mRNAs A y B están marcados por  $\rightarrow\leftarrow$ . **B:** Expresión relativa del mRNA A y mRNA B en músculo cardíaco y músculo esquelético de ratones adultos. **C:** Contribución del mRNA A y mRNA B a la expresión del gen *Sgca* en tejido cardíaco adulto. **D:** Representación esquemática de embriones de E9.25, E10.5 y E12. Las áreas oscuras indican la región de la cual fue obtenido el RNA total en cada etapa del desarrollo. **E-F:** qRT-PCR para ambos mRNAs (A y B) del gen *Sgca* usando RNA total obtenido de músculo cardíaco y músculo esquelético de diferentes etapas del desarrollo murino. Los valores fueron normalizados contra la expresión del gen interno *Gapdh*, y comparados con la expresión obtenida en estadio adulto (Línea punteada). Las barras indican la desviación estándar tres mediciones hechas por triplicado de un "pool" de 15 embriones por etapa. E: día embrionario.

De esta manera, se encontró que en el tejido cardiaco mas del 91% de la medición A+B corresponde al mRNA B (Figura 11C); por lo tanto, nosotros consideramos que la amplificación con el segundo par de primers es prácticamente la amplificación del mRNA B. Sobre esa misma estrategia analizamos la expresión de ambos mRNAs en tejido embrionario y fetal. Para embriones de estadio E9.25, E10.5 y E12.0, el análisis se realizó a partir de RNA total extraído de corazones completos y tejido que contenía células precursoras de músculo esquelético (áreas oscuras en Figura 11D). En el caso de los estadios fetales E14, E15.5, E17 y E18.5, el músculo esquelético fue obtenido de las extremidades.

En el desarrollo del corazón, los niveles de expresión del mRNA A fueron muy bajos en comparación con el tejido cardiaco adulto (Figura 11E, arriba). En contraste, el mRNA B fue ligeramente detectado en E9.25 e incrementó sus niveles significativamente en E10.5, E12 y E14 estadios correspondiente a un alto grado de proliferación de cardiomiocitos (Sucov et al., 1994; Merki et al., 2005), y un pico máximo de expresión fue observado en E15.5 durante el crecimiento del tabique interventricular (Rosenthal and Harvey, 2010). Estos niveles tienden a decrecer en estadios E17 y E18.5 (Figura 11E, abajo).

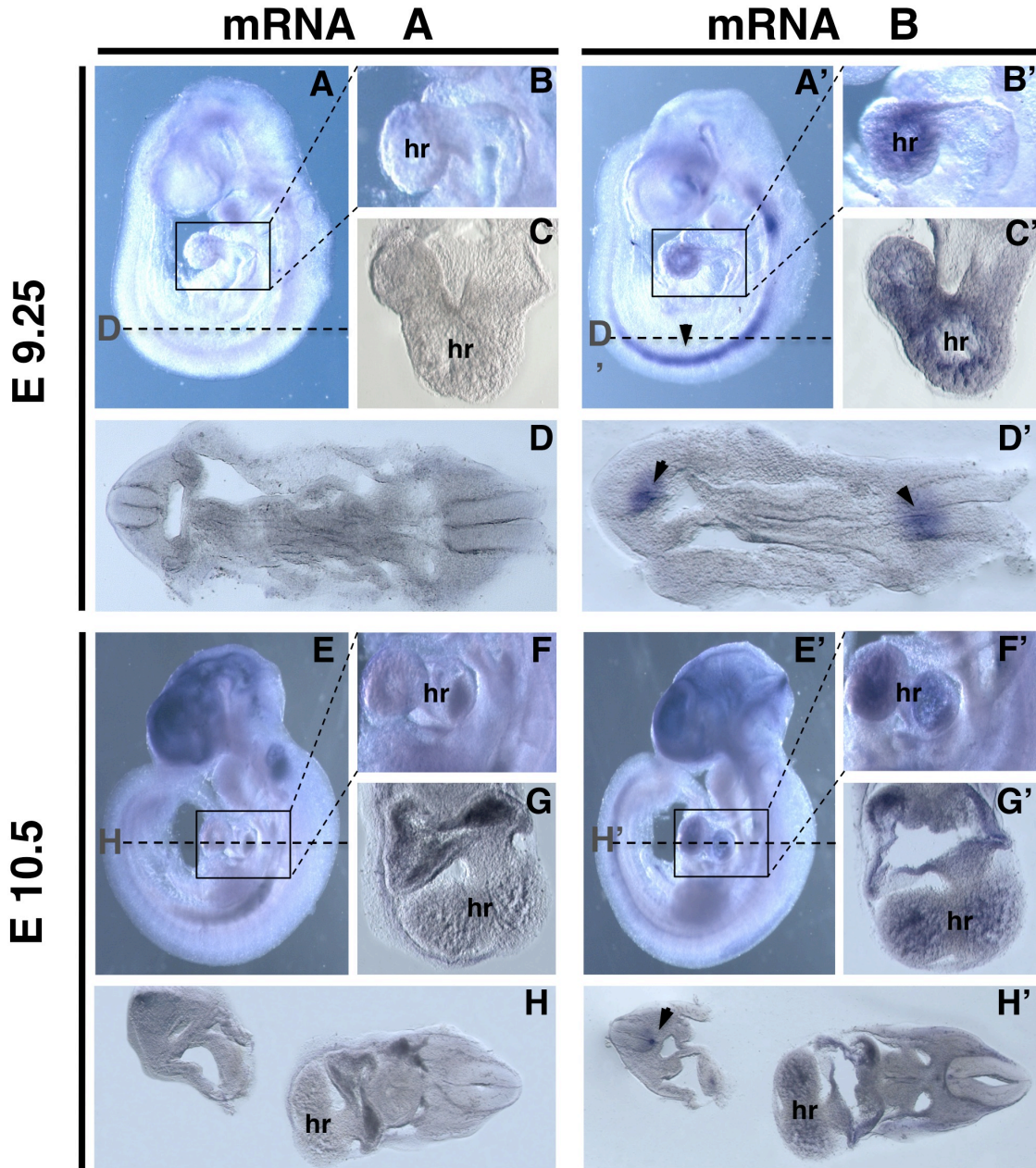
En el músculo esquelético se detectaron bajos niveles de mRNA A desde E9.25 hasta E14, el nivel de expresión incrementa gradualmente en etapas fetales de E15.5 a E18.5 (Figura 11F, arriba). Esto sugiere que el promotor A podría estar regulando positivamente la expresión del mRNA A en un periodo marcado por una extensa formación de miotubos (Ontell and Kozeka, 1984; Ontell et al., 1988).

Interesantemente, el mRNA B fue detectado de manera importante desde E12 con dos picos máximos de expresión en E14 y E17; con marcado decremento en E15.5 y E18 (Figura 11F, abajo).

## **6.2.- Patrón de expresión diferencial del mRNA A y mRNA B del gen $\alpha$ -SG durante el desarrollo embrionario del ratón.**

Para analizar el patrón de expresión del mRNA A y el mRNA B del gen  $\alpha$ -SG en desarrollo embrionario murino, se realizaron hibridaciones *in situ* en cuerpos completos en diferentes etapas embrionarias (E9.25, E10.5, E12 y E13) y fetales (E15, E17 y E18.5).

Se observó una expresión diferencial entre el mRNA A y en mRNA B en E9.25 (Figura 12A y A') y en E10.5 (Figura 12E y E'). Esas diferencias son observadas a mas detalle en las amplificaciones (Figura 12B, B', F y F') que fueron confirmadas en los cortes en vibratomo del corazón (Figura 12C, C', G y G') y notocorda (Figura 12D, D', H y H') en donde únicamente la señal correspondiente a la expresión del mRNA B fue observada. Esta observación es consistente con lo observado por qRT-PCR donde mRNA A no se detecta a E9.5 y E10.5 en el tejido cardiaco (Figura 11E, arriba) y en bajos niveles en músculo esquelético (Figura 11F, arriba). En adición, no se observó señal evidente para mRNA A o mRNA B en somitas de E9.25 y E10.5 lo que sugiere que la expresión del gen  $\alpha$ -SG en CPM puede estar ocurriendo en etapas posteriores a la determinación miogénica (Rudnicki et al., 1993; Kassari- Duchossoy et al., 2004).



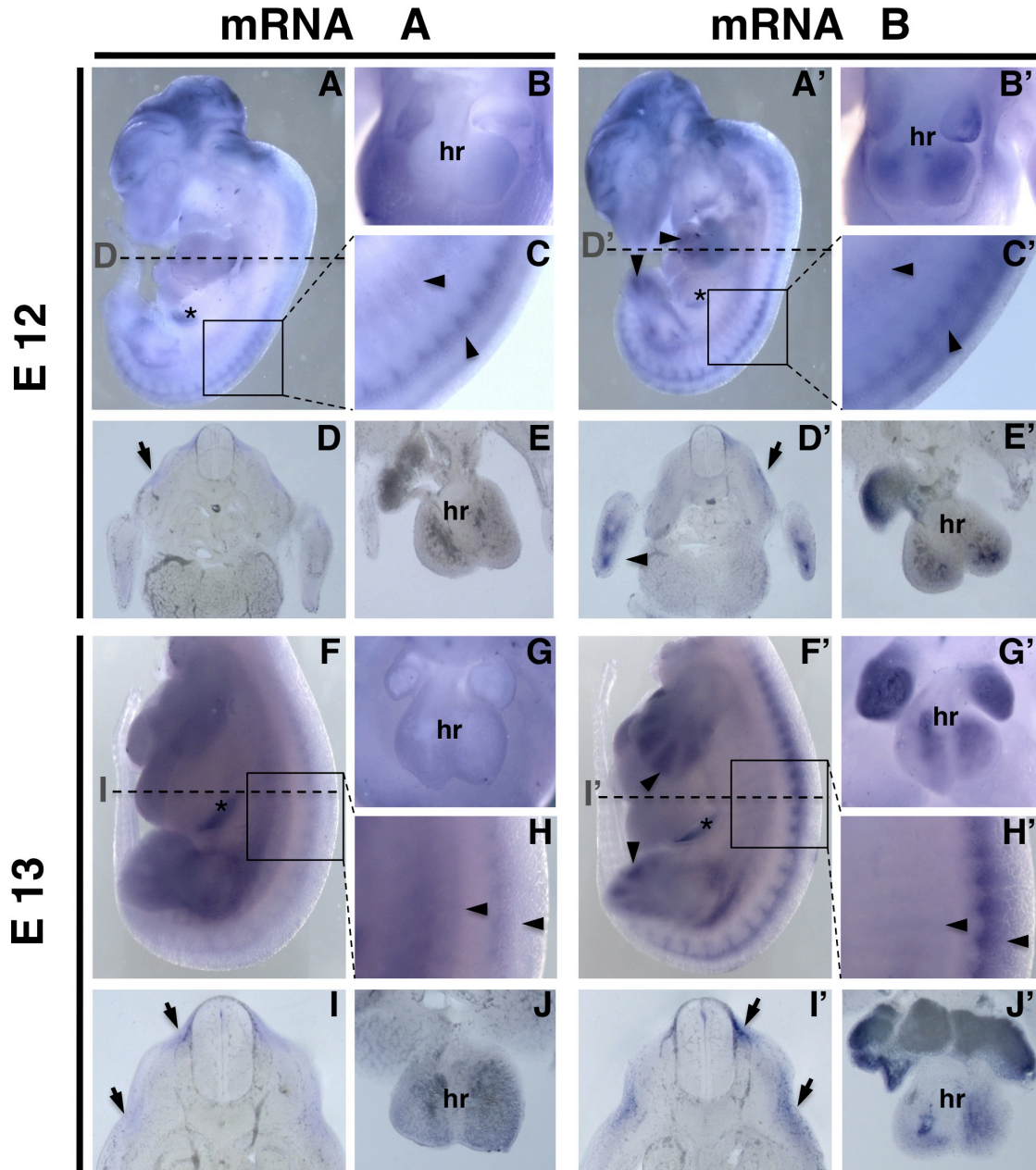
**Figura 12. Expresión del gen *Sgca* en etapas E9.25 y E10.5 del desarrollo murino.** Hibridación *in situ* en cuerpo completo. **A-H:** Detección del mRNA A inducido por la actividad del promotor A. **A'-H':** Detección del mRNA B inducido por la actividad del promotor B. Los cortes en vibratomo muestran con mayor precisión la localización de la señal en el tejido cardíaco (**C' y G'**) y notocorda (**D' y H'**). Las flechas indican la ubicación de la notocorda. Los experimentos fueron hechos por triplicado con cinco embriones por cada experimento y sus respectivos controles de ribosonda sentido.

La expresión del mRNA A y mRNA B fue observada en el músculo esquelético de embriones en E12 y E13 (Figura 13A, A', F y F'). Ambos mRNAs fueron observados en una posición medio-dorsal que asemeja la localización de los músculos intercostales entre las extremidades superiores e inferiores (Flechas en figura 3C, C', H y H') en donde la señal observada para mRNA B fue mas intensa que la observada para mRNA A. Por otro lado, la señal de mRNA B fue más evidente en comparación a la de mRNA A en regiones dorsales diferentes a los músculos intercostales (Figura 13A, A', F y F'; punta de flecha en figura 13C, C', H y H').

La expresión de ambos mRNAs fue evidente en áreas que pueden relacionarse al miotomo lateral, dermomiotomo dorsolatero y a células mesenquimales que rodean la región dorsal de las somitas (Flechas en figura 13D, D', I e I'). Adicionalmente encontramos una marcada expresión del mRNA B en los interdígitos de extremidades superiores e inferiores en embriones de E12 y E13 (Punta de flecha en figura 13A', D', F' y figura 16). El estómago y la lengua también mostraron señal de expresión para ambos mRNAs del gen de *Sgca*; En el estómago se observó señal desde E12 a E15.5 (Asterisco en figura 13A, A', F, F' y figura 16) y en lengua la señal fue evidente en E13 y E15.5 (Figura 16).

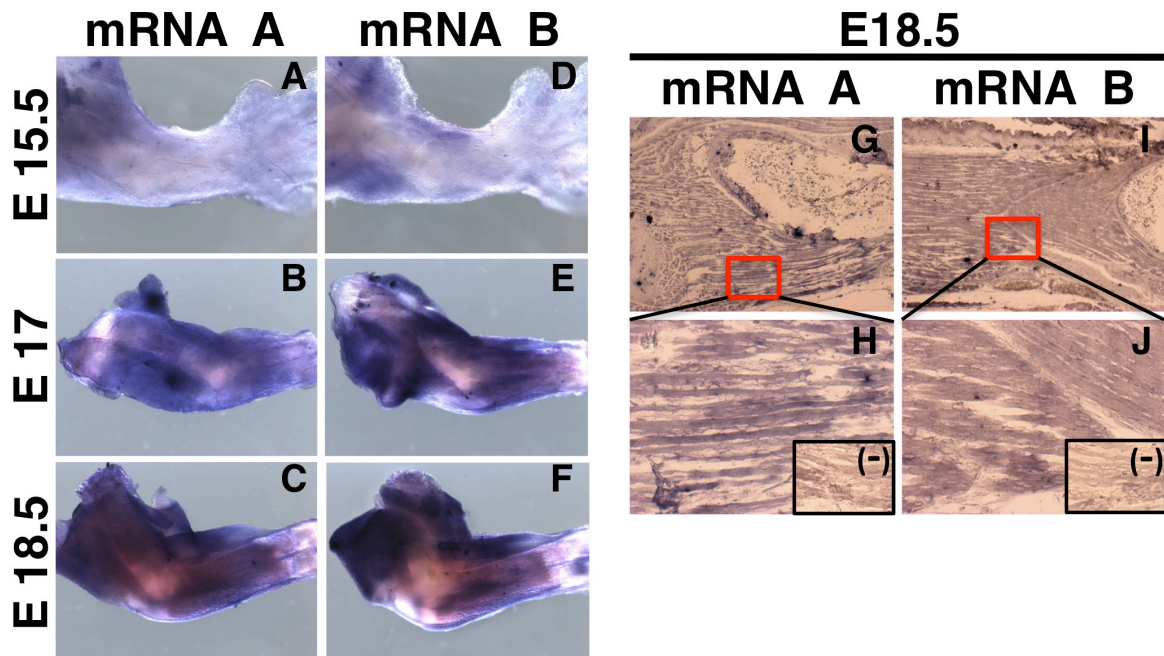
En el corazón, el mRNA A fue observado en la región ventricular a partir de E13 (Figura 13J), mientras que el mRNA B fue expresado en atrios y ventrículos tanto en E12 y E13 (Figura 13B', E', G' y J').



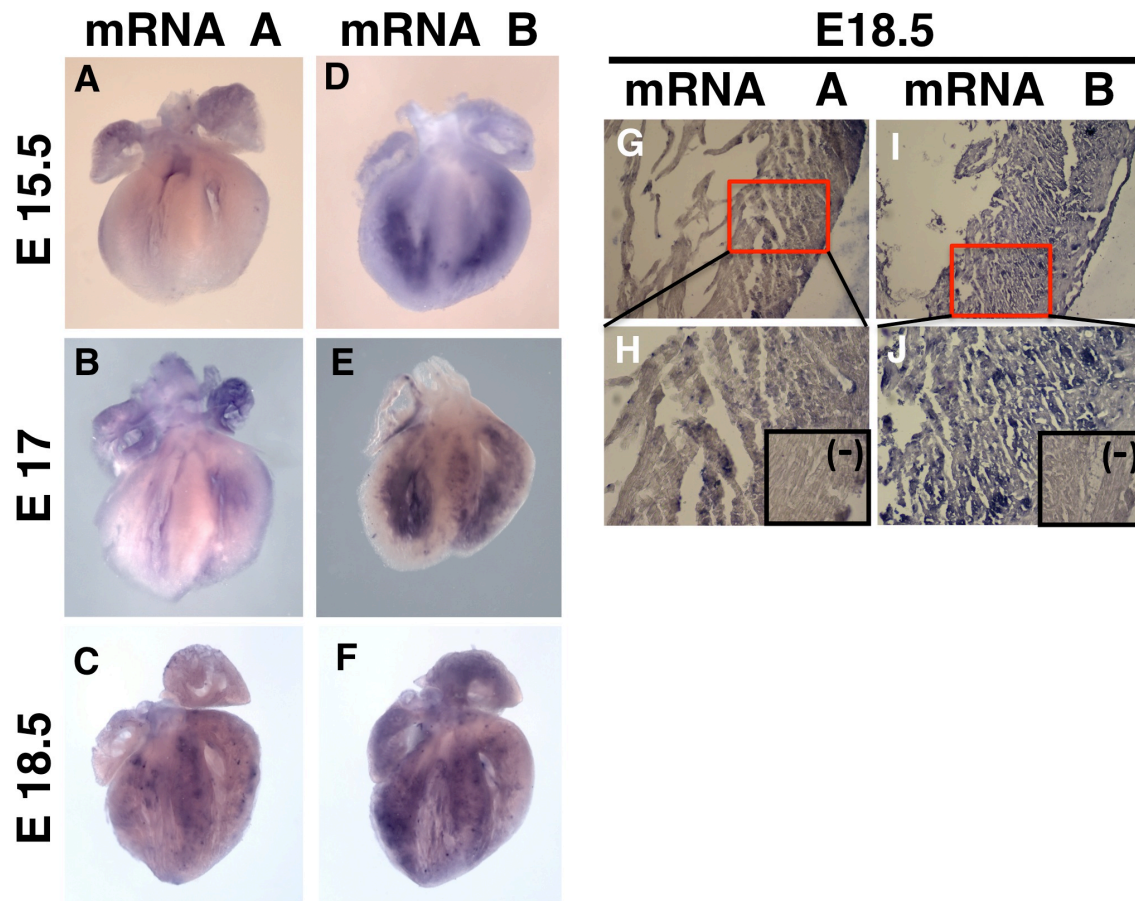


**Figura 13. Expresión del gen *Sgca* en etapas E12 y E13 del desarrollo murino.** Hibridación *in situ* en cuerpo completo. **A-J:** Detección del mRNA A inducido por la actividad del promotor A. **A'-J':** Detección del mRNA B inducido por la actividad del promotor B. El mRNA A es expresado en el mesodermo precursor de músculos intercostales así como también en células precursoras del músculo que rodeará a las vertebrae (Flechas en C, D, H y J). El mRNA B presentó el mismo patros de expresión solo que con mayor intensidad en la señal (C', D', H' y J'). Los cortes en vibratomo hacen evidente la expresión del gen  $\alpha$ -SG en el dermomyotomo (D, D', J y J'), atrios y ventrículos cardiacos (E', J y J'). En adición, ambos mRNAs son expresados en el estómago de los embriones en E12 y E13 (Asteriscos en A, A', F y F'). Los experimentos fueron hechos por triplicado con cinco embriones por cada experimento y sus respectivos controles de ribosonda sentido. hr:corazón.

En etapas fetales (E15.5, E17 y E18), los paquetes de fibras musculares de las extremidades son marcados con ambas ribosondas como lo muestra la hibridación *in situ* en cuerpo completo (Figura 14A-F); sin embargo, la señal del mRNA B (Figura 14D-14F) es mas intensa que la del mRNA A en todos los casos (Figura 14A-14C). Al igual que en el músculo esquelético, en los estadios fetales E15.5, E17 y E18, la intensidad de la señal en corazón es mayor para el mRNA B que para el mRNA A, dicha señal es observada preferencialmente en la región ventricular (15A-15F).



**Figura 14. El gen de *Sgca* es expresado en músculo esquelético de E15.5, E17 y E18.8.** Hibridación *in situ* en bloque (A-F). **A-C:** Detección del mRNA inducido por la actividad del promotor A (mRNA A). **D-F:** Detección del mRNA inducido por la actividad del promotor B (mRNA B). La presencia de ambos mRNAs fue confirmada por hibridación *in situ* en cortes de músculo esquelético de E18.5 (**G**; **I**). La expresión se aprecia mejor en las ampliaciones observadas en **H** y **J**, en donde también se muestra los respectivos controles negativos hechos con la sonda sentido (-). Cada experimento fue hecho por triplicado con su respectivo control negativo.

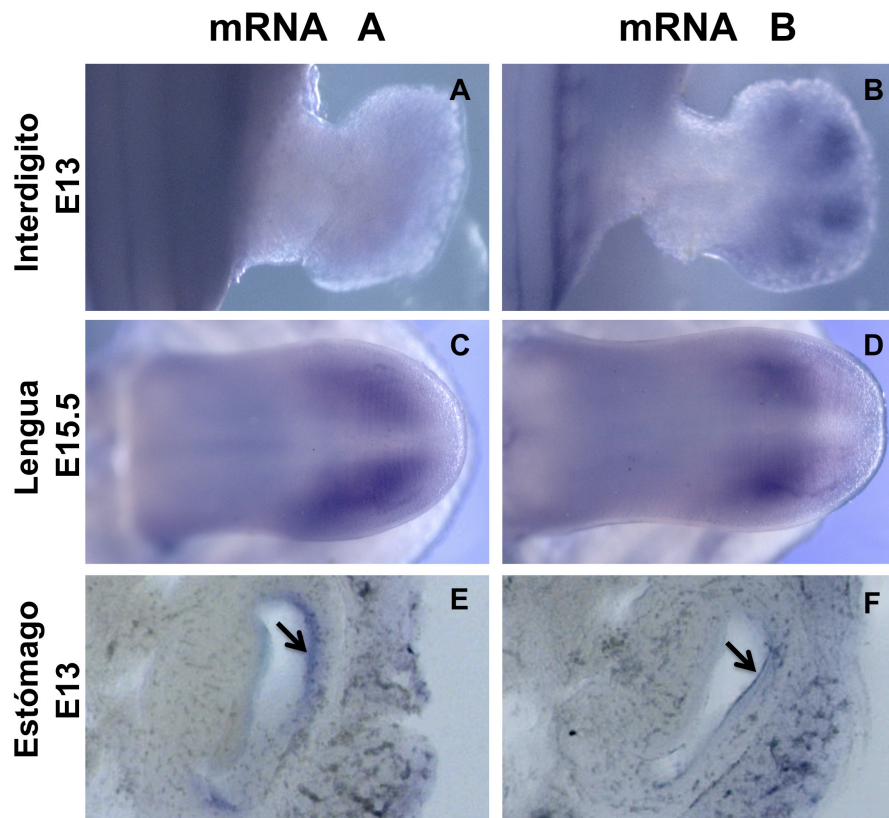


**Figura 15. El gen *Sgca* es expresado en músculo cardíaco de E15.5, E17 y E18.8.** Hibridación *in situ* en cuerpo completo (A-F). A-C: Detección del mRNA inducido por la actividad del promotor A (mRNA A). D-F: Detección del mRNA inducido por la actividad del promotor B (mRNA B). La presencia de ambos mRNAs fue confirmada por hibridación *in situ* en cortes de músculo cardíaco de E18.5 (G;I). La expresión se aprecia mejor en las ampliaciones observadas en H y J, en donde también se muestra los respectivos controles negativos hechos con la sonda sentido (-). Cada experimento fue hecho por triplicado con su respectivo control negativo.

Con el fin de corroborar la expresión de ambos mRNAs dentro de las unidades contráctiles del músculo esquelético y cardíaco, realizamos hibridación *in situ* en cortes de tejidos embebidos previamente en parafina (Figura 14G-J; figura 15G-J). En esta hibridación se observa la expresión del mRNA A y mRNA B en el músculo de las extremidades y en ventrículo cardíaco de E18.5.



Adicionalmente, hemos observado que el patrón de expresión de mRNA A y mRNA B del gen  $\alpha$ -SG no se restringe a estructuras precursoras de músculo estriado (esquelético y cardíaco) durante el desarrollo embrionario. Estructuras como el interdígito de extremidades anteriores y posteriores, lengua y estómago, también expresan ambos mRNA's (Figura 16).



**Figura 16. Expresión del gen de *Sgca* en interdígito, lengua y estómago.** Hibridación *in situ* (A-F). El mRNA A es expresado en lengua (E15.5) y estómago (E13) (C; flecha en E); pero no en interdígito de la extremidad (A). Mientras que el mRNA B es expresado en interdígito, lengua y estómago en E13 y E15.5 (B,D y flecha en F). E y F son cortes transversales en vibratomo a la altura del abdomen embrionario.

La hibridación *in situ* muestra diferencias claras en el patrón de expresión de ambos mRNAs del gen  $\alpha$ -SG durante el desarrollo embrionario (Tabla 2). Esto

sugiere una regulación diferencial de las secuencias promotoras que dirigen la expresión del mRNA A y mRNA B, en consecuencia dicha regulación podría estar mediada por diferentes factores de transcripción de expresión tejido específico.

**Tabla 2. Patrón de expresión del mRNA A y mRNA B del gen *Sgca* de ratón durante el desarrollo embrionario.**

Etapa (E)	9.25	10.5	12.0	13.0	15.5	17.0	18.5	Adulto
Corazón				★.....				
	⊕.....							
Músculo Esquelético			★.....					
			⊕.....					
Notocorda-BTN		⊕.....						
D M C			★.....					
			⊕.....					
Interdígito			⊕.....					
Estómago			★.....				ND	
			⊕.....				ND	
Lengua				★.....			ND	
				⊕.....			ND	

Base del Tubo neural (BTN); células del mesénquima dorsal (DMC); mRNA A (★); mRNA B (⊕); no determinado (ND).

### 6.3.- El promotor A y promotor B del gen de *Sgca* son regulados por MyoD, miogenina y Sox9 durante la diferenciación de células C2C12.

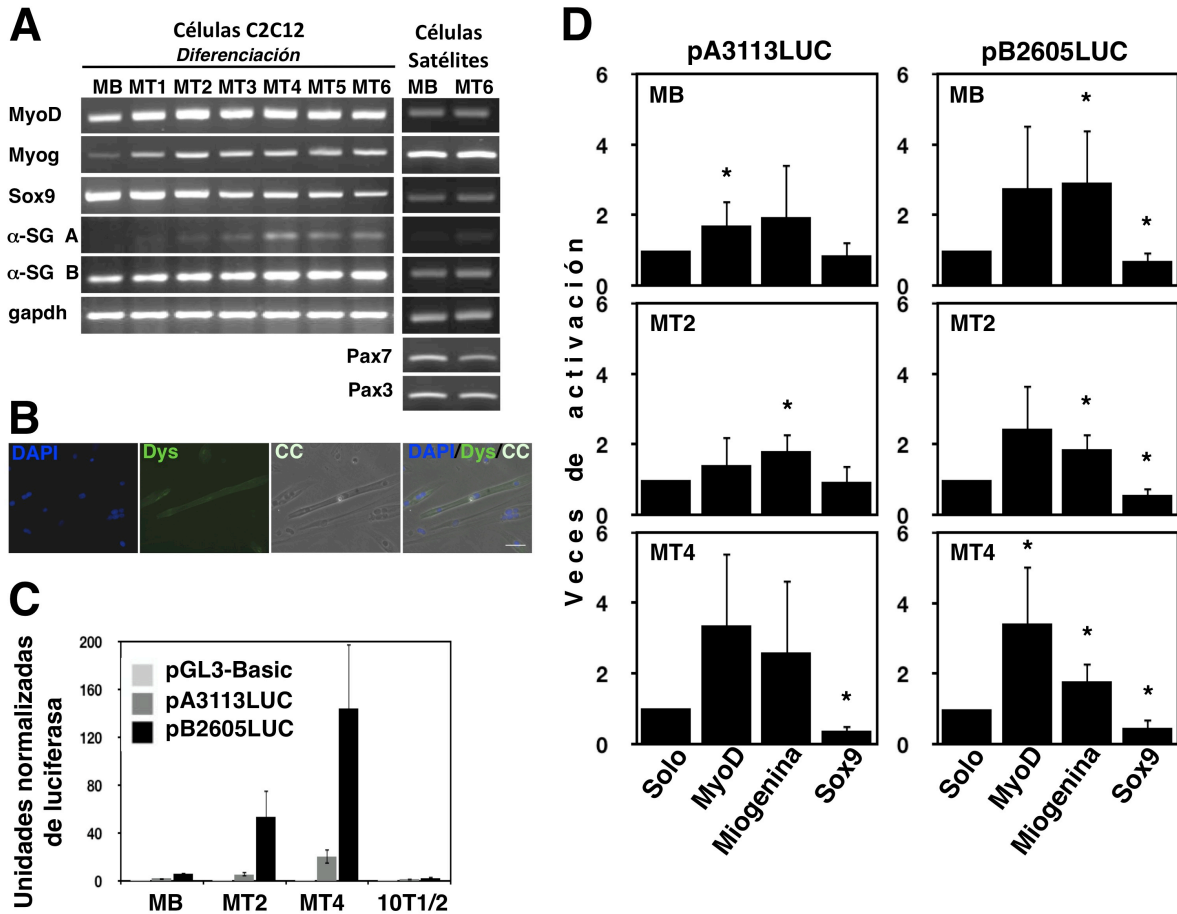
Con base en los resultados de qRT-PCR y el patrón de expresión observado con las hibridaciones *in situ*, decidimos investigar la expresión del gen de  $\alpha$ -SG durante la diferenciación *in vitro* del músculo esquelético. Para ello, utilizamos la línea celular de mioblastos murinos C2C12 como modelo de

diferenciación. Mediante RT-PCR analizamos la expresión de MyoD, miogenina y Sox9 en diferentes etapas de diferenciación. MyoD y miogenina son miembros de la familia de factores reguladores miogénicos (MRFs) (Funk et al., 1991). En adición, MyoD es un regulador maestro de la miogénesis y tiene la capacidad de iniciar el programa miogénico en mioblastos, fibroblastos y una gran variedad de otros tipos celulares (Davis et al., 1987; Edmondson and Olson, 1989; Weintraub et al., 1989; Miller, 1990; Kanisicak et al., 2009). Por otro lado, nuestro grupo ha propuesto que Sox9 modula negativamente de la expresión del gen  $\alpha$ -SG en mioblastos de células C2C12 (Hernandez-Hernandez et al., 2009).

MyoD y miogenina fueron detectados en etapas no diferenciada de mioblastos C2C12 (MB), y con forme ocurría la diferenciación los niveles de expresión incrementaban de manera dependiente a la formación de los miotubos (MT) (Figura 17A). En contraste, la expresión de Sox9 fue gradualmente desregulada durante la diferenciación celular. En este sentido, el mRNA B fue detectado en MB con incremento en su expresión durante la miogénesis de las células C2C12 (Figura 17A) (Noguchi et al., 1999; Hernandez-Hernandez et al., 2009). En contraste, el mRNA A no fué detectado en MB pero su expresión fué evidente desde mitubos de día uno de diferenciación (MT1) hasta M6 con un pico máximo de expresión en MT4 (Figura 17A). Adicionalmente, y con la idea de evidenciar la similitud de la línea celular C2C12 con células satélites presentes en el músculo esquelético, se analizó por RT-PCR la expresión de estos mismos marcadores en cultivo primario de células satélites así como también marcadores específicos de este tipo celular: Pax3 y Pax7 (Figura 17A) (Lu et al., 2008; Gharaibeh et al., 2008). Todos los marcadores estan presentes en células satélites

no diferenciadas, es importante mencionar que la expresión del mRNA A es casi nula, en tanto el mRNA B es abundante e incrementa su expresión a los seis días de diferenciación (Figura 17A). De igual forma, Sox9 y Pax3 fueron detectados en MB y MT6 de las células satélite. Por otro lado, Pax7 disminuye marcadamente su expresión en estadio diferenciado lo cual es congruente ya que Pax7 es un marcador de células precursoras miogénicas no diferenciadas (Lu et al., 2008). Adicionalmente se demostró la capacidad de fusión y del cultivo primario de células las satélites mediante una inmunofluorescencia contra la proteína distrofina, dicha proteína es un marcador específico del músculo esquelético diferenciado (Figura 17B).

Una vez establecida la expresión de ambos mRNAs del gen  $\alpha$ -SG durante la miogénesis en células C2C12, y con base en los potenciales sitios de unión a reguladores maestros de la transcripción miogénica sobre la secuencia del promotor A y promotor B (Figura 7), se procedió a evaluar mediante transfecciones transitorias la actividad transcripcional de ambos promotores durante la miogénesis *in vitro*. Para este propósito, ambos promotores fueron clonados de manera independiente en el vector de expresión de la luciferasa pGL3-Basic obteniendo las construcciones pA3113LUC (Promotor A) y pB2015LUC (Promotor B). Además del sistema de diferenciación C2C12, se utilizó una línea celular de características no miogénicas, fibroblastos 10T1/2.



**Figura 17. Modulación de los promotores A y B del gen *Sgca* durante la diferenciación de células C2C12.** **A:** Para el análisis de RT-PCR se extrajo RNA total de mioblastos C2C12 no diferenciados (MB) y miotubos C2C12 de 1 (MT1), 2 (MT2), 3 (MT3), 4 (MT4), 5 (MT5) y 6 (MT6) días de diferenciación. Se analizó la expresión de MyoD, miogenina, Sox9, mRNA A y mRNA B de  $\alpha$ -SG. Además de los marcadores antes mencionados, también se analizó la expresión de Pax3 y Pax7 en el cultivo primario de células satélites del músculo esquelético en estadio de MB y MT6. Como control endógeno se midió la expresión de gapdh. **B:** Inmunofluorescencia para distrofina (Dys) en el cultivo primario de células satélites de 6 días de diferenciación. Campo claro (CC). **C:** Transfección del promotor A (pA3113LUC) y promotor B (pB2606LUC) del gen  $\alpha$ -SG, ambas regiones moduladoras están clonadas en el vector de expresión pGL3-Basic utilizado también como control de transfección basal en este experimento. Las transfecciones se realizaron en células de linaje miogénico (C2C12) y no miogénico (Fibroblastos 10T1/2). La actividad luciferasa fue evaluada como se describe en material y métodos. **D:** En el modelo de diferenciación C2C12, se cotransfectaron de manera independiente ambos promotores (pA3113LUC y pB2606LUC) con plásmidos codificantes para MyoD, miogenina y Sox9. En todos los casos, la actividad luciferasa se midió en etapa de MB, MT2 y MT4. Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes hechos por duplicado. Las diferencias fueron determinadas con la prueba estadística U de Mann-Whitney utilizando un valor de  $P < 0.05$  (\*).

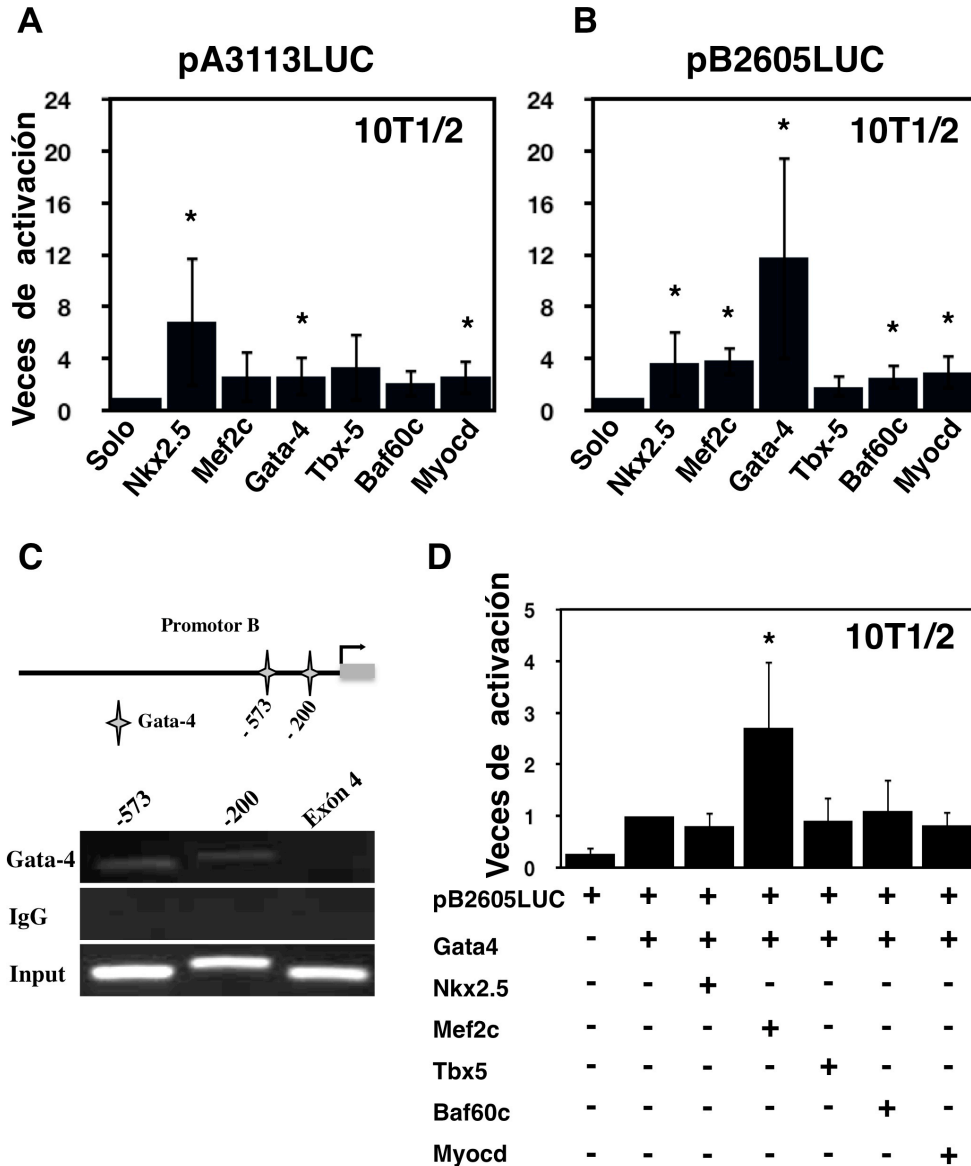
Ningún promotor mostró actividad en fibroblastos 10T1/2, por el contrario, ambos promotores responden al ambiente miogénico de diferenciación de las células C2C12 (Figura 17C). En este sentido, una ligera actividad luciferasa fué observada por el promotor B (pB2605LUC) en MB lo cual coincide con la presencia del mRNA B en esta misma etapa (Figura 17A). En miotubos de 2 y 4 días (MT2 y MT4), la actividad luciferasa aumenta considerablemente de manera dependiente al proceso de diferenciación. Sin embargo, la actividad luciferasa dirigida por el promotor A (pA3113LUC) fue siempre mas baja que la inducida por pB2605LUC (Figura 17C). Este resultado es congruente con los niveles de expresión detectados por los ensayos de RT-PCR para ambos mRNAs (A y B) durante el desarrollo embrionario (Figura 11F) y miogénesis *in vitro* (Figura 17A).

Subsecuentemente, se determinó el efecto de reguladores miogénicos sobre la actividad de ambos promotores. Células C2C12 en estadio de MB, MT2 y MT4 se cotransfectaron de forma independiente con las construcciones pA3113LUC ó pB2605LUC y vectores codificantes para las proteínas MyoD, miogenina ó Sox9 (Figura 17D). MyoD y miogenina modulan positivamente la actividad de ambos promotores principalmente en estadios diferenciados. En contraste, Sox9 modula negativamente la actividad de ambos promotores en todos los estadios experimentales (Figura 17D). Estos resultados sugieren que MyoD, miogenina y Sox9 regulan la expresión del gen  $\alpha$ -SG de manera diferencial y explica, en parte, el patrón de expresión de ambos mRNAs durante el desarrollo embrionario.

#### **6.4- Factores de transcripción cardiogénica modulan la actividad promotor A y promotor B del gen de *Sgca*.**

Un resultado interesante es que el gen de  $\alpha$ -SG es expresado en tejido embrionario cardiaco (Figuras 12, 13 y 15). Para determinar si factores de transcripción involucrados en la morfogénesis cardiaca modulan la actividad de ambos promotores (A y B), realizamos transfecciones transitorias en fibroblastos 10T1/2 utilizados ampliamente como un modelo heterólogo del tejido cardiaco que no expresa de manera endógena factores de transcripción cardiogénicos.

Se cotransfectaron de manera independiente pA3113LUC o pB2605LUC con plásmidos que codifican para los factores de transcripción Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c y miocardina. De los factores cotransfectados, Tbx-5 es el único que no muestra modulación significativa sobre ambos promotores. Por lo contrario, y de manera independiente; Nkx2.5, Gata-4 y miocardina incrementan significativamente la actividad basal de pA3113LUC (Figura 18A); por su parte pB2605LUC es activado por los mismos factores de transcripción que pA3113LUC, incluyendo además para este caso a Mef2c y Baf60c. No obstante, Gata-4 es el factor de transcripción que incrementa la actividad de pB2605LUC con mayor fuerza ( $\approx 11.7$  veces mas) comparando a la actividad basal que presenta cuando es transfectado solo (Figura 18B). Con base a lo antes mencionado y en los potenciales sitios de unión al factor de transcripción Gata-4 sobre la secuencia del promotor B (Figura 10), exploramos la posible interacción *in vivo* de Gata-4 con sus secuencias consenso contenidas en el promotor B.



**Figura 18. Factores de transcripción cardiogénicos, principalmente Gata-4, inducen la transcripción del gen Sgca en tejido cardíaco embrionario.** Ensayos de co-transfección del pA3113LUC (**A**) y pB2605LUC (**B**) con los factores de transcripción cardiogénicos Nkx2.5, Gata-4, Mef2c, Tbx-5, Baf60c y miocardina. El promotor B muestra una mayor regulación significativa en presencia de los factores cardiogénicos, y particularmente de Gata-4. **C:** Esquemática del promotor B y los sitios de unión a Gata-4 contenidos en su secuencia (arriba). Inmunoprecipitación de la cromatina utilizando un anticuerpo anti-Gata-4, y un anti-IgG como control negativo de inmunoprecipitación. La amplificación para ambos sitios de unión (-200pb y -573pb) es positiva con el uso de anti-Gata4, no así para la región del exón 4 que es utilizada como control negativo de unión. **D:** Evaluación del efecto sinérgico de los factores de transcripción cardiogénicos sobre la actividad del promotor B (pB2605LUC). Las barras representan el promedio de tres ensayos independientes hechos por duplicado. Las diferencias fueron determinadas con la prueba estadística U de Mann-Whitney utilizando un valor de  $P < 0.05$  (\*).



Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en corazones embrionarios E17, exploramos la interacción en dos sitios específicos, uno ubicado a -200pb (-AGATAA-) y el otro ubicado a -573pb (-AGATAG-) del inicio de la transcripción sobre el promotor B. El ChiP mostró la presencia de Gata-4 en ambos sitios de unión en corazones embrionarios de E17 (Figura 18C). Esto sugiere que la expresión del gen *Sgca* durante la cardiogénesis esta modulada, en gran medida por Gata-4. En relación a las interacciones que pueden generarse entre los factores cardiogénicos para modular la expresión de genes en el corazón, la actividad sinérgica de Gata-4 con otros factores de transcripción está ampliamente documentada (Stennard et al., 2003; Maitra et al., 2009). En consecuencia, exploramos los posibles sinergismos entre Gata-4 con Nkx2.5, Mef2c, Tbx-5, Baf60c y miocardina sobre la actividad del promotor B (Figura 18D). Solo Mef2c mostró actividad sinérgica con Gata-4, incrementando 2.7 veces la actividad del promotor B que el solo efecto de Gata-4.

## 7.- DISCUSIÓN

Mutaciones en el gen de *Sgca* que producen la ausencia o deficiencia de la proteína  $\alpha$ -SG se asocian con distrofias musculares de cintura (Ervasti et al., 1990; Roberds et al., 1994; Liu et al., 1997). En el ratón, la expresión del gen  $\alpha$ -SG es regulada por dos promotores que transcriben dos mRNAs que codifican para la misma proteína (Wakabayashi-Takai et al., 2001). En este trabajo se estudió la expresión de ambos mRNAs (A y B) del gen  $\alpha$ -SG en el desarrollo embrionario y durante la diferenciación *in vitro* del músculo esquelético así como la respuesta de sus secuencias promotoras a marcadores de diferenciación miogénica y cardiogénica.

Nuestros datos indican que el mRNA B es mas abundante que el mRNA A en el músculo esquelético y cardiaco, representando >91% del total de la expresión del gen *Sgca*. Adicionalmente, durante el desarrollo embrionario del ratón la expresión del mRNA B precede a la expresión del mRNA A. Lo mismo sucede durante la diferenciación *in vitro* del cultivo primario de células satélites y células C2C12 en donde el mRNA B es evidente en estadio de MB no así el mRNA A; el mRNA A que solo es detectado en etapas de MT siempre es menos abundante que el mRNA B en estos cultivos celulares.

Adicionalmente, el análisis de qRT-PCR e hibridación *in situ* muestra la expresión del mRNA B en la notocorda y la base del tubo neural en E9.25. Dicha expresión desaparece junto con la estructura embrionaria en E10.5. Este expresión es similar a la observada para los genes *Gli*, que a su vez, regulan la expresión de distintos genes en la notocorda (Sasaki et al., 1997; Lee et al., 1997;

Ruiz i Altaba, 1998; Epstein et al., 1999). Aunado a lo anterior, la expresión de genes Gli esta regulada por *Sonic hedgehog* (Shh), un marcador específico de notocorda. En relación al gen de *Sgca*, el análisis de la secuencia del promotor B muestra tres potenciales sitios de unión a los factores de transcripción Gli; por tanto, es posible que el promotor B sea un blanco río abajo de la cascada de señalización de Shh en notocorda.

En E12 y E13, ambos mRNAs fueron observados en los músculos hipoaxiales que emergen de miotomo lateral y dermomiotomo dorsolateral (Wilson-Rawls et al., 1999). Esos músculos forman la musculatura intercostal y de las extremidades que a su vez expresan a los MRFs MyoD y miogenina (Buckingham, 1992; Wood et al., 2013). Interesantemente, el mRNA B muestra una expresión dinámica durante el desarrollo del músculo esquelético con dos picos de expresión en E14 y E17 seguidos por dramáticas desregulaciones en sus niveles expresión. Esos picos de expresión observados están precedidos por una alta densidad de células satélites que expresan MyoD en las extremidades de E12.5 y E14 (Sassoon et al., 1989 ; Wood et al., 2013). Aunado a esto, nuestros ensayos mostraron evidente expresión del mRNA B en células satélites obtenidas de ratones recién nacidos lo que sugiere que los picos de expresión observados en el desarrollo embrionario pueden ser producto, en gran medida, del mRNA B expresado en las células satélites embrionarias. Por otro lado, el mRNA A muestra bajos niveles de expresión comparados con los niveles de mRNA B, en el cultivo primario de células satélites diferenciadas. Esta misma diferencias en los niveles de expresión entre el mRNA A y mRNA B se observan durante el desarrollo embrionario de músculo esquelético y durante la diferenciación de las células

C2C12. Coincidentemente, los ensayos de transfecciones transitorias respaldan esta observación ya que la actividad del promotor B siempre es mayor que la del promotor A.

En este sentido, las transfecciones transitorias en células C2C12 y fibroblastos 10T1/2 sugieren una expresión músculo-esquelética específica del gen  $\alpha$ -SG. Por otra parte, nuestro grupo reportó previamente que MyoD interactúa con los factores generales TFIIID y TFIB en la región basal del promotor B durante la diferenciación *in vitro* de células C2C12 (Delgado-Olguin et al., 2006). En este estudio, nuestros datos muestran que tanto MyoD como miogenina ejercen una regulación positiva sobre la actividad del promotor B durante la miogénesis de las células C2C12. Además de esto, en este estudio mostramos que el promotor A es significativamente activado por MyoD durante la diferenciación de células C2C12. En este sentido, el análisis de la secuencia de promotor A muestra siete potenciales sitios de unión E-box en los que podría interactuar MyoD para regular la actividad transcripcional del promotor A. Con base en los resultados antes mencionado, y junto con el patrón de expresión de MyoD y miogenina durante la embriogénesis murina (Sassoon et al., 1989; Buckingham, 1992), es posible proponer que estos factores de transcripción regulan la expresión del gen  $\alpha$ -SG durante la miogénesis embrionaria. Adicionalmente, observamos que en fibroblastos 10T1/2 Mef2c y Baf60c regulan positivamente la actividad del promotor B. Debido a que son factores de transcripción presentes en el miotomo (Edmondson et al., 1994; Lickert et al., 2004), es posible que junto con MyoD y miogenina, modulen de manera importante la expresión del gen de  $\alpha$ -SG durante

la miogénesis.

Respecto a la desregulación del mRNA B en E15.5 y E18.5, diferentes estudios han propuesto que miRNAs podrían estar regulando el programa miogénico. Por lo tanto, los mRNAs pueden ser blancos miRNAs como lo indican las predicciones realizadas con los algoritmos TargetScan (<http://www.targetscan.org>), Diana-MicroT3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr>) y miRanda (<http://www.microrna.org>) (Bartel, 2009). Estos algoritmos nos sugieren que el UTR-3' del mRNA B del gen  $\alpha$ -SG presenta una secuencia de reconocimiento canónica de tipo 7mer-1A para miR27a/b. En éste sentido, se ha reportado que miR27a/b se expresa en el músculo esquelético embrionario y desregula genes involucrados en la miogénesis esquelética (Allen and Loh, 2011; Crist et al., 2009; Huang et al., 2012).

En suma con lo anterior, nuestros datos revelan que Sox9 modula negativamente la actividad de ambos promotores del gen  $\alpha$ -SG en células C2C12. Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que los factores de transcripción NF1-2C y Sox9 se unen al promotor B en mioblastos de células C2C12 para desregular la expresión del mRNA B (Delgado-Olguin et al., 2004; Hernández-Hernández et al., 2009). Adicionalmente, nuestros experimentos sugieren que Sox9 tiene la capacidad de desregular la expresión del gen *Sgca* durante todo el proceso de diferenciación miogénica en el sistema celular C2C12. Este mecanismo de represión de Sox9 puede ser importante en embriones de E12 y E13 durante la formación de los dígitos de las extremidades ya que el mRNA B se expresa en el interdígito pero no en el dígito. Esta observación es sustentada por

el hecho de que Sox9 reprime genes musculares y activa genes condrogénicos en el dígito de las extremidades (Bi et al., 1999; Cairns et al., 2012). No obstante es razonable especular que otros factores de transcripción presentes en el interdígito puedan inducir la expresión del mRNA B. En suma con lo anterior, un estudio reportó previamente actividad transcripcional del promotor del gen  $\gamma$ -sarcoglicano ( $\gamma$ -SG) en el borde distal del autópodo de extremidades anteriores y posteriores en embriones murinos de E10.5 a E13.5 (Noguchi et al., 2001). Sobre estas bases, es posible sugerir la existencia de un complejo sarcoglicano durante la morfogénesis del autópodo de la extremidad en desarrollo.

Las hibridaciones *in situ* en el corazón indican que mRNA B es expresado en etapas temprana de la morfogénesis cardiaca, desde asa en S en E9.25 hasta corazones morfológicamente maduros en embriones de E18.5, mientras que el mRNA A fué observado en tejido cardiaco a partir de estadio E13 cuando la septación interventricular está avanzada y los procesos de proliferación y diferenciación se ven incrementados (Sucov et al., 1994; Merki et al., 2005). En este sentido, todos los factores de transcripción analizados en este estudio se expresan en tejido cardiaco desde la etapa de creciente cardiogénica (Lints et al., 1993; Wang et al., 1996; Reecy et al., 1999; Wang et al., 2001; Lickert et al., 2004). La expresión de ambos mRNAs de gen de *Sgsa* fué principalmente observada en el miocardio y endocardio ventricular, y en bajos niveles en los atrios. Coincidentemente, *Nkx2.5*, *Gata-4*, *Mef2c*, *Baf60c*, *Tbx-5* y *miocardina* también son expresados en esas estructuras cardiacas durante la morfogénesis cardiaca (Wang et al., 2001; Lickert et al., 2004; Takeuchi et al., 2007; Yoshimura

et al., 2009; Nagy et al., 2010; Greulich et al., 2011; Schachterle et al., 2012).

El análisis de las secuencias promotoras (A y B) del gen de  $\alpha$ -SG permitió identificar potenciales sitios de unión a factores de transcripción cardiogénica como Nkx2.5, Gata-4, Mef2c y Tbx-5 (Hiroi et al., 2001; Srivastava, 2006; Schlesinger et al., 2011). Nuestros ensayos de transfecciones transitorias en fibroblastos 10T1/2 indican que *in vitro*, principalmente Nkx2.5, Gata-4 y miocardina modulan positivamente la actividad transcripcional de ambos promotores (A y B). Esto sugiere que la expresión en el tejido cardiaco de ambos mRNAs puede estar mediada, en parte, por estos factores cardiogénicos. Por otro lado, Nkx2.5 y miocardina podrían estar participando en la expresión del mRNA A y mRNA B en el estómago embrionario ya que estos factores también se expresan en éste tejido en embriones de E12.5 y E13.5 (Lints et al., 1993; Reecy et al., 1999; Wang et al., 2001).

Por otro lado, Mef2c y Baf60c solo activan al promotor B. Baf60c es una subunidad del complejo remodelador de la cromatina pendiente de ATP; BAF (Factores Asociados a Brg/Brm) Swi/Snf, que es expresado en el tejido cardiaco y que junto con Tbx-5 son requeridos *in vivo* para la completa diferenciación de cardiocitos contráctiles (Wang et al., 1996; Lickert et al., 2004; Takeuchi et al., 2007; Takeuchi and Bruneau, 2009). Con base a lo anterior, la modulación del promotor B por Baf60c sugiere la posibilidad de que es esta región moduladora se estén reclutando complejos remodeladores de la cromatina mediados por Baf60c favoreciendo la expresión del mRNA B en tejido cardiaco. Además de esto, se ha reportado que Mef2c regula la expresión de genes durante el desarrollo del ventrículo embrionario (Phan et al., 2005). En suma, podemos decir que Mef2c y

Baf60c podrían estar induciendo la transcripción del mRNA B pero no la del mRNA A durante el desarrollo cardiaco.

Interesantemente, observamos una fuerte actividad luciferasa mediada por Gata-4 sobre el promotor B pero no sobre la actividad del promotor A. Gata-4 se expresa durante el desarrollo del tejido cardiaco con una amplia participación en procesos de diferenciación, proliferación y sobrevivencia del cardiomiocito, y su deficiencia se asocia a defectos cardiacos congénitos (Arceci et al., 1993; Grepin et al., 1995; Molkenin et al., 1997; Pehlivan et al., 1999). Para regular la transcripción durante el desarrollo cardiaco, Gata-4 se une a su secuencia consenso WGATAR (Donde W=A ó T, y R=A ó G) sobre las regiones promotoras. En éste sentido, hemos demostrado que el promotor B contiene dos sitios de unión que reclutan a Gata-4 en corazones embrionarios de E17 (-200pb: AGATAA; -573pb: AGATAG). Junto a los ensayos de expresión y transfección, esto es concluyente; Gata-4 modula la expresión del mRNA mas abundante del gen  $\alpha$ -SG durante la morfogénesis cardiaca: al mRNA B.

Por otro lado, se ha observado que Gata-4 interactúa con diferentes factores de transcripción y miembros de complejos remodeladores de cromatina como Nkx2.5, Tbx-5, Mef2c y Baf60c (Durocher et al., 1997; Morin et al., 2000; Lickert et al., 2004). En nuestros experimentos observamos un efecto sinérgico sobre la activación del promotor B entre Gata-4 y Mef2c, mas no con Nkx2.5, Tbx-5, Baf60c o miocardina. En este sentido, el promotor B contiene dos sitios de unión para Mef2c y dos para Gata-4; no obstante, sería importante determinar la funcionalidad de estos sitios de unión ya que podrían estar modulando



importantemente la transcripción del gen  $\alpha$ -SG durante el desarrollo cardiaco embrionario.

En resumen, en éste trabajo hemos descrito el patrón de expresión de ambos mRNA del gen  $\alpha$ -SG durante el desarrollo embrionario del ratón. Nuestros resultados indican una expresión temprana del gen  $\alpha$ -SG principalmente en células precursoras del músculo estriado. En adición, los datos sugieren que ambos promotores del gen  $\alpha$ -SG están sujetos a mecanismos específicos de regulación durante el desarrollo embrionario por la acción diferencial de factores de transcripción miogénicos y cardiogénico. En conjunto, estos resultados sugieren la presencia de la proteína  $\alpha$ -SG en etapas tempranas del desarrollo embrionario, lo que sugiere un rol importante de esta proteína durante la diferenciación embrionaria del músculo estriado. Por otro lado, la expresión del gen de  $\alpha$ -SG al igual que la de los otros miembros sarcoglicanos, pueden ser importante para el desarrollo correcto de las estructuras miogénicas y cardiogénicas. En éste sentido, ha sido reportado que *in vitro*, la deficiencia de la proteína  $\alpha$ -SG reduce la capacidad proliferativa de células progenitoras miogénicas tanto en humanos como en ratón (Cassano et al., 2011). En consecuencia, sería relevante profundizar en futuras investigaciones en el impacto que la expresión temprana de la proteína  $\alpha$ -SG pueda tener en la determinación de los nichos de células satélites y por ende, la contribución que ésta tendría sobre la fisiopatología de las distrofias musculares en etapas posnatales.

## 8.- PERSPECTIVAS

### **8.1.- Funcionalidad de los sitios de unión a Gata-4 sobre el promotor B**

En éste trabajo hemos demostrado la presencia *in vivo* del factor de transcripción Gata-4 en dos regiones del promotor B que contienen secuencias consenso para la unión de este factor. Sería interesante demostrar la funcionalidad de estos sitios de unión y si la modulación observada de Gata-4 sobre el promotor B es por interacción directa o indirecta a los dos sitios consenso. Así mismo, experimentar con proteínas dominantes negativas de Gata-4 ayudaría a entender mejor la función de Gata-4 en la regulación del promotor B.

### **8.2.- Mecanismo por el cual Gata-4 y Mef2c ejercen un efecto sinérgico sobre la modulación del promotor B.**

Como hemos observado en las transfecciones transitorias, Gata-4 y Mef2c modulan de manera sinérgica la actividad transcripcional del promotor B, resulta interesante desde el punto de vista mecanístico comprender este sinergismo. Dos posibilidades por el cual puede llevarse acabo este sinergismo son :a) Que sea un efecto sumatorio de ambos factores, cada uno modulando desde sus sitios de unión sobre el promotor B; b) Que ambos factores se encuentren modulando la transcripción desde el mismo sitio consenso, ya sea desde sitios de unión a Gata-4 (-200pb o -573pb) o a Mef2c. Esto implicaría explorar interacción directa entre ambos factores de transcripción.

### **8.3.- Impacto de la expresión temprana de la proteínas SG sobre la determinación de nichos celulares precursores de músculo esquelético.**

Resulta atractivo proponer, que la calidad de los nichos celulares de células precursoras miogénicas presentes en el músculo esquelético adulto, determinen características clínicas en pacientes con distrofia muscular de cinturas; como por ejemplo la edad de inicio de la debilidad muscular y la capacidad de este para regenerar las fibras musculares dañadas. En este sentido, sería importante evaluar durante el desarrollo embrionario y adulto, la calidad de estos nichos celulares utilizando modelos animales deficientes de los genes sarcoglicanos.

### **8.4.- Analizar el patrón de expresión de el resto de los SG**

Las explicaciones a las manifestaciones clínicas de las distrofias musculares han estado carentes de la perspectiva embrionaria; esto es debido a que se sabe poco del patrón de expresión de los componentes sarcoglicano durante estadios embrionarios, mas aun de su posible participación en este periodo del desarrollo. Considerando que el complejo sarcoglicano juega un papel muy importante en la fisiología del músculo estriado adulto, tanto a nivel mecánico como a nivel de señalización, resultaría importante conocer el patrón de expresión de los genes sarcoglicano y contribuir así a un mejor entendimiento de la fisiopatología de las distrofias musculares.

## 9.- BIBLIOGRAFÍA

Allen DL, Loh AS. 2011. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 300: C124-137.

Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13: 2235-2246.

Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.

Betto R, Luigi Senter, Stefania Ceoldo, Elena Tarricone, Donatella Biral, and Giovanni Salviati. 1999. Ecto-ATPase Activity of  $\alpha$ -Sarcoglycan (Adhalin). *The journal of biological chemistry*. 274:(12)., pp. 7907–7912.

Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22: 85-89.

Buckingham M. 1992. Making muscle in mammals. *Trends Genet* 8: 144-148.

Braun, T., Rudnicki, M., Arnold, H. H. and Jaenisch, R. 1992. Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell* 71, 369-382.

Bruneau, B.G., Nemer, G., Schmitt, J.P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., Conner, D.A., Gessler, M., Nemer, M., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106, 709–721

Cairns DM, Liu R, Sen M, Canner JP, Schindeler A, et al. 2012. Interplay of Nkx3.2, Sox9 and Pax3 regulates chondrogenic differentiation of muscle progenitor cells. *PLoS One* 7: e39642.

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

Cassano M, Dellavalle A, Tedesco FS, Quattrocchi M, Crippa S, Ronzoni F, Salvade A, Berardi E, Torrente Y, Cossu G, Sampaolesi M. 2011. Alpha sarcoglycan is required for FGF-dependent myogenic progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. *Development* 138: 4523-4533.

Chimal-Monroy J, Montero JA, Gañan Y, Macias D, Garcia-Porrero JA, Hurlé JM. 2002. Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass culture. *Dev Dyn* 224: 314-320.

Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP. 1999. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98: 465-474.

Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, Rocancourt D, Cumano A, Conway SJ, Buckingham M. 2009. Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 13383-13387.

Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51: 987-1000.

Delgado-Olguin P, Rosas-Vargas H, Recillas-Targa F, Zentella-Dehesa A, Bermudez de Leon M, Cisneros B, Salamanca F, Coral-Vázquez R. 2004. NFI-C2 negatively regulates alpha-sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 1032-1039.

Delgado-Olguin P, Recillas-Targa F, Rosas-Vargas H, Salamanca F, Coral-Vazquez RM. 2006. Partial characterization of the mouse alpha-sarcoglycan promoter and its responsiveness to MyoD. *Biochim Biophys Acta* 1759: 240-246.

Delgado-Olguin P, Hernandez-Hernandez JM, Salamanca F, Recillas-Targa F, Coral-Vazquez RM. 2008. Identification of two E-boxes that negatively modulate

the activity of MyoD on the alpha-sarcoglycan core promoter. *Biochim Biophys Acta* 1779: 74-80.

Duclos F, Broux O, Bourg N, Straub V, Felman GL, Sunada Y, Lim LE, Piccolo F, Cutshall S, Gary F, Quetier F, Kaplan JC, Jackson CE, Beckman JS, Campbell KP. 1998a. Beta sarcoglycan: genomic analysis and identification of a novel missense mutation in the LGMD2E Amish isolate. *Neuromusc Disord* 830-38.

Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP. 1998. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 142: 1461-1471.

Durbeej M, Campbell KP. Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex : an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev*. 2002. 12: 349-361.

Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 16: 5687-5696.

Edmondson DG, Olson EN. 1989. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* 3: 628-640.

Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN. 1994. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120: 1251-1263.

Epstein DJ, McMahon AP, Joyner AL. 1999. Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development* 126: 281-292.

Ervasti JM, and Campbell KP. 1993. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122:809-823.

Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345: 315-319.

Fougerousse F, Durand M, Suel L, Pourquie O, Delezoide AL, Romero NB, Abitbol M, Beckmann JS. 1998. Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics* 48: 145-156.



Funk WD, Ouellette M, Wright WE. 1991. Molecular biology of myogenic regulatory factors. *Mol Biol Med* 8:185–195.

Garg, V., Kathiriya, I.S., Barnes, R., Schluterman, M.K., King, I.N., Butler, C.A., Rothrock, C.R., Eapen, R.S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., et al. 2003. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424, 443–447.

Giuliana Rossi · Graziella Messina. Comparative myogenesis in teleosts and mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. 71:3081–3099.

Gharaibeh B, Lu A, Tebbets J, Zheng B, Feduska J, Crisan M, Péault B, Cummins J, Huard J. 2008. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *J Nat Protoc* 3:1501-1509.

Grepin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M. 1995. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15: 4095-4102.

Greulich F, Rudat C, Kispert A. 2011. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res* 91: 212–222.

Grifone R, Demignon J, Giordani J, Niro C, Souil E, Bertin F, Laclef C, Xu PX,

Maire P. 2007. Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Dev Biol* 302(2):602–616.

Grifone R, Demignon J, Houbron C, Souil E, Niro C, Seller MJ, Hamard G, Maire P. 2005. Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Development* 132(9):2235–2249.

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

Hashida-Okumura A, Okumura N, Iwamatsu A, Buijs R, Romijn H and Nagai K. 1999. Interaction of neuronal nitric oxide synthase with  $\alpha$ 1 syntrophin in rat brain. *J Biol Chem* 274:11736-11741.

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., Edmundson, D. G., Venuti, J., Olson, E. N. and Klein, W. H. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501-506.

Hernandez-Hernandez JM, Delgado-Olguin P, Aguillon-Huerta V, Furlan-Magaril M, Recillas-Targa F, Coral-Vázquez RM. 2009. Sox9 represses alpha-sarcoglycan gene expression in early myogenic differentiation. *J Mol Biol* 394: 1-14.

Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. 2001. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28: 276-280.

Huang Z, Chen X, Yu B, He J, Chen D. 2012. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 423: 265-269.

Kanisicak O, Mendez JJ, Yamamoto S, Yamamoto M, Goldhamer DJ. 2009. Progenitor of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Dev Biol* 332(1):131-141.

Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gomés D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature* 431: 466-471.

Kassar-Duchossoy L, Giacone E, Gayraud-Morel B, Jory A, Gomes D, Tajbakhsh S. 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev* 19(12):1426–1431.

Koenig M, Hoffman E, Bertelson C, Monaco A, Feener C, Kunkel L. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.

Lancioni A, Rotundo IL, Kobayashi YM, D'Orsi L, Aurino S, Nigro G, Piluso G,

---

Acampora D, Cacciottolo M, Campbell KP, Nigro V. 2011. Combined deficiency of alpha and epsilon sarcoglycan disrupts the cardiac dystrophin complex. *Hum Mol Genet* 20: 4644-4654.

Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A. 1997. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124: 2537-2552.

Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, Henkelman RM, Wrana JL, Rossant J, Bruneau BG. 2004. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodelling complexes in heart development. *Nature* 432: 107-112.

Ling A, Liu and Eva Engvall. 1999. Sarcoglycan Isoforms in Skeletal Muscle. *J. of Biological Chemistry*. (274): 38171–38176.

Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119: 969.

Liu L, Vachon PH, Kuang W, Xu H, Wewer UM, Kylsten P, Engvall E. 1997. Mouse adhalin: primary structure and expression during late stages of muscle differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 227-235.

Liu LA, Engvall E. 1999. Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem* 274: 38171-38176.

Lu A, Cummins JH, Pollett JB, Cao B, Sun B, Rudnicki MA, Huard J. 2008. Isolation of myogenic progenitor populations from Pax7-deficient skeletal muscle based on adhesion characteristics. *Gene Ther* 15: 1116-1125.

Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., and Harvey, R.P. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* 9, 1654–1666.

Maitra M, Schluterman MK, Nichols HA, Richardson JA, Lo CW, Srivastava D, Garg V. 2009. Interaction of *Gata4* and *Gata6* with *Tbx5* is critical for normal cardiac development. *Dev Biol* 326: 368-377.

Matthew T. Wheeler, Claudia E. Korcarz, Keith A. Collins, Karen A. Lapidos, Andrew A. Hack, Matthew R. Lyons, Sara Zarnegar, Judy U. Earley, Roberto M. Lang, and Elizabeth M. McNally. 2004. Secondary Coronary Artery Vasospasm Promotes Cardiomyopathy Progresión. *American Journal of Phatology* (64)163-1071.

McNally EM, Yoshida M, Mizuno Y, Ozawa E, Kunkel LM. 1994. Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9690-9694.

Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, Burch J, Kubalak SW, Kaliman P, Izpisua Belmonte JC, Chien KR, Ruiz-Lozano P. 2005. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 18455-18460.

Miller JB. 1990. Myogenic programs of mouse muscle cell lines: expression of myosin heavy chain isoforms, MyoD1, and myogenin. *J Cell Biol* 111: 1149-1159.

Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Hirai S, Ozawa E. 1993. Distribution of dystrophin isoforms and dystrophin-associated proteins 43DAG (A3a) and 50DAG (A2) in various monkey tissues. *J Biochem* 114: 936-941.

Mizuno Y, Noguchi S, Yamamoto H, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. 1995. Sarcoglycan complex is selectively lost in dystrophic hamster muscle. *Am J Pathol* 146: 530-536.

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11: 1061-1072.

Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M. 2000. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J* 19: 2046-2055.

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I. and Nabeshima, Y. 1993. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defects. *Nature* 364, 532-535.

Nagy I, Railo A, Rapila R, Hast T, Sormunen R, Tavi P, Raïsaïnen J, and Vainio S. 2010. Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium development by patterning N- cadherin and b-catenin expresi3n. *Cardiovasc Res* 85, 100–109

Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E. 1999. Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 262: 88-93.

Noguchi S, Wakabayashi-Takai E, Sasaoka T, Ozawa E. 2001. Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of gamma-sarcoglycan gene using a transgenic mouse. *FEBS Lett* 495: 77-81.

Olson, E. N. 1998. Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Development* 125, 2349- 2358.

Ontell M, Kozeka K. 1984. Organogenesis of the mouse extensor digitorum longus muscle: a quantitative study. *Am J Anat* 171: 149-161. Ontell M, Hughes D, Bourke D. 1988. Morphometric analysis of the developing mouse soleus muscle. *Am J Anat* 181: 279-288.

Ordahl, C. P. and le Douarin, N. M. 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development* 114, 339-353.

Ort T, Maksimova E, Dirx R, Kachinsky AM, Berghs S, Froehner SC, Solimena M. 2000. The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of  $\beta$ 2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol.* 79:621–630.

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

Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slauch R, Van Rheeden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV. 1999. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 83: 201-206.

Phan D, Rasmussen TL, Nakagawa O, McAnally J, Gottlieb PD, Tucker PW, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2005. BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. *Development* 132: 2669-2678.

Piccolo F, Roberds SL, Jeanpierre M, Lutercq F, Azibi K, Beldjord C, Carrié A, Récan M, Chaouch M, Reghis A, El Kerch F, Sefiani A, Voit T, Merlini L, Collon H,



Eymard B, Beckmann JS, Romero NV, Tome FMS, Campbell KP and Kaplan JC. 1995. Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nat. Genet.* Jun;10(2).243-5.

Piluso Giulio. 2000.  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$  sintrophins, Two Novel Dystrophin-binding Protein Localized in Neural Cell. *J. Biol. Chem.*275:15851-15860

Reecy JM, Li X, Yamada M, DeMayo FJ, Newman CS, Harvey RP, Schwartz RJ.. 1999. Identification of upstream regulatory regions in the heart-expressed homeobox gene *Nkx2-5*. *Development* 126: 839-849.

Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tomé FMS, Romero NB, Fardeau M, Beckmann JS, Kaplan JC, Campbell KP. 1994. Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78: 625-633.

Rosenthal N, Harvey RP. 2010. *Heart Development and Regeneration*: New York; Elsevier Science.

Rudnicki, M. A., Braun, T., Hinuma, S. and Jaenisch, R. 1992. Inactivation of *MyoD* in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene *Myf-5* and results in apparently normal muscle development. *Cell* 71(3):383-90.

Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stread RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R.

---

1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75: 1351-1359.

Ruiz i Altaba A. 1998. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125: 2203-2212.

Sandona D, Stefano G, Tiziana M and Romeo B. 2004. Characterization of the ATP-hydrolysing activity of  $\alpha$ -sarcoglycan. *Biochem. J.* 381, 105–112.

Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124: 1313-1322.

Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M. 1989. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341: 303-307.

Schachterle W, Rojas A, Xu S and Black BL. 2012. ETS-dependent regulation of a distal Gata4 cardiac enhancer. *Dev Biol* 361(2):439-449.

Schlesinger J, Schueler M, Grunert M, Fischer JJ, Zhang Q, Krueger T, Lange M, Tönjes M, Dunkel I, Sperling SR. 2011. The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs. *PLoS Genet* 7: e1001313.

Srivastava D. 2006. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126: 1037-1048.

Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM, Harvey RP. 2003. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol* 262: 206-224.

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

Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP. 1999. Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 274: 27989-27996.

Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. 1994. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 8: 1007-1018.

Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, Sun X, Yamamoto M, Chawengsaksophak K, Hamada H, Yost HJ, Rossant J, Bruneau BG. 2007. Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 846-851.

Takeuchi JK, Bruneau BG. 2009. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459: 708-711.

Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N., and Izumo, S. 1999. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically up stream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126, 1269–1280.

Valdez, M. R., Richardson, J. A., Klein, W. H. and Olson, E. N. 2000. Failure of *Myf5* to support myogenic differentiation without myogenin, *MyoD*, and *MRF4*. *Dev. Biol.* 219, 287-298.

Venuti, J. M., Morris, J. H., Vivian, J. L., Olson, E. N. and Klein, W. H. 1995. Myogenin is required for late but not early aspects of myogenesis during mouse development. *J. Cell Biol.* 128, 563-576.

Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Ozawa E. 2001. Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene. *Eur J Biochem* 268: 948-957.

Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN. 2001. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105: 851-862.

Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR. 1996. Diversity and

specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev* 10: 2117-2130

Wilson-Rawls J, Hurt CR, Parsons SM, Rawls A. 1999. Differential regulation of epaxial and hypaxial muscle development by paraxis. *Development* 126: 5217-5229.

Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5434-5438.

Wood WM, Etemad S, Yamamoto M, Goldhamer DJ. 2013. MyoD-expressing progenitors are essential for skeletal myogenesis and satellite cell development. *Dev Biol* 384: 114-127.

Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E. 1994. Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles. *J Biochem* 115: 162-167.

Yang B, Jung D, Meyer J, Koretzky G, and Cambell KP. 1995. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 270:11711-11714

Yoshida M, and Ozawa E. 1990. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to the sarcolemma. *J Biochem Tokyo* 108:748-752.

Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, Yamaoka I, Yonezawa M, Kondo T, Furutani Y, Yagi H, Yoshinaga S, Masuda T, Fukuda T, Yamamoto Y, Ebihara K, Li D, Matsuoka R, Takeuchi J, Matsumoto T, Kato S. 2009. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 9280-9285.

Zeisberg, E.M., Ma, Q., Juraszek, A.L., Moses, K., Schwartz, R.J., Izumo, S., and Pu, W.T. 2005. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J. Clin. Invest.* 115, 1522–1531.

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

**Anexo**

# Expression Pattern of mRNA A and mRNA B of Alpha Sarcoglycan Gene During Mouse Embryonic Development and Regulation of Their Expression by Myogenic and Cardiogenic Transcription Factors

Bladimir Roque-Ramírez,<sup>1</sup> Jesús Chimal-Monroy,<sup>2</sup> Patricia Canto,<sup>3</sup> and Ramón Mauricio Coral-Vázquez<sup>4,5\*</sup>

<sup>1</sup>División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F. México

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

<sup>3</sup>Unidad de Investigación en Obesidad. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. México

<sup>4</sup>Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. México

<sup>5</sup>Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, México, D.F. México

**Background:** Type 2D limb-girdle muscular dystrophy (LGM2D) is a progressive disorder caused by mutations in the alpha sarcoglycan ( $\alpha$ -SG) gene. In mice, the  $\alpha$ -SG gene contains two promoters that regulate the expression of two different mRNAs (A and B). However, their gene expression pattern during embryonic development has not been explored and their regulation by myogenic and cardiogenic transcription factors has been only partially studied. **Results:** During embryonic development, mRNA A and B of  $\alpha$ -SG gene were initially detected in hypaxial muscles, heart, stomach, tongue, and mesenchymal cells, which surround the dorsal region of the somites. Moreover, mRNA B was exclusively expressed in the floor plate and notochord and in the interdigits of limbs. In vitro, MyoD and myogenin positively regulated the transcription of mRNA B during skeletal myogenesis, whereas mRNA A was activated only for MyoD in differentiated skeletal muscle. In addition, Gata-4 together with Mef2c may regulate the expression of mRNA B in heart development, whereas Nkx2.5 and myocardin may activate expression of mRNA A in the differentiated cardiomyocyte. **Conclusions:** The differential expression of  $\alpha$ -SG mRNAs during mouse embryonic development may be a consequence of the differential regulation of both promoters by myogenic and cardiogenic factors. *Developmental Dynamics* 243:1416–1428, 2014. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** muscular dystrophy; alpha sarcoglycan; gene expression; embryonic development; skeletal muscle; cardiac muscle; mouse

Submitted 26 November 2013; Last Decision 26 June 2014; Accepted 17 July 2014; Published online 4 August 2014

## Introduction

$\alpha$ -Sarcoglycan ( $\alpha$ -SG), a transmembrane protein detected exclusively in striated muscle, is a member of the sarcoglycan-sarcospan complex (SG-SSPN), which is constituted by  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , and sarcospan (Ervasti et al., 1990; Liu et al., 1997). In turn, these proteins form a relevant subcomplex of the dystrophin-associated protein complex. The importance of the SG-SSPN complex lies in the fact that mutations in each SG gene cause one type of limb-girdle muscular dystrophy (LGMD 2C-F) and often are associated with cardiac affectations (Roberds et al., 1994; Mizuno et al., 1995; Ozawa et al., 1998; Coral-Vázquez,

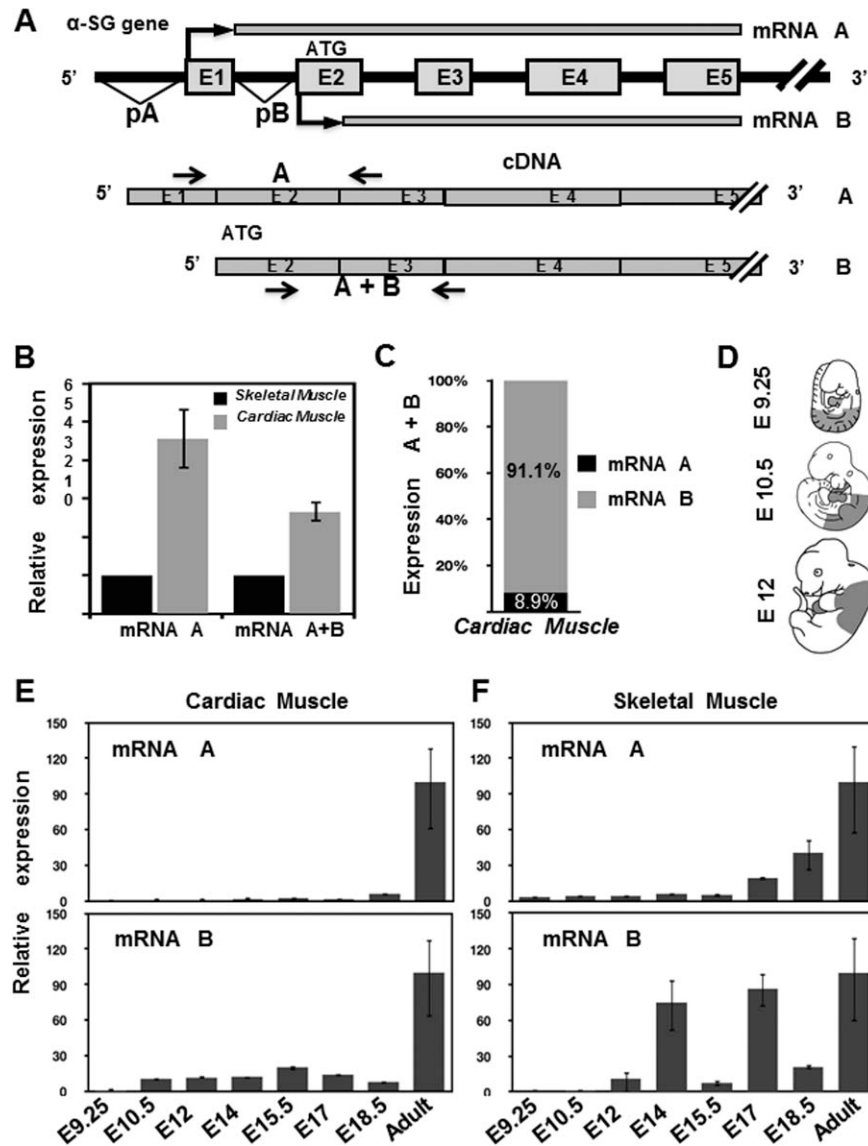
1999; Hack et al., 2000). In addition, the primary deficiency of one sarcoglycan is accompanied by the concomitant deficiency of the other sarcoglycans in the sarcolemma (Straub and Campbell, 1997; Liu and Engvall, 1999). Moreover, LGMD 2D patients with mutations in  $\alpha$ -SG and null mice for this protein present either a very mild cardiomyopathy or do not develop the disease. Absence of cardiac affectations may be explained in part due to the compensation of the absence of  $\alpha$ -SG by its highly homolog protein  $\epsilon$ -SG. This protein is part of an alternative SG-SSPN complex formed by  $\epsilon$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$ -SG present in striated muscle and other tissues including vascular smooth muscle (Liu et al., 1999; Straub et al., 1999). Double mutant mice for  $\alpha$ -SG and  $\epsilon$ -SG developed muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy (Lancioni et al., 2011). Furthermore, it has been reported that lack of  $\alpha$ -SG in myogenic progenitor cells (MPCs) leads to absence of

Grant sponsor: R.M.C.V. was supported by Grant 132284 from CONACyT. J.C.M. was supported by Grants 168642, 53484, from CONACyT, and by grants IN214511 and IN213314 from DGAPA, UNAM.

\*Correspondence to: Ramón M. Coral-Vázquez, Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Plan de San Luis y Díaz Mirón s/n, Col. Casco de Santo Tomas, México. E-mail: rmcoralv@gmail.com; rcoral@ipn.mx

Article is online at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.24175/abstract>  
© 2014 Wiley Periodicals, Inc.

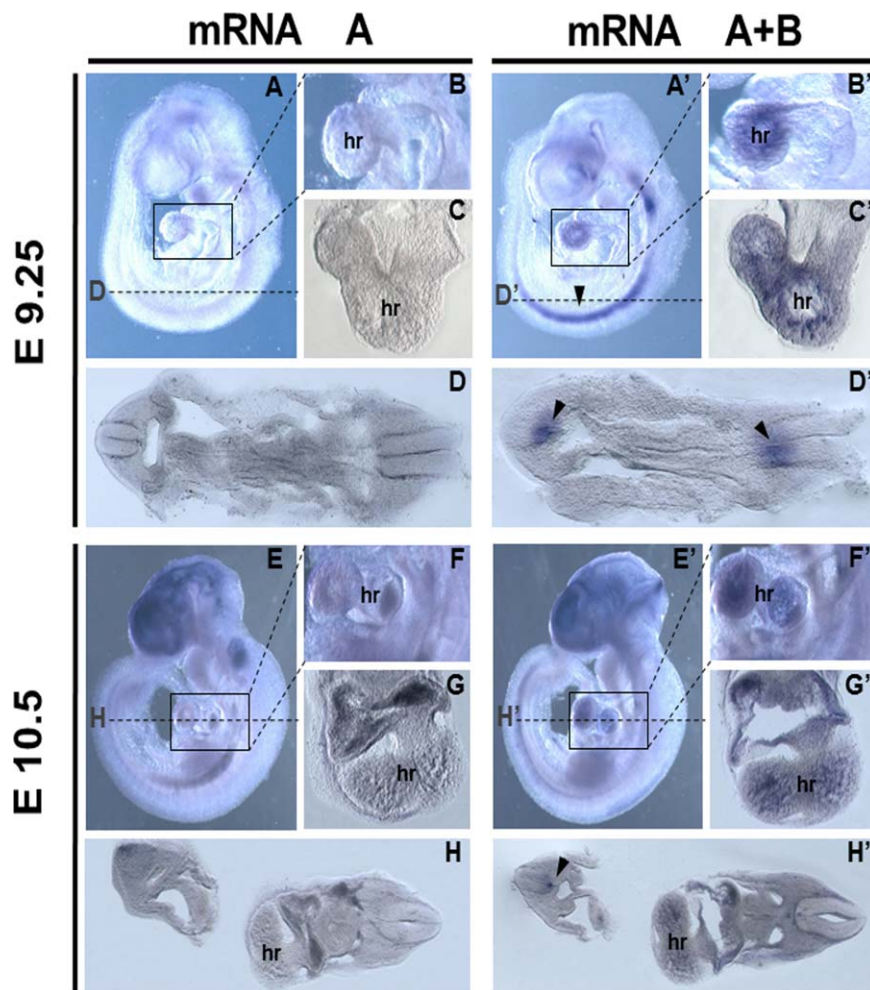




**Fig. 1.** Structure and expression of mouse  $\alpha$ -SG gene in cardiac and skeletal muscle. **A:** Location of promoter A and promoter B in the 5' region of mouse  $\alpha$ -SG gene. Promoter A induces transcription of mRNA A and promoter B directs transcription of mRNA B; the position of the primers for QRT-PCR in the regions A and B of  $\alpha$ -SG gene is represented by  $\rightarrow$   $\leftarrow$ . **B:** Relative expression of  $\alpha$ -SG mRNA A and B in cardiac and skeletal muscle of adult mouse tissue was carried out by RT-qPCR assays. **C:** Contribution of mRNA A and B for the expression of the  $\alpha$ -SG gene in adult cardiac mouse tissue. **D:** Schematic representation of embryos of E9.25, E10.5, and E12. Shaded areas indicate tissue regions from where mRNA was extracted in each stage of development. **E:** QRT-PCR expression level analysis of both mRNAs of the  $\alpha$ -SG gene using total RNA obtained from skeletal and cardiac muscle of different development stages. Values were normalized against GAPDH expression, which was used as endogenous control and compared with the expression obtained in the adult stage. Bars indicate the mean  $\pm$  SD of three triplicate measurements of a pool of 15 embryos for each stage. E, Embryonic day.

FGFR1 expression in the membrane cell, decreased cellular proliferation, and, consequently, the myogenic commitment (Cassano et al., 2011). These results highlighted the importance of the tissue-specific  $\alpha$ -SG gene regulation. In this regard, Wakabayashi-Takai et al. (2001) described the presence of two promoters in the  $\alpha$ -SG gene in mice. One of these promoters (downstream exon 1, promoter B) is activated during myotube differentiation, unlike the other promoter (upstream exon 1, promoter A) that shows a discrete activation during the same process. Studies by our research group with the  $\alpha$ -SG promoter B show that during the differentiation of myogenic precursor cells this regulatory sequence is composed of positive and negative regu-

latory elements. In this sense, we found that NFI-C2 and NFI-X2 transcription factors act as negative modulators of  $\alpha$ -SG promoter B activity in C2C12 myoblasts (Delgado-Olguin et al., 2004). In addition, this promoter is tightly regulated by the action of several distal regulatory E box elements, which exert a negative influence on the transactivation potential of MyoD on the core promoter (Delgado-Olguin et al., 2008). We later showed that Sox9 transcription factor has a repressive activity on the  $\alpha$ -SG promoter B in C2C12 myoblasts, which is enhanced by Smad3 in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner (Hernandez-Hernandez et al., 2009). On the other hand, we found that MyoD transactivated the  $\alpha$ -SG promoter B during myotube differentiation (Delgado-Olguin



**Fig. 2.** Expression of  $\alpha$ -SG gene in early stages of murine development. Detection of mRNA induced for the activity of promoter A (long mRNA, **A–H**) and the one directed for promoter A+B (short mRNA, **A'–H'**) was carried out by in situ hybridization in embryos of E9.25 and E10.5 as described in the Experimental Procedures section. Vibratome cuts more precisely show the location of the signal in cardiac tissue (**C'** and **G'**) and notochord (**D'** and **H'**). Arrowheads indicate the location of the notochord. Experiments were done in triplicate with five embryos for each experiment and with their respective negative control sense riboprobe. hr, heart.

et al., 2006). Together these studies show the importance of the  $\alpha$ -SG gene regulation by promoter B during C2C12 cell differentiation. In contrast, it appears that  $\alpha$ -SG promoter A exerts a slight influence on the regulation of  $\alpha$ -SG in this process (Wakabayashi-Takai et al., 2001). The  $\alpha$ -SG protein is expressed in adult skeletal and cardiac muscle; therefore, it is possible that both promoters may have different activities in these tissues. Additionally, fine regulation of this gene, as well as the other sarcoglycans, may be relevant for the assembly of the distinct SG-SSPN complexes during muscle differentiation (Zhu et al., 2001).

To better understand the regulation mechanisms of the  $\alpha$ -SG gene, using the MatInspector software, we searched for transcription factor binding sites matching on the DNA sequence of promoter A and promoter B. This analysis suggested that both promoters may be modulated by different master regulatory transcription factors of skeletal and cardiac muscle such as MyoD and myogenin for skeletal muscle (Buckingham, 1992) and Gata4, Nkx2.5, Mef2C, Tbx5, and Baff60C for cardiac muscle (Srivastava, 2006). Many of these factors are expressed from the early stage of striated muscle development (Buckingham, 1992;

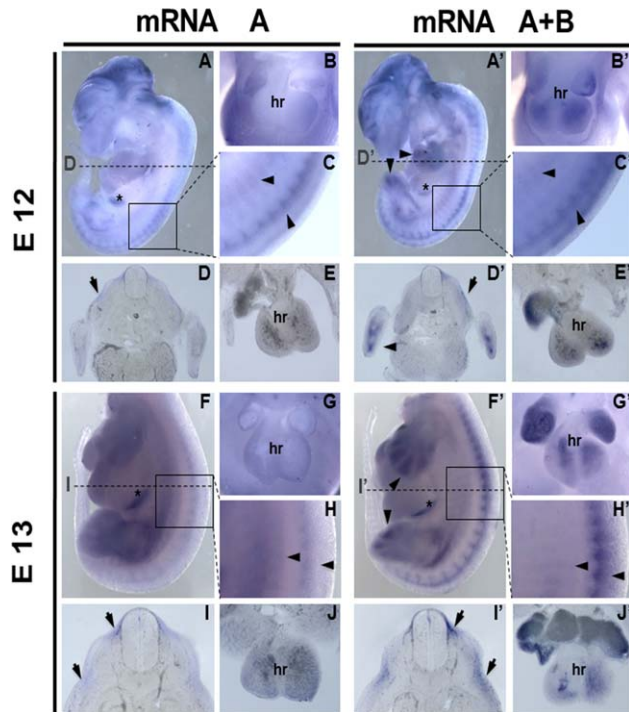
Srivastava, 2006); therefore, it is possible that promoter A and promoter B are regulated differently among themselves with tissue-specific expression during embryonic development.

In this study, we determined the expression pattern of mRNA A and mRNA B of the  $\alpha$ -SG gene during mouse development. Additionally, using transfection assays in C2C12 cells and 10T1/2 embryonic fibroblasts we identified that heart and skeletal muscle tissue-specific transcription factors are able to transactivate promoter A and promoter B of the  $\alpha$ -SG gene.

## Results

### $\alpha$ -SG mRNA B Is Expressed More Abundantly Than mRNA A During Mouse Embryonic Development

In humans and mice, the presence of the  $\alpha$ -SG protein is exclusively evident in mature striated muscle (Mizuno et al., 1993; Yamamoto et al., 1994; McNally et al., 1994; Duclos et al., 1998); moreover, in human 4-week embryos the mRNA of  $\alpha$ -SG is observed in heart and skeletal muscle precursor cells (Fougerousse et al., 1998). In order to determine the expression levels of



**Fig. 3.** Expression of  $\alpha$ -SG gene in E12 and E13 of mouse development. Detection of mRNA induced for the activity of the promoter A (long mRNA, **A–J**) and the one directed for promoter B (short mRNA, **A'–J'**) was carried out by in situ hybridization in embryos of E12 and E13 as described in the Experimental Procedures section. Long mRNA (mRNA A) is expressed in the precursor mesoderm of intercostal muscle and precursor cells of muscles that surround the backbone (arrows in **C**, **H**, and **I**); hybridization with the probe for short mRNA (mRNA B) showed a similar pattern of expression (arrows in **C'**, **D'**, **H'**, and **I'**) but with more intensity. Vibratome cuts make evident the expression of  $\alpha$ -SG gene in the dermomyotome (**D**, **D'**, **I**, and **I'**) and cardiac atrium and ventricle (**E**, **J**, and **J'**). In addition, expression of the short mRNA was also evident in interdigits of anterior and posterior limbs (arrowhead). Both mRNAs are also expressed in the stomach of embryos of E12 and E13 (asterisk in **A**, **A'**, **F** and **F'**). Experiments were done in triplicate with five embryos for each experiment and with its respective negative control sense riboprobe. hr, heart.

the  $\alpha$ -SG gene in mouse adult striated muscle and murine embryos at different stages of development, we performed QRT-PCR assays. To analyze mRNA originating from  $\alpha$ -SG gene promoters A and B (Wakabayashi-Takai et al., 2001), we designed two pairs of primers; the first one specifically identifies the longest mRNA that contains the uncoding exon 1 (mRNA A) and the second pair of primers identifies mRNAs of  $\alpha$ -SG gene (A + B) because mRNA B is contained in the sequence of mRNA A (Fig. 1A).

mRNA analysis showed that mRNA A and mRNAs A + B were more abundant in adult heart than in skeletal muscle (Fig. 1B). To determine the contribution of mRNA A in the total values of A + B, we then subtracted the  $\Delta$ CP of mRNA A from  $\Delta$ CP of mRNA A + B in the same type tissue. In this way, in cardiac muscle, it was calculated that >91% of the measurement of A + B corresponded to mRNA B (Fig. 1C); therefore, we considered that amplification with the second pair of primers was practically the measurement of mRNA B. The same strategy was used to analyze mRNA expression in embryonic and fetal mouse tissue. For embryos of days E9.25, E10.5 and E12.0, the analysis was carried

out with total RNA obtained from the heart and tissue containing skeletal muscle precursor cells (see dark areas in Fig. 1D). In fetal mice of E14, E15.5, E17 and E18.5 days, skeletal muscle total RNA was obtained from the limbs.

In developing heart, expression levels of mRNA A were very low in comparison to adult cardiac tissue (Fig. 1E, top). In contrast, mRNA B was first detected at very low levels at E9.25 and significantly increased its expression level at days E10.5, E12, and E14, which corresponds with the highest rate of cardiomyocyte proliferation (Sucov et al., 1994; Merki et al., 2005). Maximum peak expression was observed at E15.5 during growth of the muscular interventricular septum (Rosenthal and Harvey, 2010). This level then decreased in the late fetal E17 and E18.5 stages (Fig. 1E, bottom).

In skeletal muscle, we detected low levels of mRNA A from E9.25 to E14. The expression level then increased gradually from E15.5 to E18.5 fetal stages (Fig. 1F, top). This suggests that the promoter A may be positively regulated during a period marked by extensive myotube formation (Ontell and Kozeka, 1984; Ontell et al., 1988). Interestingly, mRNA B was first detected in embryonic stage from E12 with two peaks in E14 and E17 and with a marked decrease in E15.5 and E18.5 (Fig. 1F, bottom).

### Differential Expression Pattern of mRNA A and mRNA B of the $\alpha$ -SG Gene During Mouse Embryonic Development

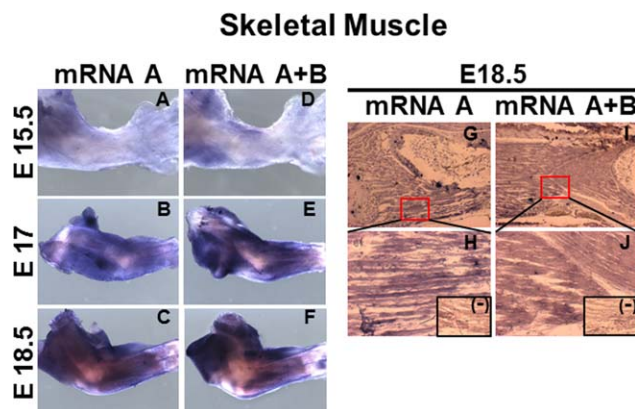
To analyze the gene expression pattern of mRNA A and mRNA B of the  $\alpha$ -SG gene, we performed whole-mount in situ hybridization in different murine embryonic (E9.25, E10.5, E12, and E13) and fetal (E15.5, E17, and E18.5) stages.

Differential expression between mRNA A and mRNA B was observed at E9.25 (Fig. 2A and A') and E10.5 (Fig. 2E and E'). These differences are seen in more detail in magnifications (Fig. 2B, B', F and F') that were confirmed with the cross-sectional slices of the heart (Fig. 2C, C', G, and G') and notochord (Fig. 2D, D', H, and H') where only the signal to mRNA B was observed. This observation is consistent with the QRT-PCR findings where mRNA A was not detected at E9.25 and E10.5 in heart (Fig. 1E, top) and with very low levels in skeletal muscle (Fig. 1F, top). In addition, we did not observe an evident signal for  $\alpha$ -SG mRNA A or B in the somites of E9.25 and E10.5, which suggests that gene expression in skeletal muscle precursor cells may occur in later stages of myoblast determination (Rudnicki et al., 1993; Kassari-Duchossoy et al., 2004).

mRNA A and mRNA B expression of the  $\alpha$ -SG gene was observed in the skeletal muscle of E12 and E13 embryos (Fig. 3A, A', F, and F'). Both RNAs were observed in a dorsal-medial position that resembles the intercostal muscle between the limbs (arrows in Fig. 3C, C', H, and H'), although mRNA B signal was more intense than the one obtained for mRNA A. In this regard, mRNA B was also evident as a strong signal in a different dorsal region from the intercostal muscles (Fig. 3A, A', F, and F'; arrowheads in Fig. 3C, C', H, and H').

Expression of both mRNAs was evident as well in areas that may be related to lateral myotome, dorsolateral dermomyotome, and mesenchymal cells that surround the dorsal region of the somites (arrows in Fig. 3D, D', I, and I'). Additionally, we found expression of mRNA B in interdigits of both forelimb and hindlimb from E12 to E13 embryos (arrowheads in Fig. 3A', D', and





**Fig. 4.**  $\alpha$ -SG gene is expressed in E15.5, E17, and E18.5 of fetal skeletal muscle. Detection of  $\alpha$ -SG mRNA induced for the activity of the promoter A (long mRNA, **A–C, G,H**) or promoter B (short mRNA, **D–F, I,J**) was carried out by in situ hybridization as described in the Experimental Procedures section. mRNA A was evident in bundles of skeletal muscle limbs of E15.5, E17, and E18.5 (**A–C**). A signal for short mRNA (mRNA B) was also present in skeletal muscle of E15.5, E17, and E18.5 (**D–F**). The presence of both mRNAs was confirmed by in situ hybridization on skeletal muscle E18.5 embryonic sections (mRNA A: **G**; mRNA B: **I**), which was more evident in the magnified images (red boxes; **H, J**). Experiments were done in triplicate for each experiment and with its respective negative control sense riboprobe (-) (**H,J**).

F'). Stomach and tongue were also marked with both mRNAs of  $\alpha$ -SG gene; stomach from E12 to E15.5 (asterisk in Fig. 3A, A', F, and F') and tongue from E13 to E15.5 (data not shown).

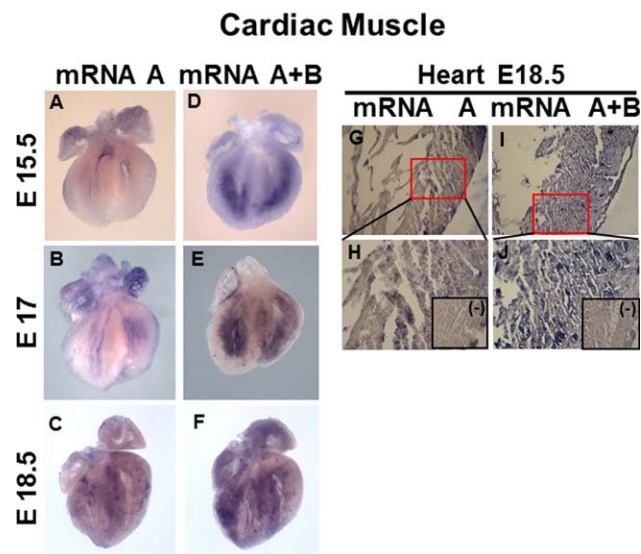
In the heart, mRNA A expression was first observed in ventricular regions of E13 embryos (Fig. 3J), whereas mRNA B was expressed in atrium and ventricle in both E12 and E13 embryos (Fig. 3B', E, G, and J').

At later development stages (E15.5 to E18.5), the bundle of muscle fibers of limb skeletal muscle was marked with both riboprobes; however, mRNA B signal (Fig. 4D–4F) was more evident than mRNA A signal (Fig. 4A–4C). mRNA transcript B showed an evident expression in myogenic stem cells isolated from newborn mouse skeletal muscle (see Fig. 6A). With respect to heart, as in skeletal muscle, mRNA B signal was more intense than the one observed for mRNA A and was observed preferentially in the ventricular region (Fig. 5A–5F). In addition, the presence of both transcripts was also evident in skeletal muscle and heart sections of E18.5 embryos (Figs. 4G–4J and 5G–5J).

The in situ hybridization assays with the sense riboprobes (negative controls) did not yield any signal (Figs. 4H, J and 5J–L). In situ hybridization showed differences in the expression pattern of both mRNAs during mouse embryonic development, suggesting that modulation of the regulatory sequences that direct the transcription of mRNA A and mRNA B may be mediated for different transcription factors. These differences in the expression pattern are summarized in Table 1.

#### Promoters A and B of $\alpha$ -SG Gene Are Regulated by MyoD, Myogenin, and Sox9 During C2C12 Cell Differentiation

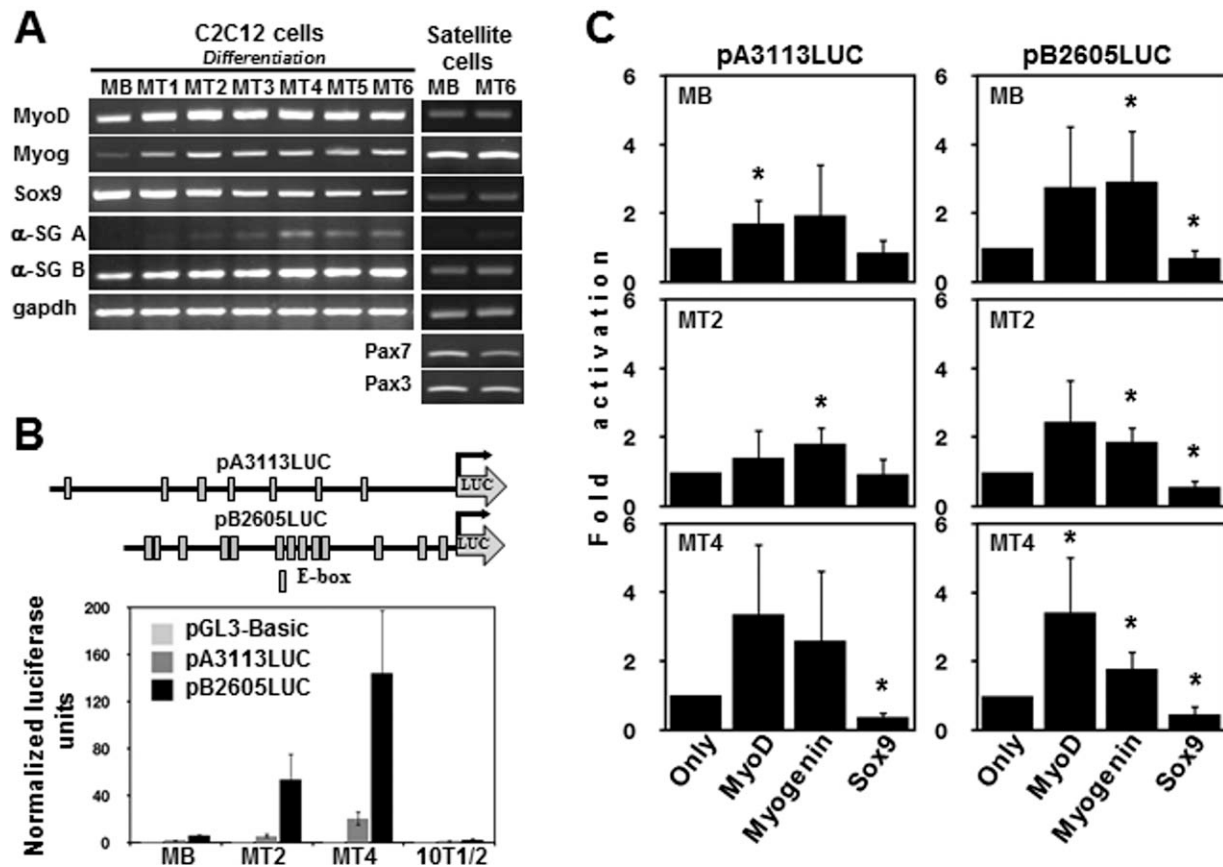
Because we observed that the  $\alpha$ -SG gene was expressed in embryonic skeletal muscle, we decided to investigate the expression of the  $\alpha$ -SG gene during in vitro skeletal muscle differentiation. We utilized murine myoblast cell line C2C12 as a



**Fig. 5.**  $\alpha$ -SG gene is expressed in E15.5, E17, and E18.5 of fetal cardiac muscle. Detection of  $\alpha$ -SG mRNA induced for the activity of the promoter A (long mRNA, **A–C**) or promoter B (short mRNA, **D–F**) was carried out by in situ hybridization as described in the Experimental Procedures section. mRNA A and B were evident in cardiac tissue of E15.5, E17, and E18.5, but the signal observed for the latter was stronger (**D–F**). The presence of both mRNAs was confirmed by in situ hybridization on cardiac muscle E18.5 embryonic sections (mRNA A: **G**; mRNA B: **I**), which was more evident in the magnified images (red boxes; **H, J**). Experiments were done in triplicate for each experiment and with its respective negative control sense riboprobe (-) (**H,J**).

differentiation model. Expression of both mRNAs of the  $\alpha$ -SG gene together with MyoD, myogenin, and Sox9 were analyzed during different stages of myogenic differentiation by RT-PCR. MyoD and myogenin are two members of a family of myogenic regulatory factors (MRFs) (Funk et al., 1991). In addition, MyoD is a master regulator of skeletal myogenesis and has the ability to initiate the myogenic program in myoblasts, fibroblasts, and a variety of other cell types (Davis et al., 1987; Edmondson and Olson, 1989; Weintraub et al., 1989; Miller, 1990; Kanisicak et al., 2009). On the other hand, our group proposed that Sox9 is responsible for preventing precocious activation of  $\alpha$ -SG gene expression during myogenic differentiation (Hernandez-Hernandez et al., 2009).

MyoD and myogenin were detected in C2C12 myoblasts (MB) and their expression level increased in the later differentiation stages of the C2C12 cells (Fig. 6A). In contrast, Sox9 expression was gradually downregulated during cell differentiation. In this regard, mRNA B was detected in MB and its expression increased during myogenesis of C2C12 cells (Fig. 6A) (Noguchi et al., 1999; Hernandez-Hernandez et al., 2009). Additionally, mRNA A was not detected in MB, but its expression was evident from myotubes of 1 day of differentiation (MT1) to MT6 with a peak in MT4 (Fig. 6A). In order to also determine the expression of all markers in a primary culture, we analyzed by RT-PCR the total RNA obtained from cultured myogenic stem cells noninduced and induced to differentiate (Fig. 6A). Foremost, to confirm the presence of myogenic cells in the isolated stem cells, expression of MyoD, Pax3, and Pax7, markers characteristic of this cell type (Lu et al., 2008; Gharaibeh et al., 2008), was analyzed. Both differentiated and undifferentiated cells showed the expression of the markers although there was an evident reduction in the expression of Pax 7 in differentiated cells.



**Fig. 6.** Modulation of  $\alpha$ -SG promoters by MyoD, myogenin and Sox9 during myotube differentiation. **A:** Total RNA from C2C12 and mouse myogenic stem cell myoblasts (MB) and myotubes of 1 (MT1), 2 (MT2), 3 (MT3), 4 (MT4), 5 (MT5), and 6 days (MT6) of differentiation was obtained to analyze by RT-PCR the expression of MyoD, myogenin, Sox9, and both mRNAs of the  $\alpha$ -SG gene (A and B). The expression of Pax 3 and Pax 7 was also analyzed in the myogenic stem cells. **B:** Schematic diagram of the  $\alpha$ -SG promoter presenting the cloned portions of promoters A (3,113 bp, pA3113LUC) and B (2,605 bp, pB2605LUC) in the pGL3-Basic expression vector and indicating the presence of the putative distal E-boxes. pGL3-Basic vector without any insert was used as a negative control. These constructs were transiently transfected into C2C12 and fibroblast (10T1/2) cells and the luciferase activity was evaluated as described in the Experimental Procedures section. **C:** C2C12 cells were transiently cotransfected with promoter A (pA3113LUC) or B (pB2605LUC) and plasmids encoding MyoD, myogenin, or Sox9. Values of luciferase activity obtained with promoter A or B alone. Bars represent the mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in duplicate. \* $P < 0.05$  was determined by the Mann-Whitney U-test.

Likewise, expression of myogenin and Sox9 was also evident in both conditions. Regarding mRNA A, it was expressed at a very low level in noninduced cells, but after differentiation its expression increased notably. In the case of mRNA B, its expression was evident in both conditions and there was a slight increment in the differentiated cells.

Once it was established that both mRNAs of the  $\alpha$ -SG gene were expressed during in vitro myogenic differentiation, we then proceeded on to evaluate the  $\alpha$ -SG gene promoter A and promoter B activity during in vitro myogenic differentiation. For this purpose, both promoters were cloned to direct the expression of the luciferase reporter gene (Fig. 6B) and transiently transfected in C2C12 and 10T1/2 cells. Neither promoter showed activity when transfected into 10T1/2 fibroblast but responded to the myogenic environment during differentiation of C2C12 cells (Fig. 6B). Basal luciferase activity was seen in C2C12 myoblast, mainly with promoter B (pB2605LUC). This activity coincided with the presence of mRNA B in this stage (Fig. 6A). In myotubes of 2 and 4 days (MT2 and MT4) of differentiation, the luciferase activity increased considerably in a time differentiation manner. Moreover, luciferase expression directed by promoter A

(pA3113LUC) was always lower than induced by pB2605LUC (Fig. 6B), corresponding with mRNA levels detected by QRT-PCR assays during mouse development (Fig. 1F). Subsequently, the effect of myogenic regulators was determined over both promoters of the  $\alpha$ -SG gene. C2C12 cells in different stages of differentiation were cotransfected with construct pA3113LUC or pB2605LUC and clones expressing MyoD, myogenin, or Sox9. MyoD and myogenin positively modulated the activity of both promoters in a similar form in all stages of differentiation (Fig. 6C). In contrast, Sox9 induced a negative modulation activity over both promoters in all stages of differentiation (Fig. 6C). These results suggest that MyoD, myogenin, and Sox9 regulate the expression activity of the  $\alpha$ -SG gene in vivo and may explain, in part, its expression pattern in embryonic development.

#### Cardiogenic Transcription Factors Modulate Promoters of the $\alpha$ -SG Gene

Another interesting finding was that  $\alpha$ -sarcoglycan was expressed in mouse embryonic heart (Figs. 2, 3, 5). To determine

**TABLE 1. Summary Expression Pattern of mRNA A and mRNA B of  $\alpha$ -SG Gene During Mouse Development<sup>a</sup>**

Stage (E)	9.25	10.5	12.0	13.0	15.5	17.0	18.5	Adult
Heart				♣				
Skeletal muscle	♢		♣					
Notochord			♢					
DMC	♢		♣					
Interdigit			♢					
Stomach			♣				ND	
Tongue			♢	♣			ND	

<sup>a</sup>DMC, dorsal mesenchymal cells; mRNA A (♣); mRNA B (♢); ND, not determined.

if cardiogenic transcription factors modify the activity of both  $\alpha$ -SG promoters, 10T1/2 fibroblasts were transiently cotransfected with pA3113LUC or pB2605LUC and plasmids encoding transcription factors Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c, and myocardin. In an independent manner, Nkx2.5, Gata-4, and myocardin significantly increased the basal activity of promoter A (Fig. 7A). Regarding promoter B, these same transcription factors plus Mef2c and Baf60 induced an increase of its activity; nevertheless, Gata-4 was the transcription factor that increases its activity with major intensity ( $\approx$ 11.7-fold). To further investigate whether Gata-4 are recruited to the  $\alpha$ -SG promoter B in vivo, we carried out chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays with the heart of E17 embryos and anti-Gata4 antibody. We used the immunoprecipitated DNA as a template for amplification and primers that include the Gata-4 binding sites at  $-200$  and  $-573$  bp present in the  $\alpha$ -SG promoter B. As negative control, we also amplified a portion of the distal  $\alpha$ -SG exon 4. Gata-4 binding sites were enriched from immunoprecipitated chromatin using anti-Gata-4 antibody, but not with an IgG (Fig. 7D). Tbx-5 did not have a significant influence over both promoters (Figs. 6B and 7A). The synergic activity of Gata-4 with other transcription factors in the cardiac-specific gene regulation has been widely documented (Stennard et al., 2003; Maitra et al., 2009). In this regard, 10T1/2 cells cotransfected with pB2605LUC and Gata-4 were also transfected together with Nkx2.5, Mef2c, Tbx-5, Baf60c, or myocardin. Only Mef2c showed a synergic activity with Gata-4 because promoter B activity was increased 2.7 times over that with just Gata-4 (Fig. 7C). On the other hand, the synergic effect of these cardiogenic factors with Nkx2.5 on the activity of pA3113LUC was investigated, but there was no significant effect (data not shown).

## Discussion

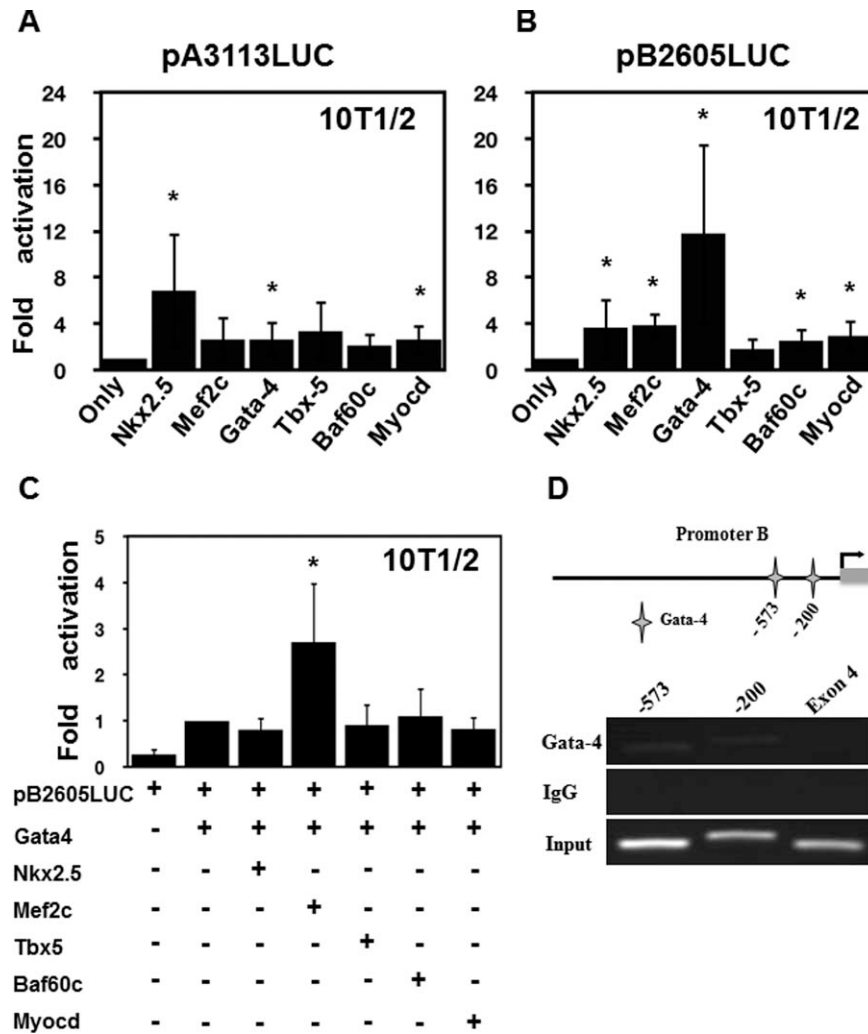
Mutations in the  $\alpha$ -SG gene that produce the absence or deficiency of the protein are associated with limb-girdle muscular dystrophy (Ervasti et al., 1990; Roberds et al., 1994; Liu et al., 1997). In mice, expression of the  $\alpha$ -SG gene is regulated by two promoters that produced two mRNAs that codify for the same protein structure (Wakabayashi-Takai et al., 2001). Here we reported for the first time the expression of two mRNAs (A and B)

of the  $\alpha$ -SG gene in mouse development and during in vitro skeletal muscle differentiation in addition to their regulation by myogenic differentiation markers as MyoD and myogenin, myogenic repressor Sox9, and cardiogenic transcription factors.

Our data indicated that mRNA B is more abundant than mRNA A in skeletal and cardiac muscle, representing  $>91\%$  of the total expression of mRNA of the  $\alpha$ -SG gene. In addition, during mouse development the expression of mRNA B preceded the expression of mRNA A. The same was observed during in vitro differentiation of C2C12 cells where mRNA B was evident from myoblast to myotubes; in contrast, mRNA A was detected only in myotube stages and was always less abundant.

Gene expression analysis by QRT-PCR and in situ hybridization showed an early expression of mRNA B in E9.25 in the floor plate and notochord that disappears together with the notochord in E10.5. This expression was similar to the one observed for Gli genes, which, in turn, regulate the expression of genes transcribed in the floor plate and notochord (Sasaki et al., 1997; Lee et al., 1997; Ruiz i Altaba, 1998; Epstein et al., 1999). Furthermore, the *Sonic hedgehog* (SHH) protein, a specific marker of the floor plate and notochord, modulates the expression of Gli genes. In a computer analysis, we observed that promoter B of the  $\alpha$ -SG gene contains three potential binding sites for the Gli transcription factors. Because of this, it is possible that promoter B of the  $\alpha$ -SG gene may be a downstream target of SHH signaling pathway in the floor plate and notochord.

In E12 and E13, both mRNAs were observed in the hypaxial muscles, which emerged from the lateral myotome and dorsolateral dermomyotome (Wilson-Rawls et al., 1999). These muscles lead to the establishment of the intercostal and limb musculature that expresses MyoD and myogenin (Buckingham, 1992; Wood et al., 2013). Interestingly, mRNA B showed a dynamic expression during embryonic development of skeletal muscle with two peaks of expression at E14 and E17 followed by a dramatic downregulation. These two peaks of expression are preceded by the presence of a high density of satellite cells expressing MyoD in limbs of E12.5 (Wood et al., 2013) and in cells of forelimbs at E14 (Sassoon et al., 1989). Likewise, our results showed an evident expression of mRNA B in myogenic stem cells isolated from newborn mice and may partially explain the expression peaks.



**Fig. 7.** Cardiogenic transcription factors positively regulate the promoters of mouse  $\alpha$ -SG gene in 10T1/2 cells. Co-transfection assay of pA3113LUC (**A**) or pB2605LUC (**B**) with constructs expressing cardiogenic transcription factors Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c, and myocardin. **C:** Co-transfection assay of pB2605LUC with different combinations of constructs expressing distinct cardiogenic transcription factors. Bars represent the means  $\pm$  SD of at least three independent experiments performed in duplicate. \* $P < 0.05$  was determined by the Mann-Whitney U-test. **D:** Schematic diagram of the  $\alpha$ -SG promoter B indicating the presence of Gata-4 boxes amplified from immunoprecipitated heart E17 embryo chromatin. Chromatin immunoprecipitated with anti-Gata-4 antibody was used as a template for PCR amplification of the DNA indicated regions. PCR products were not obtained from chromatin immunoprecipitated with an IgG.

Moreover, mRNA A showed a low expression level in myogenic stem cells induced to differentiate. This tendency in the expression level among mRNA A and B was also observed in the embryos of different stages and C2C12 cells. Coincidentally, data of the transient transfection suggest a higher activity of promoter B in comparison with promoter A.

In this regard, the transient transfection assays in C2C12 cells and 10T1/2 fibroblast suggested a skeletal muscle-specific expression of the gene. Furthermore, we previously reported that MyoD interacts with general transcription factors TFIID and TFIIB in the  $\alpha$ -SG core promoter B, which modulates the mRNA B of the  $\alpha$ -SG gene during myogenesis of C2C12 cells (Delgado-Olguin et al., 2006). In the present study, our data showed that MyoD and myogenin exert a positive regulation over promoter B during C2C12 differentiation. On the other hand, promoter A was modulated significantly by MyoD in the myoblast stage. Therefore, in silico analysis of promoter A showed that its sequence contains seven potential E-boxes that may interact with MyoD to

regulate the promoter. From these results, together with the expression pattern of MyoD and myogenin during mouse embryogenesis (Sassoon et al., 1989; Buckingham, 1992), it may be proposed that these transcription factors regulate expression of the  $\alpha$ -SG gene as muscle differentiation progresses. Interestingly, we observed in fibroblasts that Mef2c and Baf60c positively regulate the  $\alpha$ -SG promoter B because these transcription factors are also expressed in myotome (Edmondson et al., 1994; Lickert et al., 2004), it may contribute to the transcription of the gene during skeletal muscle differentiation.

Regarding the downregulation of the mRNA B at E15.5 and E18.5, several studies have proposed that miRNAs may regulate the myogenic program. In this sense, mRNA may be targeted by miRNAs as indicated by the prediction performed with the algorithms TargetScan (<http://www.targetscan.org>), Diana-MicroT3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr>), and miRanda (<http://www.microrna.org>). These algorithms suggest that the 3'UTR of mRNA B of the  $\alpha$ -SG gene have one single target canonic site for miR27a/b



type 7mer-1A in the seed match (Bartel, 2009). In this regard, it has been reported that miR27a/b are expressed in embryonic skeletal muscle and downregulate genes involved in skeletal myogenesis (Allen and Loh, 2011; Crist et al., 2009; Huang et al., 2012).

Moreover, our data showed that Sox9 negatively modulates both promoters of the  $\alpha$ -SG gene in C2C12 cells. We previously reported that NF1-2C and Sox9 bind promoter B in myoblast to downregulate mRNA B expression (Delgado-Olguin et al., 2004; Hernandez-Hernandez et al., 2009). Additionally, our experiment suggests that Sox9 has the capacity to downregulate expression of the  $\alpha$ -SG gene during all distinct stages of differentiation in C2C12 cells. This mechanism of repression may be relevant during the formation of the digits of the limbs in E12 and E13 embryos because mRNA B is expressed only in interdigits but not in the development of digits of the forelimb and hindlimb. This observation is supported by the fact that Sox9 represses muscular genes and activates chondrogenic genes in the digits of the limbs (Bi et al., 1999; Cairns et al., 2012). However, it is reasonable to speculate that other transcription factors present in the interdigital regions may promote expression of mRNA B. In addition, a previous study reported the activity of the  $\gamma$ -sarcoglycan ( $\gamma$ -SG) gene promoter in the distal ridge of the autopod of the forelimb and hindlimb from E10.5 to E13.5 embryos (Noguchi et al., 2001). On this basis, it is possible to suggest the existence of one sarcoglycan complex during the autopod morphogenesis of the limb development.

In situ hybridization in heart indicated that mRNA B was expressed in early morphogenetic states, from S-shaped looped heart at E9.25 to morphologically mature heart at E18.5 embryos, whereas the signal for mRNA A was observed in cardiac tissue from E13 embryos when interventricular septation was advanced and differentiation and proliferation processes of cardiomyocytes are increased (Figs. 2 and 3) (Sucov et al., 1994; Merki et al., 2005). In this regard, all cardiogenic transcription factors analyzed in this study are expressed in the cardiac crescent stage (Lints et al., 1993; Wang et al., 1996; Reecy et al., 1999; Wang et al., 2001; Lickert et al., 2004). Expression of both mRNAs was mainly observed in the myocardium and endocardium ventricular, and slightly in atria. Coincidentally, Nkx2.5, Gata4, Mef2c, Baf60c, myocardin, and Tbx-5 are also expressed in these structures during cardiac morphogenesis (Lickert et al., 2004; Wang et al., 2001; Takeuchi et al., 2007; Yoshimura et al., 2009; Nagy et al., 2010; Greulich et al., 2011; Schachterle et al., 2012).

According to an *in silico* analysis (MatInspector: www.genomatix.de/), it was determined that cardiogenic transcription factors Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, and Tbx-5 (Hiroi et al., 2001; Srivastava, 2006; Schlesinger et al., 2011) have potential binding sites on promoter A and promoter B of the  $\alpha$ -SG gene. Our assays of transient transfection in 10T1/2 fibroblast indicate that *in vitro*, Nkx2.5, Gata-4, and myocardin positively modulate the transcription of promoter A and B. This suggests that the specific expression in cardiac tissue of both mRNAs could be mediated, in part, by these cardiogenic factors. Nkx2.5 and myocardin may also participate in the expression and regulation of mRNA A and B in the embryonic stomach because these factors also are present in this structure at E12.5 and E13.5 embryos (Lints et al., 1993; Reecy et al., 1999; Wang et al., 2001).

Promoter B was also positively regulated by Mef2c and Baf60c. Baf60c is a subunit of the remodeling chromatin complex Swi/Snf-like BAF (Brg1/Brm-associated factor) ATP-dependent, which is expressed in the heart and together with Tbx5 was

required *in vivo* for full differentiation into contracting cardiomyocytes (Wang et al., 1996; Lickert et al., 2004; Takeuchi et al., 2007; Takeuchi and Bruneau, 2009). This result presents the possibility that the  $\alpha$ -SG promoter B recruits the remodeling chromatin complex through Baf60c. Furthermore, Mef2c is a transcriptional regulator of genes during embryonic ventricle development (Phan et al., 2005). These two transcription factors may induce promoter B activity during early heart development as observed in our *in situ* hybridization analysis.

Interestingly, we observed strong luciferase activity mediated by Gata-4 on promoter B but not on the activity from promoter A. Furthermore, the presence of the transcription factor on two regions (−200 and −573 bp) of the promoter B from the heart of E17 embryos immunoprecipitated with anti-Gata-4 was observed *in vivo*. Gata-4 is expressed during cardiac development with significant participation in cardiomyocyte differentiation, proliferation, and survival, and its deficiency is associated with congenital heart defects (Arceci et al., 1993; Grepin et al., 1995; Molkenin et al., 1997; Pehlivan et al., 1999). To regulate transcription during heart development, Gata-4 binds in promoter regions. It has been shown that it interacts with various transcription factors and members of complex chromatin remodeling such as Nkx2.5, Tbx5, Mef2c, and Baf60c (Durocher et al., 1997; Morin et al., 2000; Lickert et al., 2004). We also showed a synergic effect of activation on promoter B mediated by Gata-4 with Mef2c, but not with Nkx2.5, Tbx5, Baf60c, or myocardin. This synergy can be through a binding consensus site located along the 2.6-kB region of promoter B. This promoter contains two canonic binding sites to Mef2c and three for Gata-4; however, it would be important to determine the functionality of this consensus site as it may modulate the transcription of  $\alpha$ -SG mRNA B during heart development.

In summary, we describe for the first time the temporal-spatial expression of both mRNAs of the  $\alpha$ -SG gene during different stages of mouse development. Our results indicate an early expression of  $\alpha$ -SG, mainly in skeletal and cardiac muscle precursor cells during embryogenesis. In addition, the data suggest that both promoters of the  $\alpha$ -SG gene are subjected to specific regulation mechanisms in striated muscle development by interacting differently with myogenic and cardiogenic transcription factors. Together these outcomes suggest the early presence of the  $\alpha$ -SG protein and the significant role that it may play in the initial phases of striated muscle development. Furthermore, its expression, along with the other members of the sarcoglycan complex, may be relevant to the development of myogenic and cardiogenic structures. In this regard, it has been reported that the deficiency of  $\alpha$ -SG reduces the proliferative capacity of myogenic progenitor cells in both humans and mice (Cassano et al., 2011). Consequently, it would be relevant in future investigations to delve further into the impact that early expression of  $\alpha$ -SG protein during striated muscle development may have on the determination of satellite cell niches and its contribution to the pathophysiology of muscular dystrophy in postnatal stages.

## Experimental Procedures

### Ethics Statement

All procedures were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Animal Resources of the United States as approved in



Mexico by the National Academy of Medicine (<http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm>).

## Animals

Experiments were carried out in adult and embryonic CD1 mice. Embryonic specimens were obtained from embryonic day (E) 9.25, E10.5, E12, E13, E14, E15.5, E17, and E18.5.

## Isolation of RNA and RT-PCR Assays

Total RNA extractions from mouse embryos at different stages of development, cardiac and skeletal muscle of adult mice and C2C12 myoblasts (MB), and 6-day differentiation myotubes (MT6) and satellite cells were performed using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). cDNA was obtained by reverse transcriptase from 3 µg of total RNA using a first-strand synthesis kit (Invitrogen). cDNA was then amplified and detected by SYBR Green-based (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) RT-PCR (QRT-PCR) assays with the LightCycler 480 II Real-Time PCR System (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). The expression analysis of  $\alpha$ -SG, MyoD, myogenin, and Sox9 genes was performed using the following oligonucleotides:  $\alpha$ -SG mRNA A forward 5'-ATGGAACCTGAACTGAGACAT-3' and reverse 5'-TAGGTGATAAAGTTGTCTGCTGG-3';  $\alpha$ -SG mRNA A + B forward 5'-GGCAGCAGCAGTAACTTGGATAC-3' and reverse 5'-CTGTGACCTCGATGACTTGGTAC-3'; MyoD forward 5'-CCCCGACGGCTCTCTCTGCT-3' and reverse 5'-TCACTTTGCTCAGGCGGCGG-3'; myogenin forward 5'-CACAGCGCTCTCTGAGTCC-3' and reverse 5'-CGCTGGGCTGGGTGTTAGCC-3'; Sox9 forward 5'-GGGCTCGATGAATCTCT-3' and reverse 5'-GACCACCCGATTACAA GTAC-3'; Pax7 forward 5'-GACTCCGGATGTGGAGAAAA-3' and reverse 5'-GAGACTCGGCTAATCGAAC-3'; and Pax3 forward 5'-ATTCTTCGAACGCAGACAG-3' and reverse 5'-ACCGTGGTTGGT CAGAAGTC-3'.

RT-PCR conditions were pre-incubation for 5 min for at 95°C followed by 40 cycles, each round consisting of denaturation for 10 sec at 95°C, alignment 10 sec at 72°C, and extension 15 sec at 72°C and final extension of 7 min at 72°C. To normalize RT-PCR values we amplified the GAPDH gene using the following primers: forward 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3'; reverse 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3'.

## Synthesis of cRNA Probes and In Situ Hybridization

cRNA probes were generated by cloning two cDNA fragments of  $\alpha$ -SG gene in pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, WI). The templates were then digested with Nco I or Pst I enzymes (New England Biolabs, Ipswich, MA). Antisense and sense riboprobes were transcribed in vitro in the presence of digoxigenin-UTP (Roche Applied Science) using T7 or SP6 RNA polymerase (Invitrogen). Riboprobes were purified by ethanol precipitation using as a carrier yeast tRNA (Invitrogen). For in situ hybridization, the following riboprobes were used:  $\alpha$ -SG-173, which hybridizes with exon 1 of mRNA A of the  $\alpha$ -SG gene and the riboprobe  $\alpha$ -SG-447, which hybridized from exon 2 to exon 6 of both mRNA A and mRNA B. Whole-mount in situ hybridization was performed in embryos as well as fetal hearts and limbs (Chimal-Monroy et al., 2002). All specimens were hybridized with sense or antisense probes. Embryos and fetal tissue were fixed overnight in freshly prepared 4% formaldehyde and dehydrated

in a methanol:PBT (PBS with 0.1% Tween-20) graded series and stored in absolute methanol at -20°C until used. After dehydration and permeabilization, embryos were treated with 35 µg/mL proteinase K (PK) for 10 min at 0°C, incubated 20 min at 10°C and, finally, depending on the embryonic development stage, incubated for 20–40 min at 15°C. Hybridization of the specimens with the cRNA probe was done at 65°C and later the specimens were washed at 68°C. Signal hybridization was visualized with BM purple substrate for alkaline phosphatase (AP) (Roche). The reaction was developed for at least 4 hr depending on the developmental stage of the embryo. After photographing the specimens, they were cut into 70-µm slices with a vibratome to observe the details of the signal in the embryonic structure. For section in situ hybridization, fetal heart and limbs were embedded in paraffin and 10-µm sections were collected. Hybridization of the anti-sense or sense probe was made at 65°C overnight. After washing, the sections were incubated with anti-DIG antibody-coupled alkaline phosphatase and DIG-labelled molecules were detected using purple BM.

## Constructs and Plasmids

The 5'-flanking sequence of exon 1 of the  $\alpha$ -SG gene spanning -3,113/+28 bp of promoter A was amplified by PCR from mouse genomic DNA and cloned upstream of the reporter gene luciferase into a *KpnI* site of pGL3-Basic vector (Promega) to generate the construction pA3113LUC. Primers used to amplify this sequence were as follows: forward 5'-GCGCGGTACTACTGG AGTGCTGACAGATGA-3' and reverse 5'-GCGCGGTACTGTGCC CAGATCACCTTGATATC-3'. The integrity of the clone was confirmed by DNA sequencing. The construction pB2605LUC containing -2,605/+4 bp of promoter B was previously reported as construction F1B by our group (Delgado-Olguin et al., 2006). The constructions pQBI-MyoD and pMyogenin, which encode for MyoD and myogenin proteins, respectively, were kindly provided by Dr. Bulmaro Cisneros (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Mexico City). pcDNA N-Myc-Sox9 plasmid was used previously by our group (Hernandez-Hernandez et al., 2009). The plasmid encoding for Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c, and myocardin proteins were kindly provided by Dr. Benoit G. Bruneau (Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA).

## Satellite Cell Primary Cultures

Myogenic cell isolation was performed as previously described (Gharaibeh et al., 2008) with minor modifications. Briefly, skeletal muscle was obtained from the forelimbs and hindlimbs of mice sacrificed at 14–20 days of age. Cells were isolated through a series of enzymatic dissociations; 0.2% of collagenase type II (Invitrogen) for 1 hr, 2.4 U/ml of dispase (Invitrogen) for 45 min, and 0.1% of trypsin-EDTA (Invitrogen) for 30 min. The entire digestion process was performed under stirring at 37°C. After enzymatic dissociation and straining of the digestion product through a 40-µm cell strainer, the cells were centrifuged and resuspended in proliferation medium [DMEM/F10 supplemented with 10% FBS (Invitrogen), 10% horse serum (Invitrogen), 0.5% chick embryo extract (US Biological), and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen)]. The suspension was then plated on collagen-coated dishes and myoblasts were enriched by replating (Lu et al., 2008). To induce differentiation of the myogenic cell,

the cultures were placed into differentiation medium (DMEM supplemented with 5% FBS and 1% penicillin-streptomycin).

### Cell Culture and Transfection

C2C12 cells and 10T1/2 fibroblast were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics-antimycotics. To induce differentiation in C2C12 cells grown, medium was replaced by DMEM medium supplemented with 1% horse serum and 1% antibiotics-antimycotics (Invitrogen).

C2C12 and 10T1/2 cells seeded in six-well plates at a density of 200,000 and 500,000 cells, respectively, were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were transfected with 1  $\mu$ g of each promoter constructs or co-transfected with 0.5  $\mu$ g of MyoD, Myogenin, Sox9, Nkx2.5, Mef2c, Gata-4, Tbx-5, Baf60c, and myocardin encoding vectors. In all assays, 300 ng of pRL/CMV Renilla reniformis luciferase vector (Promega) was cotransfected for normalization.

### Dual-Luciferase Assay

C2C12 cells transfected were harvested as 24-hr myoblasts (MB) or as myotubes with 2 (MT2) and 4 (MT4) days of differentiation, whereas 10T1/2 fibroblasts were harvested 48 hr post-transfection. Luciferase activity was assessed using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions in a TD-20/20 luminometer (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA).

### ChIP Assay

Chromatin was isolated from cardiac tissue of E17 embryos according to the Magna ChIP G Tissue Kit (Millipore) protocol. Chromatin was sonicated and subjected to immunoprecipitation with 5  $\mu$ g of anti-Gata4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology). Cross-linking was reversed and DNA was purified and used as template for PCR amplification. Amplified fragments include binding sites for Gata4 on the promoter B (–200 bp and –573 bp). Primers used were Gata4–200 F 5' CAAAGCAGGCAAACAGACAA 3', Gata4–200 R 5' CTGACTCTGGGGTGGACACT 3', Gata4–573 F 5' CACACAGAGTCCTGGGTTCA 3', and Gata4–573 R 5' GCTGGCC TCAAACATGCTAT 3'. As a negative control, exon 4 of  $\alpha$ -SG was amplified with the following primers:  $\alpha$ -SGE4F: 5'-ACTGTCCGACTCACCTACCA-3' and  $\alpha$ -SGE4R: 5'-TGACTTGGTACCCACGATCT-3'. PCR conditions were as follows: 1 cycle at 95°C for 3 min, 34 cycles at 95°C for 30 sec, 63°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, and a final extension at 72°C for 7 min.

### Statistical Analysis

For data from the fold of activation of luciferase, Mann-Whitney U-test was applied to compare differences between transactions with promoter A or B and their cotransfections with different transcription factors.  $P < 0.05$  was accepted as statistically significant.

### Acknowledgments

We thank Dr. Benoit G. Bruneau for kindly providing encoded plasmids for Nkx2.5, Mef2c, Gata4, Tbx5, Baf60c, and myocardin,

M. en C. María Eugénia Aguilar Nájera (Bioterio de la Escuela, Superior de Medicina, IPN) for providing the specimens and José Manuel Hernández Hernández for technical help. Bladimir Roque-Ramírez was a Ph.D. student of the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, and received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), Mexico. Sharon Morey, Executive Editor, Scientific Communications, assisted in the English review of the manuscript.

### References

- Allen DL, Loh AS. 2011. Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C124–137.
- Arceci RJ, King AA, Simon MC, Orkin SH, Wilson DB. 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13:2235–2246.
- Bartel DP. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–233.
- Bi W, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 1999. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22:85–89.
- Buckingham M. 1992. Making muscle in mammals. *Trends Genet* 8:144–148.
- Cairns DM, Liu R, Sen M, Canner JP, Schindeler A, et al. 2012. Interplay of Nkx3.2, Sox9 and Pax3 regulates chondrogenic differentiation of muscle progenitor cells. *PLoS One* 7:e39642.
- Cassano M, Dellavalle A, Tedesco FS, Quattrocchi M, Crippa S, Ronzoni F, Salvade A, Berardi E, Torrente Y, Cossu G, Sampaolesi M. 2011. Alpha sarcoglycan is required for FGF-dependent myogenic progenitor cell proliferation in vitro and in vivo. *Development* 138:4523–4533.
- Chimal-Monroy J, Montero JA, Gañan Y, Macias D, Garcia-Porrero JA, Hurlé JM. 2002. Comparative analysis of the expression and regulation of Wnt5a, Fz4, and Frzb1 during digit formation and in micromass culture. *Dev Dyn* 224:314–320.
- Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP. 1999. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98:465–474.
- Crist CG, Montarras D, Pallafacchina G, Rocancourt D, Cumano A, Conway SJ, Buckingham M. 2009. Muscle stem cell behavior is modified by microRNA-27 regulation of Pax3 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:13383–13387.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51:987–1000.
- Delgado-Olguin P, Rosas-Vargas H, Recillas-Targa F, Zentella-Dehesa A, Bermudez de Leon M, Cisneros B, Salamanca F, Coral-Vázquez R. 2004. NFI-C2 negatively regulates alpha-sarcoglycan promoter activity in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 319:1032–1039.
- Delgado-Olguin P, Recillas-Targa F, Rosas-Vargas H, Salamanca F, Coral-Vázquez RM. 2006. Partial characterization of the mouse alpha-sarcoglycan promoter and its responsiveness to MyoD. *Biochim Biophys Acta* 1759:240–246.
- Delgado-Olguin P, Hernandez-Hernandez JM, Salamanca F, Recillas-Targa F, Coral-Vázquez RM. 2008. Identification of two E-boxes that negatively modulate the activity of MyoD on the alpha-sarcoglycan core promoter. *Biochim Biophys Acta* 1779:74–80.
- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP. 1998. Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 142:1461–1471.

- Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. 1997. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J* 16:5687-5696.
- Edmondson DG, Olson EN. 1989. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev* 3:628-640.
- Edmondson DG, Lyons GE, Martin JF, Olson EN. 1994. Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120:1251-1263.
- Epstein DJ, McMahon AP, Joyner AL. 1999. Regionalization of Sonic hedgehog transcription along the anteroposterior axis of the mouse central nervous system is regulated by Hnf3-dependent and -independent mechanisms. *Development* 126:281-292.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP. 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319.
- Fougerousse F, Durand M, Suel L, Pourquie O, Delezoide AL, Romero NB, Abitbol M, Beckmann JS. 1998. Expression of genes (CAPN3, SGCA, SGCB, and TTN) involved in progressive muscular dystrophies during early human development. *Genomics* 48:145-156.
- Funk WD, Ouellette M, Wright WE. 1991. Molecular biology of myogenic regulatory factors. *Mol Biol Med* 8:185-195.
- Gharraibeh B, Lu A, Tebbets J, Zheng B, Feduska J, Crisan M, Péault B, Cummins J, Huard J. 2008. Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *J Nat Protoc* 3:1501-1509.
- Grepin C, Robitaille L, Antakly T, Nemer M. 1995. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. *Mol Cell Biol* 15:4095-4102.
- Greulich F, Rudat C, Kispert A. 2011. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res* 91:212-222.
- Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadhazy MR, Sweeney HL, McNally EM. 2000. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci* 113:2535-2544.
- Hernandez-Hernandez JM, Delgado-Olguin P, Aguillon-Huerta V, Furlan-Magaril M, Recillas-Targa F, Coral-Vázquez RM. 2009. Sox9 represses alpha-sarcoglycan gene expression in early myogenic differentiation. *J Mol Biol* 394:1-14.
- Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, Ikeda Y, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. 2001. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet* 28:276-280.
- Huang Z, Chen X, Yu B, He J, Chen D. 2012. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochem Biophys Res Commun* 423:265-269.
- Kanisicak O, Mendez JJ, Yamamoto S, Yamamoto M, Goldhamer DJ. 2009. Progenitor of skeletal muscle satellite cells express the muscle determination gene, MyoD. *Dev Biol* 332:131-141.
- Kassar-Duchossoy L, Gayraud-Morel B, Gómes D, Rocancourt D, Buckingham M, Shinin V, Tajbakhsh S. 2004. Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature* 431:466-471.
- Lancioni A, Rotundo IL, Kobayashi YM, D'Orsi L, Aurino S, Nigro G, Piluso G, Acampora D, Cacciottolo M, Campbell KP, Nigro V. 2011. Combined deficiency of alpha and epsilon sarcoglycan disrupts the cardiac dystrophin complex. *Hum Mol Genet* 20:4644-4654.
- Lee J, Platt KA, Censullo P, Ruiz i Altaba A. 1997. Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124:2537-2552.
- Lickert H, Takeuchi JK, Von Both I, Walls JR, McAuliffe F, Adamson SL, Henkelman RM, Wrana JL, Rossant J, Bruneau BG. 2004. Baf60c is essential for function of BAF chromatin remodeling complexes in heart development. *Nature* 432:107-112.
- Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119:969.
- Liu L, Vachon PH, Kuang W, Xu H, Wewer UM, Kylsten P, Engvall E. 1997. Mouse adhalin: primary structure and expression during late stages of muscle differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 235:227-235.
- Liu LA, Engvall E. 1999. Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem* 274:38171-38176.
- Lu A, Cummins JH, Pollett JB, Cao B, Sun B, Rudnicki MA, Huard J. 2008. Isolation of myogenic progenitor populations from Pax7-deficient skeletal muscle based on adhesion characteristics. *Gene Ther* 15:1116-1125.
- Maitra M, Schluterman MK, Nichols HA, Richardson JA, Lo CW, Srivastava D, Garg V. 2009. Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development. *Dev Biol* 326:368-377.
- McNally EM, Yoshida M, Mizuno Y, Ozawa E, Kunkel LM. 1994. Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9690-9694.
- Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, Burch J, Kubalak SW, Kaliman P, Izpisua Belmonte JC, Chien KR, Ruiz-Lozano P. 2005. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:18455-18460.
- Miller JB. 1990. Myogenic programs of mouse muscle cell lines: expression of myosin heavy chain isoforms, MyoD1, and myogenin. *J Cell Biol* 111:1149-1159.
- Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Hirai S, Ozawa E. 1993. Distribution of dystrophin isoforms and dystrophin-associated proteins 43DAG (A3a) and 50DAG (A2) in various monkey tissues. *J Biochem* 114:936-941.
- Mizuno Y, Noguchi S, Yamamoto H, Yoshida M, Nonaka I, Hirai S, Ozawa E. 1995. Sarcoglycan complex is selectively lost in dystrophic hamster muscle. *Am J Pathol* 146:530-536.
- Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11:1061-1072.
- Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M. 2000. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J* 19:2046-2055.
- Nagy I, Railo A, Rapila R, Hast T, Sormunen R, Tavi P, Räsänen J, and Vainio S. 2010. Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium development by patterning N-cadherin and b-catenin expression. *Cardiovasc Res* 85:100-109.
- Noguchi S, Wakabayashi E, Imamura M, Yoshida M, Ozawa E. 1999. Developmental expression of sarcoglycan gene products in cultured myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 262:88-93.
- Noguchi S, Wakabayashi-Takai E, Sasaoka T, Ozawa E. 2001. Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of gamma-sarcoglycan gene using a transgenic mouse. *FEBS Lett* 495:77-81.
- Ontell M, Kozeka K. 1984. Organogenesis of the mouse extensor digitorum longus muscle: a quantitative study. *Am J Anat* 171:149-161.
- Ontell M, Hughes D, Bourke D. 1988. Morphometric analysis of the developing mouse soleus muscle. *Am J Anat* 181:279-288.
- Ozawa E, Noguchi S, Mizuno Y, Hagiwara Y, Yoshida M. 1998. From dystrophinopathy to sarcoglycanopathy: evolution of a concept of muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 21:421-438.
- Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slaugh R, Van Rheaden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV. 1999. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet* 83:201-206.
- Phan D, Rasmussen TL, Nakagawa O, McAnally J, Gottlieb PD, Tucker PW, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2005. BOP, a regulator of right ventricular heart development, is a direct transcriptional target of MEF2C in the developing heart. *Development* 132:2669-2678.
- Reedy JM, Li X, Yamada M, DeMayo FJ, Newman CS, Harvey RP, Schwartz RJ. 1999. Identification of upstream regulatory regions in the heart-expressed homeobox gene Nkx2-5. *Development* 126:839-849.
- Roberds SL, Leturcq F, Allamand V, Piccolo F, Jeanpierre M, Anderson RD, Lim LE, Lee JC, Tomé FMS, Romero NB, Fardeau M, Beckmann JS, Kaplan JC, Campbell KP. 1994. Missense



- mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell* 78:625–633.
- Rosenthal N, Harvey RP. 2010. *Heart Development and Regeneration*: New York; Elsevier Science.
- Rudnicki MA, Schnegelsberg PN, Stread RH, Braun T, Arnold HH, Jaenisch R. 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75:1351–1359.
- Ruiz i Altaba A. 1998. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125:2203–2212.
- Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development* 124:1313–1322.
- Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M. 1989. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341:303–307.
- Schachterle W, Rojas A, Xu S and Black BL. 2012. ETS-dependent regulation of a distal Gata4 cardiac enhancer. *Dev Biol* 361:439–449.
- Schlesinger J, Schueler M, Grunert M, Fischer JJ, Zhang Q, Krueger T, Lange M, Tönjes M, Dunkel I, Sperling SR. 2011. The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs. *PLoS Genet* 7:e1001313.
- Srivastava D. 2006. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126:1037–1048.
- Stennard FA, Costa MW, Elliott DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM, Harvey RP. 2003. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2–5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol* 262:206–224.
- Straub V, Campbell KP. 1997. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol* 10:168–175.
- Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP. 1999. Epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 274:27989–27996.
- Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. 1994. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 8:1007–1018.
- Takeuchi JK, Bruneau BG. 2009. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459:708–711.
- Takeuchi JK, Lickert H, Bisgrove BW, Sun X, Yamamoto M, Chawengsaksophak K, Hamada H, Yost HJ, Rossant J, Bruneau BG. 2007. Baf60c is a nuclear Notch signaling component required for the establishment of left-right asymmetry. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:846–851.
- Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Ozawa E. 2001. Identification of myogenesis-dependent transcriptional enhancers in promoter region of mouse gamma-sarcoglycan gene. *Eur J Biochem* 268:948–957.
- Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN. 2001. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105:851–862.
- Wang W, Xue Y, Zhou S, Kuo A, Cairns BR, Crabtree GR. 1996. Diversity and specialization of mammalian SWI/SNF complexes. *Genes Dev* 10:2117–2130.
- Wilson-Rawls J, Hurt CR, Parsons SM, Rawls A. 1999. Differential regulation of epaxial and hypaxial muscle development by paraxis. *Development* 126:5217–5229.
- Weintraub H, Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Adam MA, Lassar AB, Miller AD. 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5434–5438.
- Wood WM, Etemad S, Yamamoto M, Goldhamer DJ. 2013. MyoD-expressing progenitors are essential for skeletal myogenesis and satellite cell development. *Dev Biol* 384:114–127.
- Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E. 1994. Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles. *J Biochem* 115:162–167.
- Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, Yamaoka I, Yonezawa M, Kondo T, Furutani Y, Yagi H, Yoshinaga S, Masuda T, Fukuda T, Yamamoto Y, Ebihara K, Li D, Matsuoka R, Takeuchi J, Matsumoto T, Kato S. 2009. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci USA* 106:9280–9285.
- Zhu X, Hadhazy M, Groh ME, Wheeler MT, Wollmann R, McNally EM. 2001. Overexpression of gamma-sarcoglycan induces severe muscular dystrophy. Implications for the regulation of sarcoglycan assembly. *J Biol Chem* 276:21785–21790.

*Article*

## Comparison of Mutation Profiles in the Duchenne Muscular Dystrophy Gene among Populations: Implications for Potential Molecular Therapies

Luz Berenice López-Hernández<sup>1,2,†,\*</sup>, Benjamín Gómez-Díaz<sup>3</sup>, Alexandra Berenice Luna-Angulo<sup>4</sup>,  
Mónica Anaya-Segura<sup>2,5</sup>, David John Bunyan<sup>6</sup>, Carolina Zúñiga-Guzman<sup>2,5</sup>,  
Rosa Elena Escobar-Cedillo<sup>3</sup>, Bladimir Roque-Ramírez<sup>1</sup>, Luis Angel Ruano-Calderón<sup>7</sup>,  
Héctor Rangel-Villalobos<sup>8</sup>, Julia Angélica López-Hernández<sup>9</sup>, Francisco Javier Estrada-Mena<sup>4</sup>,  
Silvia García<sup>1</sup> and Ramón Mauricio Coral-Vázquez<sup>10,†</sup>

<sup>1</sup> National Medical Centre “20 de Noviembre”, Institute for Social Security of State Workers, Mexico City 03100, Mexico; E-Mails: bladimir\_roque@hotmail.com (B.R.-R.); rolasil@yahoo.com.mx (S.G.)

<sup>2</sup> Asociación de Distrofia Muscular de Occidente A.C., Guadalajara 44380, Mexico; E-Mails: monica207383614@gmail.com (M.A.-S.); anilorac\_zg911@hotmail.com (C.Z.-G.)

<sup>3</sup> National Institute of Rehabilitation, Mexico City 14389, Mexico; E-Mails: bgodiaz@gmail.com (B.G.-D.); rescobarmex@gmail.com (R.E.E.-C.)

<sup>4</sup> Department of Molecular Biology, Panamerican University, Mexico City 03920, Mexico; E-Mails: lunangulo@gmail.com (A.B.L.-A.); festrada@up.edu.mx (F.J.E.-M.)

<sup>5</sup> University Center of Exact Sciences and Engineering, University of Guadalajara, Guadalajara 44430, Mexico

<sup>6</sup> Wessex Regional Genetics Laboratory, Salisbury District Hospital, Salisbury SP2 8BJ, UK; E-Mail: Dave.Bunyan@salisbury.nhs.uk

<sup>7</sup> General Hospital of Durango, Durango, 34000, Mexico; E-Mail: laruanoc@hotmail.com

<sup>8</sup> Instituto de Investigación en Genética Molecular, Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara, Ocotlán, 47810, México; E-Mail: hrangel13@hotmail.com

<sup>9</sup> Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden 2333 ZA, The Netherlands; E-Mail: julyberries@hotmail.com

<sup>10</sup> Studies Section of Postgraduate and Research, School of Medicine, National Polytechnic Institute, Mexico City 11340, Mexico; E-Mail: rmcoralv@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: lblhmedgen@gmail.com; Tel.: +52-55-5200-5003; Fax: +52-33-3632-6200.

# Chronological and Morphological Study of Heart Development in the Rat

SALAZAR GARCÍA MARCELA,<sup>1,2</sup> REVILLA MONSALVE MARÍA CRISTINA,<sup>3</sup>  
PALOMINO GARIBAY MIGUEL ANGEL,<sup>4</sup> ARTEAGA MARTÍNEZ MANUEL,<sup>5,6</sup>  
DÍAZ-CINTRA SOFÍA,<sup>7</sup> DE LA ROSA-SANTANDER PATRICIA,<sup>7</sup>  
ROQUE-RAMÍREZ BLADIMIR,<sup>8</sup> AND SÁNCHEZ GÓMEZ CONCEPCIÓN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental, Hospital Infantil de México Federico Gómez

<sup>2</sup>Laboratorio de Citología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN

<sup>3</sup>Unidad de Investigación en Enfermedades Metabólicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI. Instituto Mexicano del Seguro Social

<sup>4</sup>Colegio Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, UACM

<sup>5</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

<sup>6</sup>Escuela de Medicina, Universidad Panamericana

<sup>7</sup>Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla

<sup>8</sup>División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, CMN 20 de Noviembre, ISSSTE

---

---

## ABSTRACT

Adult and embryonic laboratory rats have been used as a mammalian model organism in biomedical research, descriptive and experimental cardiac embryology, and experimental teratology. There have been, however, considerable variations and discrepancies concerning the developmental staging of the rat embryo in the reported literature, which have resulted in several controversies and inconsistencies. Therefore, we carried out a careful anatomical and histological study of rat cardiac morphogenesis from the premorphogenetic period to the mature heart in a newborn pup. A correlation between the chronology and morphological features of the heart and embryo or newborn was made. We provide a simple and comprehensive guide relating the developmental timing and fate of the embryonic components of the heart and their morphological changes in the rat based on *in vivo* labeling studies in the chick. We also compare the timing of heart development in rats, humans, and mice. *Anat Rec*, 295:1267–1290, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** heart development; cardiac embryology; rat embryonic development

---

---

## INTRODUCTION

Cardiac development is a very complex and dynamic process, which ultimately results in the formation of a four-chambered heart from a single tubular structure. Although the definitive ventricles and atria represent discrete anatomical units, both are derived from diverse embryological components (primitive cardiac segments), which emerge at specific developmental stages during the torsion and looping process (de la Cruz and Markwald, 1998; de la Cruz et al., 2001). The *in vivo* labeling of chick embryos has significantly advanced our understanding of how the heart develops, including when the rudimentary

Grant sponsor: Hospital Infantil de México Federico Gómez; Grant number: HIM/2008/013.

\*Correspondence to: Sánchez Gómez Concepción, PhD, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Lab. de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental. Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Del. Cuauhtémoc. CP 06720, México, DF. E-mail: csgomez\_2000@yahoo.com

Received 9 January 2012; Accepted 21 April 2012.

DOI 10.1002/ar.22508

Published online 19 June 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

# IMMUNODETECTION ANALYSIS OF MUSCULAR DYSTROPHIES IN MEXICO

BENJAMÍN GÓMEZ-DÍAZ, MSc,<sup>1</sup> HAYDEÉ ROSAS-VARGAS, PhD,<sup>2</sup> BLADIMIR ROQUE-RAMÍREZ, BSc,<sup>3</sup> PEDRO MEZA-ESPIÑOZA, MSc,<sup>2</sup> LUIS A. RUANO-CALDERÓN, MD,<sup>4</sup> FRANCISCA FERNÁNDEZ-VALVERDE, BSc,<sup>5</sup> DEYANIRA ESCALANTE-BAUTISTA, BSc,<sup>3</sup> ROSA E. ESCOBAR-CEDILLO, MD,<sup>6</sup> LAURA SÁNCHEZ-CHAPUL, PhD,<sup>7</sup> STEVEN VARGAS-CAÑAS, MD,<sup>5</sup> LUZ B. LÓPEZ-HERNÁNDEZ, PhD,<sup>3</sup> ELIGANTY BAHENA-MARTÍNEZ, MD,<sup>3</sup> ALEXANDRA B. LUNA-ANGULO, BSc,<sup>2</sup> PATRICIA CANTO, PhD,<sup>3</sup> and RAMÓN M. CORAL-VÁZQUEZ, PhD<sup>8</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfología Celular y Molecular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud, Mexico City, México

<sup>2</sup> Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Mexico City, México

<sup>3</sup> División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, Mexico City, México

<sup>4</sup> Hospital General de Durango, Durango, México

<sup>5</sup> Departamento de Patología Experimental, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Mexico City, México

<sup>6</sup> Servicio de Electrodiagnóstico, Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud, Mexico City, México

<sup>7</sup> Laboratorio de Bioquímica Muscular, Instituto Nacional de Rehabilitación, Secretaría de Salud, Mexico City, México

<sup>8</sup> Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Col. Casco de Santo Tomas, Del. Miguel Hidalgo, CP 11340, Mexico City & Subdirección de Enseñanza e Investigación, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, Mexico City, México

Accepted 27 September 2011

**ABSTRACT:** Introduction: The muscular dystrophies (MDs) result from perturbations in the myofibers. These alterations are induced in part by mechanical stress due to membrane cell fragility, disturbances in mechanotransduction pathways, muscle cell physiology, and metabolism. Methods: We analyzed 290 biopsies of patients with a clinical diagnosis of muscular dystrophy. Using immunofluorescence staining, we searched for primary and secondary deficiencies of 12 different proteins, including membrane, costamere, cytoskeletal, and nuclear proteins. In addition, we analyzed calpain-3 by immunoblot. Results: We identified 212 patients with varying degrees of protein deficiencies, including dystrophin, sarcoglycans, dysferlin, caveolin-3, calpain-3, emerin, and merosin. Moreover, 78 biopsies showed normal expression of all investigated muscle proteins. The frequency rates of protein deficiencies were as follows: 52.36% dystrophinopathies; 18.40% dysferlinopathies; 14.15% sarcoglycanopathies; 11.32% calpainopathies; 1.89% merosinopathies; 1.42% caveolinopathies; and 0.47% emerinopathies. Deficiencies in lamin A/C and telethonin were not detected. Conclusion: We have described the frequency of common muscular dystrophies in Mexico.

*Muscle Nerve* 45: 338–345, 2012

**M**uscular dystrophies (MDs) are a group of defined pathologic entities characterized by variable degrees and distribution of muscle wasting and weakness.<sup>1</sup> Currently, these account for about 50 diseases.<sup>2</sup> MDs are usually classified according to age at onset, pattern of inheritance, and group

of muscles involved. Diagnosis represents a challenge, because in many cases phenotypical features may resemble more than one type of MD, and clinical overlap may occur, with serious implications for genetic counseling.<sup>3,4</sup>

Patterns of muscle involvement may reflect different roles of muscle proteins (Table 1) under mechanical stress. Proximal muscle groups that contain larger fibers bear more weight and are those first affected.<sup>5</sup> These are frequently related to the loss of sarcolemmal integrity (e.g., dystrophinopathies or sarcoglycanopathies). Sarcomeric proteins (e.g., telethonin, titin, and myotilin) are more involved in distal MDs.<sup>6</sup> Nevertheless, with age, weakness affects more muscles and becomes generalized, leading to disability in most cases. Many other proteins participate in the pathophysiology of MDs. Extracellular matrix proteins, such as  $\alpha$ 2-laminin (merosin), play an important role in lateral transmission of contractile force to the basement membrane.<sup>7</sup> Nuclear envelope proteins (emerin and lamin A/C) are important for the connection between nucleus and cytoskeleton via the LINC complex (linker of nucleus and cytoskeleton), which is comprised of nesprins, sun, and lamin proteins.<sup>8</sup> Finally, the following proteins are associated with aberrant glycosylation: protein-O-mannosyl transferase 1, protein-O-mannosyl transferase 2, protein-O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1, fukutin, fukutin-related protein, and like-acetylglucosaminyltransferase (LARGE). Furthermore, those proteins involved in maintenance of the structure of sarcoplasmic reticulum (obscurin) may also play a role in MDs.<sup>9,10</sup> The frequency of subtypes of MDs may differ among populations. Limb-girdle muscular

**Abbreviations:** BMD, Becker muscular dystrophy; BPB, bromophenol blue; Cav-3, caveolin-3; CK, creatine kinase; CMD, congenital muscular dystrophy; DMD, Duchenne muscular dystrophy/dystrophin; DTT, dithiothreitol; EMD, emerin; FKRP, fukutin-related protein; FKTN, fukutin; IMSS, Instituto Mexicano del Seguro Social; LARGE, acetylglucosaminyltransferase-like protein; LGMD, limb-girdle muscular dystrophy; LINC complex, linker of nucleus and cytoskeleton; LMNA, lamin A/C; MD, muscular dystrophy; MDC1A, muscular dystrophy congenital type 1A; PBS, phosphate-buffered saline; SG, sarcoglycan

**Key words:** calpainopathies, dysferlinopathies, dystrophinopathies, immunofluorescence, muscular dystrophy

**Correspondence to:** R. M. Coral-Vázquez; e-mail: rmcoralv@gmail.com

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/mus.22314

# Dysferlin Homozygous Mutation G1418D Causes Limb-Girdle Type 2B in a Mexican Family

H. ROSAS-VARGAS,<sup>1</sup> B. GÓMEZ-DÍAZ,<sup>1</sup> L. RUANO-CALDERÓN,<sup>2</sup> F. FERNÁNDEZ-VALVERDE,<sup>3</sup>  
B. ROQUE-RAMÍREZ,<sup>1</sup> T. PORTILLO-BOBADILLA,<sup>4</sup> R.M. ORDOÑEZ-RAZO,<sup>1</sup>  
F. MINAURO-SANMIGUEL,<sup>1</sup> and R. CORAL-VÁZQUEZ<sup>1</sup>

## ABSTRACT

**Dysferlin protein (DYSF) is a ferlin family member found in sarcolemma and is involved in membrane repair, muscle differentiation, membrane fusion, etc. The deficiency of DYSF due to mutations is associated with different pathologic phenotypes including the autosomal recessive limb-girdle type 2B phenotype (LGMD2B), a distal anterior compartment myopathy (DMAT), and the Miyoshi myopathy (MM). In this study, we determined a missense mutation c.4253G>A on the DYSF gene in a Mexican family from an endogamic population. This mutation was assumed to be the cause of dystrophy because only homozygous individuals of the family manifest a clinical phenotype. Structural implications caused by G/D substitution at amino acid position 1418 are discussed in terms of potential importance of the dysferlin neighboring sequence.**

## INTRODUCTION

MUTATIONS ON THE GENES that encode sarcolemmal proteins (sarcoglycans, dysferlin, and caveolin-3) may cause diverse muscular disorders (Cohn and Campbell, 2000; Kirschner and Bonnemann, 2004). Mutations on dysferlin (DYSF) are related to at least three known different pathologic phenotypes of muscular dystrophy called dysferlinopathies (Liu *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2005) that includes pathologic phenotypes as the autosomal type B recessive limb-girdle muscular dystrophy (LGMD2B), which affects proximal limbs; Miyoshi myopathy (MM), which is characterized by affections on distal lower limb muscles (Liu *et al.*, 1998; Bushby, 1999; Illa *et al.*, 2001), and the distal anterior compartment myopathy (DMAT).

The DYSF gene encompasses 55 exons spanning over 150 kb of genomic DNA (Aoki *et al.*, 2001) that raise a large protein (230 kDa) located at the plasma membrane of muscle cells. As all ferlin members, DYSF has a conserved protein structure; it presents a transmembranal C terminus anchoring a cytoplasmic portion with 7 putative C2 domains (Davis *et al.*, 2002; Therrien *et al.*, 2006; Wenzel *et al.*, 2006) and two dysferlin domains (DysfN and DysfC). The former are related with mem-

brane repair (Nalefski and Falke, 1996; Rizo and Sudhof, 1998; Sonderman and Kuriyan, 2005), while dysferlin domains are of unknown function but similar to others found in myo-ferlin, fer-1, and yeast peroxisomal protein (Nagase *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2002). In addition to its role in skeletal muscle repair, it has been suggested that this protein is involved in the sarcolemma fusion with intracellular vesicles (Bashir *et al.*, 1998; Bansal *et al.*, 2003; Lennon *et al.*, 2003), and in muscle differentiation (De Luna *et al.*, 2004).

All of the pathogenic DYSF mutations reported impact the protein expression level in skeletal muscle. An interesting feature of the dysferlinopathies comprises phenotypic heterogeneity, in that the same mutation can cause different phenotypes in unrelated patients (Vilchez *et al.*, 2005; Dincer *et al.*, 2000), as well as in different members of an affected family (Ueyama *et al.*, 2002; Chiba *et al.*, 2003).

In this study we identified a homozygous mutation (c.4253G>A) in DYSF gene in a Mexican girl with LGMD2B, as well as in some carriers from her family. This mutation is located in a well-conserved amino acid sequence among different ferlin family members along the filogenetic scale, which suggests an important role.

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

<sup>2</sup>Servicio de Enfermedades Neuromusculares, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México, México D.F., México.

<sup>3</sup>Departamento de Neuropatología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México, México D.F., México.

<sup>4</sup>Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.