

Université de Montréal

Caractérisation d'un membre de la famille XKLF dans le développement cardiaque

par

Geneviève Lavallée

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

août, 2003

© Geneviève Lavallée, 2003



QH

506

U54

2004

V. 013

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation d'un membre de la famille XKLF dans le développement cardiaque

présentée par :
Geneviève Lavallée

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry, président-rapporteur
Dr Mona Nemer, directeur de recherche
Dr René St-Arnaud, membre du jury

Résumé

Le cœur est un organe très complexe, composé de plusieurs types cellulaires et dont la principale fonction est de pomper le sang à travers l'organisme de façon rythmique et unidirectionnelle. La formation du cœur requiert l'orchestration spatio-temporelle hautement régulée de plusieurs gènes. L'étude des régions *cis*-régulatrices des gènes cardiaques a permis l'identification de facteurs de transcription impliqués dans la cardiogenèse. Ainsi, le promoteur du facteur natriurétique de type B (BNP) a servi à établir le rôle crucial de GATA-4 dans la formation du cœur. Le BNP est une hormone cardiaque hypotensive qui représente un marqueur précoce des cellules cardiaques durant le développement et qui sert de marqueur clinique de l'hypertrophie ventriculaire chez l'adulte. Sur le promoteur proximal du BNP, les sites GATA côtoient un autre élément régulateur contenant un motif CACCC. Mon projet de maîtrise consistait à identifier et caractériser le(s) facteur(s) de transcription qui régule(nt) l'expression de BNP via la boîte CACCC. Les facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille XKLF (X-Krüppel-like factor) régulent la transcription génique en se liant à des boîtes CACCC. Quatre membres de cette famille sont exprimés dans le cœur. Cependant, leur rôle dans la régulation des gènes cardiaques n'a jamais été étudié. Puisque le transcrit de FKLF-2 (fetal-KLF-2) a une expression restreinte au cœur, aux muscles squelettiques et à la moelle osseuse et que cette protéine est capable de lier et d'activer les gènes via une boîte CACCC, notre étude a porté sur ce membre de la famille XKLF. Afin d'établir le patron d'expression de FKLF-2 durant le développement cardiaque, un anticorps hautement spécifique a été généré contre la partie N-terminale de FKLF-2. L'analyse immunohistochimique a montré la présence de FKLF-2 tôt dans les cellules cardiaques et la persistance de cette expression durant la cardiogenèse ainsi que chez l'adulte. Dans le cœur, FKLF-2 est fortement exprimé dans le myocarde mais également dans les valves, tant dans les coussins cardiaques embryonnaires que dans les valves adultes, suggérant un rôle dans le développement de diverses structures cardiaques incluant la formation valvulaire. Des études fonctionnelles ont montré que FKLF-2 active le promoteur du BNP en se liant directement à la boîte CACCC. De plus, l'activation du BNP par FKLF-2 est potentialisée par l'ajout de GATA-4 et cette potentialisation est dépendante des doigts de zinc de GATA-4. L'interaction fonctionnelle entre ces deux facteurs de transcription implique une interaction physique directe. L'ensemble de ces résultats montre pour la première fois

qu'un membre de la famille XKLF est impliqué dans la régulation des gènes cardiaques et qu'il agit de concert avec GATA-4. L'étude suggère fortement un rôle pour FKLF-2 dans le développement du cœur et soulève la possibilité d'un lien entre l'expression de FKLF-2 et certaines malformations congénitales

Mots-clés : développement cardiaque, Krüppel-like factor, BNP, FKLF-2, facteurs de transcription, sites CACCC

Abstract

The main function of the heart is to rhythmically pump the blood in a unidirectional way into the entire body. Only a highly regulated development can lead to the formation of a heart able to fulfil its roles. The identification of transcription factors essential for cardiogenesis had been improved by studying the *cis*-regulatory regions on cardiac genes. The B-type natriuretic peptide (BNP) was used as a model to identify GATA-4 as an important factor for cardiac development. BNP is a cardiac hypotensive hormone which serves as an early marker for cardiac cells as well as a clinical marker for ventricular hypertrophy in adult. Cardiac specific transcription of BNP gene is controlled by several *cis*-regulatory elements within its proximal promoter like GATA elements and CACCC motif. My Master's project was to identify and characterize the factor(s) that regulate(s) the BNP gene through the CACCC site. The XKLF (X Krüppel-like factor) regulate gene transcription through CACCC site. Four XKLFs are expressed in the heart. However, their cardiac function has not been established yet. The FKLF-2 (fetal KLF-2) transcript has a restricted expression pattern in the heart, skeletal muscles and bone marrow and it can activate genes via a CACCC box, our studies focused on this transcription factor. To determine the expression pattern of FKLF-2 during heart development, a highly specific antibody was generated against the N-terminal part of FKLF-2. The immunohistochemistry studies showed that FKLF-2 is expressed early in the heart and its expression continues throughout development and in the adult heart. FKLF-2 is expressed in the myocardium and also in cardiac cushions and adult valves. This pattern of expression suggests a role for FKLF-2 in development of cardiac structures including the valves. Functional studies have shown the activation of the BNP promoter by direct binding of FKLF-2 on the CACCC site. Moreover, FKLF-2 synergistically activates BNP with GATA-4 and this functional interaction depends on the zinc fingers of GATA-4. The synergistic activation of BNP implies a physical interaction between the two transcription factors. For the first time, our study shows a role for the XKLF family in regulation of cardiac genes and its interaction with GATA-4. These results strongly suggest a role for FKLF-2 in cardiac development and a possible link between the expression of FKLF-2 and congenital heart malformations.

Keywords : cardiac development, Krüppel-like factors, BNP, FKLF-2, transcription factors, CACCC sites

Table des matières

INTRODUCTION	1
1 DEVELOPPEMENT CARDIAQUE CHEZ LES MAMMIFERES ET MALFORMATIONS CONGENITALES	1
2 REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE AU COURS DU DEVELOPPEMENT CARDIAQUE	5
2.1 <i>Facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque</i>	7
2.1.1 Formation du tube cardiaque	7
2.1.1.1 Les facteurs de transcription de la famille GATA	7
2.1.1.1.1 GATA-4	8
2.1.1.1.2 GATA-5	8
2.1.2 Segmentation du tube cardiaque	9
2.1.2.1 Les facteurs de la famille à boîte T	9
2.1.2.1.1 Tbx5	10
2.1.2.2 Les facteurs de la famille bHLH	11
2.1.2.2.1 eHand et dhand	12
2.1.2.2.3 Iroquois 4	12
2.1.2 Morphogenèse cardiaque	13
2.1.2.1.1 Les facteurs de la famille MEF2	13
2.1.2.1.1 Les facteurs à homéodomaines	14
2.1.3 Formation du cœur adulte avec ses quatre cavités distinctes	15
2.1.3.1 Les facteurs de la famille GATA	15
2.1.3.1.2 GATA-6	16
2.1.3.2 Les facteurs de la famille NF-AT	16
3 ÉLÉMENTS <i>CIS</i> -RÉGULATEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES GÈNES CARDIAQUES	17
4 PEPTIDES NATRIURÉTIQUES CARDIAQUES	19
4.2 <i>Régulation transcriptionnelle du peptide natriurétique de type B</i>	21
5 LES MEMBRES DE LA FAMILLE XKLFs	23
5.1 <i>Nomenclature des XKLFs</i>	24
5.2 <i>Structure conservée entre les membres XKLFs</i>	24
5.3 <i>Importance biologique des XKLFs</i>	28
5.3.1 Différenciation et prolifération cellulaires	28
5.3.2 Régulation du cycle cellulaire et implication dans les cancers	29
5.3.3 Contrôle de la transcription par les XKLFs	30
5.3.4 Expression tissu-spécifique des XKLFs	31
5.4 <i>XKLFs extra-cardiaques</i>	32
5.4.1 EKLF	32
5.4.1.1 Interaction entre EKLF et GATA-1	33
5.4.2 IKLF	33
5.4.3 UKLF	34
5.4.4 FKLf	34

5.5 Facteurs XKLFs exprimés dans le cœur	35
5.5.1 BKLF	35
5.5.2 GKLF	36
5.5.3 LKLF	37
5.5.4 FKLF-2	38
6 OBJECTIF DU TRAVAIL	43
RÉSULTATS	44
A ROLE FOR A TISSUE-RESTRICTED MEMBER OF THE XKLF FAMILY OF TRANSCRIPTION FACTORS IN CARDIAC DEVELOPMENT	44
<i>Abstract</i>	45
<i>Material and methods</i>	51
<i>Results</i>	58
<i>Acknowledgements</i>	69
DISCUSSION	88
XKLFs DANS LE DEVELOPPEMENT CARDIAQUE	88
<i>Malformations des valves cardiaques</i>	90
CONSERVATION DES KRÜPPEL À TRAVERS LES ESPÈCES	91
REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE BNP	93
REGULATION DES GENES PAR LES XKLFs	96
<i>Rôles fonctionnels de FKLF-2</i>	96
<i>Spécificité ou redondance des XKLFs</i>	98
<i>Système érythroïde</i>	99
<i>Lymphocytes T</i>	100
<i>Système cardiaque</i>	101
<i>Rôles putatifs de FKLF-2 dans les tissus extra-cardiaques</i>	103
PERSPECTIVES	104
CONCLUSION	107
BIBLIOGRAPHIE	108

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1 BASE GÉNÉTIQUE DES MALADIES CONGÉNITALES CARDIAQUES CHEZ L'HUMAIN ASSOCIÉES À LA MUTATION D'UN GÈNE	4
TABLEAU 1.2 FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUÉS DANS LE DÉVELOPPEMENT CARDIAQUE	6
TABLEAU 1.3 ÉLÉMENTS CIS-RÉGULATEURS IMPORTANTS POUR LA RÉGULATION DE GÈNES CARDIAQUES	18
TABLEAU 1.4 CLASSIFICATION ET FONCTIONS DES FACTEURS XKLFs	25

Listes des Figures

Introduction

FIGURE 1.1 CONTRÔLE TRANSCRIPTIONNEL DU DÉVELOPPEMENT CARDIAQUE CHEZ LES MAMMIFÈRES	2
FIGURE 1.2 STRUCTURE DES DEUX PEPTIDES NATRIURÉTIQUES.....	18
FIGURE 1.3 PROMOTEUR PROXIMAL DE BNP.....	22
FIGURE 1.4 STRUCTURE CONSERVÉE ENTRE LES MEMBRES DE LA FAMILLE XKLF.....	26
FIGURE 1.5 ARBRE PHILOGÉNIQUE DES XKLFs	26
FIGURE 1.6 ALIGNEMENT DES TROIS DOIGTS DE ZINC CONSERVÉS ENTRE LES MEMBRES DE LA FAMILLE XKLF	27
FIGURE 1.7 DOMAINES FONCTIONNELS DE FKLF-2.....	40

Article

FIGURE 2.1 STRUCTURAL ORGANISATION OF THE RBNP PROMOTER	74
FIGURE 2.2 EXPRESSION OF THE XKLF'S IN CULTURED CARDIOMYOCYTES	75
FIGURE 2.3 GENERATION OF A SPECIFIC FKLF-2 ANTIBODY	76
FIGURE 2.4 FKLF-2 IS EXPRESSED DURING CARDIAC DEVELOPMENT	77
FIGURE 2.5 FKLF-2 IS EXPRESSED IN THE ADULT HEART.....	79
FIGURE 2.6 EXPRESSION OF FKLF-2 OUTSIDE THE HEART DURING DEVELOPMENT.....	80
FIGURE 2.7 THE BNP CACCC ACTIVITY IN CULTURED CARDIOMYOCYTES	82
FIGURE 2.8 FKLF-2 BINDS SPECIFICALLY TO THE CACCC BOX OF THE BNP PROMOTER ..	83
FIGURE 2.9 FKLF-2 ACTIVATES THE BNP PROMOTER THROUGH THE CACCC MOTIF	84
FIGURE 2.10 FKLF-2 CAN ACTIVATE OTHER CARDIAC PROMOTERS BUT TO A LESSER EXTENT THAN THE BNP PROMOTER	85
FIGURE 2.11 FKLF-2 ACTS SYNERGISTICALLY WITH GATA-4 TO ACTIVATE THE WILD TYPE PROXIMAL RBNP PROMOTER	86
FIGURE 2.12 FKLF-2 PHYSICALLY INTERACTS WITH GATA-4.....	87

Liste des sigles et des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ALAS : 5' aminolevulinate synthase
ANF : facteur natriurétique de type A
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messenger
BHLH : facteurs basiques hélice-boucle-hélice
BKLF: basic Krüppel-like factor
BMP-4 : protéine morphogénique des os 4
BNP : peptide natriurétique de type B
BTEB: basic transcription element binding protein
CHO : cellules d'ovaires de hamster chinois
CGMP : guanosine monophosphate cyclique
CTnC : troponine cardiaque C
CYP1A1 : cytochrome P450 1A1
EKLF : erythroid Krüppel-like factor
EZF : doigt de zinc épithélial
FC: ferrochelatase
FGF : facteur de croissance des fibroblastes
FKLF: fetal Krüppel-like factor
FKLF-2: fetal Krüppel-like factor 2
FOG-2: friend of GATA-2
GFP: glycophorine
GKLF: gut Krüppel-like factor
HB-EGF : facteur de croissance épithéliale
HGNC : Comité de la nomenclature des gènes humains
IKLF: intestinal Krüppel-like factor
Irx4 : Iroquois 4
LKLF: lung Krüppel-like factor
MADS: MCM1, agamous, deficiens and SFR
MEF2: myocyte enhancer binding factor 2
MEL : cellules érythrocytaires de souris

min : néoplasies multiples intestinales
 α MHC : chaîne lourde de la myosine α
 β MHC : chaîne lourde de la myosine β
Mlc2v : chaîne légère de la myosine ventriculaire 2
PBGG : porphobilinogen deaminase
PCAF: p300/CBP associated factor
PECAM-1 : molécule d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales 1
PDGF β : facteur β de croissance dérivé des plaquettes
PDGFR β : récepteur du facteur β de croissance dérivé des plaquettes
PPA γ : récepteur γ peroxyosome activé
TEF1: transcription enhancer factor-1
TGF- β 1: transforming growth factor-beta-1
RANTES: Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted
RAR : récepteurs rétinoïques acides
RFLAT-1: RANTES Factor of Late Activated T Lymphocytes-1
RXR : récepteurs rétinoïques X
SRF : facteur de réponse au serum
Tie-1 : récepteur tyrosine kinase spécifique aux cellules endothéliales-1
Tie-2 : récepteur tyrosine kinase spécifique aux cellules endothéliales-2
TIEG-2: transforming growth factor β -regulated gene 2
UKLF: ubiquitous Krüppel-like factor
VEGF: facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
XKLF : membre de la famille des Krüppel-like factor

*A mes parents
et
ma soeur*

Remerciements

J'aimerais premièrement remercier la directrice du laboratoire le Dr Mona Nemer de m'avoir accueillie au sein de son équipe et je voudrais aussi la remercier pour son support financier.

Je voudrais également présenter ma reconnaissance au Dr Georges Nemer qui m'a montré les bases de la science à mon arrivée au laboratoire. J'ai beaucoup de gratitude envers le Dr Sophie Debrus qui m'a aidée énormément au point de vue technique et avec qui j'ai eu de longues discussions qui m'ont permis d'apprendre énormément sur la façon de penser scientifique. Il y a aussi le Dr Bruno Delorme qui a pris le temps de m'aider à découvrir la science. Je voudrais sincèrement remercier toutes les personnes du laboratoire du Dr Nemer qui ont fait de ce lieu d'apprentissage un endroit agréable à travailler où les discussions scientifiques côtoient la camaraderie en particulier Pooja Jain, Rana Temsah, Loulwa Rahbani, Sophie Debrus et Romain Georges. Je voudrais également souligner l'aide de Chantal Lefebvre qui est toujours là avec un sourire. Je tiens à exprimer ma gratitude à Lise Laroche pour son assistance dans la préparation du manuscrit et sa grande disponibilité. Je voudrais souligner l'aide précieuse de Rana Temsah et Romain Georges dans la critique constructive de ce mémoire.

Je voudrais particulièrement remercier mes parents Gilles et Yolande ainsi que ma sœur Julie qui m'ont toujours soutenue durant mon cheminement et sans qui je n'aurais pas pu parvenir à atteindre mes objectifs.

À tous, un grand merci!

Introduction

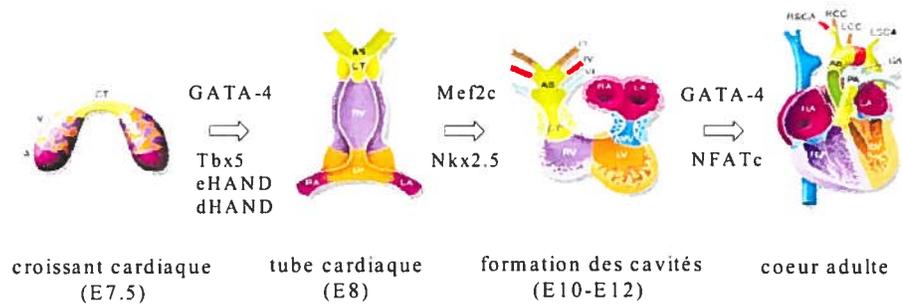
1 Développement cardiaque chez les mammifères et malformations congénitales

Le cœur est le premier organe à se former durant le développement embryonnaire. En effet, chez la souris, au jour embryonnaire 8 (E8), le tube cardiaque est déjà formé et il a même commencé à exercer sa fonction de pompe.¹ Les cellules précurseurs cardiaques proviennent du mésoderme latéral antérieur. Après la gastrulation, le mésoderme antérieur latéral se replie pour former le croissant cardiaque dans le côté antérieur de l'embryon. Le croissant fusionne pour donner lieu au tube cardiaque sur la ligne ventrale de l'embryon selon l'axe antéro-postérieur. C'est à ce moment que les cellules cardiaques commencent à se contracter, premièrement de manière péristaltique et par la suite, les battements deviennent rythmiques.^{2;3} Au niveau du tube cardiaque, il y a déjà une segmentation, il est possible d'identifier les cellules précurseurs des oreillettes et des ventricules.^{1;4;5} Le côté droit et le côté gauche du cœur sont également déterminés lorsque le tube cardiaque se forme. Les cellules qui deviendront le sac aortique et les voies d'éjections (conotruncus) sont aussi identifiables à ce moment.³ À ce stade, les cellules qui se différencieront en cellules auriculaires se trouvent sur le côté postérieur de l'embryon. Sur le côté antérieur, on retrouve les cellules qui formeront les ventricules. Un important remodelage morphologique et génétique survient et le tube cardiaque fait une boucle vers la droite, c'est la morphogenèse cardiaque (looping cardiaque) amenant ainsi les oreillettes sur le côté antérieur et les ventricules sur le côté postérieur.^{1;2;3} Les quatre cavités du cœur sont maintenant morphologiquement identifiables (Figure 1.1).

Un cœur adulte possède quatre chambres bien distinctes qui se contractent de manière synchronisée entre elles et font circuler le sang de manière unidirectionnelle pour distribuer le sang dans l'organisme.⁴ Suite à la morphogenèse cardiaque, il y a un remodelage à l'intérieur du cœur afin d'obtenir un organe mature.^{1;2;4;6} Les septums musculaires et membranaires sont formés ainsi que les valves, le coussin endocardique et le

Figure 1.1 Contrôle transcriptionnel du développement cardiaque chez les mammifères

Les facteurs de transcription nécessaires à chaque étape du développement sont indiqués. Les jours embryonnaires représentent le développement chez la souris.



Légende : CT : conotruncus

V : ventricules

A : oreillettes

AS : sac aortique

RV : ventricule droit

LV : ventricule gauche

RA : oreillette droite

PA : artère pulmonaire

LA : oreillette gauche

RSCA : artère sous-clavière droite

LSCA : artère sous-clavière gauche

RCC : carotide commune droite

LCC : carotide commune gauche

Ao : aorte

DA : canal artériel

D'après Srivastava, D. *Nature*. 2000; 407 : p.221-226

système vasculaire autour du cœur. Les parois des quatre chambres, les septums et les valves proviennent du coussin cardiaque.²⁻⁴ Les cellules épithéliales de la matrice extracellulaire (gelée cardiaque) se différencient en cellules endocardiques. Ces dernières deviendront des cellules mésenchymateuses qui formeront le coussin cardiaque.^{2:4} Les cellules du coussin cardiaque migrent pour former les valves atrioventriculaire et ventriculoartériale et elles interviennent dans la formation du septum atrioventriculaire.⁴ Le myocarde, c'est-à-dire la partie musculaire du cœur, est formé progressivement selon un ordre déterminé. Le myocarde formant le septum atrioventriculaire est développé en premier.^{2:7} Ensuite, le myocarde est formé entre les oreillettes et les ventricules pour séparer le côté antérieur du côté postérieur.^{2:7} Après toutes ces étapes de différenciation, le cœur a maintenant atteint sa morphologie adulte.

Différents tissus forment le cœur dont l'endocarde, le myocarde et le système de conduction. L'interaction entre ces différents types cellulaires est essentielle au développement normal du cœur. La dérégulation du nombre ou de l'état de différenciation de l'un ou l'autre de ces types cellulaires affecte la formation ou le fonctionnement du cœur. Ce n'est donc pas surprenant de constater que des mutations au niveau de certains gènes importants pour la différenciation ou la survie des divers types cellulaires cardiaques mènent à des malformations congénitales (Tableau 1.1). Les maladies cardiaques sont une des premières causes de décès dans les pays industrialisés. Malheureusement, les mécanismes moléculaires qui causent ces maladies ne sont pas entièrement élucidés. Les malformations surviennent lorsqu'il y a un déséquilibre dans la régulation des gènes liés au développement ou au fonctionnement cardiaque. Ces gènes sont régulés à plusieurs niveaux: la stabilité de l'ARN, les régulations post-transcriptionnelles (phosphorylation, glycosylation), la localisation cellulaire des protéines ainsi qu'au niveau transcriptionnel. Une mauvaise régulation à l'une ou l'autre de ces étapes peut entraîner une malformation cardiaque. Une mutation dans un facteur de transcription l'empêche d'activer ou d'inhiber le gène cible et est donc susceptible de causer des malformations cardiaques congénitales.^{4:8}

Tableau 1.1 Base génétique des maladies congénitales cardiaques chez l'humain associées à la mutation d'un gène

Maladie et symptômes	Gènes mutés responsables	références
Tétralogie de Fallot avec une sténose pulmonaire	JAG-1 Nkx2.5	Doff et al. ⁹ Benson et al. ¹⁰
Persistance du canal artériel	TFAP2B	Satoda et al. ¹¹
Syndrome de William, sténose aortique supra-avalvulaire	Elastin	Curran et al. ¹²
Syndrome de Marfan, anévrisme aortique	fibrillin	Dietz et al. ¹³
Défaut du septum atrial et des valves tricuspides	NKx2.5	Schott et al. ¹⁴
Syndrome de DiGeorge	Tbx1 (délétion)	Merscher et al. ¹⁵
Syndrome de Holt-Oram	Tbx5	Basson et al. ¹⁶
Maladies cardiaques congénitales	GATA-4	Pehlivan et al. ¹⁷
Cardiomyopathies hypertrophiques	β -MHC, cTnT, α tropomyosine, cardiac mbpC, canaux potassium voltage-dépendant, PARAG2, isoleucine tRNA glycine tRNA, actine cardiaque, troponine 1, chaîne légère de la myosine, titin	Seidman et al. ¹⁸ Marian et al. ¹⁹ Sadamatsu et al. ²⁰ Poetter et al. ²¹ Satoh et al. ²²
Cardiomyopathies dues à une dilatation	cTnT, actine cardiaque, β -MHC, lamine A/C, desmine, dystrophine, tafazzin	Seidman et al. ¹⁸
Syndrome long de QT (arytmie)	Protéines sarcomériques Canaux cardiaques Na ⁺ et K ⁺	Keller et al. ²³ Wehrens et al. ²⁴

A noter que la majorité des patients atteints du syndrome de DiGeorge ont une délétion au niveau de la région chromosomique dans laquelle est inclus le gène de Tbx1.

Abréviations: β -MHC: chaîne lourde β de la myosine, cTnT: troponine cardiaque T, cardiac mbpC: protéine C de liaison à la myosine cardiaque, PARAG2; sous-unité non catalytique de l'AMP-activé gamme 2 de la protéine kinase A, canaux cardiaques Na⁺ et K⁺ : canaux cardiaques au sodium et au potassium

2 Régulation transcriptionnelle au cours du développement cardiaque

Pour que les cellules du mésoderme latéral migrent, se différencient et forment un cœur mature, de nombreux gènes régulés par des facteurs de transcription sont requis à des moments et des endroits bien précis dans le cœur (Figure 1.1). Les facteurs de transcription jouent un rôle important dans la régulation génique et leur étude aide à mieux comprendre les mécanismes d'expression des gènes. La régulation transcriptionnelle cardiaque se fait par l'entremise de plusieurs facteurs de transcription qui peuvent être catégorisés en deux groupes distincts: le premier regroupe les facteurs de transcription qui sont impliqués dans le développement du cœur ainsi que dans le développement d'autres organes tandis que le deuxième groupe comprend les facteurs de transcription qui régulent spécifiquement le développement cardiaque (Tableau 1.2). La majorité des facteurs de transcription du premier groupe ont une expression ubiquitaire comparativement à ceux du deuxième groupe qui sont principalement exprimés dans le cœur. Dans le premier groupe, on retrouve les facteurs de transcription des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR et RXR), TEF1 (transcription enhancer factor-1), *N-myc*, *c-myc*, et *Hox1.5*. L'étude de ces facteurs chez la souris a révélé leur importance lors du développement cardiaque. En effet, les souris n'exprimant pas le gène *RXRα* ont des malformations au niveau du myocarde et au niveau oculaire.^{5;6;25;26} Ces souris souffrent d'hypoplasie des ventricules marquée par des parois ventriculaires très minces et des défauts des septum ventriculaires.²⁷ Ce phénotype ressemble beaucoup à la déficience en vitamine A chez la souris, ce qui suggère que les récepteurs rétinoïques soient impliqués dans la voie signalétique de la vitamine A lors du développement cardiaque.²⁷ Les mécanismes moléculaires lors de l'hypertrophie cardiaque ressemblent souvent au programme génétique embryonnaire. En plus d'avoir un rôle lors du développement, les *RXRα* semblent impliqués dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque *in vitro* en induisant l'accroissement de la taille des cardiomyocytes et l'induction de l'ANF.²⁸ L'ANF est une hormone cardiaque présente très tôt dans le développement cardiaque et son expression diminue considérablement chez l'adulte pour augmenter de nouveau lors d'hypertrophie cardiaque.^{29;30} Un autre facteur de transcription ubiquitaire joue un rôle déterminant lors du développement cardiaque. Lorsque TEF-1 n'est pas exprimé chez la souris, la cardiogenèse est initiée normalement mais la paroi

ventriculaire est plus mince que chez les animaux normaux.^{25;26;31} Les protooncogènes de la famille *myc*, *N-myc* et *c-myc*, semblent aussi impliqués dans le développement cardiaque. Effectivement, lorsque *N-myc* est inactivé, le myocarde est plus mince et la morphogenèse des bronches pulmonaires est interrompue.³² La surexpression de *c-myc* dans les myocytes provoque l'accroissement de la masse cardiaque causé par la prolifération accrue des cardiomyocytes.³³ Les gènes Hox sont également importants lors de la cardiogenèse. Ces gènes participent à la spécification des cellules très tôt dans l'embryogenèse.³⁴ Les souris n'exprimant pas le gène *hox1.5* présentent différents problèmes, entre autres leur cœur et leurs artères sont mal formés et elles ont des déformations craniofaciales.³⁴ Les souris *hox1.5*^{-/-} présentent sensiblement les mêmes symptômes que les humains atteints du syndrome de DiGeorge.³⁴ Cette maladie autosomale dominante est caractérisée par une hypotrophie thymique et parathyroïdienne, des malformations craniofaciales et cardiaques.³⁴ Toutes ces études sur ces différents facteurs de transcription montrent leur importance durant le développement cardiaque même si leurs rôles ne sont pas restreints au cœur. L'expression généralement ubiquitaire de ces facteurs favorise leur implication dans la régulation de gènes retrouvés dans tous les types cellulaires.

Le deuxième groupe est formé de quelques facteurs de transcription qui régulent spécifiquement le développement cardiaque. La majorité de ces facteurs a une expression enrichie dans le cœur. Ces protéines cardiaques formant le deuxième groupe de facteurs de transcription impliqués dans la formation du cœur feront l'objet d'une étude plus détaillée dans la prochaine section.

Tableau 1.2 Facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque

Stage du développement	Facteurs de transcription impliqués dans le développement du cœur et d'autres organes	Facteurs de transcription qui contrôlent le développement cardiaque
Formation du tube cardiaque		GATA-4
Segmentation du tube cardiaque		eHand, dHand, Tbx5, Irx4
Morphogenèse cardiaque		MEF2C, Nkx2.5
Formation des quatre cavités distinctes	TEF-1, <i>hox1.5</i> , RXR α , <i>N-myc</i> , <i>c-myc</i>	GATA-4, NFATc, Tbx5

2.1 Facteurs de transcription impliqués dans le développement cardiaque

La cardiogenèse est régulée par des facteurs de transcription appartenant à plusieurs familles différentes comme la famille GATA, les facteurs de la famille à boîte T, les facteurs de la famille possédant un domaine bHLH (basique hélice-boucle-hélice), les facteurs de la famille MEF2, les facteurs à homéodomains et les facteurs de la famille NF-AT. Toutes ces familles de facteurs de transcription sont impliquées dans au moins une des quatre étapes cruciales au développement cardiaque: la formation du tube cardiaque, la segmentation du tube cardiaque, la morphogenèse cardiaque et la formation du cœur adulte avec ses quatre cavités distinctes.

2.1.1 Formation du tube cardiaque

L'inactivation des membres de la famille GATA a montré leur importance dans le repliement et la fusion du croissant cardiaque pour former normalement le tube cardiaque.^{35;36}

2.1.1.1 Les facteurs de transcription de la famille GATA

La famille de facteur de transcription GATA est nécessaire pour que le tube cardiaque puisse se développer normalement. Les membres de cette famille sont des protéines possédant deux doigts de zinc dans leur partie C-terminale. Ces doigts de zinc sont impliqués dans la liaison à l'ADN au niveau du motif (A/T)GATA(A/G).² Il y a une grande homologie au niveau des doigts de zinc entre les membres de cette famille. Il y a également conservation de la famille GATA entre les différentes espèces puisque les facteurs GATAs se retrouvent autant chez les invertébrés que chez les vertébrés.³⁷ Cette famille se divise en deux sous-familles; l'une restreinte aux cellules hématopoïétiques (GATA-1,2,3) tandis que l'autre regroupe les membres exprimés dans le cœur (GATA-4/5/6).^{2;38} Les facteurs GATA-1, 2 et 3 sont très importants dans la différenciation des lignées hématopoïétiques et ont des rôles non-redondants dans la spécification des lignées érythrocytaires.^{2;25;38} Les facteurs GATA-4, 5 et 6 sont exprimés dans le mésoderme précardiaque et jouent divers rôles dans le développement cardiaque. GATA-4 est l'un des premiers marqueurs des cellules précurseurs cardiaques.²⁵

2.1.1.1.1 GATA-4

GATA-4 est présent dans le mésoderme cardiaque au jour E7.5 et son expression persiste tout au long de l'embryogenèse et chez l'adulte.^{25;38} Chez l'adulte, GATA-4 est exprimé dans le myocarde et l'endocarde.³⁸ L'inactivation du gène GATA-4 chez la souris est létale et conduit à une *cardia bifida*, c'est-à-dire que le croissant cardiaque ne fusionne pas pour donner le tube cardiaque et qu'il y a formation de deux cœurs.^{35;36} Le phénotype est corrigé suite à l'ajout de la protéine GATA-4, ce qui supporte l'hypothèse que GATA-4 est nécessaire et suffisant à la formation du tube cardiaque.^{2;38} De plus, GATA-4 active la transcription de gènes cardiaques tel que les facteurs natriurétiques cardiaques de type A³⁹ et B⁴⁰ (respectivement ANF et BNP), les chaînes lourdes α ⁴¹ et β ⁴² de la myosine (α MHC et β MHC) et la troponine cardiaque C (cTnC)^{43;44} ce qui montre la contribution importante de GATA-4 dans le développement cardiaque.

2.1.1.1.2 GATA-5

Chez le poisson zebrafish, l'inactivation de l'homologue de GATA-5 a le même phénotype que les souris n'exprimant pas GATA-4, c'est-à-dire une *cardia bifida*.⁴⁵ GATA-5 se retrouve sur le locus *faust* du poisson. Une mutation au niveau de ce locus révèle que GATA-5 est nécessaire pour la migration du croissant cardiaque vers la ligne ventrale de l'embryon, pour le maintien de l'expression de gènes myocardiques ainsi que pour la formation des ventricules.⁴⁵ La conservation des fonctions des protéines GATAs entre les espèces suggère que GATA-5 joue un rôle déterminant dans la formation du cœur chez les mammifères. Effectivement, GATA-5 est présent très tôt durant l'embryogenèse au moment où les cellules sont définitivement entrées dans la voie de différenciation de cellules cardiaques. A ce moment, GATA-5 est exprimé dans l'endoderme primitif et le mésoderme précardiaque.⁴⁶ GATA-5 présente un patron d'expression différent des deux autres GATAs cardiaques (GATA-4/6). GATA-5 est un activateur de gènes cardiaques *in vitro*³⁸ et il est essentiel pour la différenciation des cellules cardiaques précurseurs en cellules endocardiques cardiaques en interagissant avec le facteur NF-Atc.⁴⁷ GATA-5 continue d'être exprimé dans le cœur adulte. Le patron d'expression grandement régulé durant la cardiogenèse de GATA-5 et sa capacité à activer des gènes cardiaques font de ce facteur de transcription un bon candidat pour l'établissement de la lignée cellulaire endocardique.⁴⁸

GATA-5 est très similaire à GATA-4 et en plus de ces deux facteurs de transcription à doigts de zinc, un troisième membre de la famille, GATA-6, est présent dans les cellules cardiaques. Par contre, GATA-6 semble être impliqué dans la différenciation plus tardive des cardiomyocytes. Les trois membres de la famille GATA sont également retrouvés dans d'autres organes que le cœur et chaque membre possède un patron bien défini.⁴⁹ GATA-4 est détecté dans les intestins et les ovaires tandis que GATA-5 est exprimé dans l'estomac, le petit intestin, les poumons et la rate.⁴⁹ GATA-6 est présent dans les poumons, le foie et les ovaires. Par contre l'expression de GATA-4/5/6 est prédominante dans le cœur. La présence de GATA-4/5 est requise pour que le tube cardiaque se forme sur la ligne ventrale de l'embryon et puisse ensuite se segmenter pour donner lieu aux différentes régions du cœur.

2.1.2 Segmentation du tube cardiaque

Dès sa formation, le tube cardiaque est segmenté selon un axe antéro-postérieur. Les cellules sont déjà prédestinées à former un compartiment précis du cœur adulte selon leur emplacement dans le tube cardiaque.^{1:4:5} Jusqu'à ce jour, on a identifié un membre de la famille des protéines à boîte T, deux facteurs possédant un domaine bHLH ainsi qu'un membre de la sous-famille Iroquois (des protéines à homéodomaine) comme étant nécessaires à la segmentation normale du tube cardiaque.

2.1.2.1 Les facteurs de la famille à boîte T

Les facteurs de la famille à boîte T se retrouvent chez les invertébrés et les vertébrés.⁵⁰ A ce jour, il y a 15 membres connus chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et au moins 20 membres identifiés chez les vertébrés. Ces facteurs de transcription jouent un rôle important durant le développement, plus précisément au niveau de la spécification du type cellulaire ainsi que la morphogénèse.⁵⁰ Brachyury, un gène essentiel pour la segmentation du mésoderme, est le membre fondateur de cette famille et il a premièrement été identifié chez la souris.⁵¹ Les membres de cette famille partagent une boîte T d'environ 180 acides aminés dont l'homologie entre les différents membres est d'au moins 70%. Ce domaine est impliqué dans la liaison à l'ADN ainsi que dans l'homodimérisation de certains membres (par exemple Brachyury) et sert également d'interface d'interaction avec d'autres facteurs de transcription. Brachyury lie un site palindromique qui est également

reconnu par la majorité des autres membres de la famille. Des mutations au niveau de certains de ces facteurs de transcription à boîte T sont associées à des maladies congénitales. Chez la souris, l'inactivation de *tbx1* entraîne des malformations similaires à celles retrouvées dans le syndrome de DiGeorge chez l'humain⁵² caractérisé par d'importants problèmes développementaux incluant des anomalies des voies d'éjection cardiaques, des malformations faciales et des problèmes au niveau de la glande thyroïde.¹⁵ *Tbx3* est quant à lui associé au syndrome de «ulnar-mammary» qui est caractérisé par une hypoplasie de la phalange terminale pouvant mener à l'absence des mains ou des membres supérieurs et à un développement anormal des dents, de la poitrine et des organes génitaux.⁵² De nombreuses mutations retrouvées au niveau de *Tbx5* engendrent le syndrome d'Holt-Oram qui se caractérise par des malformations des membres supérieurs et d'une mauvaise septation du cœur.^{52;53}

2.1.2.1.1 *Tbx5*

Tbx5 est exprimé tôt durant le développement, au niveau du croissant cardiaque.^{54;55} Son expression persiste durant la formation du tube cardiaque puis elle se restreint progressivement à la région postérieure de tube cardiaque qui va former les oreillettes et le ventricule gauche. Son expression continue durant le développement et chez l'adulte, son expression est prédominante dans les oreillettes ainsi que dans le ventricule gauche. Chez les souris transgéniques qui surexpriment *tbx5* dans les ventricules embryonnaires sous le contrôle du promoteur de la chaîne β lourde de la myosine (β -MHC), certains embryons ne parviennent pas à effectuer le repliement cardiaque et ceux qui y parviennent montrent des anomalies dans la morphogénèse des cavités cardiaques.⁵⁴ Ces embryons transgéniques perdent l'expression de gènes spécifiquement ventriculaires et la morphogénèse des ventricules est retardée. La diminution de l'expression de la chaîne légère 2v de la myosine (*Mlc2v*) qui est un marqueur spécifique des ventricules, montre bien l'incapacité des embryons à développer normalement les ventricules. Puisque les ventricules ne se forment pas complètement, le tube cardiaque n'est pas en mesure d'effectuer le repliement nécessaire à la morphogénèse des quatre cavités. Ce phénotype suggère que *Tbx5* soit impliqué dans la différenciation initiale des chambres cardiaques. Lorsque les souris n'expriment pas *Tbx5*, le ventricule droit se développe mais il y a une sévère hypoplasie des oreillettes et du ventricule gauche.⁵³ De plus, des gènes spécifiques aux ventricules

sont diminués entre autres *Mlc2v* et *Irx4* (Iroquois 4).⁵³ Ces résultats d'inactivation de Tbx5 peuvent sembler contradictoires avec les données obtenues par sa surexpression dans les ventricules en développement. Dans les deux cas, les marqueurs spécifiques aux ventricules sont diminués, ce qui suggère que Tbx5 agit de façon dose-dépendante et qu'il coopère avec un co-facteur qui se trouve limitant lors de la surexpression de Tbx5. Toutes ces observations montrent bien le rôle important de Tbx5 dans la différenciation précoce entre les oreillettes et les ventricules dans le tube cardiaque. La fonction de Tbx5 n'est pas restreinte à la différenciation des cardiomyocytes, il est également nécessaire pour la morphogenèse des cavités cardiaques.

Tbx5 est aussi impliqué dans la spécification plus tardive des cavités cardiaques. Chez la souris, l'haploinsuffisance de Tbx5 entraîne la mort des embryons au jour E9.⁵³ Ces souris hétérozygotes ont une sévère hypoplasie des oreillettes et du ventricule gauche et l'expression de plusieurs marqueurs cardiaques est diminuée incluant NKx2.5, GATA-4, *Mlc2v*, l'ANF et la connexin 40. Tbx5 est un facteur essentiel pour le développement cardiaque.

2.1.2.2 Les facteurs de la famille bHLH

Les facteurs de transcription de la famille basique hélice-boucle-hélice (bHLH) sont également requis pour que le tube cardiaque se replie et positionne les ventricules sur le côté postérieur de l'embryon. Les facteurs eHand et dHand, aussi appelés respectivement Hand1 et Hand2, font partis de la famille bHLH et ils sont exprimés dans le mésoderme latéral ainsi qu'au niveau du tube cardiaque.^{2;5} Ces gènes sont présents chez tous les vertébrés et leur expression cardiaque est restreinte au compartiment antérieur du tube qui va donner naissance aux ventricules.^{2;4;5} Ils sont exprimés de façon complémentaire, c'est-à-dire que ehand marque la région présomptive du ventricule gauche alors que dhand se retrouve dans la région présomptive du ventricule droit.^{4;5} Chez l'embryon de poulet, l'inhibition de l'expression des deux protéines hand par des antisens empêche la formation des ventricules.⁵⁶

2.1.1.2.1 eHand et dhand

Chez la souris, l'inactivation de eHand mène à une létalité embryonnaire due aux malformations du placenta.⁵⁷ Cependant, la correction de ce phénotype par des chimères tétraploïdiques a mis en évidence un problème de segmentation et de repliement cardiaque.⁵⁸ Cette incapacité à effectuer le repliement cardiaque est aussi observée suite à l'inactivation d'un autre facteur de transcription, NKx2.5, qui semble contrôler l'expression de ehand.^{59;60}

D'autre part, l'inactivation de dHand chez la souris résulte en une hypoplasie du segment du tube cardiaque qui va donner lieu au ventricule droit ce qui empêche le développement normal du cœur.⁶¹ De plus, l'expression de GATA-4 diminue lorsqu'il n'y a pas d'expression de dHand. Ainsi, les deux protéines Hand semblent importantes pour la spécification et la formation des deux ventricules.

2.1.1.2.3 Iroquois 4

La famille de facteurs de transcription à homoédomaine Iroquois (Irx) comprend six membres qui sont impliqués dans la spécification de différents tissus chez les vertébrés. Les facteurs Irx possèdent tous la même boîte Iro composée de 13 acides aminés qui caractérisent cette famille.⁶² Les protéines Irx sont retrouvées du nématode à l'humain et chez les mammifères, elles sont divisées en deux groupes chromosomiques : Irx1/2/4 retrouvées sur le chromosome 8 et Irx 3/5/6 sur le chromosome 13.⁶² Les facteurs Irx sont nécessaires autant pour les étapes précoces du développement que pour la différenciation finale des cellules.⁶³ En effet, chez le poulet, Irx2 est exprimé dans la plaque neurale et il a un effet antagoniste sur BMP-4 (protéine morphogénique des os 4).⁶³ BMP-4 réprime la voie de différenciation neurale au profit des cellules épidermiques, il est donc nécessaire d'avoir une diminution de l'activité de BMP-4 pour la formation de la plaque neurale, Irx2 est donc favorable à la différenciation neurale. La plaque se différencie en tube neural qui acquiert un patron dorso-ventral qui est entre autre régulé par Irx2.⁶³ Les membres de la famille Irx sont bien impliqués dans le développement neural.

Irx4 est présent dès le jour E7.5 chez la souris. Son expression est restreinte aux régions du cœur qui donneront naissance aux ventricules et persiste chez les ventricules adultes.⁶⁴ Chez les souris qui n'expriment pas Irx4, les marqueurs auriculaires sont augmentés dans les ventricules tandis que les marqueurs ventriculaires sont diminués

suggérant que *Irx4* est requis pour établir le patron d'expression ventriculaire.³ *Irx4* semble être dans la voie signalétique de *dhand/NKx2.5* puisque son expression est diminuée en l'absence de l'un ou l'autre de ces gènes.^{4;65} Toutes ces observations suggèrent que *Irx4* joue un rôle important dans la spécification et la différenciation des ventricules et que ce facteur de transcription spécifique au cœur est un effecteur situé en aval de *Nkx2-5* et *dHand*.

2.1.2 Morphogenèse cardiaque

Lorsque le tube cardiaque s'est positionné selon l'axe antéro-postérieur, il effectue un repliement afin d'amener les oreillettes sur le côté antérieur et les ventricules sur le côté postérieur. En plus de la différenciation adéquate des cellules auriculaires et ventriculaires, la morphogenèse cardiaque dépend de la prolifération différentielle et de la communication appropriée entre les divers types cellulaires cardiaques. La présence d'un facteur de la famille *MEF2*^{2;5;26} ainsi qu'un facteur à homéodomaine semble requise à cette étape.^{4;59}

2.1.2.1.1 Les facteurs de la famille *MEF2*

Les facteurs de transcription de la famille *MEF2* appartiennent à la grande famille des MADS (*MCM1*, *amagous*, *deficiens*, and *serum response factor SRF*).² Le domaine MADS permet à la protéine de lier des sites AT-riche présents sur les promoteurs de gènes.² Plusieurs gènes cardiaques possèdent cette région *cis*-régulatrice qui fut au départ identifiée sur les gènes des muscles squelettiques. Il y a quatre membres dans la famille *MEF*: *MEF2A*, *MEF2B*, *MEF2C* et *MEF2D*. *MEF2C* est principalement exprimé dans les muscles squelettiques et le cœur. Son expression cardiaque est détectée peu de temps après celle de *GATA-4*.² Bien que *MEF2C* soit exprimé tôt durant le développement cardiaque, l'inactivation de ce gène n'arrête pas la différenciation des cardioblastes et n'entraîne pas de problème dans la mise en place du croissant cardiaque ou du tube cardiaque.⁶⁶ Par contre, le développement cesse lors de la morphogenèse cardiaque et l'expression de marqueurs cardiaques comme l'*ANF* et l' α *MHC* est diminuée. Les ventricules semblent se différencier davantage en un ventricule gauche puisque le facteur *eHand* est exprimé plus largement et le facteur *dHand* a une expression plus restreinte. *MEF2C* pourrait être un co-facteur de *dHand* et il semble prendre une place importante dans la morphogenèse cardiaque.^{2;25;26;66} De plus lors de l'inactivation de *MEF2C*, l'expression de gènes

importants pour la vasculogénèse notamment l'angiopoïétine et VEGF (facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires) est inhibée dans les myocytes ce qui pourrait influencer la différenciation de l'endocarde et des vaisseaux du cœur.⁶⁷

2.1.2.1.1 Les facteurs à homéodomaines

Le facteur de transcription à homéodomaine Nkx2.5 est nécessaire à la morphogénèse cardiaque. Les membres de la famille NK2 ont une hélice conservée dans leur homéodomaine et ils possèdent une tyrosine à la position 54, ce qui caractérise la famille.⁶⁸ Cette tyrosine pourrait servir aux membres NK2 à reconnaître le motif T(C/T)AAGTG sur l'ADN.² L'étude de la drosophile a permis l'identification du premier élément essentiel à la formation du cœur.⁶⁸ Effectivement, la protéine *tinman*, l'homologue de Nkx2.5, est nécessaire pour la spécification précoce de la lignée cardiaque chez la mouche au niveau du mésoderme latéral. *Tinman* est le premier marqueur des cardioblastes.⁶⁸ Lors de l'inactivation de *tinman*, les embryons de la mouche ne parviennent pas à former un cœur, ce qui démontre l'importance de ce facteur de transcription dans la cardiogénèse. Chez les vertébrés, plusieurs homologues de *tinman* ont été identifiés.⁶⁸ Certains membres de la famille ont des patrons d'expression qui se chevauchent, par exemple, le cerveau exprime Nkx2.1 et Nkx2.2, la langue Nkx2.5 et Nkx2.6 tandis que les poumons expriment Nkx2.1 et Nkx2.6. Dans le cœur, on retrouve plusieurs membres NK2 : Nkx2.5, Nkx2.3, Nkx2.7 et Nkx2.8.

Chez la souris, Nkx2.5 est le membre de la famille le plus étudié. Il est exprimé tôt dans le mésoderme latéral qui donnera lieu aux cellules cardiaques.⁶⁹ Le patron d'expression de GATA-4 est très similaire à celui de NKx2.5, ce qui fait de ces deux facteurs de transcription des marqueurs précoces des cellules cardiaques.³⁸ L'expression de NKx2.5 persiste durant le développement et durant la vie adulte. Son rôle dans le développement cardiaque a été mis en évidence par l'inactivation génique chez la souris.⁶⁹ En l'absence de NKx2.5, le tube cardiaque se forme et commence à battre mais il n'effectue pas de repliement cardiaque et le développement s'arrête après la formation du tube cardiaque. Le tube se forme mais les cardiomyoblastes ne parviennent pas à se différencier complètement. Ils n'expriment pas à des niveaux normaux les marqueurs cardiaques que sont l'ANF et le BNP et les facteurs de transcription cardiaques eHand et

dHand ont également une expression plus faible. Des mutations du gène *Nkx2.5* chez l'humain sont associées à des malformations cardiaques congénitales entre autres à la tétralogie de Fallot et à d'autres défauts de septation.⁴ *Nkx2.5* semble agir avec des cofacteurs pour permettre la différenciation des cardioblastes. Un de ces cofacteurs est GATA-4. Les deux facteurs de transcription ont le même patron d'expression et sont requis pour transmettre les signaux de facteurs cardiogéniques comme FGF (facteur de croissance des fibroblastes) et BMP et activent de façon synergique des gènes cibles tel que l'ANF.^{70;2;39;71} *In vitro*, ils sont suffisants pour induire la formation de cardiomyocytes à partir de cellules souches.^{72;73}

2.1.3 Formation du cœur adulte avec ses quatre cavités distinctes

Chez les mammifères, le cœur adulte est composé de quatre cavités qui ont des propriétés morphologiques, contractiles et biochimiques différentes. Ces chambres sont séparées par des septums et par des valves. Pour arriver à cette différenciation tardive du cœur, les facteurs de la famille GATA,^{38;73} de la famille NF-AT^{2;47;74;75} et de la famille des protéines à boîte T sont requis.

2.1.3.1 Les facteurs de la famille GATA

Les facteurs GATA ont été décrits précédemment. Ils sont impliqués dans les premières étapes du développement cardiaque ainsi que dans les étapes plus tardives. GATA-4 est nécessaire à la différenciation finale des cardiomyocytes. En effet, des études *in vitro* ont montré l'importance de GATA-4 dans la différenciation des cellules.⁷³ Les cellules P19 sont des cellules embryonnaires pluripotentes pouvant se différencier en cardiomyocytes. Suite à la transfection d'un plasmide contenant un anti-sens de GATA-4 dans les cellules P19, ces dernières ne parviennent plus à se différencier totalement en cardiomyocytes et beaucoup de cellules précardiaques entrent en apoptose. Au contraire, si GATA-4 est surexprimé dans les cellules P19, celles-ci se différencient plus rapidement en cardiomyocytes. GATA-4 est aussi requis dans les cardiomyocytes post-nataux.³⁸ Lorsque les cardiomyocytes de rats de quatre jours sont infectés avec des adénovirus contenant l'anti-sens de GATA-4, l'expression de plusieurs gènes cardiaques endogènes est diminuée dont l'ANF, le BNP, la troponine cardiaque C, la β -MHC, l' α -MHC et le récepteur du

facteur β de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR β).³⁸ Pour démontrer le rôle de GATA-4 *in vivo* dans la formation du cœur, l'inactivation du gène de GATA-4 chez la souris est limitant puisque c'est létal très tôt durant le développement. Une autre stratégie a donc été employée; une mutation a été instaurée dans le doigt de zinc N-terminal de GATA-4 chez la souris l'empêchant ainsi d'interagir avec son co-facteur FOG-2 (friend of GATA-2) tout en lui permettant de lier spécifiquement l'ADN.⁷⁶ Cette étude révèle que l'interaction entre GATA-4 et FOG-2 est essentielle à la morphogénèse du cœur ainsi qu'à la formation des vaisseaux coronaires. GATA-4 est requis pour la formation du cœur et joue donc un rôle primordial dans le développement des cardioblastes ainsi que dans le maintien des cardiomyocytes.

2.1.3.1.2 GATA-6

GATA-6 est le troisième membre de la famille GATA retrouvé dans le cœur. GATA-6 est exprimé tôt dans le myocarde et son expression persiste durant le développement embryonnaire et chez l'adulte. Comme les autres facteurs GATA cardiaques, GATA-6 est capable d'activer des gènes cardiaques *in vitro*.³⁸ De plus, lorsque GATA-6 est inactivé dans les cardiomyocytes post-natals, plusieurs gènes cardiaques ont une expression diminuée dont les hormones de l'ANF et du BNP.⁷⁷ GATA-6 semble donc nécessaire au maintien des cardioomyocytes différenciés.

2.1.3.2 Les facteurs de la famille NF-AT

Les membres de la famille NF-AT (nuclear factor of activated T cells) sont des facteurs de transcription calcium-dépendent.⁷⁴ Le calcium active la calcinurine qui à son tour déphosphoryle les NF-AT et induit leur translocalisation nucléaire où ils agissent comme facteurs de transcription.⁷⁴ Lorsque la concentration de calcium est faible, les facteurs NF-AT restent dans le cytoplasme. Un membre de la famille, NF-Atc1, est exprimé tôt dans le développement cardiaque uniquement dans les cellules qui donneront naissance aux valves et au revêtement intérieur du cœur.^{2;47} NF-Atc1 est tout d'abord exprimé spécifiquement dans les cellules épithéliales qui deviendront des cellules mésenchymateuses formant le coussin cardiaque. Les valves et les septums du cœur adulte proviennent du coussin cardiaque. L'inactivation de NF-ATc1 chez la souris est létale à E13.5 du fait de l'absence de la formation des valves des voies d'éjection et que le septum

entre les deux oreillettes ne se ferme pas complètement.⁷⁵ NF-Atc1 joue donc un rôle important dans la septation cardiaque. Il est intéressant de souligner que les protéines NF-At coopèrent avec les facteurs GATA tant dans les cellules endocardiaques que myocardiques.⁷⁸

3 Éléments *cis*-régulateurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes cardiaques

Les mécanismes moléculaires intervenant dans la cardiogenèse sont encore largement méconnus.²⁵ La section précédente révèle qu'un nombre limité de facteurs de transcription est identifié à ce jour pour jouer un rôle primordial dans le développement du cœur. Or, la formation d'un organe complexe comme le cœur requiert une régulation transcriptionnelle très précise tant dans le temps que dans l'espace et qui ne peut pas être expliquée entièrement par les facteurs de transcription déjà connus. Par ailleurs, l'étude des éléments *cis*-régulateurs des promoteurs de gènes cardiaques suggère la présence d'autres régulateurs importants du programme génétique cardiaque.^{25;26}

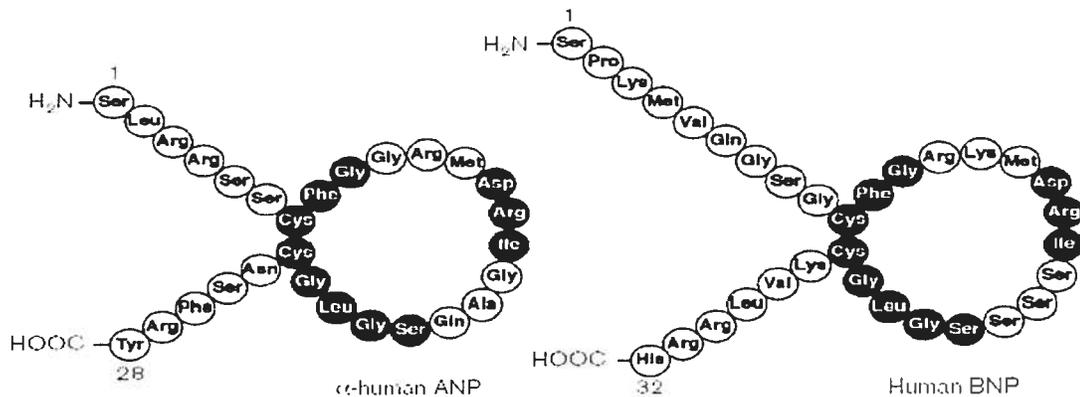
Plusieurs éléments régulateurs se retrouvent sur différents gènes cardiaques suggérant que ces motifs soient des joueurs-clé de la différenciation cardiaque. Les principaux éléments *cis*-régulateurs cardiaques sont représentés dans le tableau 1.3. On note que sauf pour le motif CACCC, le facteur de transcription qui lie ces éléments régulateurs a été identifié. L'élément CACCC se retrouve sur les promoteurs des gènes du peptide natriurétique de type A (ANF), du peptide natriurétique de type B (BNP), de l'actine cardiaque, de la troponine cardiaque et de la chaîne β -lourde de la myosine. Il est aussi intéressant de souligner que les promoteurs des gènes de l'ANF et du BNP se sont souvent avérés de très bons modèles pour mettre en évidence des éléments *cis*-régulateurs importants pour le contrôle des gènes cardiaques amenant ensuite à l'identification de facteurs de transcription essentiels au développement cardiaque. L'élément GATA du promoteur de BNP a permis de cloner GATA-4 et de montrer que c'est un régulateur important de gènes cardiaques.⁴⁰ Les promoteurs des facteurs natriurétiques ont également contribué à montrer l'importance des motifs NKE, CARG/SRE et TBE dans la régulation de gènes cardiaques et ces éléments sont régulés respectivement par les facteurs de transcription cardiaques Nkx2.5, SRF et Tbx5.

Tableau 1.3 Éléments cis-régulateurs importants pour la régulation de gènes cardiaques

Éléments	Protéines	Promoteurs
GATA	GATA-4,6	BNP*, ANF, α -MHC, cTpC, Nkx2.5
NKE	Nkx2.5	ANF*, β -MHC, MLC2, CARP
MEF2	MEF2A, B, C, D	α -MHC*, ANF, MCK, MLC2
CARG/SRE	SRF	ANF*, α -Ska, α -CA, α -MHC, MCK
TBE	Tbx5	ANF*, MLC1A, α -MHC, Cx40
CACCC	?	BNP*, α -CA, β -MHC, cTnC, ANF

Légende: Les astérisques suivants les promoteurs des gènes indiquent que ce promoteur a servi à identifier l'élément cis-régulateur comme un régulateur important de gènes cardiaques.

Abréviations: BNP; peptide natriurétique de type B, ANF; peptide natriurétique de type A, α -MHC; chaîne lourde α de la myosine, cTpC; troponine cardiaque, β -MHC; chaîne lourde β de la myosine, MLC2; chaîne légère des myosines, CARP; protéine ankyrin répétée strictement cardiaque, MCK; créatine kinase musculaire, α -Ska; actine squelettique α , α -CA; actine cardiaque α , MLC1; chaîne légère de la myosine 1 des oreillettes, Cx40; connexine 40

**Figure 1.2** Structure des deux peptides natriurétiques

La boucle biochimique importante pour leurs activités biologiques est conservée entre les deux hormones.

4 Peptides natriurétiques cardiaques

En plus d'exercer son rôle de pompe et de fournir le sang oxygéné à tout l'organisme, le cœur a également une fonction endocrine.⁷⁹ L'ANF⁸⁰ et le BNP⁸¹ sont des hormones sécrétées principalement par le cœur et elles ont des propriétés diurétiques, natriurétiques et vasodilatatrices.^{29;82-84} Ces hormones agissent selon plusieurs actions pharmacologiques dont les principales sont l'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone, l'augmentation du flux sanguin au niveau rénal, l'augmentation du taux de filtration glomérulaire, l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins et la relaxation des muscles lisses vasculaires pour amener une réduction de la pression sanguine.⁸² L'ANF et le BNP sont sécrétées dans les cardiomyocytes et sont libérées sous forme de prohormones. Le proANF et le proBNP sont des peptides biologiquement inactifs de 126 et 108 acides aminés respectivement qui vont être coupés en ANF/NT-proANF et BNP/NT-proBNP par une endopeptidase neutre EC3.4.24.11 (NEP).^{83;85} Les peptides NT-proANF et NT-proBNP sont la partie N-terminale des peptides et n'ont pas d'activité biologique connue. Les formes actives sont les peptides de l'ANF et du BNP qui contiennent respectivement 28 acides aminés et 32 acides aminés.⁸³ Les deux hormones ont la même structure biochimique comme le montre la figure 1.2. Les deux hormones contiennent une boucle de 17 acides aminés fermée par un pont disulfure entre les deux cystéines et qui est essentielle à leur activité biologique.⁸⁴ L'ANF et le BNP activent leurs cibles en se liant à des récepteurs transmembranaires qui contiennent dans leur partie intracellulaire une guanylate cyclase. L'activation des récepteurs produit le second messenger intracellulaire qui est la guanosine monophosphate cyclique (cGMP).^{84;86} Il existe trois types de récepteurs; les récepteurs de type A, B et C. Les trois récepteurs sont exprimés dans les reins, le cœur, l'endothélium vasculaire, les muscles lisses vasculaires, les glandes surrénales et dans le système nerveux central. L'ANF et le BNP lient les récepteurs de type A et de type B mais l'ANF a une meilleure affinité pour les deux récepteurs. Le récepteur C ne contient pas de partie guanylate cyclase et on lui attribue une fonction de clairance.

Des animaux transgéniques ont été générés pour mieux caractériser le rôle des facteurs natriurétiques. Le gène de l'ANF a été inactivé chez la souris; ces animaux ont un cœur plus gros que la normale et ils montrent des signes d'hypertension de manière

dépendante au sel.⁸⁷ De plus, quand l'ANF est surexprimée, les souris sont hypotendues. Selon ces résultats, l'ANF semble avoir un rôle essentiel dans le contrôle sodium-dépendant de la pression sanguine. L'inactivation du BNP a également été faite chez la souris; ces animaux sont normaux-tendus mais ils développent de la fibrose cardiaque.⁷³ Au contraire, lorsque le BNP est surexprimé, les souris ont une masse cardiaque plus faible et elles sont hypotendues.^{88;89} Cela suggère que le BNP aurait un rôle dans le remodelage ventriculaire et le contrôle de la pression artérielle dans des conditions pathophysiologiques. L'inactivation du récepteur guanylyl-cyclase de type A (NPR-A) chez la souris a confirmé le rôle des peptides natriurétiques cardiaques. Les souris n'exprimant pas le récepteur NPR-A développent de la fibrose et de l'hypertrophie cardiaques.^{90;91} En plus, ces animaux sont hypertendus même dans des conditions normales de sel.⁹⁰ Ces modèles animaux ont permis de montrer l'importance de l'ANF et du BNP dans la régulation de la pression sanguine et de l'hypertrophie cardiaque.

Chez l'humain, l'ANF et le BNP représentent des marqueurs de plusieurs pathologies chez l'adulte et les mesures des niveaux plasmatiques de ces hormones sont maintenant couramment utilisées en clinique.^{79;84;85,92-94} La taille de la cavité intraventriculaire est un régulateur de la sécrétion de l'ANF et du BNP.^{82;93} Les concentrations cardiaques et plasmatiques de l'ANF et du BNP augmentent lors d'un stress ou d'un étirement de la paroi ventriculaire.²⁹ Les peptides natriurétiques sont donc de bons outils de diagnostic pour la défaillance cardiaque et leurs concentrations plasmatiques corrélerent avec l'ampleur de la maladie.⁸⁵ Une dysfonction ventriculaire peut être induite par un infarctus du myocarde ou par une hypertrophie cardiaque menant à l'augmentation de la concentration plasmique de BNP. La concentration plasmique de BNP est utilisée en clinique pour le diagnostic de la sévérité des défaillances cardiaques, la progression de la fonction cardiaque suite à un infarctus ou à une défaillance et pour la détermination du temps d'hospitalisation.⁹³ D'autres anomalies cardiaques peuvent augmenter la concentration plasmique de BNP comme c'est le cas pour les dysfonctions systolique et diastolique et les problèmes reliés aux valves.⁸⁴ Le BNP est augmenté dans certaines pathologies qui n'affectent pas directement le cœur mais qui peuvent causer des problèmes secondaires d'hypertension ou d'insuffisance cardiaque résultant ultérieurement en dysfonction ventriculaire. Les embryons de rate souffrant de diabète de grossesse et les fœtus trisomiques qui sont souvent atteints de défaillance cardiaque entraînent une

augmentation cardiaque du BNP.⁸³ Chez l'adulte, les maladies pulmonaires chroniques, les maladies de la glande thyroïde et les problèmes rénaux chroniques ou aigus amènent tous une augmentation de la synthèse de BNP.⁸⁴

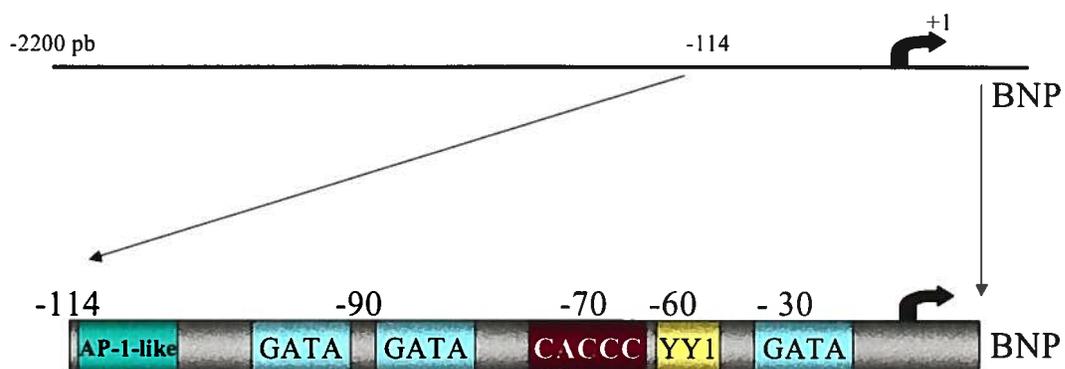
4.2 Régulation transcriptionnelle du peptide natriurétique de type B

L'expression de l'ANF et du BNP est fortement régulée durant l'embryogenèse. Les deux gènes sont exprimés tôt par les cardiomyocytes à des stades très précoces du développement cardiaque.³⁰ En effet, chez la souris au jour E8, l'ANF est détecté dans le cœur; au jour E9, l'ANF est retrouvé en grande quantité dans les oreillettes et dans les ventricules où il prédomine. Contrairement, chez l'adulte, l'expression de l'ANF est restreinte aux oreillettes. Par contre, d'autres organes tels que le cerveau, les vaisseaux sanguins et les reins expriment également l'ANF mais de façon beaucoup moins importante que le cœur. Le gène du BNP a un patron d'expression semblable à celui de l'ANF³⁰ mais il est davantage détecté dans les ventricules que dans les oreillettes. Contrairement à l'ANF, le BNP est exprimé aussi bien dans les oreillettes que dans les ventricules du cœur adulte. L'expression précoce et restreinte au cœur de ces deux gènes en fait de très bons marqueurs des cellules cardiaques durant l'embryogenèse. Les changements importants dans les patrons d'expression de l'ANF et du BNP au cours du développement fœtal et post-natal suggèrent un contrôle très précis dont le mécanisme n'est pas entièrement élucidé.

Le BNP est un bon modèle d'étude pour comprendre les mécanismes par lesquels les gènes cardiaques sont régulés puisque l'expression de BNP est principalement cardiaque et que BNP ne se retrouve pas dans les muscles striés.³⁰ Le promoteur de BNP qui est dans la partie 5' non-traduite contient plusieurs éléments cis-régulateurs potentiels comme le montre la figure 1.3. Cette partie de 2500 paires de bases possède trois sites putatifs AP1 ((T/G)(T/G)AGTCA), six sites GATA (GATAA), un site CRE (TGACTTCA), un site Octamer (ATGCAAAT), un site Sp1 (GGGCGG), neuf sites SRE-like (CC(AT)₆GG) et un site CACCC (CACCC). Tous ces sites sont des cibles potentielles pour les facteurs de transcription. Le BNP a une expression principalement restreinte au cœur et au cerveau. Pour obtenir cette spécificité, les éléments *cis*-régulateurs du

Figure 1.3 Promoteur proximal de BNP

Le promoteur proximal du BNP est suffisant pour son expression maximale et il contient les sites de régulation GATA, CTCCAT, CACCC et AP-1 like.



promoteur doivent contrôler l'expression du BNP. La région proximale du promoteur est suffisante pour diriger l'expression de BNP dans les cultures primaires de cardiomyocytes.⁴⁰ Comme le montre la figure 1.3, le promoteur proximal contient trois sites GATAs qui sont régulés par GATA-4, un site de type AP-1, un élément CTCCAT qui lie l'activateur YY1 et un site CACCC. Les sites GATAs et CACCC sont conservés à travers les espèces. L'organisation spatiale de deux éléments GATA près d'un site CACCC se retrouve aussi dans le locus distal des gènes des globines α et β .⁹⁵ Ces sites GATAs et CACCC sont d'importants régulateurs de l'hématopoïèse et de la transcription des gènes érythroïdes.⁹⁶ Dans le système érythropoïétique, ce sont les facteurs de transcription GATA-1 et erythroid krüppel-like-factor (EKLF) qui lient respectivement les sites GATA et CACCC.⁹⁷ Dans le cas du promoteur de BNP, le rôle de la boîte CACCC dans la régulation de l'expression cardiaque n'a pas encore été déterminé et le facteur de transcription qui s'y lie n'est pas identifié.

5 Les membres de la famille XKLFs

La famille grandissante de facteurs de transcription Sp/XKLF contrôle la transcription des gènes dotés de motifs riches en GC et de motif CACCC.⁹⁸ Ces deux éléments régulateurs sont des motifs très répandus.⁹⁹ Ils se retrouvent sur les promoteurs, les régions amplificatrices ou stimulatrices et sur les régions de contrôle des locus incluant des gènes histo-spécifiques.¹⁰⁰ La famille peut se subdiviser en deux sous-familles; la famille Sp et la famille XKLF.¹⁰⁰ Malgré une grande homologie entre les deux sous-familles, la différence majeure reste leur affinité pour les sites de liaison à l'ADN. La famille Sp lie préférentiellement les sites riches en GC tandis que la famille XKLF lie davantage les sites CACCC.¹⁰⁰ Les membres de la famille Krüppel-like factors (XKLF) sont des facteurs de transcription à doigt de zinc. Les doigts de zinc forment le motif le plus commun parmi les facteurs de transcription, ils représentent environ 2% du génome humain.¹⁰¹ Les facteurs XKLFs se retrouvent chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les invertébrés comme *C. elegans*, les insectes par exemple la drosophile et chez tous les mammifères étudiés.⁹⁹ Cette conservation entre les différentes espèces suggère un rôle fondamental pour cette famille de facteurs de transcription.

5.1 Nomenclature des XKLFs

XKLF signifie X Krüppel-like-factor et le X réfère au tissu dans lequel l'expression du facteur est la plus abondante ou le tissu à partir duquel le facteur a été cloné. EKLF a été nommé ainsi puisqu'il est exprimé principalement dans les érythrocytes.¹⁰² D'autres nomenclatures existent afin de classer les membres de cette famille. Il y a la nomenclature fournie par le Comité de la Nomenclature des Gènes Humains (HGNC)¹⁰³ et celle provenant des chercheurs qui identifient un nouveau facteur de transcription de la famille XKLF et ils lui donnent un nom complètement arbitraire.

Les noms donnés par l'organisation HGNC sont les KLF. Les lettres KLF (Krüppel-like factor) sont suivies d'un numéro, de 1 à 17, représentant généralement l'ordre dans lequel les facteurs de transcription ont été clonés. Par exemple, EKLF qui est le membre fondateur de la famille est aussi nommé KLF1 puisqu'il a été le premier membre identifié. Cependant, plusieurs noms peuvent donc désigner la même protéine (Tableau 1.4).

5.2 Structure conservée entre les membres XKLFs

Les facteurs XKLFs ont trois doigts de zinc de type C2H2, un doigt de zinc étant formé par la coordination d'un atome de zinc avec deux cystéines et deux histidines.^{99;100} Ces doigts de zinc de type C2H2 ont la même configuration que la protéine *Krüppel* chez la *Drosophila mélanogaster* d'où la provenance du nom de la famille XKLF.¹⁰⁰ L'atome de zinc se retrouve au centre d'un tétraèdre formé par des liaisons ioniques avec les deux cystéines et les deux histidines.⁴⁸ Cela donne une conformation tridimensionnelle de deux brins anti-parallèles de feuillet β dans la partie amino-terminale de la protéine et d'un brin anti-parallèle formant une hélice α .¹⁰⁴

La famille XKLF est caractérisée par les trois doigts de zinc formés de 81 acides aminés et situés dans la partie C-terminale de la protéine. Une autre caractéristique de la famille XKLF est les liens Krüppel qui relient les doigts de zinc entre eux (Figures 1.4 et 1.6).⁹⁹ Cet arrangement de trois doigts de zinc séparés par un nombre défini d'acides aminés dans la partie C-terminale caractérise la famille. Jusqu'à présent 17 membres ont été identifiés.¹⁰⁵ L'arbre phylogénique de la figure 1.5 indique les membres connus de la

Tableau 1.4 Classification et fonctions des facteurs XKLFs

	Noms des facteurs de transcription	Tissus exprimant le facteur	rôles	références
Facteurs non-cardiaques	EKLF, Klf1	Érythrocytes, mastocytes	KO: léthal à E15 par anémie sévère, différenciation finale des érythrocytes	Nuez et al. ¹⁰⁶ Perkins et al. ¹⁰⁷
	IKLF, Klf5, BTEB-2	intestins	KO: léthal à E8.5 prolifération cellulaire intestinale, réponse au stress, remodelage tissulaire	Conkright et al. ¹⁰⁸ Shindo et al. ¹⁰⁹
	UKLF, Klf7	ubiquitaire	développement et maintien des neurones	Matsumoto et al. ¹¹⁰
	FKLF, Klf11, TIEG-2	ubiquitaire	Anti-prolifération	Asano et al. ¹¹¹ Cook et al. ¹⁰⁵
Facteurs exprimés dans le cœur	BKLF, Klf3, TEF-2	ubiquitaire	KO: viable mais développement de maladies myéloprolifératives	Crossley et al. ¹¹² Crossley et al. ¹¹³
	GKLF, Klf4, EZF	Intestins, poumons, peau, cœur	KO: léthal périnatal, malformation de l'épiderme, impliqué dans cycle cellulaire et différenciation finale des cellules intestinales	Segre et al. ¹¹⁴ Shields et al. ¹¹⁵ Shie et al. ¹¹⁶
	LKLF, Klf2	Cellules endothéliales vasculaires, cœur, poumons	KO: léthal à E12.5 par hémorragies et malformations vasculaires, rôle dans le développement pulmonaire tardif	Wani et al. ¹¹⁷ Wani et al. ¹¹⁸
	FKLF-2, Klf13, RFLAT-1, BTEB3	Cœur, muscles squelettiques, moelle osseuse, lymphocytes	Non-déterminé	Asano, et al. ¹¹⁹ Schohy et al. ¹²⁰ Song et al. ¹²¹ Martin et al. ¹²²



Figure 1.4 Structure conservée entre les membres de la famille XKLF

Les trois doigts de zinc dans la partie C-terminale sont conservés entre les membres tandis que la partie N-terminale de la protéine est spécifique à chaque facteur de transcription.

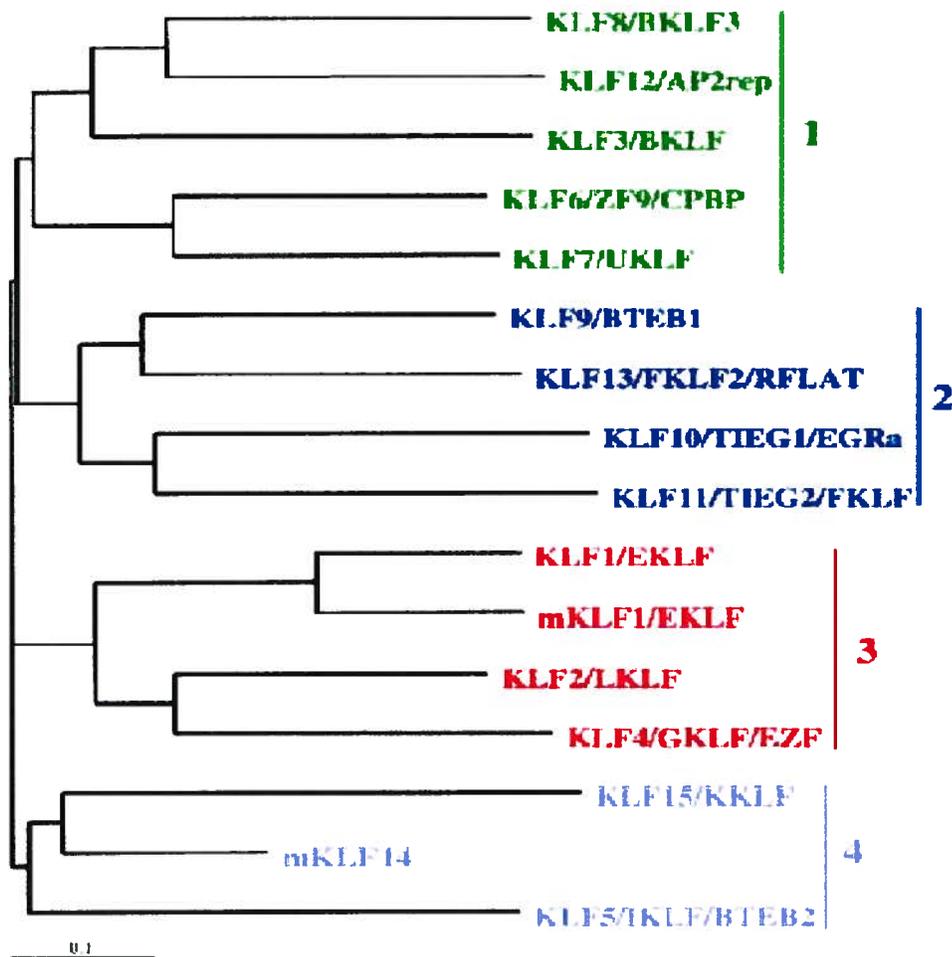


Figure 1.5 Arbre philogénique des XKLFs

Le schéma représente la relation entre les membres connus de la famille XKLF. Ils peuvent être classés en quatre sous-familles, les membres d'une même sous-famille étant très homologues entre eux. Les différents noms utilisés pour le même facteur de transcription sont indiqués.

D'après Bieker. *J. Biol. Chem.* 276; 34355-8

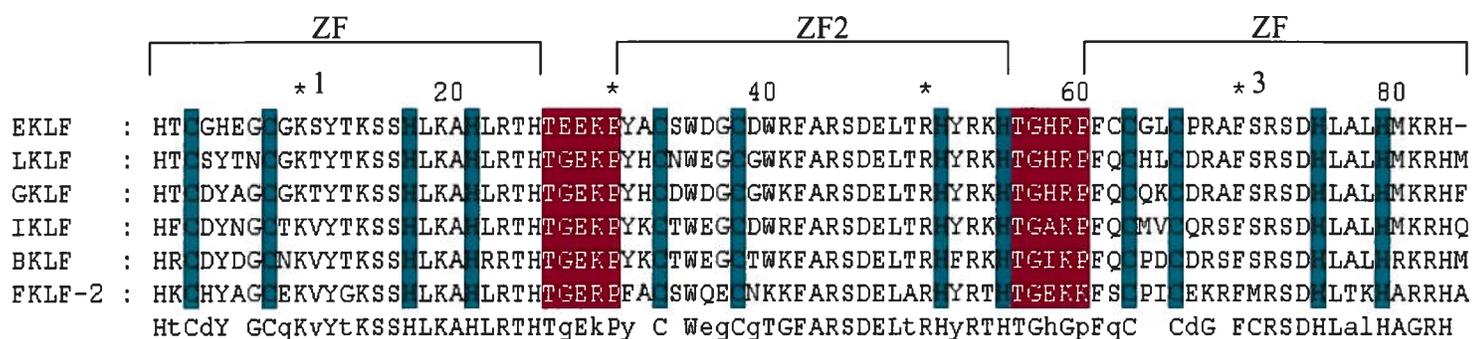


Figure 1.6 Alignement des trois doigts de zinc conservés entre les membres de la famille XKLF

Les trois doigts de zinc sont délimités par les accolades (ZF1, ZF2 et ZF3). Les cystéines et les histidines faisant parties du motif C2H2 sont soulignées en vert. Les liens Krüppel sont soulignés en rouge. Le premier lien Krüppel relie le deuxième doigt de zinc au premier et le deuxième lien Krüppel relie le troisième doigt de zinc au deuxième. Les numéros d'accésion GenBankTM sont les suivants; EKL:Erythroid-Krüppel-like factor AF033102, LKL: Lung-Krüppel-like factor U25096, GKL: Gut-Krüppel-like factor U20344, IKL:intestinal-enriched-Krüppel-like Factor AF079852, BKL: Basic-Krüppel-like factor U36340 et FKL-2: Fetal-Krüppel-like factor AF251796.

famille ainsi que les différents noms attribués à chaque membre. Une des caractéristique de la famille est l'expression tissu-spécifique de la majorité des membres.

Tous les membres de la famille possèdent une région C-terminale très conservée dans laquelle se retrouvent les motifs en doigts de zinc (Figure 1.6).¹⁰³ Par contre, la partie N-terminale diffère énormément entre les membres. Cette partie est unique pour chaque facteur de transcription XKLF, il n'y a aucune région à l'extérieur des doigts de zinc qui présente une homologie entre les membres de la famille XKLF. Dépendamment des XKLFs, la partie N-terminale de la protéine peut être riche en proline, en glutamine ou en sérine.¹²³ Les doigts de zinc C2H2 facilitent les interactions entre les facteurs de transcription et l'ADN.⁹⁹ Les XKLFs peuvent également interagir avec l'ARN, des protéines ou des lipides via leurs doigts de zinc.¹⁰¹ Outre l'homologie trouvée au niveau des motifs C2H2, le lien Krüppel entre les doigts de zinc est identique pour tous les membres. Ce lien est toujours composé des sept résidus suivants: TGEKP(Y/F)X.⁹⁹ C'est une structure qui est très flexible lorsque la protéine est en solution mais qui devient rigide et aide à la stabilisation du complexe protéine-ADN suite à la liaison à l'ADN.¹⁰⁴ Le lien Krüppel a premièrement été identifié chez la drosophile et il a été montré comme un facteur nécessaire à la différenciation et au développement de l'abdomen. Puisque les XKLFs sont structurellement similaires à la protéine *Krüppel*, cela suggère que les différents XKLFs jouent probablement un rôle dans la différenciation cellulaire et le développement de divers organes.

5.3 Importance biologique des XKLFs

5.3.1 Différenciation et prolifération cellulaires

Plusieurs membres de la famille jouent un rôle primordial autant dans la différenciation que dans la prolifération cellulaire. En effet, EKLF, GKLF et UKLF semblent tous impliqués dans la différenciation cellulaire. L'importance de EKLF dans la différenciation finale des érythrocytes est bien documentée. EKLF est nécessaire pour le changement des globines, c'est-à-dire pour l'induction globine adulte β qui remplace la globine fœtale γ .¹²⁴ GKLF (gut enriched Krüppel-like factor) est impliqué dans la différenciation finale des cellules de la peau et des cellules intestinales. Chez les souris

n'exprimant pas GKLf, les nouveau-nés meurent quelques heures après la naissance car leur épiderme ne se forme pas.¹¹⁴ En plus, ces souris ont une diminution de 90% du nombre de leurs cellules caliciformes dans leur colon malgré une prolifération cellulaire normale.¹²⁵ Les cellules ne semblent pas pouvoir parvenir à leur différenciation finale. L'expression spatio-temporelle de UKLF (ubiquitous Krüppel-like factor) suggère que ce facteur est impliqué dans la différenciation des cellules nerveuses.¹²⁶ UKLF est exprimé tôt dans le développement des systèmes nerveux central et périphérique. De plus, son expression corrèle avec la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des précurseurs neuronaux. En plus UKLF peut réguler l'expression du récepteur TrkA qui est essentiel pour la maturation et la différenciation des neurones sensitifs et sympathiques.¹²⁷

Outre leurs rôles dans la différenciation cellulaire, les XKLFs sont également impliqués dans la croissance cellulaire. Par exemple, IKLF (Intestinal enriched Krüppel-like factor) est exprimé dans l'intestin, plus précisément dans les cellules de la base des cryptes impliquées dans la régénération de l'épithélium intestinal.¹⁰⁸ IKLF semble impliqué dans la prolifération des cellules intestinales puisque son expression est augmentée dans les vaisseaux sanguins des muscles lisses dans lesquels il y a eu induction de la croissance.¹²⁸ IKLF est un activateur de la prolifération tandis que GKLf en est un inhibiteur. Des études *in vitro* dans les cellules NIH 3T3 montrent que GKLf est exprimé lorsque les cellules sont en arrêt de croissance induit par une privation de sérum ou par une inhibition de contact.¹¹⁵ La croissance cellulaire est intimement liée au cycle cellulaire. Cette dernière fonction biologique requiert la présence de certains XKLFs pour pouvoir se dérouler normalement.

5.3.2 Régulation du cycle cellulaire et implication dans les cancers

Chez les mammifères, le cycle cellulaire est divisé en cinq étapes; 1) la première ouverture (G1) 2) la synthèse de l'ADN (S) 3) la deuxième ouverture 2 (G2) 4) la mitose (M) 5) la phase de quiescence (G0).¹²⁹ Le bon fonctionnement du cycle est nécessaire pour maintenir la prolifération et la différenciation à des niveaux normaux. Il a été démontré que GKLf est un régulateur négatif de la croissance cellulaire. GKLf est nécessaire pour l'arrêt du cycle en phase G1/S.¹²⁹ LKLF (lung krüppel-like factor) semble également avoir un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. LKLF est diminué lors de l'activation des

lymphocytes T et B mais sa présence est nécessaire pour maintenir les lymphocytes T activés dans un état de quiescence.¹³⁰ Cela suggère que LKLF est aussi un inhibiteur de la croissance.

Du fait de leurs rôles importants dans la prolifération et la différenciation cellulaires, l'hypothèse que certains XKLFs soient impliqués dans le développement de tumeurs cancéreuses est très probable. Effectivement, l'expression de GKLF est affectée dans plusieurs types de cancers. Le niveau de GKLF est considérablement diminué dans les intestins des souris *Min* (multiple intestinal neoplasia) et chez les patients atteints de polypes adénomateux familiaux.^{131;132} GKLF peut agir comme oncogène dans les stades précoces des tumeurs de l'épithélium et il est augmenté dans les carcinomes de la poitrine et du pharynx.¹³³

5.3.3 Contrôle de la transcription par les XKLFs

L'action des XKLFs au niveau transcriptionnel implique la liaison spécifique à l'ADN via la boîte CACCC. Malgré la grande homologie entre les membres, certains XKLFs activent des gènes cibles tandis que d'autres les répriment. EKLF, GKLF, FKLF (fetal Krüppel-like factor) et FKLF-2 semblent agir comme des activateurs. EKLF active le gène de la globine adulte β en se liant à la boîte CACCC du promoteur.¹²⁴ GKLF peut activer le promoteur de la kératine 4 (une kératine associée au changement de la prolifération à la différenciation cellulaires),¹³⁴ la laminine-5 (une protéine de la matrice extra-cellulaire)¹³⁵ et peut même s'auto-activer.¹³⁶ FKLF et FKLF-2 peuvent activer le promoteur de la globine fœtale γ .^{111;119}

Certains XKLFs agissent comme des répresseurs dont BKLF (basic Krüppel-like factor) qui est un puissant répresseur de la globine.¹¹² De plus, GKLF peut aussi agir comme répresseur; ainsi GKLF diminue l'activité du cytochrome P450, CYP1A1,¹³⁷ ainsi que l'activité du promoteur de la cycline D1.¹¹⁶

Pour l'instant, les mécanismes moléculaires qui font qu'une même protéine peut être une fois un activateur et une autre fois un répresseur ne sont pas bien élucidés. Le contexte cellulaire semble influencer l'activité des XKLFs sur leurs gènes cibles puisqu'ils agissent avec l'aide de co-facteurs; l'absence de ces co-facteurs peut affecter la régulation

des gènes cibles. Par exemple, BKLF réprime de manière beaucoup plus drastique un promoteur contenant un site CACCC et des éléments de réponse aux glucocorticoïdes en présence de son co-répresseur mCtBP2 que sans co-facteur.¹³⁸ Pour sa part, EKLF est un important activateur du gène de la globine et l'activation est amplifiée par la présence des co-activateurs CBP et P300.¹³⁹ Par contre, EKLF peut physiquement interagir avec les co-répresseurs mSin3A et HDAC1 pour réprimer *in vitro* un promoteur artificiel contenant le domaine de liaison Gal4.¹³⁹ La présence d'autres facteurs de la famille XKLFs dans la même cellule influence aussi la capacité d'un facteur XKLF à lier un gène cible car si tous les XKLFs lient le site CACCC, leur affinité est différente. En présence de deux facteurs XKLFs, il y a compétition pour la liaison à l'ADN. Dans les cellules érythroïdes, EKLF et BKLF sont présents mais EKLF a une meilleure affinité pour le promoteur de la globine β tandis que BKLF lie préférentiellement le promoteur de la globine γ .¹³⁸ De plus, BKLF a une meilleure affinité que Sp1 pour les sites CACCC des promoteurs érythroïdes suivants: les sites distal et proximal de GATA-1 et PBGD (porphobilinogen deaminase).¹¹² Le promoteur des muscles lisse $\alpha 22$ est activé par FKLF-2¹⁴⁰ mais réprimé par GKLF.¹⁴¹ Par contre, l'interaction entre ces deux XKLFs n'a pas encore été étudiée. Dans le contexte des cellules en différenciation, GKLF active le promoteur de la laminin $\gamma 1$, une protéine de la matrice extra-cellulaire, de façon dépendante à Sp1.¹⁴² En l'absence du facteur ubiquitaire Sp1, GKLF n'a que très peu d'effet sur le promoteur. De plus, l'expression histo-spécifique des XKLFs amène une spécificité d'activation ou de répression puisque *in vivo* ces facteurs de transcription ne sont en contact qu'avec un nombre limité de gènes.

5.3.4 Expression tissu-spécifique des XKLFs

Chaque membre de la famille a un patron d'expression spatio-temporel bien défini. La majeure partie des XKLFs ont leur transcrite restreint à un ou quelques tissus comme c'est le cas pour EKLF, GKLF, FKLF, FKLF-2, IKLF et LKLF. Par contre, UKLF et BKLF se retrouvent dans presque tout l'organisme. Certains facteurs de transcription XKLFs ont des patrons d'expression qui se chevauchent. EKLF et BKLF sont tous les deux exprimés dans les érythrocytes. EKLF active le gène de la globine tandis que BKLF l'inhibe. Il y a une balance entre les XKLFs pour que les gènes soient exprimés correctement. En l'absence d'un des deux facteurs, la régulation génique est anormale et la cellule ne pourra plus fonctionner adéquatement.

À part le système érythroïde, d'autres tissus expriment conjointement plusieurs membres de la famille XKLF. Dans le cœur, les transcrits de quatre XKLFs sont présents mais leur rôle au niveau cardiaque n'est pas encore déterminé; il s'agit de BKLF, GKLF, LKLF et FKLF-2.^{112;119;143;144} Les membres EKLF, IKLF, UKLF et FKLF n'ont aucune expression au niveau du cœur.

5.4 XKLFs extra-cardiaques

La plupart des XKLFs se sont révélés importants pour le développement de l'organe où ils sont exprimés.

5.4.1 EKLF

EKLF, (Klf1), est le membre fondateur de la famille. Il est exprimé spécifiquement dans les érythrocytes et faiblement dans les mastocytes.¹⁰² Il est un marqueur précoce des cellules érythroïdes. EKLF est détecté au jour E7.5 dans les cellules primitives des érythrocytes et son expression se localise dans les tissus hématopoïétiques durant le développement et chez l'adulte.¹⁴⁵ EKLF active le gène de la globine β via le site CACCC du promoteur et une mutation dans ce site CACCC empêche EKLF d'activer la globine β .¹⁴⁶ Le rôle de EKLF dans la différenciation terminale des érythrocytes a été mis en évidence par l'inactivation du gène chez la souris.^{106;107} Lorsque le gène EKLF est inactivé, les souris meurent *in utero* au jour E15. La mort des embryons est causée par une anémie sévère très semblable à celle des β -thalassémies chez l'humain. Par ailleurs, des études génétiques ont révélé que les thalassémies sont souvent causées par une mutation dans le domaine de liaison de EKLF.¹⁰⁷ Les souris EKLF^{-/-} ne parviennent pas à exprimer les gènes de la globine adulte même si tous les gènes de la globine fœtale sont fonctionnels et présents à des niveaux normaux. EKLF semble donc important pour le passage de la globine fœtale à la globine adulte. L'expression de BKLF diminue aussi chez les souris n'exprimant pas EKLF suggérant que BKLF soit également impliqué dans le contrôle des gènes érythropoïétiques.¹¹² Puisqu'il y a une augmentation de la globine fœtale mais une diminution de la globine adulte, cela suggère que EKLF induit l'expression de BKLF et de la globine adulte tandis que BKLF réprime les gènes de la globine fœtale. Une interaction entre les deux XKLFs semble donc nécessaire pour la différenciation terminale de la lignée

érythroïde. En plus des facteurs de la famille XKLF, GATA-1, le membre fondateur de la famille GATA, est impliqué dans la régulation de la globine et la différenciation érythroïde.

5.4.1.1 Interaction entre EKLF et GATA-1

GATA-1 est présent dans les érythrocytes, les mastocytes et les mégacaryocytes.^{147;148} Le promoteur de la globine β contient deux sites GATA près du site CACCC.⁹⁵ GATA-1 lie les sites GATAs et active le promoteur de la globine β . GATA-1 potentialise l'activation de la globine β par EKLF.⁹⁷ Des études d'interactions de protéines *in vitro* ont permis de montrer que GATA-1 et EKLF interagissent physiquement.⁹⁷ De plus, GATA-1 lie et active le promoteur EKLF.¹⁴⁹ Le développement du système hématopoïétique semble être sous le contrôle d'un facteur de la famille GATA, de facteurs de la famille XKLF et de l'interaction entre les membres de ces deux familles.

5.4.2 IKLF

IKLF (Intestinal enriched Krüppel-like factor) est aussi nommé KLF5 et BTEB2.^{108;150} IKLF est exprimé dans l'intestin et il y joue un rôle dans la prolifération cellulaire.¹²⁸ IKLF est exprimé tôt durant l'embryogenèse et son expression est fortement régulée.¹⁰⁸ IKLF est détecté sur de l'ARN d'embryons entiers au jour E7 puis son expression diminue jusqu'à disparaître au jour E11. Aux jours E15 et E17, une faible présence de IKLF est observée. Chez l'adulte, IKLF semble prédominant dans l'intestin.¹⁰⁸ *In vitro*, IKLF peut activer le promoteur de la chaîne lourde de la myosine non-musculaire, ce dernier étant un marqueur du remodelage des muscles lisses.¹⁵¹ L'expression de cette myosine augmente dans les muscles lisses et les fibroblastes qui ont subi des lésions vasculaires.¹⁵² Lorsque IKLF n'est pas exprimé chez les souris, les embryons meurent avant le jour E8.5.¹⁰⁹ Les souris hétérozygotes IKLF^{+/-} ont un phénotype normal mais elles ont une diminution des cellules du mésenchyme et des cellules de la matrice extracellulaire de l'intestin. De plus, ces souris présentent moins de fibrose et d'hypertrophie cardiaque suite à l'injection d'angiotensine II. IKLF semble donc être un agent potentiel de la réponse au stress extérieur et au remodelage tissulaire.

5.4.3 UKLF

UKLF (ubiquitous Krüppel-like factor), aussi nommé KLF7, a été isolé par PCR en utilisant des oligonucléotides dégénérés correspondants au domaine de liaison à l'ADN de EKLF sur de l'ADN complémentaire de cellules endothéliales vasculaires humaines.¹¹⁰ Peu d'études ont été faites sur ce facteur de transcription qui est exprimé dans presque tous les tissus humains adultes et embryonnaires. Le rôle de UKLF n'est pas clair mais il semble capable de lier le site CACCC du promoteur de la globine β .¹¹⁰ Le patron d'expression spatio-temporel de UKLF chez la souris laisse présager un rôle dans la différenciation neurale.¹²⁶ UKLF a une expression prédominante dans les systèmes nerveux central et périphérique. Chez l'embryon, UKLF est exprimé à partir du jour E9.5, atteint son expression maximale au jour E11.5 puis son expression diminue. Chez l'adulte, UKLF est surtout exprimé dans le cervelet et les racines des ganglions dorsaux. Son profil d'expression corrèle avec la différenciation neurale. Des études *in vitro* ont également montré que la surexpression de UKLF stimule l'expression de p21 et inhibe la cycline D1 produisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1. UKLF pourrait être impliqué dans la modulation du cycle cellulaire au cours du développement et du maintien du phénotype neuronal dans le cervelet et dans les racines des ganglions dorsaux.¹¹⁰

5.4.4 FKLF

FKLF (fetal Krüppel-like factor) est aussi nommée TIEG-2 (transforming growth factor β -regulated gene 2) et Klf11. FKLF a été clonée par RT-PCR à partir de cDNA de cellules hépatiques humaines embryonnaires avec des oligonucléotides dégénérés des doigts de zinc de EKLF.¹¹¹ FKLF a aussi été identifiée par un autre groupe qui l'a isolée à partir d'une librairie de cDNA de cellules épithéliales humaines.¹⁰⁵ Peu d'informations sont disponibles sur FKLF. Cette dernière est surtout présente dans les lignées cellulaires érythroïdes et est capable d'activer les promoteurs des gènes fœtaux de la globine (globines γ et ϵ) via le site CACCC.¹¹¹ FKLF a une expression ubiquitaire dans les tissus adultes humains.^{105;111} Lorsque FKLF est surexprimée dans des cellules épithéliales CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois), elle est retrouvée dans le noyau.¹⁰⁵ Par ailleurs, dans ces cellules le niveau d'ARN messager de FKLF est inversement corrélé à la présence de sérum suggérant un rôle anti-prolifératif pour FKLF.¹⁰⁵ Cette hypothèse reste à confirmer.

5.5 Facteurs XKLFs exprimés dans le cœur

Jusqu'à présent, les transcrits de quatre membres de la famille XKLF ont été détectés dans le cœur soit; BKLF, GKLF, LKLF et FKLF-2. L'expression de BKLF, GKLF et LKLF est présente dans le cœur mais elle n'y est pas prédominante et ces facteurs semblent être essentiels au développement d'autres organes. Pour l'instant, le rôle des protéines XKLFs dans le cœur demeure inexploré. Par ailleurs, aucune étude n'a porté sur l'identification des types cellulaires cardiaques qui expriment les gènes XKLFs.

5.5.1 BKLF

BKLF (basic krüppel-like factor), aussi connu sous les noms de Klf3 et TEF-2, possède une charge basique dans la partie N-terminale de la protéine. BKLF a été isolé à partir d'une librairie de cDNA de cellules MEL (cellules érythroleucémiques de souris) avec une sonde contenant les doigts de zinc de Sp1 et de EKLF.¹¹² BKLF est présent dans la majorité des tissus adultes humains.¹¹² BKLF est capable de lier la boîte CACCC du promoteur de la globine fœtale γ avec plus d'affinité que EKLF et il active le promoteur de la globine adulte β à un degré moindre que EKLF.¹¹² Par contre, aucune étude ne montre son effet *in vitro* sur le promoteur de la globine γ . En présence d'un promoteur artificiel contenant la boîte CACCC et l'élément de réponse des glucocorticoïdes (GR), BKLF devient un puissant répresseur. Dans des essais *in vitro* de transactivation, BKLF réprime le niveau basal du promoteur artificiel contenant trois boîtes CACCC chacune liées à un élément GR.¹³⁸ Dans cette expérience, de petites quantités de BKLF bloquent les effets d'activation de EKLF, ce qui suggère l'effet d'inhibition de BKLF n'est pas seulement dû à une compétition entre les deux XKLFs mais aussi à un domaine répresseur intrinsèque à BKLF. Bien que BKLF soit exprimé tôt dans l'embryogenèse, l'inactivation de ce gène ne montre pas de phénotype particulier.^{107;113} Les souris ont de légères anomalies dans leur système hématopoïétique et elles ont une plus grande tendance à développer des maladies myéloprolifératives à l'âge adulte. Même si l'ARNm de BKLF est détecté dans le cœur adulte, aucune étude ne porte sur sa fonction cardiaque.

5.5.2 GKLf

GKLf (gut Krüppel-like factor) est un autre membre de la famille XKLF exprimé dans le cœur. GKLf est aussi nommé Klf4 et EZF (epithelial zinc finger). Dans les sections précédentes, il a déjà été question des nombreux rôles de ce membre de la famille. Outre l'implication de GKLf dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales de la peau et des intestins, ce facteur a également des rôles dans la régulation du cycle cellulaire. Lorsque l'ADN est endommagé, GKLf bloque le cycle cellulaire en phase G1/S de manière dépendante à p53.¹²⁹ Selon le contexte cellulaire et les promoteurs, GKLf peut parfois être un activateur et parfois un répresseur. GKLf active le promoteur de la laminine γ 1, de la kératine 4 et peut s'auto-activer.^{135;153;154} Par contre, GKLf peut réprimer la cycline D1 et le cytochrome P4501A1.^{116;137} L'activation du promoteur de la laminine par GKLf est potentialisée par Sp1.¹⁴² Il y a donc interaction entre deux membres de la même famille pour la régulation d'un gène important dans la différenciation cellulaire. GKLf est exprimé à partir du jour E13, son expression augmente graduellement pour atteindre son pic aux jours E17-18.¹⁴³ GKLf continue d'être exprimé chez l'adulte surtout dans les poumons, la peau, le cœur et les intestins.^{115;143} Dans les intestins, GKLf a un patron d'expression complémentaire à IKLF. GKLf se retrouve en plus grande quantité dans la muqueuse intestinale qui est principalement composée de cellules épithéliales en phase terminale de différenciation, tandis que IKLF se trouve dans les couches inférieures où il y a principalement de la prolifération cellulaire. GKLf se retrouve aussi largement exprimé dans l'épiderme, plus précisément dans la partie supérieure épineuse et dans les couches granuleuses. Autant dans les cellules épithéliales de la peau que dans celles des intestins, l'ARNm de GKLf est principalement exprimé dans les cellules post-mitotiques.^{143;155} Pour mieux comprendre le rôle de GKLf *in vivo*, des souris n'exprimant pas ce gène ont été produites.¹¹⁴ Tous les organes des embryons GKLf^{-/-} se développent normalement y compris le cœur mais les nouveau-nés meurent quelques heures après leur naissance car leur épiderme ne parvient pas à se former correctement et à les protéger des stress extérieurs. En plus de son rôle dans la différenciation terminale des cellules intestinales, le phénotype des souris n'exprimant pas GKLf, implique un rôle important dans la différenciation terminale de l'épiderme. GKLf semble également impliqué dans le développement de cancers, son expression étant diminuée chez les souris *Min* qui ont des adénomes intestinaux et chez les patients ayant des polypes adénomateux dans le colon.¹³²

Avec une diminution de GSK3 β , les cellules n'arrêtent plus en phase G1/S¹⁵⁶ et il y a une croissance démesurée des cellules qui est caractéristique du développement de cancers.

5.5.3 LKLF

En plus d'être exprimé dans le cœur, l'ARNm de LKLF (lung Krüppel-like factor), ou *klf2*, est retrouvé dans les poumons, la rate, les muscles squelettiques, les ganglions lymphoïdes et les testicules.¹⁴⁴ Son expression est prédominante dans les poumons et fortement régulée au cours du développement.¹⁴⁴ LKLF est détectable à partir du jour E7 sur de l'ARN d'embryons entiers, son expression est ensuite inexistante pour reprendre au jour E15 et jusqu'à l'âge adulte. La présence du transcrit de LKLF est détectée dans les poumons en développement mais aucune étude ne montre si LKLF est présent dans d'autres organes au cours de l'embryogenèse.¹¹⁸ LKLF peut activer le promoteur de la globine β tandis qu'il inhibe le promoteur du récepteur γ peroxysome activé (PPAR γ)^{144;157} qui est nécessaire à la différenciation adipocitaire. Les effets transcriptionnels de LKLF passent par les boîtes CACCC des promoteurs.¹⁴⁴ En plus de son domaine de transactivation, LKLF a un domaine d'auto-inhibition sur lequel peut se lier la ligase ubiquitine E3, WWP1, qui empêche LKLF d'agir comme activateur.¹⁵⁸

Le rôle de LKLF n'est pas complètement compris. LKLF semble être important pour la régulation des lymphocytes T et pour le développement des poumons. LKLF est exprimé durant la maturation des lymphocytes T simples-positifs (SP) mais disparaît dans les cellules activées.¹³⁰ Dans un état normal, les lymphocytes T SP ne prolifèrent pas et sont dans un état de quiescence. Les mécanismes moléculaires qui empêchent ces cellules immunitaires de proliférer ne sont pas bien compris. Les cellules T n'exprimant pas LKLF sont rapidement activées et elles meurent par apoptose dans la rate ou dans les ganglions lymphatiques ce qui suggère que LKLF est requis pour garder les lymphocytes T dans un état de quiescence.¹³⁰ Pour vérifier si LKLF joue un rôle dans le développement des poumons, ce gène a été inactivé chez la souris.¹¹⁷ Les embryons des souris LKLF^{-/-} se développent normalement jusqu'au jour E11.5-12.5. À ce moment, les embryons meurent à cause d'hémorragies intra-embryonnaires et intra-amniotiques et de malformations des parois des vaisseaux sanguins, la media étant plus mince que chez les souris normales. Le marqueur pour les cellules endothéliales PECAM-1 est exprimé normalement dans les

embryons $LKLF^{-/-}$ ainsi que les marqueurs des cellules endothéliales vasculaires Tie-1, Tie-2, PDGF-B et HB-EGF.¹⁵⁹ L'inactivation de $LKLF$ causant une létalité embryonnaire, son rôle dans le développement pulmonaire n'a pas pu être déterminé. Pour étudier l'implication de $LKLF$ dans les étapes finales du développement des poumons, des souris chimériques provenant de cellules souches n'exprimant pas $LKLF$ ont été générées. Certaines souris chimériques meurent après la naissance à cause de malformations pulmonaires. Dans les souris chimériques qui survivent, les cellules souches $LKLF^{-/-}$ participent à la formation de la majorité des organes exceptés les poumons impliquant un rôle autonome de $LKLF$ dans le développement des poumons.¹¹⁸ De plus, ces animaux chimériques expriment normalement des marqueurs de cellules endothéliales comme PECAM-1, ce qui suggère que la vasculogénèse se développe normalement. Le rôle cardiaque de $LKLF$ n'a pas encore été investigué, la seule information disponible à ce sujet est la présence de son ARNm dans le cœur adulte.

5.5.4 FKLF-2

FKLF-2 (fetal Krüppel-like factor 2) est un membre nouvellement identifié de la famille XKLF.¹¹⁹ Ce facteur de transcription a été isolé simultanément par plusieurs groupes qui lui ont tous attribué des noms différents. Ainsi, FKLF-2 est aussi appelé Klf13,¹²⁰ RFLAT-1 (RANTES Factor of Late Activated T Lymphocytes-1)¹²¹ et BTEB3 (Basic Transcription Element Binding protein 3).¹²² Comme tous les autres membres de la famille, FKLF-2 possède une région C-terminale de 81 acides aminés formée des trois doigts de zinc nécessaires à la liaison à l'ADN et à d'autres protéines. En plus des doigts de zinc, FKLF-2 a deux signaux de localisation nucléaire indépendants dont un dans les doigts de zinc et l'autre dans un domaine d'activation compris dans une région riche en alanine en N-terminale. FKLF a aussi un domaine de répression compris dans un domaine riche en alanine et proline comme le montre la figure 1.7. FKLF-2 est localisé dans le noyau des cellules dans lesquelles il semble pouvoir agir comme activateur ou comme répresseur transcriptionnel. Tout comme GKLf, FKLF-2 peut inhiber le promoteur du cytochrome P4501A1 dans les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) via le site BTE qui est une boîte GC.¹⁶⁰ FKLF-2 active les promoteurs de la myosine alpha 22 du muscle lisse, du virus simien 40, du gène humain de la globine γ et de RANTES (Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted).^{119;121;122} FKLF-2 active faiblement les gènes de la

globine ϵ et β et d'autres gènes érythroïdes comme GATA-1, porphobilinogen deaminase (PBG) ferrochelatase (FC), glycophorin B (GPB) et 5-aminolevulinate synthase (ALAS).¹¹⁹ FKL-2 active le facteur RANTES par la boîte CTCCC en synergie avec NF- κ B.¹⁶¹ FKL-2 active la globine fœtale γ par la boîte CACCC. Cette dernière activation est potentialisée par deux co-activateurs; CBP/p300 et p300/CBP-associated factor (PCAF).¹⁶² De plus, CBP et PCAF augmentent la capacité de FKL-2 à lier le promoteur de la globine γ . FKL-2 interagit directement avec CBP *in vivo* et *in vitro*. La partie N-terminale de FKL-2 peut interagir avec deux histones déacétylases qui sont des co-répreurs impliqués dans le remodelage de la chromatine; mSin3A et HDAC-1.¹⁶³ FKL-2 est capable de faire compétition à Sp1 pour la liaison au site BTE et il antagonise ainsi l'activation de Sp1 sur un promoteur artificiel contenant six sites BTE¹⁶⁰ qui sont des sites riches en GC. FKL-2 semble donc pouvoir réguler la transcription en se liant directement à l'ADN, en interagissant avec des co-facteurs incluant d'autres membres de la famille Sp/XLKL. Cependant, les cibles *in vivo* de FKL-2 demeurent inconnues.

En dépit des études transcriptionnelles *in vitro*, le rôle de FKL-2 ainsi que son patron d'expression *in vivo* restent incertains. Des études d'hybridation *in situ* ont montré que l'ARNm de FKL-2 est exprimé tôt dans le développement.¹⁶⁴ Au jour E8, FKL-2 est exprimé à travers presque tout l'embryon avec une prédominance pour le cœur primitif. Par la suite, FKL-2 continue d'être exprimé dans le cœur ainsi que dans le cerveau, le thymus, la vessie, les intestins, les muscles et l'épiderme de la peau. L'expression de FKL-2 à l'âge adulte n'est pas encore bien établie. Selon certaines études,¹²² l'ARN de FKL-2 est présent dans tous les tissus adultes de la souris. Dans les tissus humains adultes, le même patron d'expression est retrouvé.¹²¹ Par contre, un troisième groupe¹¹⁹ a détecté les transcrits de FKL-2 seulement dans le cœur, les muscles squelettiques et la moelle osseuse mais pas dans les autres tissus humains adultes testés. Cette controverse est difficile à expliquer puisque les sondes utilisées par ces groupes ne sont pas bien décrites.

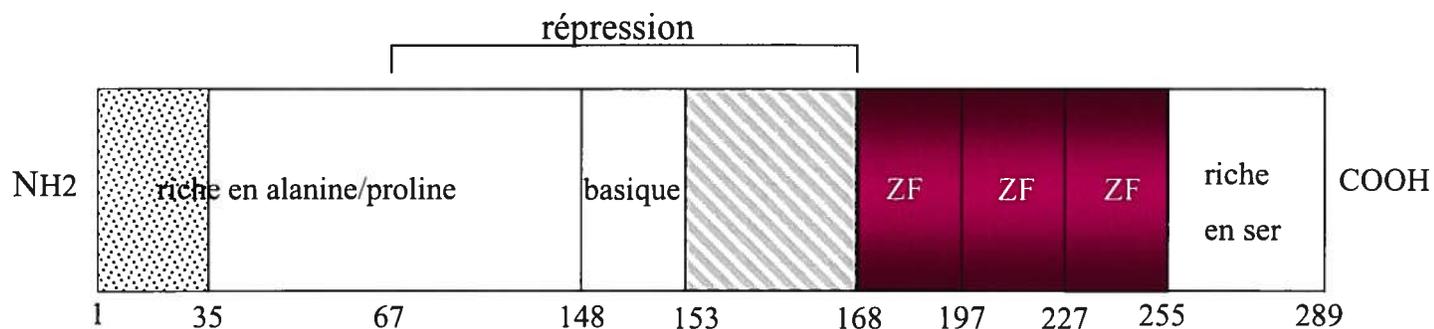


Figure 1.7 Domaines fonctionnels de FKLf-2

Les chiffres représentent les acides aminés (aa) de la protéine. Les trois doigts de zinc sont indiqués en mauve. FKLf-2 possède deux signaux de localisation nucléaire, un représenté par la boîte hachurée et l'autre est compris dans les doigts de zinc. La partie activatrice de la protéine est montrée par la boîte avec des points. Le domaine de répression est indiqué au-dessus de la protéine et il va de l'aa 67 à l'aa 168. FKLf-2 a un domaine riche en alanine/proline (aa 1 à 148), un domaine basique (aa 148 à 168) et un domaine riche en sérotonine (aa 255 à 289).

Le rôle de FKLf-2 n'est pas encore établi mais il semblerait important pour les lymphocytes T activés. FKLf-2 est présent trois jours après l'activation des lymphocytes T ce qui coïncide avec l'activation du facteur RANTES qui est un puissant chimioattractant lors d'inflammation et qui est associé à une résistance au virus du sida.¹²¹ RANTES est induit dans les lymphocytes T entre trois et cinq jours suivant leur activation, en même temps que l'apparition de FKLf-2. L'expression de FKLf-2 est contrôlée par une région 5'-UTR qui est nécessaire et suffisante pour la répression transcriptionnelle de ce facteur.¹⁶⁵ En effet, FKLf-2 semble être régulé par eIF4E, un facteur initiant la transcription et limitant pour la liaison de l'ARNm aux ribosomes.¹⁶⁵ Peu de temps après l'activation des lymphocytes T, le niveau protéique de eIF4A est augmenté et par la suite, FKLf-2 est activé. Pour déterminer si l'augmentation de la protéine FKLf-2 est causée par eIF4E, ce dernier est surexprimé dans les cellules S2-6 avec la construction contenant tout l'ADNc de FKLf-2. Dans cette situation, la quantité de protéines FKLf-2 produites est plus grande que dans les cellules qui n'ont pas été transfectées par eIF4E. Par contre, lorsque eIF4E est transfecté avec l'ADN de FKLf-2 qui ne contient pas la région 5'-UTR, il n'y a aucun effet sur le niveau protéique de FKLf-2. eIF4E fait parti de la voie signalétique de p38 MAPK et ERK-1/2. Lorsque ces voies sont inhibées, les lymphocytes du sang périphérique humain produisent moins de FKLf-2 ce qui suggère que ce membre de la famille XKLF soit régulé par les voies de p38 MAPK et ERK-1/2.¹⁶⁶ FKLf-2 semble bien régulé dans les lymphocytes T activés mais par contre, il n'y a aucune étude qui porte sur le rôle *in vivo* de FKLf-2 au niveau des lymphocytes ou au niveau des autres sites d'expression de FKLf-2.

Malgré le fait que plusieurs XKLFs soient exprimés dans le cœur, leur fonction cardiaque n'est pas encore connue. Selon les études d'inactivation génique, les souris n'exprimant pas BKLF, GKLF ou LKLF ne montrent pas de problèmes dans le développement cardiaque, ce qui suppose que ces facteurs de transcription n'ont pas un rôle déterminant durant la cardiogenèse ou qu'il y a une redondance des rôles. Dans le système érythroïde qui est bien étudié, les membres de la famille ne semblent pas redondants entre eux mais plutôt complémentaires. Si le système de régulation génique dans le cœur est semblable à celui des érythrocytes, les quatre membres présents auraient des fonctions différentes pour le contrôle des gènes cardiaques et n'auraient pas de redondance entre eux. De plus, l'expression des membres XKLFs a été montrée sur de l'ARN de cœur entier, ce qui n'indique pas dans quelle(s) partie(s) de l'organe ces facteurs de transcription sont

exprimés ni dans quel(s) type(s) cellulaires. Il est possible que leur expression cellulaire soit complémentaire comme c'est le cas dans les intestins avec GKLf et IKLf ou que tous les membres soient présents dans les mêmes cellules comme dans les érythrocytes qui expriment EKLf et BKLf. Jusqu'à présent aucune étude ne porte sur le rôle des membres de la famille XKLf retrouvés dans le cœur.

6 Objectif du travail

L'objectif du projet de recherche est de mieux comprendre l'importance biologique des XKLFs dans la régulation des gènes cardiaques et dans le développement du cœur. Le présent travail vise trois principaux objectifs. Le premier objectif est de déterminer l'importance de la boîte CACCC dans la régulation des gènes cardiaques. Pour ce faire, le promoteur BNP est utilisé car il a déjà été montré comme étant un bon modèle d'étude pour la régulation des gènes cardiaques.

Le deuxième objectif du travail est de caractériser le facteur de transcription cardiaque liant la boîte CACCC pour comprendre son rôle dans le développement cardiaque. Les facteurs de transcription candidats pour cette étude sont les membres de la famille XKLF exprimés dans le cœur. L'attention est portée sur le membre FKLF-2 car il semble avoir une expression restreinte au cœur, aux muscles squelettiques et à la moelle osseuse. De plus, selon les études d'inactivation de gènes, les autres membres XKLFs connus qui sont exprimés dans le cœur ne semblent pas avoir une implication directe dans le développement cardiaque.

Le dernier objectif du travail vise à identifier les partenaires potentiels du facteur FKLF-2 dans le cœur. Plus précisément, l'interaction avec les membres de la famille GATA dans la régulation de la transcription des gènes cardiaques sera examinée. Dans les érythrocytes, l'interaction entre les membres de la famille GATA et ceux de la famille XKLF contrôle la transcription de gènes dont les promoteurs ont une structure semblable à ceux de certains promoteurs cardiaques, soit deux sites GATA adjacents à un site CACCC. Nous voulons vérifier si le système cardiaque a des mécanismes transcriptionnels semblables à ceux du système érythroïde et si l'interaction entre les familles XKLF et GATA est importante pour le cœur.

Résultats

A role for a tissue-restricted member of the XKLF family of transcription factors in cardiac development

Geneviève Lavallée^{1,2}, Georges Nemer^{1,3} and Mona Nemer^{1,2,3*}

Laboratoire de Développement et Différenciation Cardiaques, Institut de Recherches Cliniques de Montréal¹ and Département de biologie moléculaire, Université de Montréal² and Département de pharmacologie, Université de Montréal³, Montréal, Québec, Canada

***Corresponding author.** Mailing address: Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7. Phone : (514)987-5680. Fax : (514)987-5575. E-mail:nemerm@ircm.qc.ca

Abstract

Cardiac development requires precise spatio-temporal expression of various genes. Nevertheless, the molecular mechanisms underlying embryogenesis remain poorly understood. In spite of the increasing interest in studying the regulation of genes involved in cardiogenesis, only a few transcription factors are known to be heart specific. The B-type natriuretic peptide (BNP) was used as a model to identify GATA-4 as an important factor for cardiac development. As an early marker of cardiac cell, BNP is controlled by several *cis*-regulatory elements within the proximal promoter including GATA elements and a CACCC motif. In this study, we show the importance of the CACCC box in the regulation of BNP expression and characterize its cognate binding protein in cardiomyocytes. The members of the Krüppel-like factors (XKLFs) are a family of zinc fingers transcription factors implicated in several biological processes such as cellular differentiation and proliferation. Moreover, they are well known to regulate genes through the CACCC site. The transcripts of four XKLFs are present in the heart, however, their function in heart development is unknown. In this work, we show that expression of FKLF-2 (fetal-KLF-2) predominates in the developing heart and throughout cardiogenesis. FKLF-2 is also expressed in the adult heart with a predominance in the atria as compared to the ventricles. Functional studies demonstrate that FKLF-2 activates the BNP promoter by direct binding to its CACCC site. Moreover, FKLF-2 physically interacts and cooperates with GATA-4 to synergistically activate the transcription from the BNP promoter. The work reveals for the first time that members of the XKLF family regulate cardiac genes and are collaborators of GATA-4. The results also suggest a role for FKLF-2 in cardiac cell differentiation and heart morphogenesis.

Key words: heart development, Krüppel-like factors, BNP, FKLf-2, transcription factors

Introduction

Cardiac development is a multi-staged process during which the anterior lateral mesoderm forms a cardiac crescent (9,10,42). The migration and folding of the crescent to the midline of the embryo gives rise to the beating heart tube. Cardiac looping will remodel the tube to form the atria and ventricles. The complete segmentation ends by the formation of the septa and the valves (9,10,42). Our understanding of the molecular pathways involved in normal or pathologic heart development is far from being clear. To obtain a complex organ such as the heart, many genes have to be precisely regulated throughout development and during adulthood. Transcription factors play a key role in controlling gene expression but only a few have been characterized as regulators of the cardiac genetic program and/or of heart development. They include: GATA-4, a zinc finger protein (21,31), Tbx5, a T-box protein (7,22), dHand and eHand members of the bHLH (basic helix-loop-helix) family (15), MEF2C, a MADS (MCM1, amagous, deficiens, and serum response factor SRF) protein (6,9,23,25), Nkx2.5, a homeodomain protein (24) and NFATc a calcium-dependant protein (37). Mutation in some of these transcription factors is associated with human congenital cardiac defects. For example, mutations in Tbx5 are linked to Holt-Oram syndrome which is characterized by skeletal and cardiac malformations (7,34). Mutations in *NKX2.5* are associated with septal and vavular defects including atrioventricular, atrial and ventricular septal defects, tetralogy of Fallot (characterized by tricuspid valve malformations and outflow tract defect) and atrioventricular valve malformation (3). Mutations in GATA-4 have also been reported in human with septal defects (16).

To identify transcription factors essential for heart development, the study of cardiac gene promoters was a helpful tool. In particular, use of the B-type natriuretic peptide (BNP) unravelled the importance of GATA-4 in regulation of cardiac genes (17). BNP is a cardiac hormone important for the regulation of natriuresis, blood pressure and smooth muscle relaxation (11,38,45,46). Since BNP is expressed in cardiomyocytes throughout heart development and because its expression is enhanced in ventricular hypertrophy and chronic heart failure, it is considered an important biochemical and clinical marker for heart function (38). The proximal BNP promoter contains several *cis*-regulatory elements and is sufficient for its expression in primary cardiomyocyte cultures (17). Within this region, there are three GATA sites which are regulated by GATA-4 (17) and one CTCCAT site regulated by YY1 (4). This region also contains a CACCC box, but its relevance to BNP transcription has not been investigated.

The CACCC box is found in several cardiac promoters like the atrial natriuretic factor (ANF), the α -cardiac actine (α -CA), the β -MHC (β -myosin heavy chain) and the cTnC (cardiac troponin C). It is also found in promoters of many genes involved in the regulation of cell cycle, hormone activation and embryonic development (36). It is well known that transcription factors of the Krüppel family, the Krüppel-like factors (XKLF), are able to bind the CACCC box (5). The XKLF family is defined by 81 amino acid residues that contain three C2H2 zinc fingers at the C-terminal segment of the protein. Between each zinc finger there is a Krüppel link, a conserved stretch of amino acids, very similar to the one found in the protein *Krüppel* of *Drosophila melanogaster*. The zinc fingers are highly conserved between the members whereas the N-terminal part is specific to each transcription factor. Functional studies have shown that XKLFs can act as activators or repressors (5). The XKLFs are characterized by their tissue-restricted

expression and their key role in development. For example, EKLF (erythroid Krüppel-like factor), the founder of the family, is expressed mostly in red cells and in bone marrow (30). EKLF plays an important role during development of the erythroid system as it mediates the switch from the foetal γ -globin to the adult β -globin (33,35).

To date, the RNA of four XKLFs have been detected in the adult heart: GKLF (Gut enriched-KLF),(44) BKLF (Basic KLF),(12) LKLF (Lung KLF) (1) and FKLF-2 (fetal KLF-2) (2). However, their role in the regulation of cardiac genes or cardiogenesis remains unknown. Inactivation of the GKLF, BKLF and LKLF genes using homologous recombination in mice did not display any obvious cardiac phenotype (40,33,35,47). The pups of GKLF null mice die few hours after birth because of a skin defect (40). The BKLF^{-/-} mice develop normally but are more likely to have myeloproliferative diseases during adulthood (33,35), whereas inactivation of the LKLF gene in mice was embryonic lethal at day 12.5 (E12.5) due to intra-amniotic and intra-embryonic haemorrhages and the failure of proper development of the vessel wall (47). FKLF-2, also known as KLF13 (39), RFLAT-1 (41) and BTEB-3 (27), is reported to be expressed only in the heart, skeletal muscles and bone marrow (2). FKLF-2 can activate several promoters like the 22 α smooth muscle myosin, the simian virus, the γ globin and RANTES (Regulated on Activation Normal T cells Expressed and Secreted) (2,27,41).

The aims of this study were to determine the role of the CACCC box as a regulator of cardiac gene expression and to characterize the proteins that bind to this *cis*-regulatory element. Because FKLF-2 has a restricted expression and is able to activate genes through the CACCC site (2), we tested the hypothesis that FKLF-2 might be a regulator of cardiac genes and possibly of cardiogenesis. In the present study, we show that FKLF-2 is

expressed early in the developing heart and that its expression persists in the adult heart. We also demonstrate that the CACCC box of BNP is important for its cardiac transcription and that it mediates the binding and activation of FKLF-2. We also show that FKLF-2 interacts with GATA-4 to regulate cardiac transcription. The results show for the first time a role for a member of the XKLF family in cardiac transcription and open the way to analyse their role in embryonic and postnatal cardiac growth.

Material and methods

Plasmids

Rat BNP-luciferase (rBNP) constructs were obtained by cloning BNP genomic fragments into PXP2 as previously described (17). The various GATA-4 expression vectors were previously described (32). The full length FKLF-2 subcloned into pSG5DD was a kind gift of Dr Haruhiko Asano (GenBankTM accession number for FKLF-2: AF251796). The full length GKLF subcloned in the pcDNA3 vector was a kind gift of Anil K. Rustgi (GenBankTM accession number for GKLF: U20344). The full length FKLF-2 was amplified by PCR with the following oligonucleotides: (from 369 bp to 386 bp) TTTTCTAGAATGGCAGCCGCCGCCTAT and (from 1238 bp to 1221 bp) TTTGGTACCTCAGGGTGAGCTGGCCGG. The oligonucleotides contained XbaI and KpnI restriction sites respectively. Both the PCR product and the empty vector pCGN, which has the HA-tag, were digested with XbaI and KpnI. The PCR product was then inserted into the vector in frame with the HA-tag. The full length FKLF-2 was also inserted into pMALC-2 to produce a fusion protein with maltose binding protein (MBP). FKLF-2 was amplified by PCR with the oligonucleotides: (from 366 bp to 380 bp) GGAATTCCTTAGCATGGCAGCCGCC and (from 1240 bp to 1224 bp) CCCAAGCTTGGGGCTCAGGTGAGCTGGC. The PCR product and the pMALC-2 vector were digested with EcoRI and Hind III. The full length FKLF-2 was inserted into pMALC-2 in phase with MBP (MBP-FKLF-2-fl). The N-terminal part of FKLF-2, amino acid (aa) residues 6 to 135, displays no sequence homology with other members of the XKLF family and was subcloned into pMALC-2. The fragment was obtained by PCR using the following oligonucleotides: (from 385 bp to 412 bp) TTTGAATTCTATGT

GGACCACTTTGCC and (from 734 bp to 759 bp) TTTTCTAGATTACTCCAATGCC GCCTCG. Both the fragment and vector were cut with EcoRI and XbaI. FKLF-2 N-terminal was inserted in phase with MBP (MBP-FKLF-2-N-ter). All constructs were confirmed by sequencing.

Recombinant protein production

MBP-FKLF-2-fl and MBP-FKLF-2-N-ter were transformed in BL21, an *Escherichia coli* strain. Briefly, individual colonies were picked and grown in 500 ml of Luria broth up to an OD of 0.6 at 600 nm. Recombinant proteins were induced by adding iso-propyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 0.5 mM for 2 hours at 37°C. The cultures were centrifuged and the bacteria was resuspended and lysed by sonication. Purification was performed on amylose columns according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, Beverly, MA).

Antibody

An antibody against FKLF-2 was generated with the recombinant protein MBP-FKLF-2-N-ter by immunizing rabbits according to standard procedures. Female New-Zeland rabbits were given three subcutaneous and intramuscular injections every three weeks. The antiserum was collected nine weeks after the first injection and was purified. It was characterized by Western Blot to verify the specificity of the antibody and to exclude potential cross-reactivity with other members of the XKLF family. All animals manipulations were approved by the institutional animal care committee.

Cell culture and transfections

P19 cells, murine embryonic carcinoma cells, were maintained in alpha minimum essential medium (α MEM) supplemented with 2.5% fetal bovine serum (FBS) and with 7.5% donor bovine serum (DBS). Cells were plated in 12-well plates at a density of 30,000 cells per well. Transfections were carried out 24 hours after plating using the calcium phosphate technique. Different constructs of rBNP-luciferase plasmids or other cardiac promoters were used at 1.5 μ g per well and the total amount of DNA was kept constant at 1.6 μ g in each well by adding the empty vector. The reporter genes were transfected with different amounts of pCGN-FKLF-2 or pcDNA3-GATA-4 or both as indicated in the figure legend. Cells were harvested 36 hours after transfection and the luciferase activity was measured by a luminometer autolumat LB953. Rous sarcoma virus luciferase (RSV-luc) was used as an external control. The experiments were done at least three times in duplicate.

Primary culture of cardiomyocytes from four days-old Sprague-Dawley rats were transfected as previously described (32) except that cells were plated at 250,000 cells per well in 6-well plates. 24 hours later the medium was changed for serum-free hormonally defined medium (SFHF). Transfections were done four hours later and the rest of the protocol was the same as with the P19 cells.

Nuclear extracts

Nuclear extracts were prepared from mocked transfected cells, transfected P19 cells and cardiomyocytes. Mocked transfected cells were treated as the transfected cells except that no DNA was included. Cells were plated at 2×10^6 in 100 mm petri dishes and the nuclear extracts were prepared as described before (32). Cells were washed with ice-cold

phosphate-buffered saline (PBS) and scraped with 2 ml of ice-cold PBS. The cells were resuspended in 400 μ l of buffer A (10 mM Tris [pH=7.9], 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin and 2 μ g/ml pepstatin) and left on ice for 15 min. Then 25 μ l of 10% of Nonidet P-40 (NP40) was added and Eppendorfs were vortexed vigorously. The nuclei were collected by centrifugation at 15,000 rpm at 4°C for 30 seconds. The pellet was resuspended in 50 μ l of buffer C (20 mM Tris (pH=7.9), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT, 10 μ g/ml pepstatin, 10 μ g/ μ l leupeptin, 10 μ g/ μ l and 10 μ g/ μ l aprotinin) and left on a shaker at 4°C for 1 hour. The nuclear extract was cleared by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min at 4°C and quick-frozen on dry ice in small aliquots. The protein concentration was estimated by the Bradford method.

EMSA

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was done with nuclear extracts. The probe used for the rBNP proximal promoter corresponds to the segment from -80 bp to -64 bp: ATAACCCCA~~CCC~~CCTACTC for the wild type and ATAATCCTACTCCTACTC for the mutated CACCC site. The Oct-1 probe was also used to verify the equal loading of proteins in all wells (GATCTCAATCGCTTATGCAAATAAGGTGAAGCTGC). The oligonucleotide was annealed with its complementary DNA and it was radiolabelled with ³²P by a kinase reaction. The binding reaction was carried out in a total volume of 20 μ l with 50,000 cpm of the ³²P-labelled probe and 3-5 μ g of the nuclear extract for 20 min at room temperature. The binding buffer contained 60 mM HEPES, 100 mM KCl, 25 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCL (pH= 7.4), 3 mM EDTA and 50% glycerol. Competitor oligonucleotides were added prior to the labelled probe at a molar excess of 100 fold.

Reactions were loaded on a 6% polyacrylamide nondenaturing gel and run at 200 V at room temperature in 0.25 X TBE. The gel was dried and exposed to a PhosphorImager screen.

Immunocytochemistry on cultured cells

P19 cells and cardiomyocytes were plated in 12-well plate on coverslips. Thirty-six hours after transfection, P19 cells were fixed with 100% methanol for 10 min, whereas cardiomyocytes were fixed with 4% paraformaldehyde diluted in PBS for 10 min after 60 hours of plating. Cells were then rinsed three times with TBS containing 0.2% Tween (TBT) after which they were blocked for 45 min with 5% bovine serum albumine (BSA) diluted in TBT. Cells were incubated with the first antibody overnight, washed three times with TBT and blocked again for 45 min with 5% BSA-TBT. The signal was amplified by a secondary biotinylated antibody incubated for 1 hour. The cells were again washed three times with TBT and blocked 45 min with 5% BSA-TBT. The signal was detected by an antibody coupled with a fluorochrome and was incubated for 1 hour. Final washes in TBT were followed by the nuclear staining with the Hoescht dye at 0.5 ng/ μ l. Cells were incubated 10 min with the dye and then washed three times in TBT. Coverslips are mounted on slides with DABCO and sealed with nail polish. To detect endogenous FKLF-2, the antibody generated in the laboratory was used in a dilution of 1/5000, followed by an anti-rabbit biotinylated antibody diluted at 1/250 (Dimension, BA-1000). The last antibody was the Avidin-D rhodamine diluted at 1/500 (Dimension). The anti-desmin BAY60851 antibody (Accurate chemical and scientific) was also used in cardiomyocytes in a dilution of 1/200. The signal was not amplified and was detected with the anti-mouse Avidin-D

fluorescein diluted at 1/200 (Vector). Images were taken from Leica microscope with the software Northern Eclipse.

Immunohistochemistry of tissue sections

Mice embryos from E9, E10.5, E12, and E14 were dissected. They were rinsed in ice-cold PBS and then fixed in 4% paraformaldehyde overnight. Immunohistochemistry was also performed on adult hearts by perfusing the left ventricle with a saline buffer followed by a fixation with 4% paraformaldehyde, overnight. Embryonic and adult tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Histological sections were cut (5 μm), rehydrated and blocked for 1 hour in 5% BSA-TBT. FKLF-2 was immunolocalized by the peroxidase method. The slides were incubated with the anti-FKLF-2 antibody overnight at a dilution of 1/200. The slides were washed three times in PBS with 0.2% of Tween (PBT) and blocked again for 1 hour in 5% BSA-PBT. An anti-rabbit biotinylated antibody diluted at 1/250 BA-1000 (Dimension) was used for 1 hour followed by PBT washes and 1 hour blocking. Streptavidine HRP was used at a dilution of 1/250 (NEL 750 from NEN life science) and the slides were washed three times, then incubated 3 min with Diaminobenzidine (DAB). The nuclei were counterstained with methyl green. The pictures were taken with a Leica microscope using the software Matrox Intellicam.

Western Blots

Nuclear extracts (20 μg) from P19 cells or cardiomyocytes were resolved on a 12% sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred on Hybond-polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. The membranes were then immunoblotted to detect the presence of FKLF-2 and revealed by ECL Plus (Amersham Pharmacia

Biotechnology) as described by the manufacturer. Rabbit FKLF-2 antibody was used at a dilution of 1/500 and revealed with an anti-rabbit peroxidase antibody (A-6154, Sigma) at a dilution of 1/10,000. The anti-GATA-4 antibody (Sc-1237x, Santa Cruz) was used at a dilution of 1/500 and revealed with the anti-goat peroxidase antibody (A-9542, Sigma) at a dilution of 1/10,000. The protein bands were visualized by exposure to a Kodax film. Membranes were stripped for 30 min at 50°C in a buffer containing 2% of SDS, 62.5 mM of Tris-HCL (pH=6.8) and 350 µl of β-mercaptoethanol per 50 mL of buffer. The membrane was then exposed 1 hour with a Kodax film to confirm the complete stripping.

Protein-protein binding assays

In vitro transcription and translation were performed using T7 RNA polymerase in the system of rabbit reticulocyte lysates as described by the manufacturer (Promega). MBP-FKLF-2-fl was checked on a gel stained by Coomassie blue to estimate the concentration and monitor the integrity of the protein. *In vitro* translated ³⁵S-labeled GATA proteins (15 µl) were incubated with 500 ng MP-FKLF-2-fl fusion protein in 500 µl of binding buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris [pH=8], 0.3% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.25% BSA) for overnight at 4°C with rotation. The incubation was followed by a centrifugation of 2 min at 15,000 rpm at 4°C. Beads were washed three times in 500 µl of binding buffer by vortexing followed by three times wash with 500 µl of binding buffer lacking BSA by vortexing. The protein complexes were released after boiling 5 min in SDS loading buffer and resolved on a 15% SDS-PAGE. Labelled proteins were visualized by using a PhosphorImager screen and a STORM (system Molecular Dynamics) scanner.

Results

The CACCC box is an important *cis*-regulatory element for the BNP promoter. The BNP promoter harbors the CACCC box at -70 bp from the start site, a genomic structure which is evolutionary conserved (Figure 2.1A). We carried out transient transfections in cardiomyocytes of four days-old rats to determine if the CACCC box has an effect on the activity of the BNP proximal promoter (-80 bp) which is known to be sufficient for high level expression in cultured cardiac cells (17). Mutation of the CACCC site decreased the basal promoter activity by five fold in the atria and 1.5 fold in the ventricles (Figure 2.1B). The same pattern was observed in the cardiomyocytes when the CACCC box is deleted. Thus, the CACCC box seems to be important for maximal BNP transcription in primary cardiomyocyte cultures and this effect is more significant in the atria as compared with the ventricles.

Characterization of the FKLF-2 antiserum. It was already known, that four members of the XKLF family are expressed in the adult heart: GKLF, BKLF, LKLF and FKLF-2 (1,2,12,44). To test chamber specificity of these transcription factors, RT-PCR were carried out on cDNA (complementary DNA) prepared from atria and ventricles from four days-old rats. As shown in Figure 2.2B, GKLF, BKLF, LKLF and FKLF-2 were expressed in both atria and ventricles, whereas, as expected, EKLF transcript was not present.

XKLFs have highly conserved zinc fingers at the C-terminal region of the protein. The four XKLFs expressed in the heart share an identity of at least 75% within their zinc fingers (Figure 2.2A). The similarity outside the zinc fingers, i.e. the N-terminal region is low between the four cardiac XKLFs. Because of the divergence of the N-terminal, we

generated an antibody against amino acids 6 to 135 of FKLF-2 (Figure 2.3A). The peptide was inserted in phase with the MBP protein and injected into rabbits. Antiserum was collected and purified. We then tested the specificity of the anti-FKLF-2 by Western blot. P19 cells were transfected with the empty vector pCG or with expression vectors for tagged HA FKLF-2 (HA-FKLF-2) or for GKLF. As demonstrated in the upper panel of Figure 2.3B, the anti-HA antibody was able to recognize HA-FKLF-2 at a molecular weight of 40 kDa but it did not detect any other protein. The Western blot membrane was then stripped and hybridized with the anti-FKLF-2 antibody. A band was detected at 40 kDa in extracts overexpressing FKLF-2 but not GKLF (Figure 2.3B, lower panel). The antiserum does not seem to interact with the GKLF protein. The band at 26 kDa has not been identified yet but it could be a phosphorylated form of FKLF-2 endogenously present in P19 cells. These results show the ability of the generated antibody to specifically recognize the FKLF-2 protein.

Spatial and temporal expression of FKLF-2. To establish the expression pattern of FKLF-2 during heart development, histological sections from E9.5 to E14.5 mice embryos were hybridized with the anti-FKLF-2 antibody. The presence of FKLF-2 was detected as early as E9.5 (Figures 2.4A, B, C). At this stage, the FKLF-2 expression was clear in the developing heart (Figure 2.4A) where it was well expressed in both the ventricles (Figure 2.4B) and the atria (Figure 2.4C). The expression persisted until E14.5 in the heart (Figure 2.4D, G, J). The nucleus of both the ventricular (Figure 2.4E, H, K) and the atrial myocytes (Figure 2.4F, I, L) showed significant FKLF-2 expression. The endocardial cushion tissue that gives rise to the valves, the septum and the walls of the chambers also expressed FKLF-2 (Figure 2.4F). FKLF-2 was detected in the right and left

ventricles at E12.5 (Figure 2.4M). Therefore, FKLF-2 is present in several cardiac structures at the developmental stages examined.

Sections from adult hearts were also tested for FKLF-2 expression which was present in both ventricles (Figure 2.5A) and atria (Figure 2.5B). At higher magnification (Figure 2.5C), it was apparent that FKLF-2 is expressed in the nuclei of the atrial cells. Three structures from the ventricles were highly expressing FKLF-2: the valves (Figure 2.5D), the myocardium (Figure 2.5E) and the septum (Figure 2.5F). The valves and the septum are derived from the endocardial cushions which were also marked by the anti-FKLF-2 antibody. The valves and the septum seem to express FKLF-2 from their early developmental stages and in the differentiated structures.

Finally, during development, FKLF-2 was also present outside the heart (Figure 2.6). From E9.5 to E14.5, the epithelial cells of the contour of the embryo were marked with the anti-FKLF-2 antibody (Figure 2.6A, B). FKLF-2 was also found in brain, dorsal ganglions and skeletal muscles during development (Figure 2.6E, G, C, D, F). At E14.5, the endothelial cells of the vascular vessels in the liver started showing an expression of FKLF-2 (Figure 2.6H). Although FKLF-2 was expressed in other tissues, its expression during development was higher in the heart. FKLF-2 is expressed early in the heart and its expression persists during development. This pattern of expression suggests an important role during the formation of the heart.

FKLF-2 is present in cardiomyocytes and activates the BNP promoter. BNP is expressed early in cardiomyocytes and its expression persists in the postnatal heart (8). The BNP promoter harbors a consensus CACCC site, making it a potential transcription target for FKLF-2. First, EMSAs were done to analyze if cardiac cells contain proteins that can interact with the CACCC site of the BNP. Ventricular and atrial nuclear extracts from

four days-old rats were incubated with the radiolabeled probe and then loaded on a 6% polyacrilamide gel. A complex was formed by extracts from both atria and ventricles (Figure 2.7A). The complex produced was more intense in atrial extracts. To test if this difference was due to a quantification problem of the proteins, we incubated the extracts with the Oct-1 probe. As demonstrated in Figure 2.7A, the amount of Oct-1 protein is the same in both extracts.

We next examined FKLF-2 expression in cultured cardiomyocytes to determine whether the binding activity over the CACCC box may correspond to FKLF-2. We performed immunocytochemistry on cardiomyocytes with the anti-FKLF-2 antibody and the anti-desmin antibody. In the heart, desmin is expressed in the cardiomyocytes but not in fibroblasts. The nuclei of the primary culture of cardiomyocytes showed endogenous expression of FKLF-2, as seen in Figure 2.7B (red stain). The nucleus of all the cells in the primary culture were stained in blue with the Hoechst dye. As shown in Figure 2.7B (merge), cardiomyocytes (cells that are marked in red by FKLF-2 and in green by the desmin) as well as cardiac fibroblasts (red cells marked only by FKLF-2) expressed endogenous FKLF-2. It is interesting to point out that GATA-4, an important regulator of heart development, has the same expression pattern as FKLF-2 (data not shown).

To determine the level of expression of FKLF-2 protein in the ventricle and in the atria, we carried out a Western blot with cytoplasmic and nuclear extracts using the anti-FKLF-2 antibody. The data confirm that FKLF-2 was only present in the nucleus of the cardiomyocytes and not the cytoplasm (Figure 2.7C, upper panel). Moreover, the protein level of FKLF-2 in the atria was higher than in the ventricle. In the atrial extracts but not in the ventricular extracts, there were two bands detected by the antibody. To confirm equal protein loading, the Western blot membrane was then stripped and hybridized with the anti-

GATA-4. GATA-4 was expressed only in the nucleus and at the same levels in both the ventricle and the atria (Figure 2.7C, lower panel).

In order to characterize the capacity of FKLF-2 to bind to the CACCC site of BNP, we performed EMSAs with nuclear extracts from P19 cells. Mocked cells, overexpressing the empty vector pCG and FKLF-2 formed a complex with the BNP probe containing the CACCC site (Figure 2.8). However, the complexes made by mocked cells or pCG were less intense than the one formed by FKLF-2. Therefore, there are unknown proteins in the P19 cells that can bind the CACCC site of BNP. Since P19 cells do not endogenously express FKLF-2 (Figure 2.3B), it can be anticipated that the higher intensity of the band when FKLF-2 is incubated with the CACCC probe is due to the overexpression of FKLF-2. The FKLF-2 binding was competed by the cold wild type probe at 100-fold but it was not competed by the cold mutated probe at 100-fold (Figure 2.8). The mutated probe failed to produce a complex with FKLF-2 with the same pattern as the wild type probe (Figure 2.7). Unfortunately, because neither anti-FKLF-2 nor anti-HA antibodies can recognize the FKLF-2 protein bound to the DNA (data not shown), the identity of the complex bound to the CACCC box could not be further identified.

FKLF-2 activates the BNP promoter via the CACCC site. To demonstrate the functional role of FKLF-2, we cotransfected FKLF-2 with the proximal BNP promoter in P19 cells. FKLF-2 activated BNP in a dose-dependant manner (Figure 2.9A). The optimal dose for the activation was 50 ng of FKLF-2. This amount of protein was then used to determine if the action of FKLF-2 was through the CACCC box. As shown in Figure 2.9B, the activation of the proximal BNP promoter observed with FKLF-2 was lost when the CACCC site was mutated while this activation was not affected by a mutation at the YY1 site.

The effect of FKLF-2 on the BNP promoter was also tested by transient transfections in primary culture of cardiomyocytes of four days-old rats. In the atria, FKLF-2 strongly activated the proximal promoter of BNP (Figure 2.7D). When a mutation in the CACCC box was introduced in the proximal promoter, FKLF-2 lost its stimulatory effect in the atrial cells (Figure 2.7D). On the other hand, FKLF-2 was not able to activate the BNP promoter when the same transfections were done in the ventricles (Figure 2.7D). Surprisingly, FKLF-2 activates more the BNP in the atria than in the ventricle. The results suggest that other important co-activator(s) are needed so that FKLF-2 can activate the BNP promoter in the atria or co-repressor(s) are present in the ventricle.

FKLF-2 is an activator of cardiac genes. We further analyzed the role of FKLF-2 in regulating the promoter of other cardiac genes. Increasing doses of FKLF-2 were transfected with cardiac promoters in P19 cells. As shown in Figure 2.10, FKLF-2 activated the full length and the proximal BNP promoters. It also weakly activated the ANF promoter and the α -CA while it had no effect on the β -MHC or α -sk-actin.

FKLF-2 is a co-activator of GATA-4. In the erythroid system, the XKLF and GATA families interact to regulate the β -globin gene (29). In view of the fact that the BNP promoter contains two GATA sites juxtaposed to the CACCC box and, since both FKLF-2 and GATA-4 (17) activate transcription from the BNP promoter, we hypothesized a possible synergy between both factors. We carried out transient transfections in P19 cells in which FKLF-2 was co-transfected with GATA-4 and BNP promoter and the luciferase activity was measured. Both FKLF-2 and GATA-4 activated the BNP promoter by 3.5 and 12-folds respectively (Figure 2.11A). When FKLF-2 and GATA-4 were co-transfected, the BNP promoter was activated by 160-fold (Figure 2.11A). To map which part of the GATA-4 protein is required for this synergy, constructs expressing various GATA-4

mutants were co-transfected with the BNP reporter alone or in presence of FKLF-2 (Figure 2.11B). The N-terminal part of GATA-4 (1-260) that contains the first zinc finger and the construct with the two zinc fingers (1-332) were not able to activate the BNP promoter and they did not potentiate the activation of FKLF-2. On the other hand, the C-terminal regions (260-443) and (201-332) failed to activate the BNP promoter but they synergistically activated the promoter when co-transfected with FKLF-2 (9 and 12 folds, respectively). The construct that contains the two zinc fingers and the C-terminal part (201-443) activated the BNP promoter by 6 folds and by 22.6 folds in the presence of FKLF-2. Thus, the two zinc fingers and the C-terminal of GATA-4 seem to be required for the functional synergy between GATA-4 and FKLF-2 over the BNP promoter.

FKLF-2 physically interacts with GATA-4. To determine if the transcriptional synergy between FKLF-2 and GATA-4 involves a direct interaction between the two proteins, we carried out *in vitro* pull-down assays. The MBP-FKLF-2-fl fusion protein was incubated with the *in vitro* translated ³⁵S-labeled GATA-4. MBP-FKLF-2-fl, but not the negative control MBP-lacZ, was able to retain GATA-4 (Figure 2.12).

Discussion

XKLF transcription factors play important roles in diverse biological processes such as differentiation, proliferation and cell cycle control (5,13,20). Members of the family are involved in the formations of several organs and systems, most notably the hematopoietic lineage (33,35). Based on the facts that FKLF-2 is restricted to the adult heart, the bone marrow and the skeletal muscles and based on its ability to activate genes through a CACCC element (2), we speculated that FKLF-2 would regulate cardiac genes containing a CACCC site within their regulatory regions. As an important cardiac marker, we have selected the BNP promoter which is known to be activated by GATA-4 and contains two GATA sites near a CACCC box.

FKLF-2 expression in cardiac cells. In order to delineate the possible involvement of XKLF factors in the regulation of cardiac genes, we investigated their expression in cardiomyocytes. BKLF, LKLF, GKLF and FKLF-2 mRNA were detected in both atria and ventricle. Since the BKLF, LKLF and GKLF knockout models did not show any cardiac phenotype (40,33,35,47), and FKLF-2 expression is more restricted to the heart, we were interested in focusing on this member of the family. When checked for the protein levels of FKLF-2, it was found that this protein was expressed in the nucleus, not the cytoplasm, of the atrial and ventricular cells. Its expression was higher in the atria than in the ventricle.

Using *in situ* hybridization technique, it was shown that the mRNA of FKLF-2 is widely expressed during development from E8 to E16 (28). In our study, we have demonstrated a more restricted pattern of expression for the FKLF-2 protein during embryogenesis which started at E9.5 and continued till adulthood with a predominance in the heart. The discrepancy between the expression levels of the mRNA and the protein

could be explained by post-translational modifications. At this point, it is important to mention that BNP is expressed in the developing heart from E9 to adulthood, a pattern that is similar to FKLF-2 (43). Interestingly, FKLF-2 was expressed at the early stages of valve formation and persisted in adults. It is also known that GATA-4 is expressed in the valves but its role in their formation is not established yet. The molecular mechanisms of valvulogenesis are not well understood and even less is known about the mechanisms underlying the congenital valves defects. The identification of valvular regulatory proteins may open the way for investigating the role of these transcription factors in valvular defects.

FKLF-2 regulates BNP promoter via its CACCC site. To ascertain the functional relevance of FKLF-2 in the activation of BNP promoter, both atrial and ventricular cells were transiently transfected with FKLF-2. The BNP proximal promoter was significantly activated in the atrial but not in the ventricular cardiomyocytes. The activation was abrogated by the mutation or deletion of the CACCC box. Similar results were obtained when P19 cells were transfected with FKLF-2.

The possible direct interaction between FKLF-2 and the BNP promoter was studied by EMSA. The results showed the presence of a complex that can bind to the CACCC box of the BNP promoter in both the atrial and ventricular extracts. Nevertheless, the binding was stronger in the atria than in the ventricle. The strong binding observed could be explained by the higher levels of FKLF-2 atrial protein as revealed by Western Blot. This explanation is enforced by the finding that P19 cells, which do not endogenously express FKLF-2, transfected with FKLF-2 showed a higher level of binding to the CACCC probe than the non-transfected cells. Nevertheless, it is possible that other co-factors are involved in the atrial binding. Collectively, the results indicate that the activation of the BNP

promoter via the CACCC site requires FKLF-2 protein. The absence of activation of the promoter in the ventricle when transfected with FKLF-2 imply the possible involvement of repressors that prevent the binding and hence the activation.

GATA-4 is a co-activator of FKLF-2. Several facts have implicated GATA-4 as a good candidate for an interaction with FKLF-2. Firstly, the proximity of the two GATA sites and the CACCC box make it easier for the transcription factors to interact. Secondly, it is well established that EKLF interacts with GATA-1 to regulate erythroid gene (29) which shows the possibility of interaction between the members of both families. Finally, FKLF-2 and GATA-4 have a similar expression during development and they are both expressed in cardiomyocytes (Figures 2.7C, (18,26,19)). As shown in Figure 2.11, there is a synergy between FKLF-2 and GATA-4. This functional interaction seems to require the C-terminal part of GATA-4 with its two zinc fingers. Although FKLF-2 and GATA-4 can physically interact, this interaction was weak. It is very possible that stabilizing factors are required for such a complex. The synergy observed between GATA-4 and FKLF-2 cannot explain the difference in the BNP activation levels between the atria and ventricles since GATA-4 is expressed at the same level in both types of cardiac cells. Therefore, it is postulated that other factors are responsible for the differential response observed.

The interaction between the GATA and the XKLF families in the erythroid system is a model to understand the mechanisms of transcription regulation in cardiac cells. Those kinds of interactions could most probably be extended to other tissues. In T lymphocytes, members of both families are present. GATA-3, FKLF-2 and LKLF are expressed in T lymphocytes. The promoter of the receptor alpha, also in T cells, contains GATA and CACCC sites and is likely regulated by GATA-3 (48). An interaction between the families is possible. The three zinc fingers factors are physiologically present in the same cells.

Following the erythroid model, the GATA member will regulate the gene and interact with the two XKLFs while one XKLF will be an activator and the other a repressor.

To examine the specificity of FKLF-2 in regulating cardiac genes, we tested its effect on other promoters. FKLF-2 is shown to preferentially activate BNP promoter while stimulating the ANF and α cardiac actin promoters at a much lower level. The full length BNP promoter is the only promoter tested containing two GATA sites near a CACCC box. But the most activated promoter is the proximal BNP that harbors only a CACCC site at 40 bases pairs of a GATA site. The ANF promoter also has two GATA sites but they are separated from the two CACCC sites by 65 bases pairs. On the other hand, the α cardiac actin promoter contains only a CACCC site and no GATA element. These results raise two important questions that deserved to be investigated: first, the proximity of the CACCC box to the GATA site which may facilitate the physical interaction between GATA-4 and FKLF-2. Second, a possible difference in the affinity of FKLF-2 to the various CACCC sites. It would also be interesting to investigate the role of the other XKLF members in regulating cardiac genes.

In summary, we show for the first time that XKLF family is involved in the regulation of cardiac gene transcription. In this report, we have shown the cardiac-restricted expression of the FKLF-2 protein during development and throughout adulthood. This pattern of expression suggests an important role for FKLF-2 in the regulation of the developing heart. Moreover, the functional role of FKLF-2 appears to be specific to atrial cells. The presence of FKLF-2 at every stage of valve formation suggests that this protein may be an important regulator for valve development. The identification of a transcription factor important for the valves formation would enhance our knowledge of some of the most common birth defects i.e. valve malformations(14).

Acknowledgements

We are grateful to the members of the Nemer's laboratory for discussions and we thank Dr Rana Temsah and Dr Gregore Andelfinger for critical reading of this manuscript. We also thank Lise Laroche for secretarial assistance and Chantal Lefebvre for technical assistance. This work was supported by a grant from the Canadian institut of health research (CIHR-13057) and Dr Mona Nemer holds a Canadian research chair in molecular biology.

Reference

1. **Anderson, K. P., C. B. Kern, S. C. Crable, and J. B. Lingrel.** 1995. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol.Cell Biol.* **15**:5957-5965.
2. **Asano, H., X. S. Li, and G. Stamatoyannopoulos.** 2000. FKLf-2: a novel Kruppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood* **95**:3578-3584.
3. **Benson, D. W., G. M. Silberbach, A. Kavanaugh-McHugh, C. Cottrill, Y. Zhang, S. Riggs, O. Smalls, M. C. Johnson, M. S. Watson, J. G. Seidman, C. E. Seidman, J. Plowden, and J. D. Kugler.** 1999. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J.Clin.Invest* **104**:1567-1573.
4. **Bhalla, S. S., L. Robitaille, and M. Nemer.** 2001. Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *J.Biol.Chem.* **276**:11439-11445.
5. **Bieker, J. J.** 2001. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J.Biol.Chem.* **276**:34355-34358.
6. **Bruneau, B. G.** 2002. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ.Res.* **90**:509-519.
7. **Bruneau, B. G., G. Nemer, J. P. Schmitt, F. Charron, L. Robitaille, S. Caron, D. A. Conner, M. Gessler, M. Nemer, C. E. Seidman, and J. G. Seidman.** 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.
8. **Cameron, V. A., G. D. Aitken, L. J. Ellmers, M. A. Kennedy, and E. A. Espiner.** 1996. The sites of gene expression of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta. *Endocrinology* **137**:817-824.
9. **Charron, F. and M. Nemer.** 2000. Cardiac development and regulation of cardiac transcription, p. 705-717. *In* N. Sperelakis (ed.), *Heart Physiology and Pathophysiology*, 4th edition. Academic Press, San Diego, USA.
10. **Christoffels, V. M., P. E. Habets, D. Franco, M. Campione, F. de Jong, W. H. Lamers, Z. Z. Bao, S. Palmer, C. Biben, R. P. Harvey, and A. F. Moorman.** 2000. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev.Biol.* **223**:266-278.

11. **Cowie, M. R. and G. F. Mendez.** 2002. BNP and congestive heart failure. *Prog.Cardiovasc.Dis.* **44**:293-321.
12. **Crossley, M., E. Whitelaw, A. Perkins, G. Williams, Y. Fujiwara, and S. H. Orkin.** 1996. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol.Cell Biol.* **16**:1695-1705.
13. **Dang, D. T., J. Pevsner, and V. W. Yang.** 2000. The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **32**:1103-1121.
14. **Eisenberg, L. M. and R. R. Markwald.** 1995. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ.Res.* **77**:1-6.
15. **Firulli, A. B., D. G. McFadden, Q. Lin, D. Srivastava, and E. N. Olson.** 1998. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat.Genet.* **18**:266-270.
16. **Garg, V., I. S. Kathiriya, R. Barnes, M. K. Schluterman, I. N. King, C. A. Butler, C. R. Rothrock, R. S. Eapen, K. Hirayama-Yamada, K. Joo, R. Matsuoka, J. C. Cohen, and D. Srivastava.** 2003. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* **424**:443-447.
17. **Grepin, C., L. Dagnino, L. Robitaille, L. Haberstroh, T. Antakly, and M. Nemer.** 1994. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol.Cell Biol.* **14**:3115-3129.
18. **Harvey, R. P.** 1999. Seeking a regulatory roadmap for heart morphogenesis. *Semin.Cell Dev.Biol.* **10**:99-107.
19. **Heikinheimo, M., J. M. Scandrett, and D. B. Wilson.** 1994. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev.Biol.* **164**:361-373.
20. **Kaczynski, J., T. Cook, and R. Urrutia.** 2003. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* **4**:206.
21. **Kuo, C. T., E. E. Morrisey, R. Anandappa, K. Sigrist, M. M. Lu, M. S. Parmacek, C. Soudais, and J. M. Leiden.** 1997. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* **11**:1048-1060.
22. **Liberatore, C. M., R. D. Searcy-Schrick, and K. E. Yutzey.** 2000. Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development. *Dev.Biol.* **223**:169-180.

23. **Lin, Q., J. Schwarz, C. Bucana, and E. N. Olson.** 1997. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* **276**:1404-1407.
24. **Lyons, I., L. M. Parsons, L. Hartley, R. Li, J. E. Andrews, L. Robb, and R. P. Harvey.** 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* **9**:1654-1666.
25. **Mably, J. D. and C. C. Liew.** 1996. Factors involved in cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. *Circ.Res.* **79**:4-13.
26. **Marian, A. J. and R. Roberts.** 2001. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J.Mol.Cell Cardiol.* **33**:655-670.
27. **Martin, K. M., W. N. Cooper, J. C. Metcalfe, and P. R. Kemp.** 2000. Mouse BTEB3, a new member of the basic transcription element binding protein (BTEB) family, activates expression from GC-rich minimal promoter regions. *Biochem.J.* **345 Pt 3**:529-533.
28. **Martin, K. M., J. C. Metcalfe, and P. R. Kemp.** 2001. Expression of *Klf9* and *Klf13* in mouse development. *Mech.Dev.* **103**:149-151.
29. **Merika, M. and S. H. Orkin.** 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol.Cell Biol.* **13**:3999-4010.
30. **Miller, I. J. and J. J. Bieker .** 1993. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol.Cell Biol.* **13**:2776-2786.
31. **Molkentin, J. D., Q. Lin, S. A. Duncan, and E. N. Olson.** 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* **11**:1061-1072.
32. **Morin, S., P. Paradis, A. Aries, and M. Nemer.** 2001. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol.Cell Biol.* **21**:1036-1044.
33. **Nuez, B., D. Michalovich, A. Bygrave, R. Ploemacher, and F. Grosveld.** 1995. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the *EKLF* gene. *Nature* **375**:316-318.
34. **Packham, E. A. and J. D. Brook .** 2003. T-box genes in human disorders. *Hum.Mol.Genet.* **12**:R37-R44.
35. **Perkins, A. C., A. H. Sharpe, and S. H. Orkin.** 1995. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor *EKLF*. *Nature* **375**:318-322.

36. **Philipsen, S. and G. Suske.** 1999. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **27**:2991-3000.
37. **Ranger, A. M., M. J. Grusby, M. R. Hodge, E. M. Gravallesse, F. C. de la Brousse, T. Hoey, C. Mickanin, H. S. Baldwin, and L. H. Glimcher.** 1998. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**:186-190.
38. **Rubattu, S. and M. Volpe.** 2001. The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J.Hypertens.* **19**:1923-1931.
39. **Schoy, S., P. Gabant, T. Van Reeth, V. Hertveldt, P. L. Dreze, P. Van Vooren, M. Riviere, J. Szpirer, and C. Szpirer.** 2000. Identification of KLF13 and KLF14 (SP6), novel members of the SP/XKLF transcription factor family. *Genomics* **70**:93-101.
40. **Segre, J. A., C. Bauer, and E. Fuchs.** 1999. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat.Genet.* **22**:356-360.
41. **Song, A., Y. F. Chen, K. Thamtrakoln, T. A. Storm, and A. M. Krensky.** 1999. RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity.* **10**:93-103.
42. **Srivastava, D. and E. N. Olson .** 2000. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature* **407**:221-226.
43. **Steinhilper, M. E.** 1993. Structure, expression, and genomic mapping of the mouse natriuretic peptide type-B gene. *Circ.Res.* **72**:984-992.
44. **Ton-That, H., K. H. Kaestner, J. M. Shields, C. S. Mahatanankoon, and V. W. Yang.** 1997. Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett.* **419**:239-243.
45. **Venugopal, J.** 2001. Cardiac natriuretic peptides--hope or hype? *J.Clin.Pharm.Ther.* **26**:15-31.
46. **Walther, T., H. P. Schultheiss, C. Tschöpe, and H. Stepan.** 2002. Natriuretic peptide system in fetal heart and circulation. *J.Hypertens.* **20**:785-791.
47. **Wani, M. A., R. T. Means, Jr., and J. B. Lingrel.** 1998. Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res.* **7**:229-238.
48. **Winoto, A. and D. Baltimore.** 1989. A novel, inducible and T cell-specific enhancer located at the 3' end of the T cell receptor alpha locus. *EMBO J.* **8**:729-733.

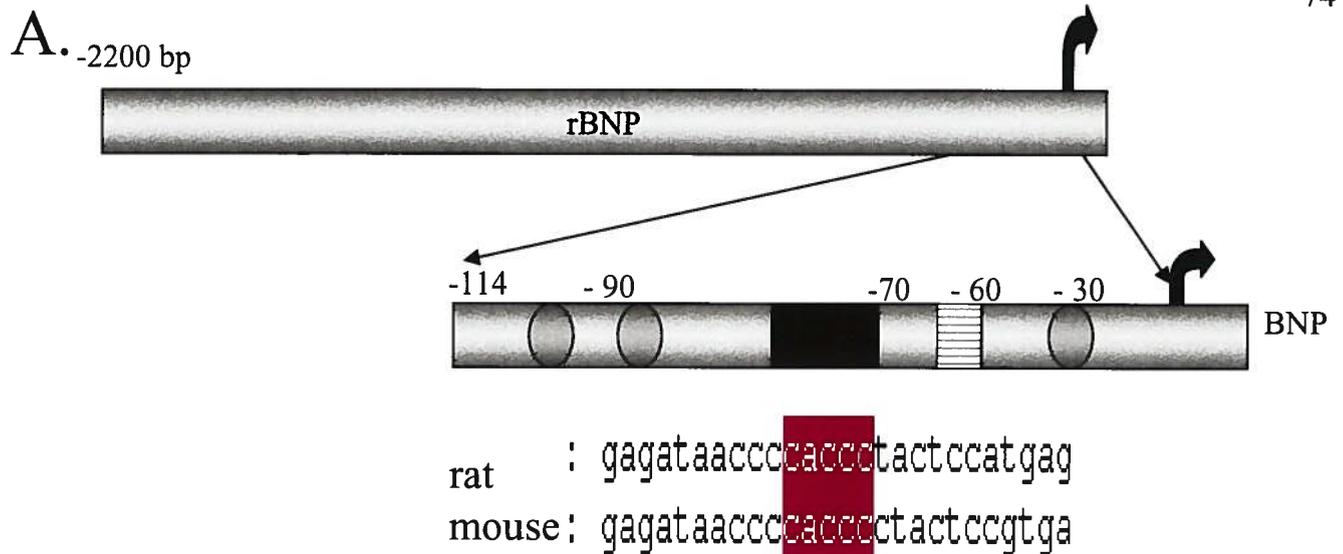
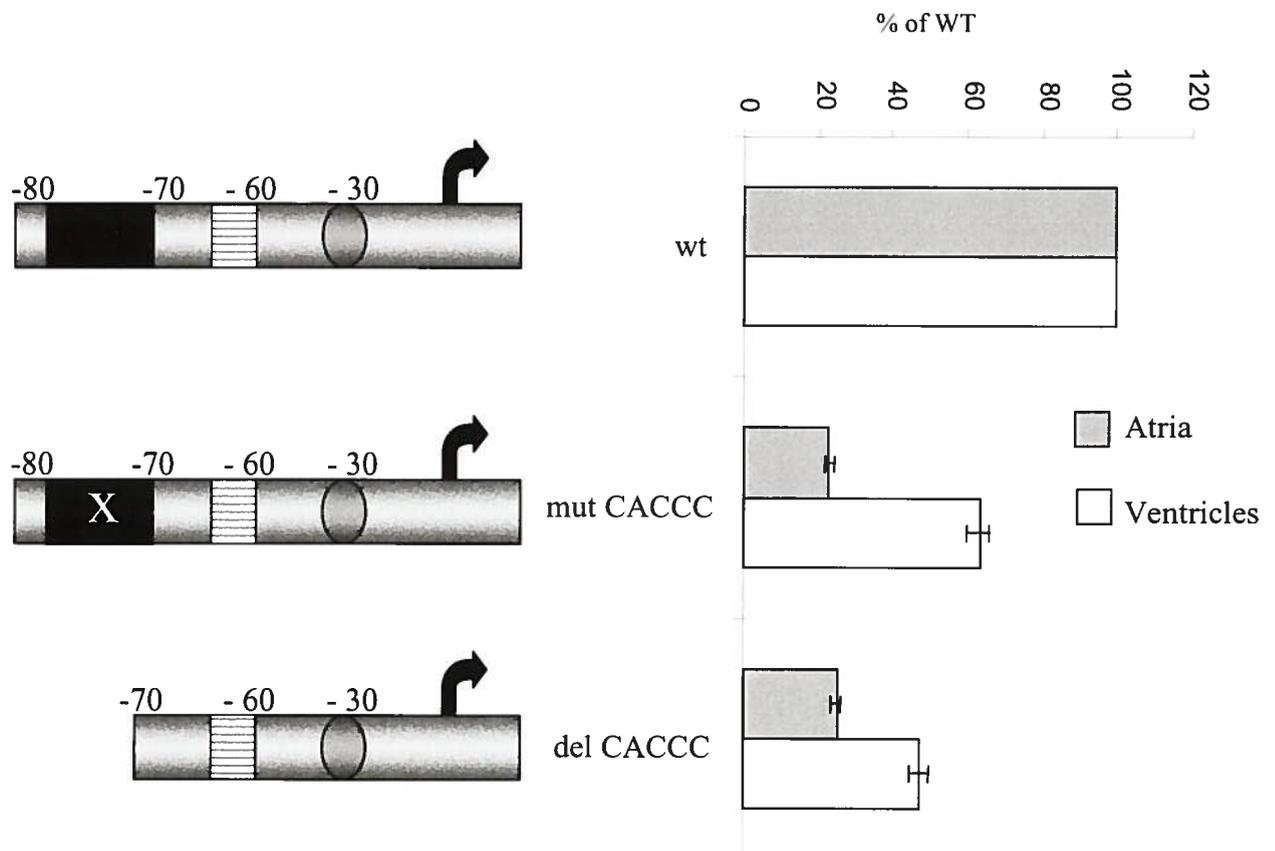
**B.**

Figure 2.1 Structural organisation of the rBNP promoter. (A) A schematic representation of the structure of the rBNP promoter. The BNP proximal promoter contains several *cis*-regulatory elements indicated with their relative position to the start site. The grey circles represent the GATA sites, the striped box, the YY1 site and the black rectangle, the CACCC site. There is a conservation of the CACCC site of the BNP promoter among species. (B) A representation of the proximal BNP promoter constructs used in transfection in cardiomyocytes of four days-old rat (left). The grey and white bars represent relative luciferase activity in atrial and ventricular myocytes, respectively. The levels were calculated as percentage of the proximal wild type (WT) BNP promoter. The data is one representative result of three experiments each done in duplicate.

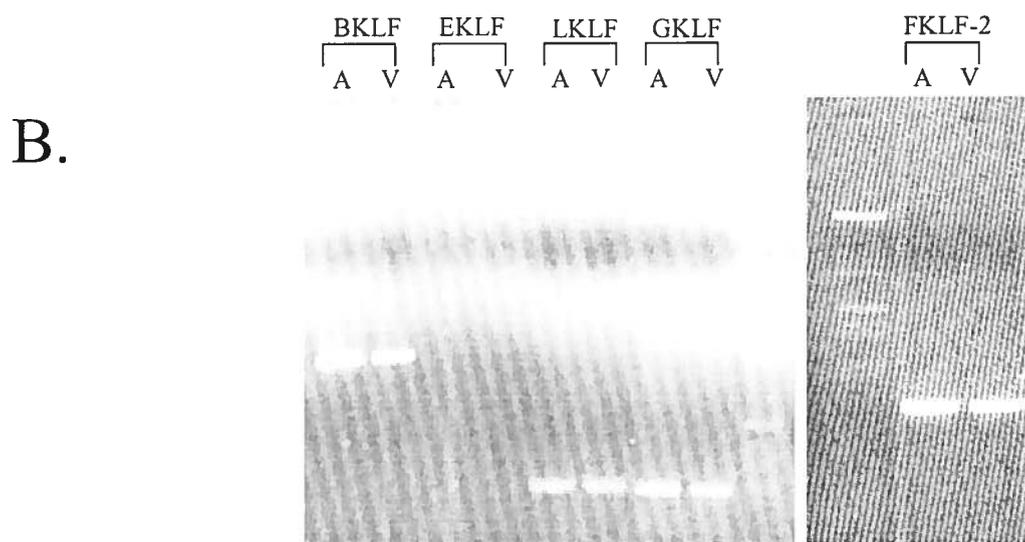
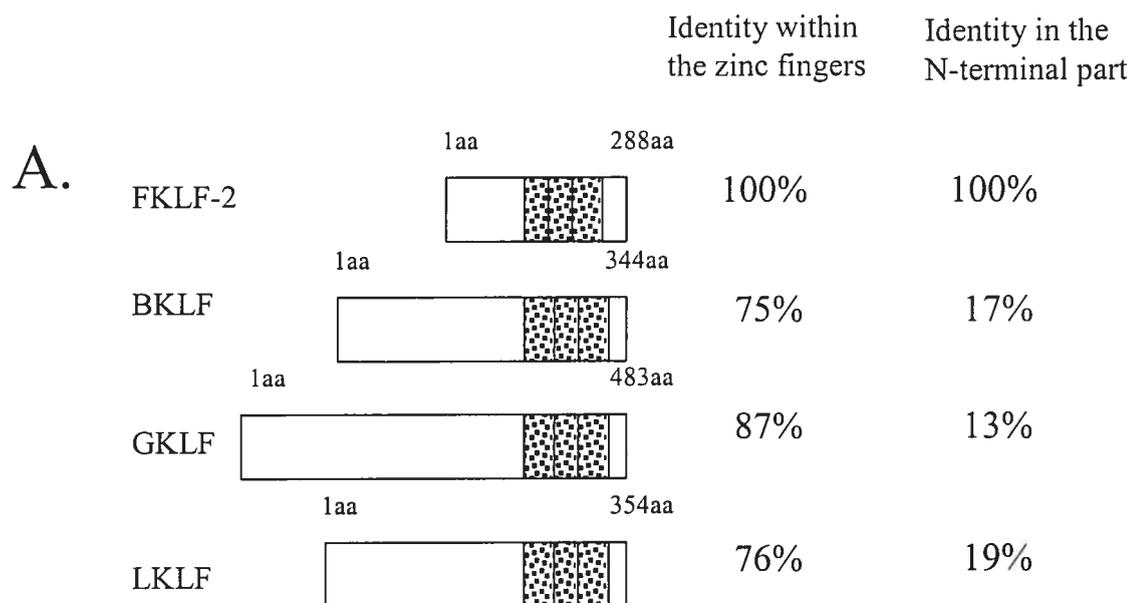


Figure 2.2 Expression of the XKLF's in cultured cardiomyocytes. (A) Homology between the XKLF expressed in the heart. All sequences are compared to the FKLF-2 sequence (AF251796) (BKLF; U36340, GKLF; U20344, LKLF; U25096). The line-up was made through clustalw program and the identity was calculated with the infoalign of Emboss. The numbers above the drawings represent the amino acid (aa) residues. The dotted boxes represent the three zinc fingers. (B) RT-PCRs were done on cDNA of atria (A) and ventricles (V) of cells of four days-old rats.

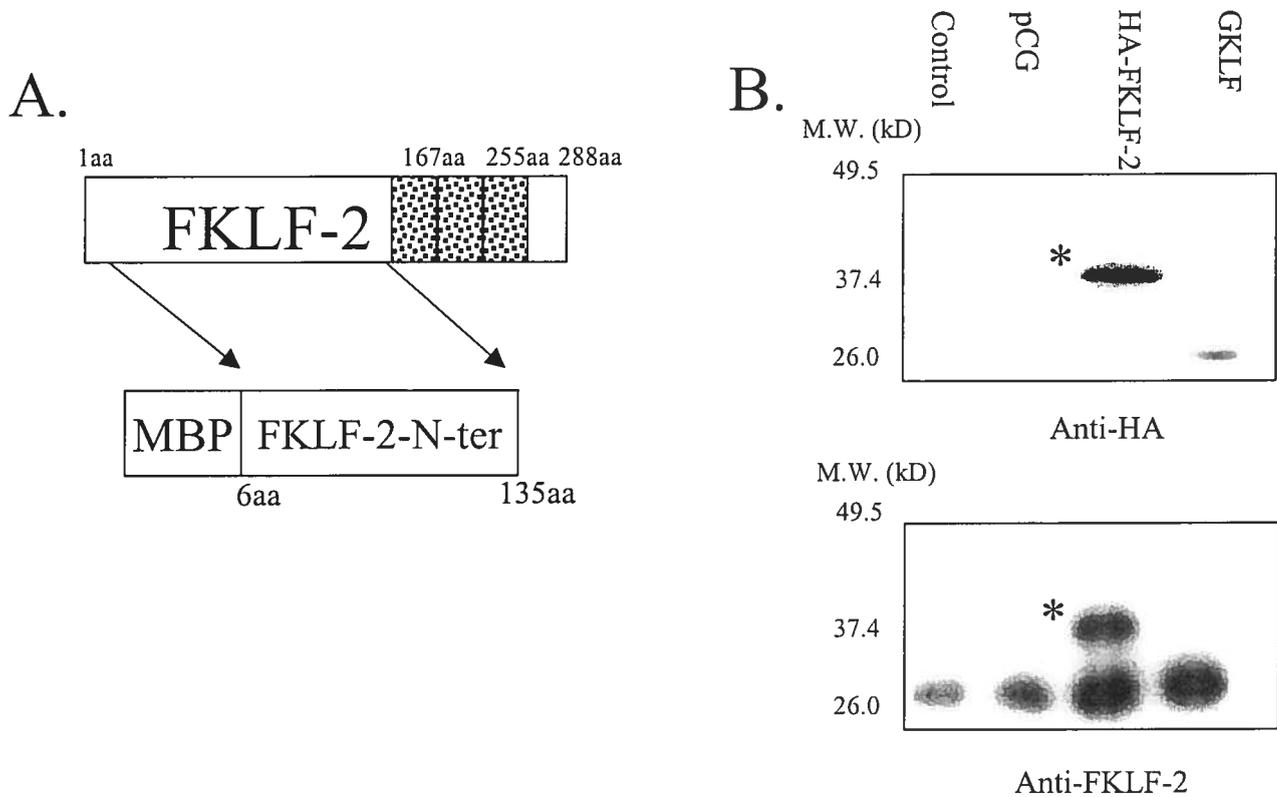
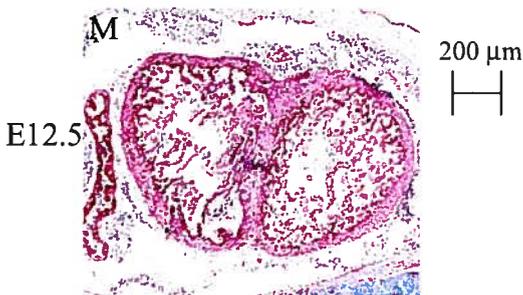
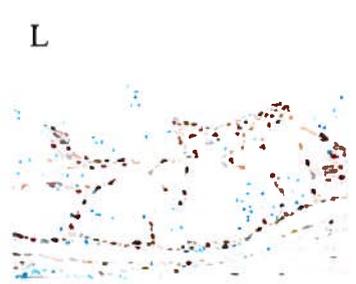
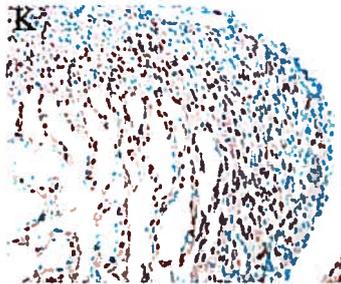
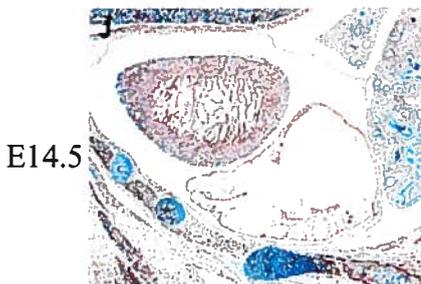
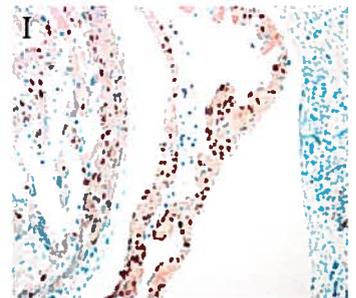
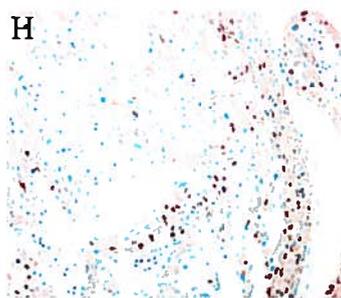
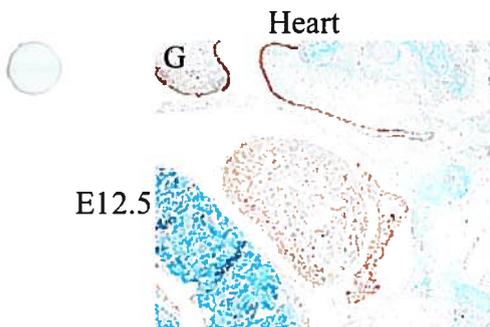
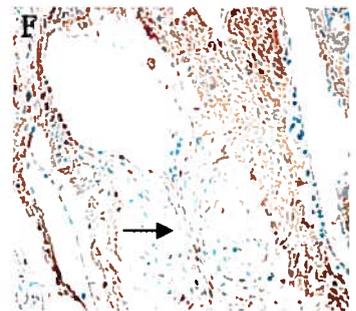
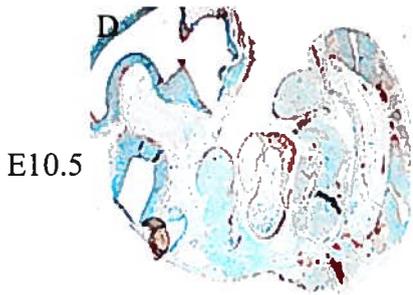
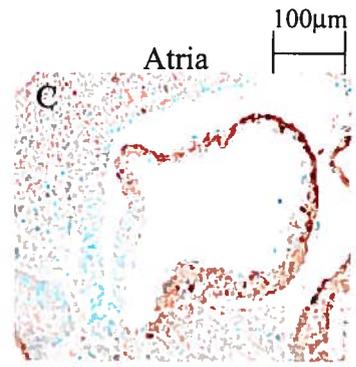
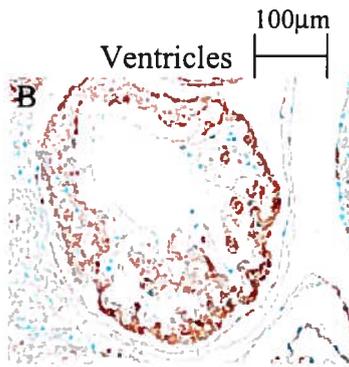
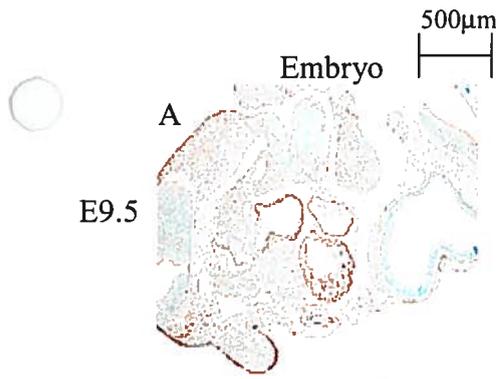


Figure 2.3 Generation of a specific FKLF-2 antibody. (A) Representation of the region of FKLF-2 selected (6 to 135 aa) to generate the antibody. (B) Western blot analysis are showing the specificity of the antibody. Nuclear extracts (20 μ g) from transfected P19 cells with water (control), pCG, FKLF-2 or GKLF were run on an SDS-PAGE gel and transferred to a PVDF membrane. The FKLF-2 was detected with anti-HA (dilution 1/200) and with anti-FKLF-2 (dilution 1/500).

Figure 2.4 FKLF-2 is expressed during cardiac development

Immunohistochemistry of sections from mice embryos at different stages of development were done with the anti-FKLF-2 antibody and nuclear counterstaining was done with methylgreen as described in material and methods. A, D, G and J are showing low magnification of the embryo (A, D) or the whole heart (G, J). Ventricles (B, E, H, K) and atria (C, F, I, L) express FKLF-2 during different stages of cardiogenesis. The atrioventricular cushions (arrow in F) express FKLF-2. FKLF-2 is expressed both the right and left sides of the heart as shown in the transversal section of a heart at E12.5 (M). The age of the embryo is indicated at the left and the level of magnification is represented by a bar at the top of each columns.



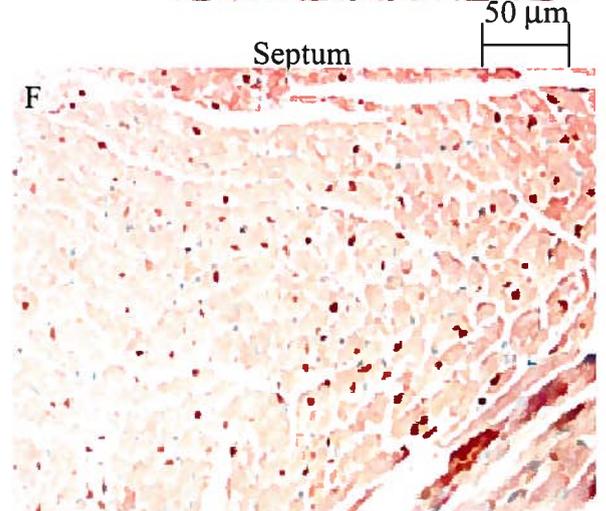
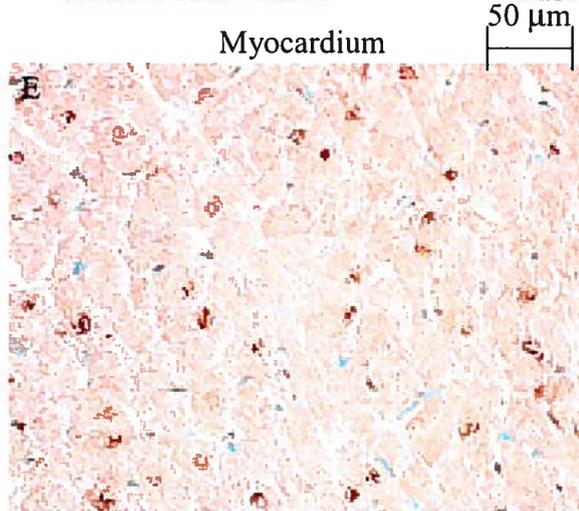
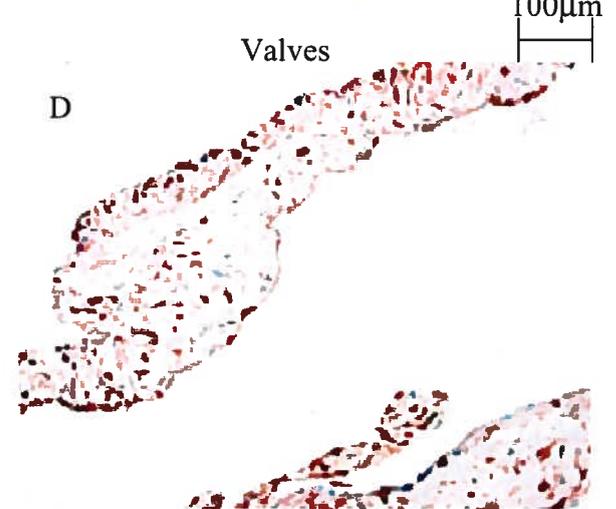
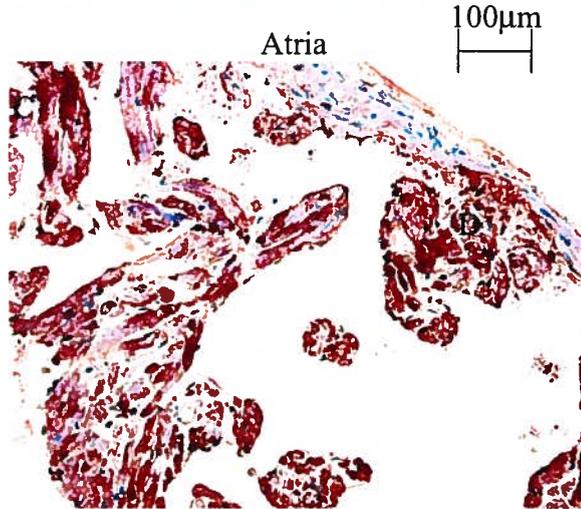
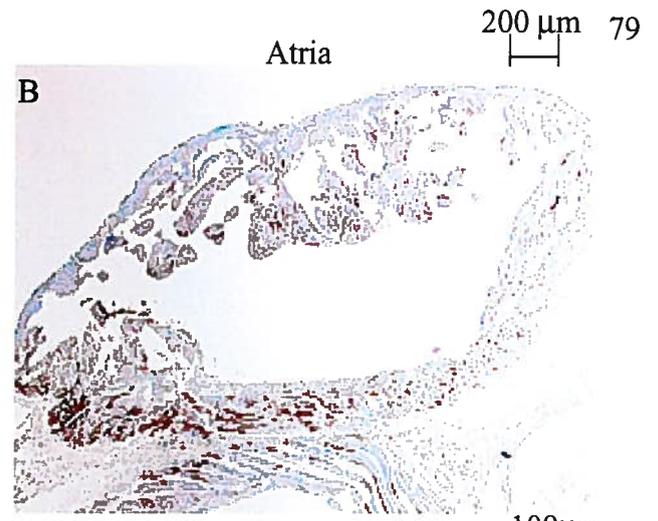
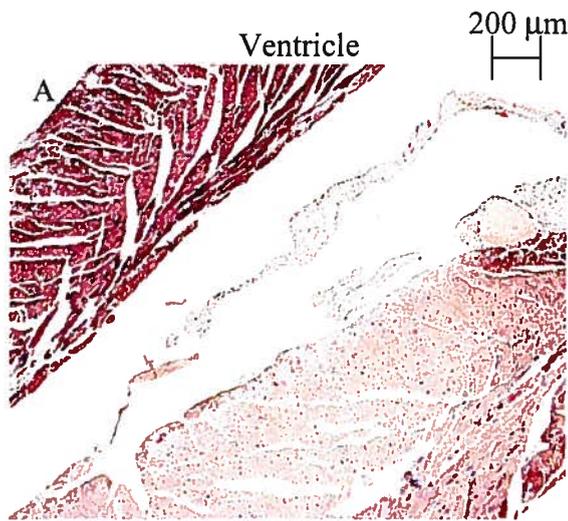
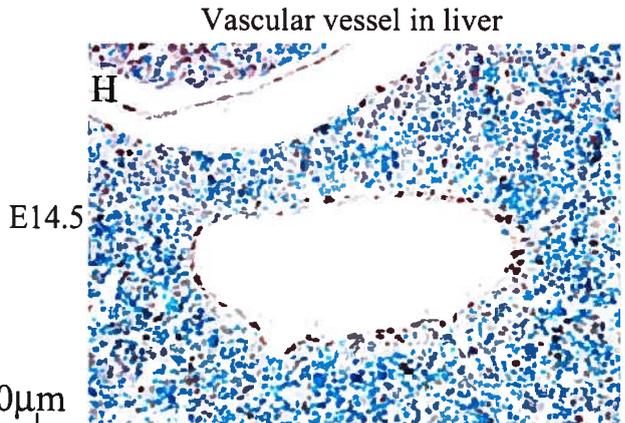
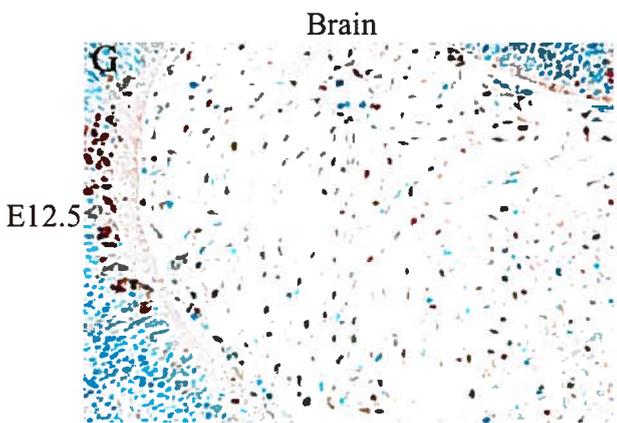
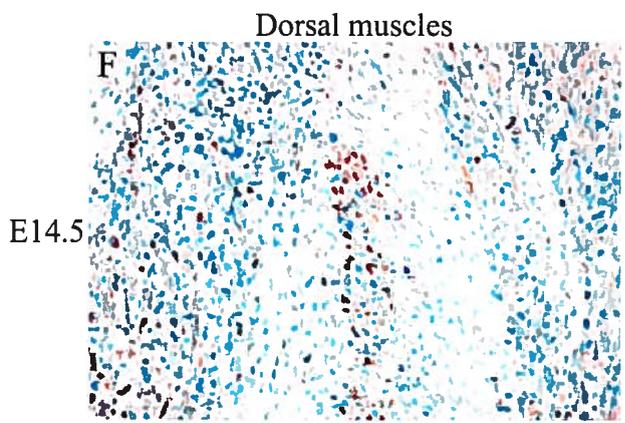
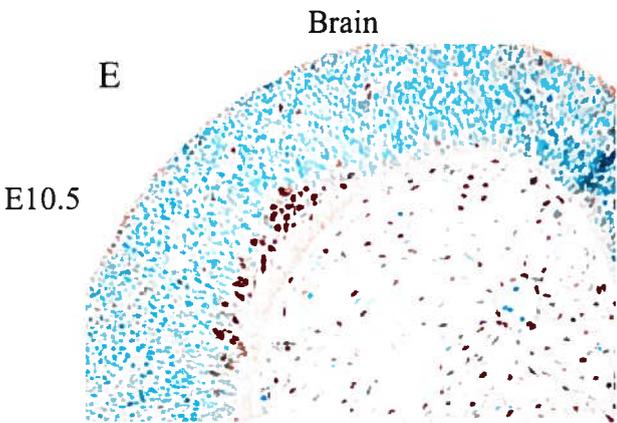
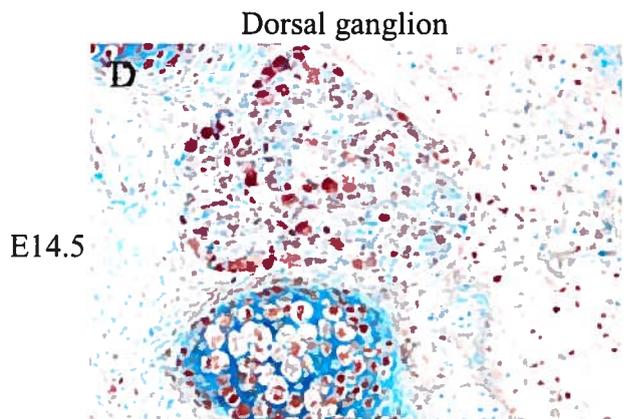
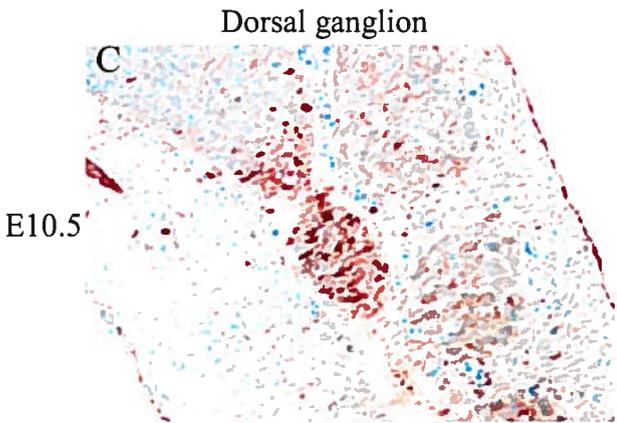
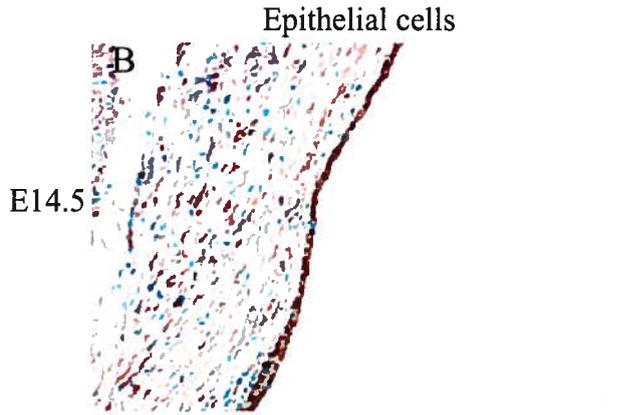
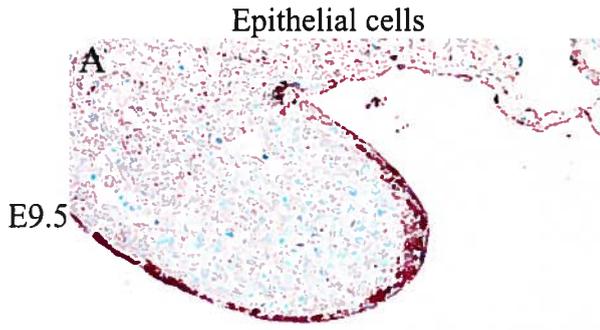


Figure 2.5. FKL2 is expressed in the adult heart.

Immunohistochemistry was performed on slides of adult hearts from wild type mice. The slides were incubated with the anti-FKL2 antibody and were counterstained with methylgreen. FKL2 is expressed throughout the heart. The low magnification of the ventricle and atria are presented in panels A and B. At higher magnification, FKL2 is clearly detected in the nuclei of the valvular cells (D), the myocardium (E) and the septum (F).

Figure 2.6 Expression of FKLF-2 outside the heart during development

Immunohistochemistry was performed on sections from mice embryos at different stages of development. The slides were incubated with the anti-FKLF-2 antibody and were counterstained with methylgreen. Epithelial cells from the contour of the embryo express FKLF-2 at E9.5 (A) and E14.5(B). FKLF-2 is present in dorsal ganglions at E10.5 and E14.5 (respectively C and D). The brain express FKLF-2 during development at E10.5 (E) and E12.5 (G). Dorsal muscles and vascular vessel in liver express FKLF-2 at E14.5. The age of the embryos are indicated at the left and the level of magnification is represented by a bar at the bottom.



100µm

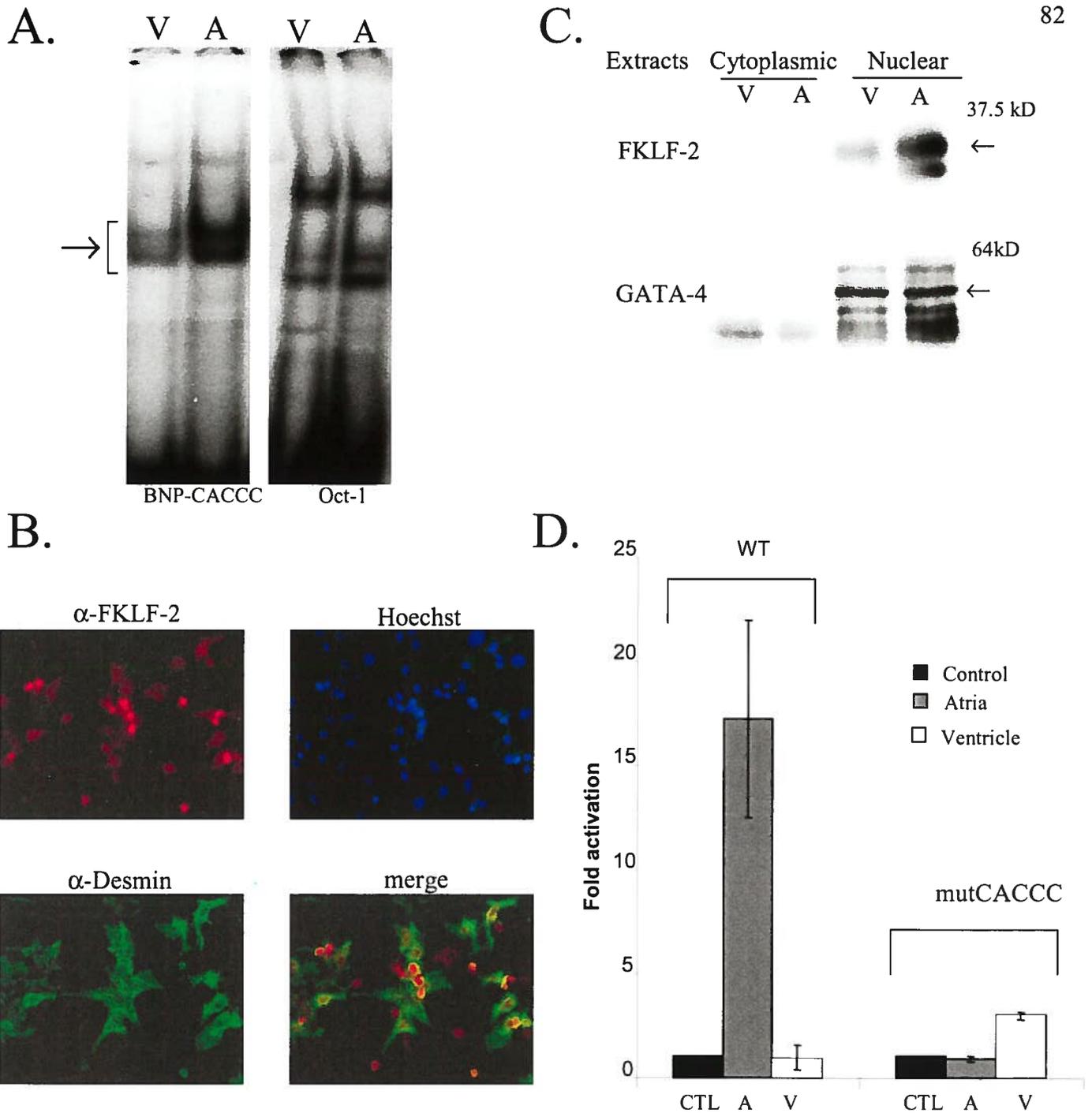


Figure 2.7 The BNP CACCC activity in cultured cardiomyocytes. (A) Gel shift assay was done with a radiolabelled probe which contains the CACCC motif of the BNP promoter and nuclear extracts from ventricles (V) and atria (A) from four days-old rats. Specific binding was detected in both extracts from atria and ventricles (left panel). The binding is stronger in the atria compared to the ventricle. The cardiomyocytes extracts were also incubated with Oct-1 probe and the intensity of bands in both atria and ventricles was comparable. (B) Immunocytochemistry was done on primary culture of cardiomyocytes with the anti-FKLF-2 (red cells). The cytoplasm of the cardiomyocytes were marked with the anti-desmin antibody (green cells). The nuclei of all the cardiac cells were stained in blue with the Hoechst dye. (C) Western blots were done on cytoplasm and nuclear extracts from ventricles (V) and atria (A) and probed for FKLF-2 (arrow). The membrane was then stripped and hybridized with anti-GATA-4 to confirm equal protein loading between the nuclear extracts of the atria and the ventricle. The arrow shows the specific band for GATA-4. (D) Transfections were done in primary culture of cardiomyocytes of neonatal rats. Proximal promoter of BNP was transfected with 50 ng of FKLF-2. The reporter genes used were BNP-WT (BNP wild type -80) and BNP-mutCACCC (BNP -80 with a mutation at the CACCC site). The control (CTL) is the BNP promoter transfected without FKLF-2. This is the mean of three independent experiments each done in duplicate.

Non-transfected P19	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
pCG	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
FKLF-2	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Self competition	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
CACCC mut competition	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-

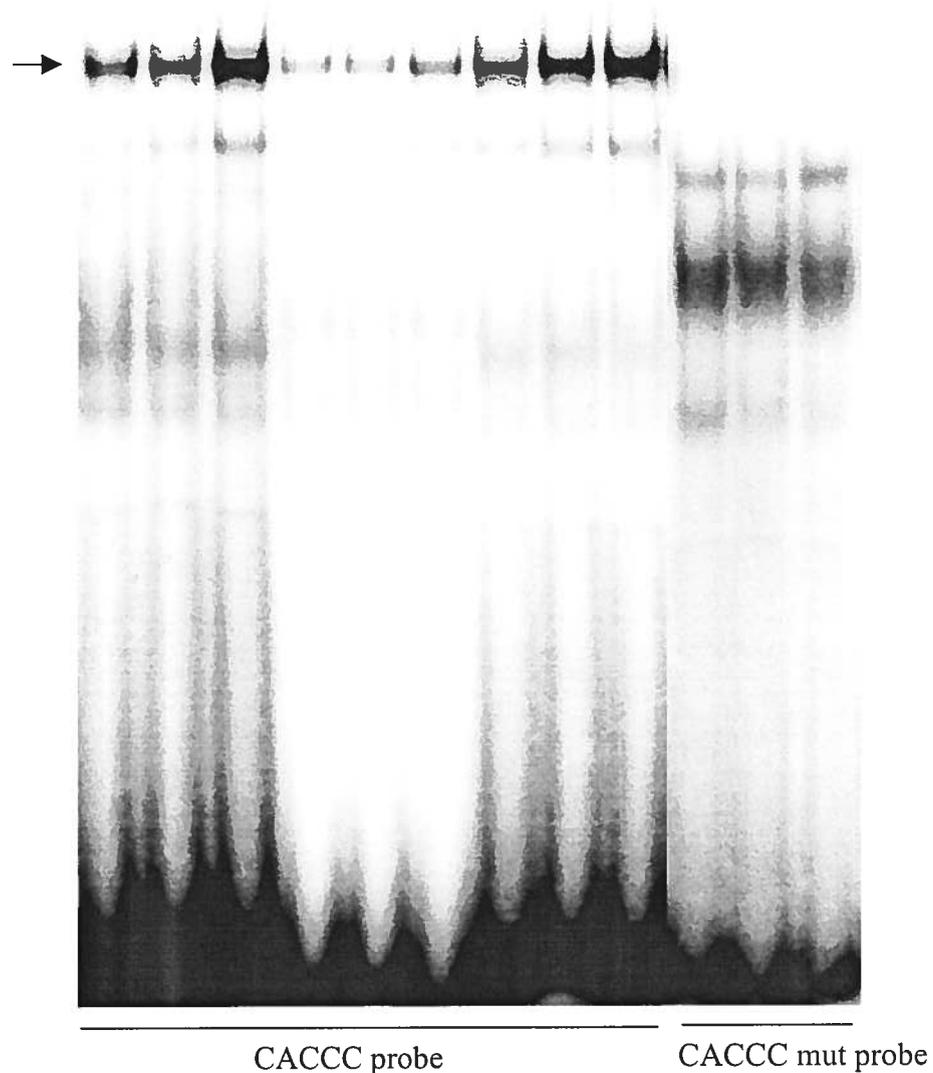


Figure 2.8 FKLF-2 binds specifically to the CACCC box of the BNP promoter. EMSA studies were carried out with the ^{32}P -radiolabelled proximal BNP probe wild type WT (ATAAC**CCC**CACCCCTACTC) or mutated (ATAATCCTACTCTCCTACTC). The CACCC box is represented in bold and the mutated base pairs are underlined. Nuclear extracts (3 μg) from transfected P19 cells were incubated with the WT labelled probe. The WT probe was competed with 100 fold molar excess of the same WT cold oligonucleotide (self competition) or with 100 fold molar excess of the CACCC mutated oligonucleotide. Nuclear extracts (3 μg) from transfected P19 cells were also incubated with the mutated probe which failed to bind the protein with the same pattern as the WT.

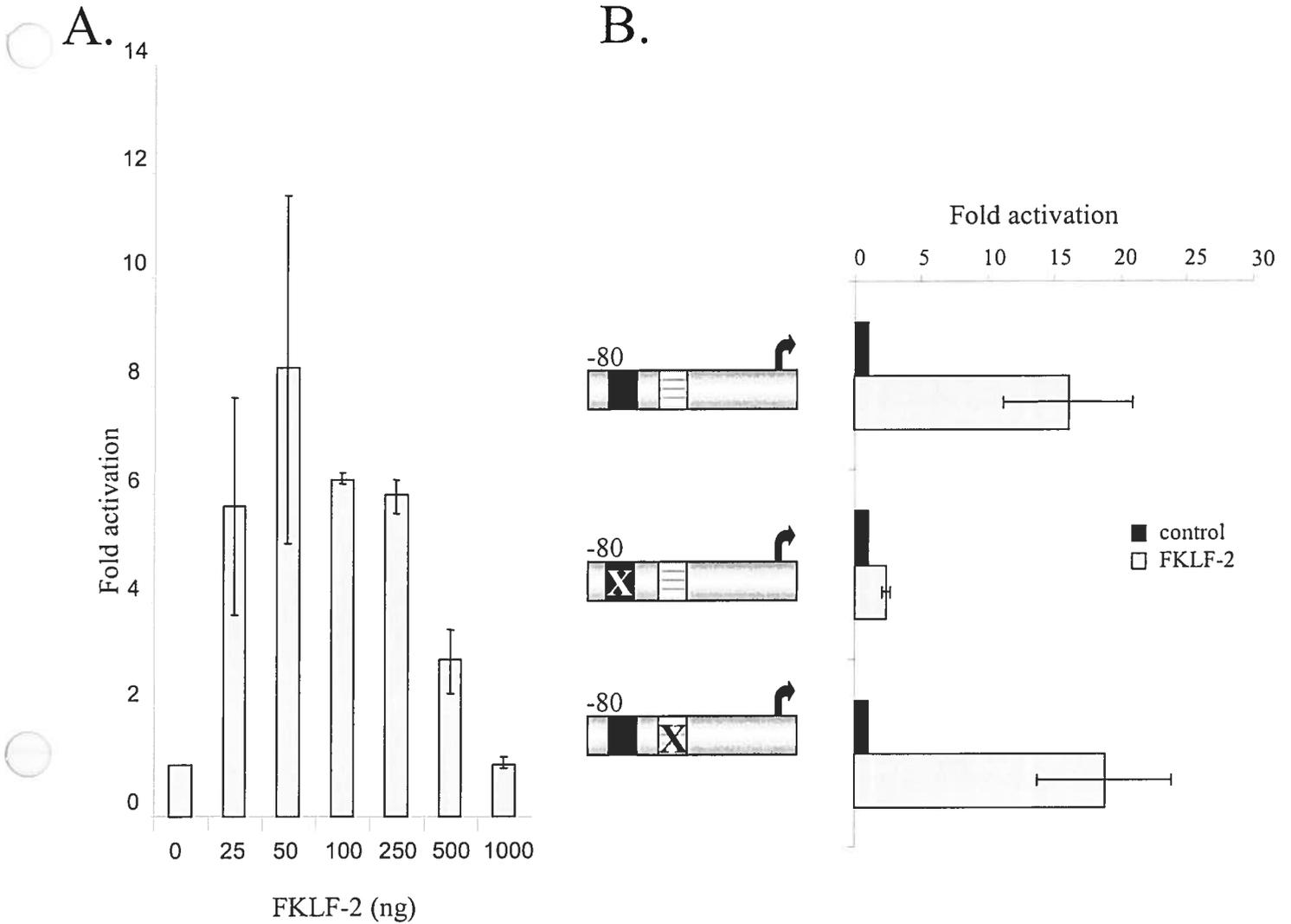


Figure 2.9 FKLF-2 activates the BNP promoter through the CACCC motif. (A) FKLF-2 activates the rBNP proximal promoter in a dose-dependent manner. Transient transfections were done in P19 cells. (B) Schematic representation of the proximal rBNP constructs are shown on the left, the black box represents the CACCCC site, the striped box represents the YY1 site and the X shows a mutation at the site. FKLF-2 (50 ng) was transfected with 1.5 μ g of proximal rBNP and the total amount of DNA was kept constant at 1.6 μ g/well. The results shown are from one representative experiment out of 3 different experiments each done in duplicate.

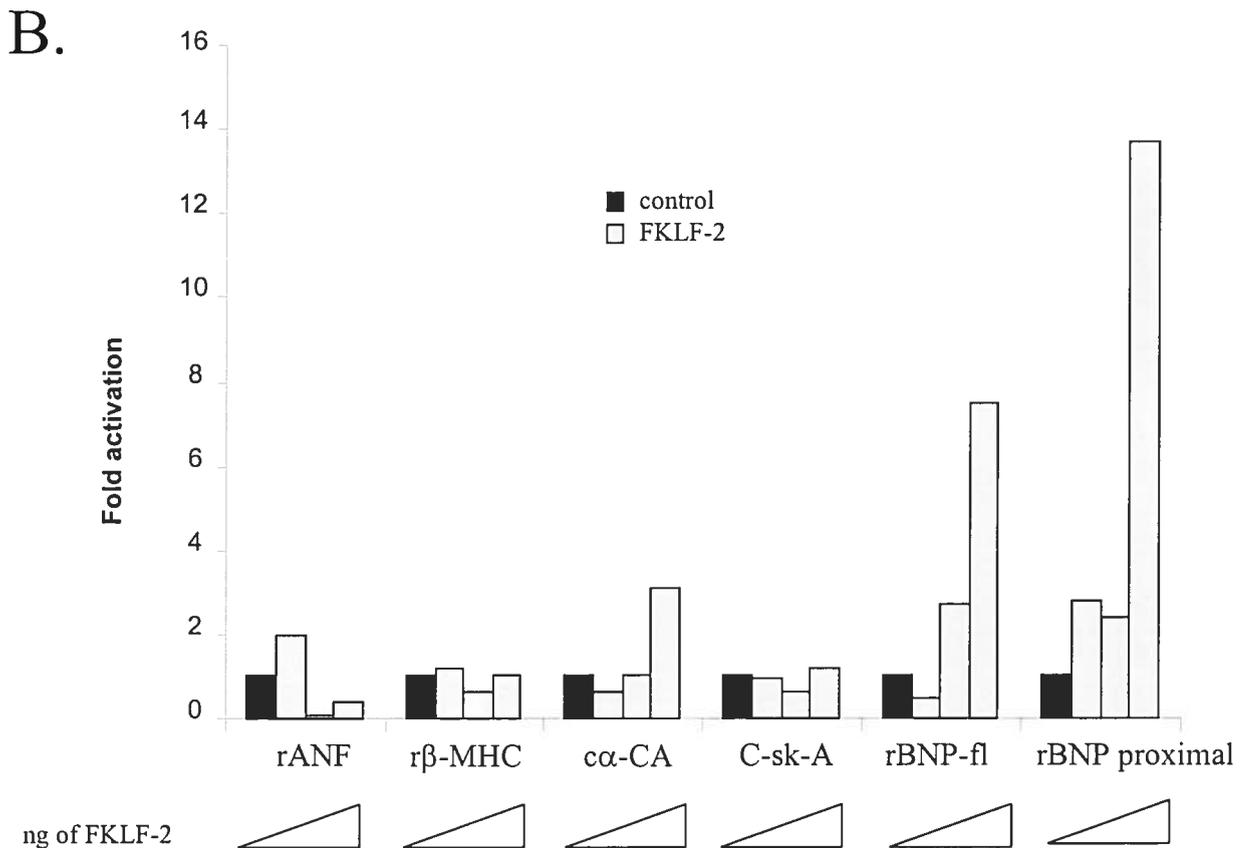
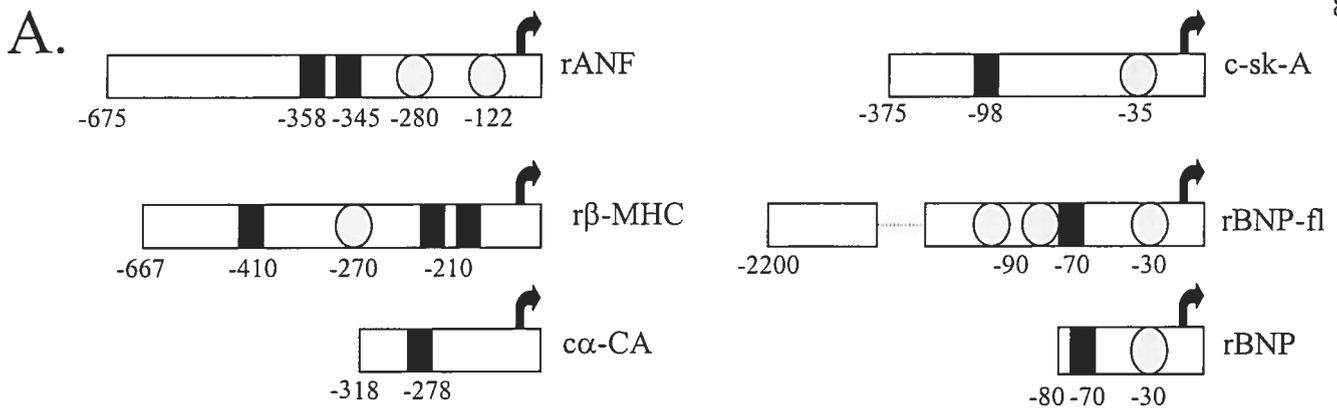


Figure 2.10 FKL2 can activate other cardiac promoters but to a lesser extent than the BNP promoter. (A) Schematic representations of different cardiac promoters used in transfections: rANF; rat a-type natriuretic peptide, rβ-MHC; rat β-myosin heavy chain, α-CA; chicken cardiac actin, c-sk-A; chicken skeletal actin, rBNP-fl; BNP full length and rBNP proximal. They all contain at least one CACCC site represented by a black box. The circles show the GATA motifs. (B) Transfections were done as described in material and methods with 1.5 μg of reporter genes in P19 cells. Each reporter was transfected with 25 ng, 50 ng and 100 ng of FKL2 and the total amount of DNA was kept constant for each well. This is one representative experiment out of three experiments each done in duplicate.

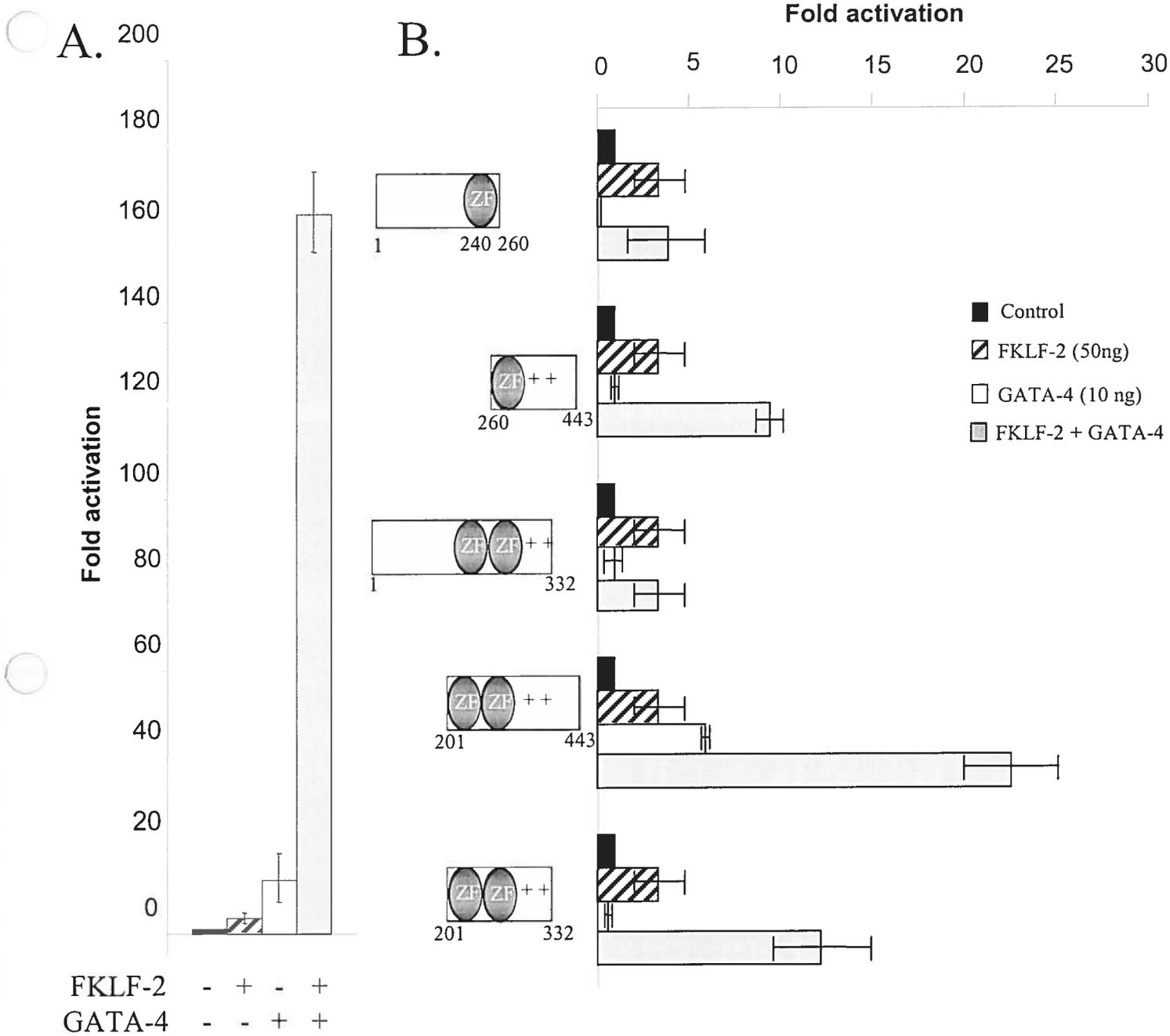


Figure 2.11 FKLF-2 acts synergistically with GATA-4 to activate the wild type proximal rBNP promoter. (A) In P19 cells, 1.5 μ g of the wild type proximal reporter rBNP luciferase is transfected with 50 ng of FKLF-2 alone, 10 ng of GATA-4 alone or both. The total amount of DNA was kept constant at 1.6 μ g. (B) The rBNP promoter is transfected either with FKLF-2 or with the different constructs of GATA-4 or with both activators. The different GATA-4 constructs are indicated beside the graph, the circles represent the zinc fingers and the ++, the basic domain. The data shown are the mean of four different experiments done in duplicate.

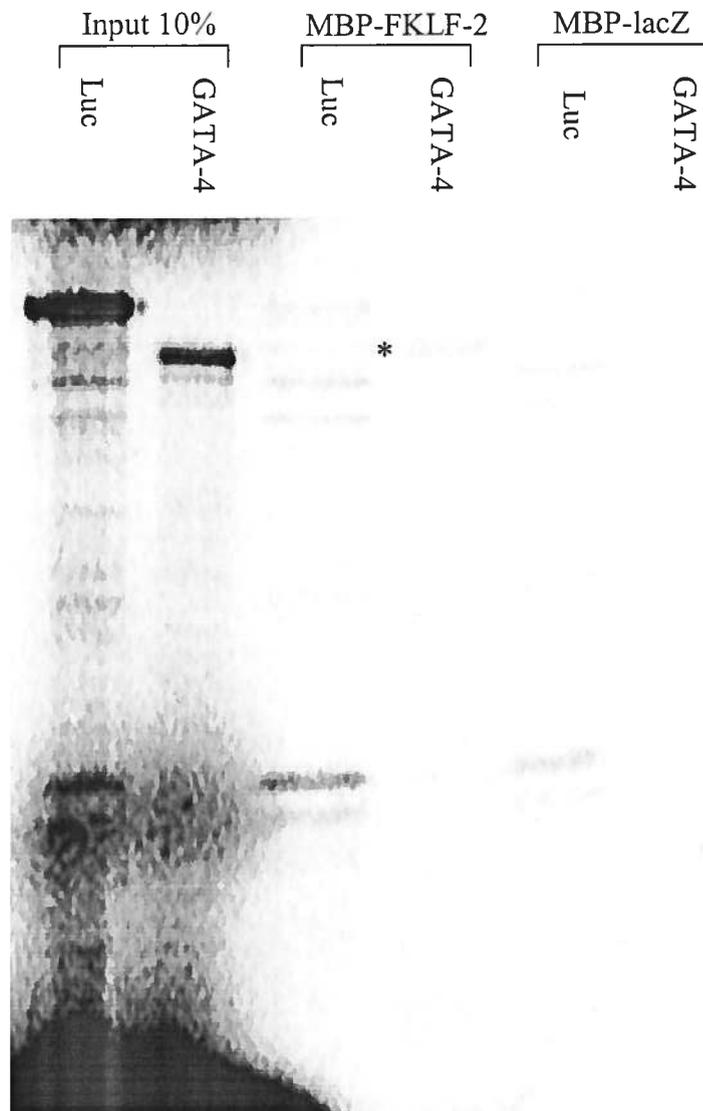


Figure 2.12 FKLF-2 physically interacts with GATA-4. LacZ and FKLF-2 fused with MBP were bacterially produced. MBP fusion proteins immobilized on amylose-beads were incubated with *in vitro* translation of ^{35}S -labelled of GATA-4 or luciferase (Luc). Protein complexes were analyzed on a SDS-PAGE gel. The asterix represents the interaction between GATA-4 and FKLF-2.

Discussion

Le développement cardiaque nécessite la mise en place d'un programme génétique précis tant spatialement que temporellement. Ce contrôle génique se fait principalement par le biais de facteurs de transcription dont l'expression est spécifique, ou du moins enrichie, dans les cellules cardiaques. Malgré la percée des dernières années au niveau de la compréhension des mécanismes moléculaires régulant le développement cardiaque, peu de facteurs de transcription spécifiques à la cardiogenèse ont été identifiés. L'étude des éléments *cis*-régulateurs s'est souvent avérée très utile pour l'identification de facteurs de transcription histo-spécifiques. Au niveau cardiaque, l'analyse du promoteur BNP a révélé le rôle important des membres de la famille GATA dans la régulation des gènes et du développement cardiaques.⁴⁰ Le promoteur proximal du BNP, qui est suffisant pour diriger son expression dans les cardiomyocytes, contient plusieurs régions *cis*-régulatrices dont une boîte CACCC. Le but de mon projet de recherche a été d'établir le rôle de cet élément dans la transcription du gène BNP et de caractériser la protéine qui s'y lie. Nous avons montré que la boîte CACCC est importante pour l'activité cardiaque du promoteur BNP et que son rôle est plus marqué dans les oreillettes que dans les ventricules. De plus, nous avons identifié FKLf-2, un membre de la famille XKLF, comme régulateur du gène BNP via la boîte CACCC. L'expression prédominante de FKLf-2 dans le cœur durant l'embryogenèse et sa capacité à réguler des gènes cardiaques suggèrent un rôle important dans la cardiogenèse.

XKLFs dans le développement cardiaque

Les transcrits de quatre membres de la famille XKLF soit GKLF, BKLF, LKLF et FKLf-2, sont présents dans le cœur adulte mais aucune étude n'a examiné leur expression spatio-temporelle ou leur rôle au cours de la cardiogenèse. Par ailleurs, leur expression a été analysée sur l'ARN de cœur entier, ce qui n'identifie pas les types cellulaires exprimant les XKLFs. Pour préciser leur expression cardiaque, nous avons, dans un premier temps, vérifié leur présence dans les cardiomyocytes en effectuant des RT-PCR sur de l'ADNc provenant de cultures primaires de cardiomyocytes de rats post-nataux. Dans un deuxième temps, nous avons analysé l'expression de l'un des membres, soit FKLf-2, dans le cœur

durant l'embryogenèse car son expression semblait prédominante dans les muscles squelettiques et cardiaques ainsi que dans la moelle osseuse.¹¹⁹ Il a été montré précédemment que le transcrite de FKLF-2 est présent tôt dans le développement.¹⁶⁴ En effet, des études d'hybridation *in situ* ont révélé que l'ARNm de FKLF-2 est détecté du jour E8 jusqu'au jour E16 dans la plupart des organes y compris le cœur; l'expression de l'ARNm de FKLF-2 est prédominante dans le cœur au jour E11 alors que par la suite, la détection maximale de FKLF-2 se fait dans le cerveau.¹⁶⁴ L'interprétation de ce patron d'expression est compliquée par la présence de divers membres de la famille possédant de grandes homologies de séquences. De plus, la présence de l'ARNm n'indique pas nécessairement la présence de la protéine. Nous avons donc privilégié l'approche immunohistologique sur des coupes d'embryons de différents jours pour déterminer l'ontogenèse de FKLF-2. Un anticorps généré contre la partie la plus variable, soit le N-terminal de FKLF-2, a été utilisé au cours de cette étude. Cet anticorps a été démontré comme spécifique à FKLF-2 et ne semble pas reconnaître GKLF. Pour clairement démontrer qu'il n'y a pas de réaction croisée avec GKLF, il aurait fallu montrer par transfert de Western que le niveau de surexpression de la protéine GKLF est équivalent à celui de FKLF-2. Les tests de pré-absorption avec le N-terminal de FKLF-2 éliminaient tout signal sur les coupes histologiques, ce qui démontre bien la spécificité de l'anticorps (résultats non montrés).

La protéine FKLF-2 a une expression prédominante dans le cœur à tous les stades embryonnaires testés, c'est-à-dire aux jours E9.5, E10.5, E11.5, E12.5 et E14.5. L'expression cardiaque plus spécifique de la protéine par rapport à l'ARNm pourrait suggérer une régulation post-transcriptionnelle de FKLF-2 dans les différents types cellulaires. Les oreillettes et les ventricules en formation expriment la protéine tant du côté gauche que droit. Ce patron d'expression ne suggère pas, à priori, une implication de FKLF-2 dans la compartimentation atrio-ventriculaire du cœur ni dans la formation de l'axe gauche-droit. De plus, les coussins cardiaques expriment fortement la protéine FKLF-2. Les coussins cardiaques vont se différencier en valves et en septum atrioventriculaires²⁻⁴ qui eux aussi expriment clairement FKLF-2. Ce patron d'expression suggère un rôle important de FKLF-2 dans la différenciation du tissu mésenchymateux en valves. A cet égard, il est intéressant de noter qu'un autre membre de la famille, GKLF, a été associé à la différenciation de cellules mésenchymateuses. Durant le développement,

l'ARNm de GKLf est exprimé dans les cellules mésenchymateuses qui se différencieront en cartilage squelettique et en reins.¹⁵⁵ L'expression diminuée du transcrit de GKLf dans ces organes à l'âge adulte suggère un rôle au niveau de la prolifération et/ou différenciation précoce de ces cellules. L'implication dans la différenciation des cellules mésenchymateuses pourrait être conservée entre les membres de la famille XKLF. Cependant, contrairement à GKLf dont l'expression disparaît après la différenciation des cellules mésenchymateuses, l'expression de FKLF-2 persiste dans les parties du cœur dérivées du tissu mésenchymateux, ce qui laisse présager une fonction dans le maintien des cellules différenciées.

En plus d'être exprimée durant le développement cardiaque, la protéine FKLF-2 est également présente dans le cœur adulte. Son expression est répandue à travers le cœur. Les oreillettes et les ventricules gauches et droits expriment FKLF-2. Au niveau des ventricules, son expression est très marquée dans le septum atrioventriculaire, le myocarde et les valves. Ces études d'immunohistologie ont établi le patron d'expression spatio-temporel du facteur de transcription FKLF-2 tout en lui suggérant un rôle dans la formation et la fonction cardiaques.

Malformations des valves cardiaques

Chez l'humain, la majorité des défauts cardiaques congénitaux est reliée à la malformation des valves et des membranes des septum.¹⁶⁷ Jusqu'à présent, aucun gène ou facteur de transcription n'a été identifié comme responsable des malformations valvaires chez l'humain. Seulement quelques protéines sont exprimées uniquement dans le canal atrioventriculaire, où sont situées les cellules mésenchymateuses cardiaques, comme TGF- β (facteur de croissance transformant-bêta), BMP-4 et la protéine à homéodomaine msx-2. Cependant, aucune de ces protéines n'est associée à la malformation des valves et leur rôle dans la valvulogenèse demeure incertain.¹⁶⁷ Certains facteurs de transcription sont aussi exprimés dans les cellules précurseurs des valves et des septum et au moins l'un d'entre eux, le facteur de transcription FKHL7 (forkhead-like 7), a été génétiquement impliqué dans la formation des valves et du septum auriculaire.¹⁶⁸ En effet, les patients atteints du syndrome autosomique dominant Axenfed-Rieger ont des malformations oculaires et certains développent également des malformations au niveau des valves et du septum

auriculaire. Les patients avec des problèmes aux yeux et aux valves ont une mutation dans FKHL7 mais le nombre de patients étudiés est trop petit pour confirmer statistiquement que la mutation dans ce facteur de transcription est la cause des malformations. Même si le rôle exact de FKHL7 n'est pas encore établi, il est intéressant de noter que le transcrit de l'homologue de FKHL7 chez la souris, Mfl, est aussi présent dans les coussins cardiaques ainsi que dans le septum auriculaire durant le développement.¹⁶⁸ Un autre facteur de transcription, NF-Atc, est également un candidat potentiel dans le développement valvaire puisqu'il est exprimé dans les valves et que son inactivation chez la souris empêche la formation des valves et du septum.^{75;169} Par contre, le lien entre NF-Atc et les malformations congénitales chez l'humain n'est pas connu.

Le patron d'expression de FKLF-2 dans les coussins cardiaques et les valves atrioventriculaires laisse présager un rôle de FKLF-2 dans leur formation. Il serait intéressant d'examiner, chez les patients atteints de malformations valvaires, la séquence du gène FKLF-2 afin de déterminer si des mutations de FKLF-2 sont associées à des malformations valvaires. La compréhension de la base génétique des maladies congénitales des valves aiderait grandement à prévenir les problèmes cardiaques dégénératifs causés par des malformations valvulaires qui ne sont mis à jour que trop tard.

Conservation des Krüppel à travers les espèces

Les protéines Krüppel sont conservées chez plusieurs espèces, elles se retrouvent de la levure aux mammifères.⁹⁹ Chez tous les organismes étudiés, elles exercent des rôles importants durant le développement. Une conservation entre les différentes espèces montre bien l'importance des XKLFs pour les fonctions vitales de l'organisme; de plus, il semble y avoir une évolution entre les espèces par la duplication de ces gènes. Dans les organismes inférieurs, peu de XKLFs sont identifiés tandis que chez les mammifères, comme la souris et l'humain, 17 membres sont connus.

Les facteurs de transcription de la famille XKLF doivent leur nom à la protéine *Krüppel* retrouvée chez la drosophile. *Krüppel* a été montrée nécessaire au développement de l'abdomen de la mouche.^{170;171} La drosophile exprime également les facteurs de

transcription *Buttonhead* et *D-Sp1*. Ce dernier est très similaire fonctionnellement et structurellement à la protéine Sp1 chez l'humain^{172;173} tandis que *Buttonhead* a 66% d'homologie avec FKLf-2 (Pubmed unigène). Des études de mutations ont montré que *Buttonhead* et *D-Sp1* sont tous les deux requis pour le développement des antennes et qu'en plus *Buttonhead* est nécessaire à la formation des segments de la mandibule et ceux intercalaires.^{172;173} Les membres de la famille XKLF présents chez la drosophile jouent donc un rôle clé durant le développement.

Chez la levure *Saccharomyce cerevisiae*, il y a deux facteurs de transcription similaires, Mig1p et Mig2p, qui contiennent les deux premiers doigts de zinc de la famille XKLF et qui régulent les gènes via des régions riches en GC.^{174;175} Ils sont impliqués dans la répression du glucose pour favoriser l'utilisation d'autres sources de carbone et jouent ainsi un rôle important dans la survie de la levure. Un autre facteur de transcription de type XKLF a été identifié chez la levure, Azf1 (Asparagine zinc finger protein) qui est homologue à FKLf-2 à 40%¹⁷⁶(Pubmed unigene). Azf1 est une protéine nucléaire qui active la cycline CLN3 qui est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire; une forte expression de CLN3 diminue la durée de la phase G1.¹⁷⁷ Azf1 est hautement régulé et son expression est augmentée dans les milieux de glucose.^{177;176} Dans les environnements riches en glucose, Azf1 augmente l'activation de CLN3 qui à son tour rend la phase G1 plus courte et permet à la levure de passer plus rapidement à travers le cycle cellulaire pour obtenir une croissance plus accélérée. En contrôlant CLN3, Azf1 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire chez la levure.

Les XKLFs sont également présents chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Mua-1 est un membre de la famille impliqué dans le bon positionnement des muscles et dans l'attachement du nerf ventral durant le développement.^{178;178} Une protéine, ZK858.4, homologue à FKLf-2 à 66% est aussi présente chez le nématode (Pubmed unigene). Elle semble être un facteur de transcription et l'inactivation de cette protéine par interférence avec l'ARNm est létale à l'étape embryonnaire, ce qui suggère un rôle primordial de ZK858.4 dans le développement.¹⁷⁹

Chez le poisson *Danio rerio*, cinq membres de la famille XKLFs ont été isolés à partir d'une librairie de cDNA de reins.¹⁸⁰ Trois des protéines identifiées, Klf2a, Klf2b et

Klf4, sont des orthologues de LKLF. Ces trois orthologues sont présents dans le système hématopoïétique en développement, ce qui suggère une conservation de la fonction des XKLFs dans la formation des cellules sanguines.¹⁸⁰ Le rôle de Klf4 dans la formation du système hématopoïétique a été analysé par inactivation de la protéine à l'aide de morpholinogènes; l'absence de Klf4 entraîne une diminution du nombre de cellules sanguines chez le poisson.¹⁸¹ Cette baisse de cellules sanguines peut s'expliquer par le fait que Klf4 est un activateur des gènes GATA-1 et globine- β , deux joueurs importants du système hématopoïétique.¹⁸¹ Chez l'amphibien *Xenopus laevis*, le système érythroïde est également sous la régulation d'un facteur de transcription de la famille XKLF. Ce facteur, *neptune*, a une grande homologie avec les membres LKLF et GKLF et il est fortement exprimé dans les îlots de sang ventraux.¹⁸² *Neptune* interagit avec xGATA-1, l'homologue de GATA-1 chez la grenouille, pour activer le gène de la globine.¹⁸² Les systèmes érythroïdes des poissons, des grenouilles et des mammifères sont donc sous le contrôle des XKLFs.

Chez les mammifères, la famille grandissante des XKLF comprend 17 membres et ces protéines sont impliquées autant dans la différenciation et la prolifération cellulaires que dans la régulation du cycle cellulaire et l'oncogenèse.¹⁰⁵ Selon des études d'inactivation génique chez la souris, plusieurs facteurs XKLFs sont nécessaires à des stades très précoces du développement (voir Introduction). FKLf-2 est un nouveau membre de la famille et son rôle dans l'embryogenèse n'a pas encore été défini. Dans les organismes inférieurs, les protéines ayant une grande homologie avec FKLf-2 semblent être impliquées dans le développement. Puisque FKLf-2 est exprimé de façon prédominante et précocement dans le cœur, cela suggère un rôle important lors du développement cardiaque. La fonction de FKLf-2 au niveau de la transcription cardiaque a été investiguée au cours de ce projet de recherche.

Régulation transcriptionnelle du gène BNP

Le BNP est une hormone cardiaque importante dans la régulation de la pression artérielle. L'expression du gène BNP est hautement régulée au cours du développement embryonnaire et post-natal. De plus, son expression diminuée chez l'adulte augmente lors de l'hypertrophie ventriculaire ainsi qu'en réponse à divers stress cardiaques. Ces

modulations se font essentiellement au niveau transcriptionnel. Le promoteur du gène BNP comprend plusieurs éléments *cis*-régulateurs qui sont ciblés par diverses classes de facteurs de transcription. Ces derniers incluent les membres de la famille GATA (GATA-4/6), la famille NK (Nkx2.5), les protéines NF-AT et la famille Krüppel (YY1).^{39;40;46;77;183} Il est intéressant de noter que tous ces facteurs de transcription sont des régulateurs clé du développement cardiaque (voir Introduction). Le promoteur proximal de BNP contient, entre autres, un site CTCCAT qui lie la protéine YY1, un facteur qui peut activer ou réprimer la transcription et qui, dans le cas de BNP, agit comme activateur.⁴⁶ Entre le site de YY1 et les sites GATA, se trouve un élément CACCC conservé, dont le rôle dans la régulation de BNP restait à élucider. Dans la présente étude, nous avons montré que le site CACCC est un nouvel élément *cis*-régulateur important pour la transcription du gène BNP. En effet, la boîte CACCC est nécessaire à l'expression maximale de BNP dans les cardiomyocytes de rats post-natals. En plus du BNP, d'autres promoteurs cardiaques tels l'ANF, la troponine cardiaque, l'actine cardiaque alpha et la chaîne bêta lourde de la myosine possèdent une boîte CACCC. Dans le cas du promoteur de la troponine cardiaque, lorsque la boîte CACCC est mutée, l'activité transcriptionnelle dans les cardiomyocytes est diminuée.¹⁸⁴ De plus, cet élément régulateur est directement lié par quatre différents facteurs présents dans les extraits nucléaires de cardiomyocytes dont les facteurs ubiquitaires Sp1 et Sp3.¹⁸⁵ En effet, Sp1 régule la transcription des gènes via des régions riches en GC et via des boîtes CACCC.¹²³ Dans le système érythroïde, Sp1 active le gène de la globine en liant la boîte CACCC.⁵⁴ Cette activation est potentialisée par une interaction directe avec GATA-1.⁹⁷ En plus du gène de la globine, les éléments *cis*-régulateurs GATA et CACCC sont essentiels à l'expression d'autres gènes hématopoïétiques dont GATA-1 et un récepteur des lymphocytes T.^{96;186} Les éléments GATA et CACCC se retrouvent également dans les promoteurs cardiaques. Il est intrigant de constater que l'organisation des éléments régulateurs sur les promoteurs de gènes hématopoïétiques et cardiaques sont similaires et qu'ils sont contrôlés par des protéines de la même famille mais qu'ils sont exprimés dans différents tissus. Ceci soulève la question de la spécificité tissulaire de ces promoteurs. Il est évidemment possible que des éléments régulateurs voisins, qui restent à identifier, dirigent l'expression de manière tissu-spécifique. Il se peut également que le patron d'expression spécifique à chaque promoteur soit dû à l'interaction des différents membres de la famille GATA ou XKLF, à

des co-activateurs ou des co-répresseurs qui sont eux-mêmes histo-spécifiques ou qui interagissent de façon différentielle avec les parties variables des différentes protéines.

Le promoteur proximal du BNP contient les sites GATA et CTCCAT nécessaires à son activité maximale dans les cardiomyocytes et qui lient respectivement GATA-4 et YY1.^{40;46} Ces deux facteurs de transcription coopèrent dans l'activation du gène BNP, cependant, cette interaction fonctionnelle n'implique pas une liaison directe entre les deux facteurs de transcription.⁴⁶ La régulation du gène BNP par FKLF-2 via la boîte CACCC permet de proposer une hypothèse sur le modèle d'interaction entre GATA-4 et YY1. En effet, nous avons démontré que FKLF-2 lie et active le promoteur du BNP via la boîte CACCC et que cette activation est potentialisée par une interaction directe avec GATA-4. D'autre part, il est connu que les membres de la famille XKLF interagissent physiquement entre eux via leurs doigts de zinc.⁹⁸ Il est donc possible que FKLF-2 serve d'échafaud et qu'il permette la formation d'un complexe contenant GATA-4 et YY1 favorisant ainsi l'interaction des trois facteurs de transcription. Il serait donc intéressant de tester si FKLF-2 et YY1 peuvent agir de concert pour activer le promoteur du BNP ou si ces deux facteurs de transcription entrent en compétition pour lier l'ADN et/ou interagir avec GATA-4.

Enfin, notre étude a montré que le site CACCC est un élément important pour la transcription histo-spécifique du BNP, par contre, son rôle dans la régulation transcriptionnelle en réponse à divers stress ou stimuli n'a pas été abordé. A cet égard, il est intéressant de noter que dans les fibroblastes cardiaques, la stimulation à l'angiotensine II, une hormone qui induit le gène BNP ainsi que l'hypertrophie cardiaque, augmente la concentration d'IKLF.¹⁰⁹ Le mécanisme de cette induction n'est pas connu mais suggère que la famille XKLF pourrait être impliquée dans la reprogrammation génique qui caractérise l'hypertrophie cardiaque. Il est donc possible que la boîte CACCC soit un élément régulateur qui est impliqué dans l'induction du BNP associée à l'hypertrophie cardiaque.

Régulation des gènes par les XKLFs

Tel que décrit dans l'Introduction, les XKLFs régulent les gènes en se liant à la boîte CACCC ou à des régions riches en GC et sont impliqués dans l'embryogenèse.^{99;103;105;123} Le membre fondateur de la famille, EKLF, ainsi que BKLF semblent importants pour le développement du système hématopoïétique.^{113;124} GKLF est essentiel pour la différenciation finale des cellules de l'épiderme¹¹⁴ tandis que LKLF est nécessaire au développement du système vasculaire.¹¹⁷ Parmi les quatre XKLFs exprimés dans le cœur, soit GKLF, LKLF, BKLF et FKLF-2, seulement FKLF-2 n'a pas encore de rôle connu *in vivo*.

Rôles fonctionnels de FKLF-2

FKLF-2 a un patron d'expression similaire au BNP durant le développement cardiaque et en plus, la boîte CACCC semble être un élément important dans la régulation de BNP. Pour vérifier si FKLF-2 est un facteur de transcription régulant le gène BNP, des transfections ont été faites dans les cellules embryonnaires P19 qui ont la capacité de se différencier en cardiomyocytes lorsqu'elles sont induites par le DMSO. Les études ont été faites dans ces cellules puisque c'est la lignée cellulaire testée qui contient le moins de XKLFs endogènes (résultats non montrés). Les autres lignées testées étaient les NIH 3T3, 293 T, HeLa, C2C12 et CV1. Elles contiennent toutes des protéines ayant la capacité de lier la sonde CACCC du BNP. Les XKLFs se retrouvent dans la majorité des tissus et dans toutes les lignées cellulaires provenant de mammifères. En effet, le facteur Sp1 qui fait parti de la grande famille des Krüppel est capable de lier les sites CACCC et son expression est ubiquitaire.¹²³ La présence de XKLFs endogènes peut fausser les résultats des expériences effectuées, il est donc important de travailler avec des modèles contenant peu de XKLFs. Dans les cellules P19, il y a des protéines nucléaires qui peuvent lier la boîte CACCC de BNP mais en moins grande quantité que dans les autres lignées cellulaires. Par contre, ces protéines et leurs effets sur les XKLFs étudiés ne sont pas connus. Selon les transferts de Western effectués, les cellules P19 non-différenciées n'expriment pas de façon endogène la protéine FKLF-2. Il serait intéressant de traiter les cellules P19 avec du DMSO pour induire leur différenciation en cellules cardiaques et de vérifier le niveau

d'expression de la protéine FKLF-2 endogène. Il est fort probable que la protéine FKLF-2 puisse être détectée dans les P19 différenciées à l'aide du DMSO puisqu'elle est présente de façon endogène dans les cultures de cardiomyocytes de rats post-nataux et dans les cellules cardiaques de souris.

Dans les cellules P19, l'activité du promoteur BNP est augmentée lorsqu'il y a ajout de FKLF-2. En mutant ou en enlevant l'élément CACCC, FKLF-2 n'est plus en mesure d'activer le BNP. Cela confirme le rôle activateur de FKLF-2 via la boîte CACCC. Pour déterminer si cette activation était le fruit d'un contact direct entre le promoteur de BNP et FKLF-2 ou si l'effet produit était indirect, des études de retard sur gel ont été faites. Ces études montrent que FKLF-2 lie directement le site CACCC de BNP. Ainsi, FKLF-2 active les gènes par sa liaison à l'élément *cis*-régulateur CACCC. La spécificité de la liaison entre FKLF-2 et l'ADN a été démontrée par des études de compétition. La protéine FKLF-2 surexprimée dans les cellules P19 est marquée à l'extrémité de sa partie N-terminale avec l'épitope HA. Les anticorps anti-HA et anti-FKLF-2 ont été pré-incubés avec les extraits nucléaires et ils ont ensuite été mis en présence de la sonde contenant le site CACCC de BNP. Aucun des deux anticorps n'est parvenu à ralentir la migration du complexe formé par la sonde et la protéine FKLF-2 ou à empêcher la liaison entre la boîte CACCC et FKLF-2 (résultats non montrés). Les deux anticorps sont dirigés contre la partie N-terminale de FKLF-2 et les deux ne sont pas en mesure de reconnaître cette partie lorsque FKLF-2 interagit avec l'ADN. Il est donc probable que l'interaction de FKLF-2 avec l'ADN masque sa partie N-terminale empêchant ainsi les anticorps de reconnaître FKLF-2. Il serait intéressant d'investiguer si un anticorps dirigé contre les 88 derniers acides aminés en C-terminal de FKLF-2, situés après les doigts de zinc, pourrait reconnaître spécifiquement la protéine liée à l'ADN. Vu que des extraits de cellules de mammifères surexprimant FKLF-2 ont été analysés, il est aussi possible que des co-facteurs endogènes soient recrutés à la partie N-terminale de FKLF-2 une fois la protéine associée à l'ADN. Pour tester cette hypothèse, des études de retard sur gel pourraient être faites avec une protéine recombinante produite chez la bactérie, telle une fusion MBP-FKLF-2. Il serait également intéressant de vérifier si FKLF-2 lie le site CACCC de BNP *in vivo* par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) en utilisant des extraits nucléaires de cardiomyocytes. De plus, cette technique nous permettrait de connaître les autres cibles

d'interaction de FKLF-2 et de tester si ces cibles sont les mêmes dans les oreillettes et dans les ventricules.

Pour investiguer si FKLF-2 peut avoir une fonction dans le cœur, la présence de la protéine a été détectée par transfert de Western. FKLF-2 est exprimée dans les ventricules et les oreillettes adultes mais son expression est prédominante dans les oreillettes. Cela corrèle avec les résultats des études de transfections dans les cardiomyocytes de rats post-natals qui montrent que l'activité de la boîte CACCC est plus importante dans les oreillettes que dans les ventricules. En ayant plus de protéine FKLF-2 endogène dans les oreillettes, il est normal que l'expression de BNP soit plus affectée par la mutation ou la délétion de la boîte CACCC dans les oreillettes que dans les ventricules. De plus, dans les oreillettes, deux bandes apparaissent lorsque FKLF-2 est détecté tandis qu'une seule bande est visible dans les ventricules. La deuxième bande n'a pas encore été identifiée mais, comme il a déjà été montré que FKLF-2 peut être phosphorylé,¹²¹ il est fort probable que ce soit des formes plus ou moins phosphorylées de FKLF-2 qui sont détectées par l'anticorps. Pour déterminer la fonction de FKLF-2 dans les cellules cardiaques, des transfections dans des cultures primaires de cardiomyocytes de rats âgés de quatre jours ont été effectuées. Dans les oreillettes, FKLF-2 active le promoteur de BNP via le site CACCC tandis qu'il n'a aucun effet sur l'activité de BNP dans les ventricules. Ce résultat est surprenant puisqu'il y a plus de FKLF-2 endogène dans les oreillettes que dans les ventricules, le promoteur de BNP doit donc être plus activé à l'état basal dans les oreillettes que dans les ventricules. Cela suggère que FKLF-2 agit de concert avec un co-activateur présent dans les oreillettes mais pas dans les ventricules ou qu'il y a un co-répresseur dans les ventricules. Pour trouver le co-facteur de FKLF-2 dans les cellules cardiaques des expériences de double hybride pourraient être effectuées ou encore les complexes FKLF-2 pourraient être isolés et les composantes identifiées par spectrométrie de masse.

Spécificité ou redondance des XKLFs

Malgré l'expression tissu-spécifique de la majorité des XKLFs, certains tissus expriment plusieurs XKLFs. Les mécanismes par lesquels les XKLFs interagissent entre eux et régulent les gènes ne sont pas bien étudiés. Le système hématopoïétique semble être

un bon modèle pour la compréhension des XKLFs puisque le système érythroïde et les lymphocytes T expriment plusieurs XKLFs dans les mêmes types cellulaires.

Système érythroïde

La dissection génique de la différenciation hématopoïétique a grandement contribué à la compréhension de la régulation génique par les XKLFs. En effet, les souris n'exprimant pas EKLF meurent au jour E15 à cause d'une β -thalassémie sévère.^{106;107} De plus, chez ces souris, l'expression de BKLF est diminuée, ce qui suggère une relation entre les deux membres de la famille XKLF dans une boucle de rétroaction.¹⁸⁷ Dans ce mécanisme, EKLF active les gènes érythroïdes tandis que BKLF les réprime. EKLF activerait les gènes hématopoïétiques mais en même temps il augmenterait l'expression de BKLF. À son tour, BKLF réprimerait les gènes activés par EKLF pour garder une balance dans l'activation des promoteurs. EKLF et BKLF sont présents dans les mêmes types cellulaires mais EKLF a une meilleure affinité pour les sites CACCC de la globine adulte bêta tandis que BKLF lie mieux la globine fœtale gamma.^{112;124} EKLF semble donc important pour la régulation de la globine adulte tandis que BKLF est nécessaire à la globine fœtale. Ainsi, la différence dans l'affinité de ces deux facteurs de transcription aux sites CACCC joue un rôle important dans le développement et le maintien des cellules hématopoïétiques et peut également expliquer en partie la spécificité des XKLFs.

En plus d'interagir avec BKLF, EKLF agit de concert avec un facteur de transcription à deux doigts de zinc de la famille GATA, soit GATA-1. Sur le promoteur de la globine, il y a deux sites GATA à proximité d'un site CACCC. GATA-1 active le gène de la globine en se liant aux sites GATA.^{188;189} GATA-1 régule aussi la globine en interagissant physiquement et fonctionnellement avec EKLF.⁹⁷ Le complexe formé par GATA-1 et EKLF peut activer le gène de la globine. Cette structure de promoteur est retrouvée dans d'autres systèmes en particulier dans les lymphocytes T et dans les cellules cardiaques.

Lymphocytes T

Les lymphocytes T forment une ligne de défense importante pour l'organisme. Ces cellules immunitaires reconnaissent les antigènes situés à la surface des molécules étrangères et éliminent ces dernières.¹⁹⁰ Pour atteindre cette maturité, les cellules doivent passer par plusieurs étapes de réarrangement de leurs récepteurs. Un de ces récepteurs est le PD β qui est spécifique à la réorganisation génique des lymphocytes T durant leur maturation.¹⁸⁶ Dans les lymphocytes T, au moins trois membres de la famille XKLF sont exprimés ainsi qu'un membre de la famille GATA soit GATA-3 qui est essentiel pour la différenciation des lymphocytes T.¹⁹¹⁻¹⁹³

De plus, les lymphocytes T expriment trois facteurs de transcription de la grande famille Krüppel, soit Sp1, LKLF et FKLf-2.^{105;121;130} Sp1 est un facteur ubiquitaire qui est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes de maintien cellulaire.¹⁰⁵ Pour sa part, LKLF semble jouer un rôle dans la maturation des lymphocytes T.¹³⁰ Il est exprimé dans les lymphocytes en différenciation mais sa présence n'est plus détectée lorsque les cellules immunitaires ont atteint leur maturité. FKLf-2 est aussi présent dans les lymphocytes T, par contre, il n'est pas établi s'il est présent au cours du réarrangement génique des lymphocytes. *In vitro*, FKLf-2 semble nécessaire à la différenciation terminale des lymphocytes T, lorsqu'ils ont été activés par un antigène.¹²¹ L'interaction exacte entre ces trois XKLFs et GATA-3 n'est pas encore comprise. Néanmoins, il a été démontré que pour la maturation des lymphocytes T, le promoteur PD β doit être activé par Sp-1 et GATA-3.¹⁸⁶ Ainsi, LKLF pourrait être impliqué dans la différenciation terminale des lymphocytes tandis que FKLf-2 aurait plutôt une fonction au niveau des lymphocytes T activés. Ces trois membres de la grande famille Krüppel présents dans les mêmes cellules ne semblent pas agir sur les mêmes gènes mais plutôt à des moments différents de la différenciation. L'interaction entre les XKLFs lymphocytaires est donc très différente de celle des XKLFs érythrocytaires où les membres agissent en antagoniste dans une boucle de rétroaction. Cependant, dans les deux cas, l'interaction est conservée entre les familles GATA et XKLF durant la différenciation.

Système cardiaque

Le rôle des protéines XKLF dans le cœur n'a pas encore été déterminé. De plus, même si plusieurs promoteurs cardiaques contiennent des éléments GATA et CACCC juxtaposés, l'interaction fonctionnelle entre ces deux éléments régulateurs n'a jamais été étudiée. Le promoteur BNP contient deux sites GATA situés près d'un site CACCC et cette organisation a été conservée durant l'évolution. En se basant sur l'interaction documentée des systèmes érythroïde et lymphocytaire entre les protéines GATA et XKLF, et étant donné que GATA-4 et FKLF-2 activent tous les deux le promoteur BNP, on a testé l'interaction entre GATA-4 et FKLF-2 sur le promoteur BNP. Dans les cellules P19, l'activation du promoteur BNP par FKLF-2 est augmentée de façon synergique en présence de GATA-4. Le domaine de transactivation C-terminal de GATA-4 semble être nécessaire à la synergie avec FKLF-2. La nécessité d'avoir le doigt de zinc C-terminal ainsi que la partie C-terminale de GATA-4 est également retrouvée pour la synergie entre GATA-4 et SRF (serum response factor) sur le promoteur de l'ANF.¹⁹⁴ Dans les érythrocytes, le doigt de zinc en C-terminal de GATA-1 est requis pour la synergie avec Sp1.⁹⁷ Ainsi, le doigt de zinc en C-terminal semble avoir une fonction conservée à travers les membres de la famille GATA pour établir des synergies avec leurs co-activateurs. En plus de la synergie entre GATA-4 et FKLF-2, des essais d'interaction *in vitro* montrent que ces deux protéines forment un complexe même en absence de l'ADN. Donc, FKLF-2 pourrait recruter GATA-4 au site CACCC alors que GATA-4 pourrait recruter FKLF-2 aux sites GATA. Les deux protéines sont donc des co-activateurs réciproques.

D'autres membres de la famille XKLF sont exprimés dans le cœur. L'analyse par RT-PCR a démontré que l'ARNm de LKLF, BKLF, GKLF et FKLF-2 est présent dans les oreillettes et les ventricules où ils pourraient être importants dans la régulation de gènes cardiaques. Des études de retard sur gel et de transfections dans les cellules P19 ont montré que GKLF peut lier la boîte CACCC de BNP et activer le promoteur de BNP mais de façon moindre que FKLF-2 (résultats non montrés). Cela sous-tend qu'au moins deux facteurs XKLFs peuvent activer des gènes cardiaques. Il serait donc important de confirmer la présence de la protéine GKLF dans les cardiomyocytes et d'analyser par la suite l'interaction exacte entre GKLF et FKLF-2 dans le cœur. Comme BKLF et LKLF sont également exprimés dans les cardiomyocytes, il serait aussi intéressant de tester si,

comme dans les érythrocytes, l'un d'entre eux agit en antagoniste de FKLF-2 au niveau du gène BNP.

Le motif CACCC est présent dans la région régulatrice de plusieurs gènes cardiaques dont l'ANF, la troponine cardiaque, l'actine cardiaque alpha et la chaîne bêta lourde de la myosine. Ces gènes sont donc des cibles potentielles pour FKLF-2 et/ou les autres XKLFs. Pour vérifier si FKLF-2 peut activer d'autres promoteurs, des études de transfections ont été faites dans les cellules P19 avec différents promoteurs de gènes cardiaques ayant un site CACCC. En plus d'activer le BNP, FKLF-2 semble également activer, mais de façon moindre les promoteurs de l'ANF et de l'actine cardiaque alpha. Par contre, les autres gènes testés, soit la chaîne lourde de la myosine β , l'actine cardiaque α et l'actine squelettique, ne semblent pas être affectés par la présence de FKLF-2. En examinant les promoteurs des gènes utilisés, seuls l'ANF et le BNP contiennent un site CACCC et deux sites GATAs. L'ANF a deux sites CACCC qui sont séparés des deux sites GATA par 65 paires de base tandis que dans le cas du BNP, les sites GATA sont juxtaposés au site CACCC. Le promoteur proximal de l'actine cardiaque alpha ne contient pas de site GATA mais il a un site CACCC qui semble être régulé par FKLF-2. Pour sa part, le promoteur de l'actine squelettique cardiaque est composé d'un site CACCC et d'un site GATA séparés par 63 paires de base et FKLF-2 n'a aucun effet sur son activation. FKLF-2 ne parvient pas non plus à activer le promoteur de la chaîne lourde de la myosine bêta qui contient pourtant trois sites CACCC dont deux sont situés côte à côte et à 60 paires de bases du site GATA. Étant donné que seul BNP est fortement activé par FKLF-2 et qu'il est le seul promoteur à avoir le site CACCC juxtaposé au site GATA, une interaction entre les boîtes CACCC et GATA est peut-être nécessaire pour l'activation des gènes cardiaques. Il est aussi possible que FKLF-2 n'ait pas la même affinité de liaison pour les sites CACCC des autres promoteurs. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer des études de retard sur gel pour démontrer si FKLF-2 ou les autres XKLFs présents dans les cardiomyocytes lient les différents éléments CACCC sur ces promoteurs et de déterminer l'affinité relative de FKLF-2 pour chaque promoteur.

Rôles putatifs de FKLF-2 dans les tissus extra-cardiaques

Chez l'adulte, la distribution tissulaire de FKLF-2 est controversée. Certaines études affirment que ce facteur de transcription est exprimé de façon ubiquitaire¹²⁰⁻¹²² tandis qu'un groupe de recherche a montré qu'il a une expression restreinte au cœur, aux muscles squelettiques et à la moelle osseuse.¹¹⁹ Cette différence entre les études peut s'expliquer par les moyens de détection utilisés. Les techniques utilisées sont la RT-PCR et le transfert Northern. La divergence entre les résultats pourrait provenir des oligonucléotides ou de la sonde utilisés. La partie de la sonde utilisée n'était pas toujours décrite ou elle correspondait aux doigts de zinc. Les doigts de zinc sont très conservés entre les XKLFs et différents membres de la famille sont présents dans tous les tissus. Il est donc fort possible que l'inclusion de la région des doigts de zinc dans la sonde ait détecté d'autres membres de la famille en plus de FKLF-2.

Selon les études d'immunohistologie, FKLF-2 est prédominant dans le cœur durant le développement mais il est aussi exprimé dans d'autres tissus. En plus d'être exprimé dans le cœur, FKLF-2 est présent dans le cerveau en développement. Le cerveau est l'organe à partir duquel BNP a été isolé.¹⁹⁵ FKLF-2 est un régulateur du gène BNP dans les cellules cardiaques et il est possible qu'il l'active également dans les cellules cervicales et qu'il soit ainsi impliqué dans le développement et le maintien du cerveau. Durant toute l'embryogenèse, FKLF-2 est aussi exprimé dans les cellules épithéliales entourant l'embryon. En appliquant le modèle du système érythroïde, il est possible que GKLF, qui est aussi nécessaire pour la différenciation terminale des cellules de la peau, et FKLF-2 interagissent durant le développement, FKLF-2 à un niveau plus précoce que GKLF. FKLF-2 est également exprimé dans les muscles squelettiques durant le développement où certains gènes cardiaques sont exprimés, ce qui suggère des mécanismes de régulation similaires pour ces deux types musculaires. La troponine cardiaque C et la chaîne bêta lourde de la myosine (β -MHC) sont exprimées dans le cœur et dans les muscles squelettiques et leurs promoteurs contiennent un site CACCC, ce qui en font des cibles potentielles pour FKLF-2. Aucune étude n'a été faite pour vérifier si le promoteur de la troponine est régulé par FKLF-2 dans le cœur ou les muscles squelettiques. Le promoteur de la β -MHC a été testé dans les cardiomyocytes et il ne semble pas répondre à l'ajout de

FKLF-2. Il est cependant possible que dans les muscles squelettiques FKLF-2 coopère avec d'autres activateurs pour réguler le gène de la β -MHC.

Le rôle de FKLF-2 à l'extérieur du cœur n'a pas été investigué dans cette étude. Quelques fonctions ont été proposées pour FKLF-2 chez l'adulte. Premièrement, FKLF-2 pourrait être impliqué dans la réponse immunitaire, plus précisément dans la différenciation des lymphocytes T activés.^{121;161;165} FKLF-2 est exprimé de trois à cinq jours suivant l'activation des lymphocytes T et son expression coïncide avec celle de RANTES, une cytokine chemoattractive. FKLF-2 active le promoteur RANTES via un site CTCCC. Une autre fonction proposée pour FKLF-2 est le contrôle de l'expression de la myosine alpha 22 dans les muscles lisses.^{122;140} Le rôle de la myosine alpha 22 n'est pas encore connu mais elle est un marqueur des cellules des muscles lisses. De plus, lorsqu'il y a une coupure dans les cellules vasculaires des muscles lisses, une protéine qui a les doigts de zinc des XKLFs est induite.¹⁴⁰ Il se peut que cette protéine soit FKLF-2 et qu'elle soit impliquée dans la réparation des vaisseaux des muscles lisses. Cette fonction concorderait avec le patron d'expression de FKLF-2 durant le développement puisque notre analyse immunohistologique a montré la présence de FKLF-2 dans les muscles de l'abdomen (résultats non montrés). Durant le développement, FKLF-2 est exprimé dans les cellules endothéliales entourant l'embryon. Le promoteur du gène endothélial PECAM-1 (molécule d'adhésion des plaquettes et des cellules endothéliales 1) contient un site GATA et un site CACCC.¹⁹⁶ GATA-2 régule le gène PECAM-1¹⁹⁶ et il serait intéressant de vérifier si ce gène est également contrôlé par FKLF-2 ou un autre XKLF. Finalement, il a été proposé que FKLF-2 soit impliqué dans la régulation de la différenciation des érythrocytes puisqu'il active le gène de la globine fœtale γ et qu'il est présent dans la moelle osseuse.¹¹⁹ Ainsi, en plus d'être impliqué dans le développement cardiaque, FKLF-2 pourrait participer à divers processus biologiques chez l'adulte.

Perspectives

Cette étude a ouvert des portes sur d'autres questions concernant le rôle des XKLFs au niveau du cœur. L'ARN de quatre membres de la famille, GKLF, BKLF, LKLF et FKLF-2, est exprimé dans les cardiomyocytes mais la présence des protéines n'a pas été

démontrée sauf pour FKLF-2. Il serait important de montrer par transfert de Western et par immunohistochimie si les protéines des trois autres XKLF sont présentes dans les cardiomyocytes. Des anticorps commerciaux (Santa Cruz biotechnology Inc.) reconnaissant la partie N-terminale de GKLF et LKLF sont disponibles. Un anticorps contre la partie N-terminale de BKLF a été généré par un groupe de recherche mais cet anticorps reconnaît aussi le premier doigt de zinc.¹¹² Cette reconnaissance risque de diminuer beaucoup la spécificité de l'anticorps puisque les XKLFs ont une grande homologie dans leurs doigts de zinc. Avant d'utiliser cet anticorps, ainsi que les anticorps commerciaux, il serait prudent de tester leur spécificité. S'il y a une régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm qui empêche les protéines d'être exprimées dans le cœur, il n'est pas pertinent de continuer d'étudier le rôle cardiaque de ces XKLFs. Par contre, si les protéines sont exprimées, il serait intéressant de déterminer leur fonction. FKLF-2 a été montré comme un puissant activateur de BNP mais le rôle des autres XKLFs cardiaques demeure inconnu. Il serait intéressant de faire des études de transfections transitoires et de retard sur gel pour répondre à cette question. Les transfections montreraient si les XKLFs sont des activateurs ou des répresseurs du BNP et si la régulation passe par le site CACCC. Des études préliminaires ont montré que GKLF active le BNP mais de façon moindre que FKLF-2 (résultats non montrés). Les études de retard sur gel pourraient expliquer si ces facteurs de transcription se lient directement à l'ADN ou si leurs effets sont indirects. En faisant des compétitions au niveau de la liaison à l'ADN entre les différents XKLFs, leur affinité pour le site CACCC peut être déterminée. Cela permettrait de savoir si un des membres est favorisé pour ce site et de mieux comprendre la relation entre les XKLFs.

FKLF-2 a été montré comme un co-facteur de GATA-4. La partie N-terminale de GATA-4 s'est révélée nécessaire pour qu'il y ait une potentialisation de l'activation de FKLF-2 mais il serait intéressant de constater si cette partie est également essentielle à l'interaction physique des deux protéines. De plus, il serait d'intérêt de savoir quelles portions de la protéine FKLF-2 sont nécessaires pour les interactions fonctionnelle et physique avec GATA-4. En se basant sur l'interaction entre Sp1 et GATA-1 qui requiert les trois doigts de zinc de Sp1,⁹⁷ les trois doigts de zinc de FKLF-2 seraient requis l'interaction avec GATA-4. Il serait aussi intéressant de vérifier si l'interaction entre la famille GATA et la famille XKLF se limite à un seul membre de la famille ou si les autres

XKLFs cardiaques peuvent également interagir avec GATA-4 pour réguler le gène BNP ou d'autres gènes cardiaques.

La co-activation entre FKLF-2 et GATA-4 améliore la compréhension de la régulation des gènes cardiaques mais ne parvient pas à expliquer pourquoi FKLF-2 active le promoteur BNP dans les oreillettes mais n'a aucun effet dans les ventricules puisque GATA-4 est présent dans ces deux tissus. Il y a probablement un activateur dans les oreillettes ou un répresseur dans les ventricules qui amène à cette différence d'activation. L'identification de ce co-facteur pourrait se faire par co-immunoprécipitation (Co-IP). Cette technique permettrait de connaître les protéines qui interagissent avec FKLF-2 *in vivo* et peut-être d'identifier un facteur spécifique aux oreillettes ou aux ventricules.

FKLF-2 régule le BNP dont l'expression est plus élevée chez les patients ayant de l'insuffisance cardiaque ou une hypertrophie du ventricule gauche.^{79;84} Il serait intéressant de vérifier s'il y a un changement dans la concentration protéique et/ou des modifications post transcriptionnelles, telle la phosphorylation, de FKLF-2 lorsqu'une hypertrophie est induite, possiblement avec l'angiotensine II, dans les cardiomyocytes. Cela pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de FKLF-2 dans le cœur adulte.

L'ensemble des résultats supporte un rôle pour FKLF-2 dans le développement cardiaque. Pour établir le rôle de FKLF-2 *in vivo*, il faudrait produire des souris transgéniques surexprimant ou sous-exprimant FKLF-2. En particulier, l'inactivation du gène FKLF-2 chez les souris permettrait d'établir sa fonction lors de l'embryogenèse. Le phénotype escompté est une malformation cardiaque, très probablement aux niveaux des valves ou peut-être un phénotype plus précoce dans la cardiogenèse car FKLF-2 est exprimé très tôt dans le cœur en développement et semble interagir avec GATA-4 dans la régulation de gènes cardiaques.

Conclusion

Les XKLFs sont des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de mécanismes biologiques importants et ils sont nécessaires au développement de plusieurs tissus dont le tissu hématopoïétique, l'épiderme et les parois des vaisseaux sanguins. La présente étude suggère un rôle pour la famille XKLF dans le développement cardiaque. FKLF-2 active un gène cardiaque, le BNP, en se liant directement au site CACCC et interagit physiquement avec GATA-4, un régulateur clé du muscle cardiaque. Les deux familles de facteurs de transcription à doigts de zinc, les familles GATA et XKLF, interagissent pour moduler l'expression de gènes cardiaques. Le patron d'expression de FKLF-2 ainsi que sa capacité à activer des gènes cardiaques suggèrent fortement que ce facteur de transcription est impliqué dans le développement cardiaque.

Le but de la recherche fondamentale est de mieux comprendre les mécanismes régulant l'organisme afin de connaître les secrets du corps humain pour prévenir ou traiter la maladie et ainsi améliorer la qualité de vie de la population. Les malformations congénitales cardiaques constituent une des principales complications à la naissance, comprenant surtout des problèmes valvulaires et les maladies cardiovasculaires continuent d'être une des principales causes de mortalité. Les bases moléculaires de ces pathologies ne sont pas complètement comprises mais l'approfondissement des connaissances permettrait probablement d'améliorer la prévention et les traitements de ces maladies. Cette étude apporte un espoir dans la compréhension du développement des valves cardiaques en suggérant que le facteur de transcription FKLF-2 soit impliqué dans la valvulogenèse. Malgré les grands efforts déployés pour comprendre le développement cardiaque, beaucoup de points demeurent obscurs. Pour former un organe aussi complexe que le cœur, plusieurs gènes interagissent entre eux à des moments et des endroits très précis. Une régulation bien orchestrée de ces joueurs doit être mise en place très tôt dans l'embryogenèse et tout au long de la vie adulte. Les résultats de cette étude suggèrent que FKLF-2 est un nouveau membre de la petite liste des facteurs de transcription impliqués dans le développement et le maintien du cœur. Pour la première fois, les facteurs de transcription de la famille XKLF sont impliqués dans la régulation des gènes cardiaques.

Bibliographie

1. Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 2000;223:266-278.
2. Charron F, Nemer M. Cardiac development and regulation of cardiac transcription. In: *Heart Physiology and Pathophysiology*, 4th edition. Sperelakis N, ed. 2000. Academic Press, San Diego, USA.
3. Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development. *Circ Res.* 2002;91:457-469.
4. Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* 2000;407:221-226.
5. Harvey RP. Seeking a regulatory roadmap for heart morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:99-107.
6. Yelon D, Stainier DY. Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:93-98.
7. Lamers WH, Moorman AF. Cardiac septation: a late contribution of the embryonic primary myocardium to heart morphogenesis. *Circ Res.* 2002;91:93-103.
8. Chu G, Haghighi K, Kranias EG. From mouse to man: understanding heart failure through genetically altered mouse models. *J Card Fail.* 2002;8:S432-S449.
9. McElhinney DB, Krantz ID, Bason L, Piccoli DA, Emerick KM, Spinner NB, Goldmuntz E. Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome. *Circulation.* 2002;106:2567-2574.
10. Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation.* 2001;104:2565-2568.
11. Satoda M, Zhao F, Diaz GA, Burn J, Goodship J, Davidson HR, Pierpont ME, Gelb BD. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nat Genet.* 2000;25:42-46.
12. Curran ME, Atkinson DL, Ewart AK, Morris CA, Leppert MF, Keating MT. The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell.* 1993;73:159-168.
13. Dietz HC, Pyeritz RE. Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders. *Hum Mol Genet.* 1995;4 Spec No:1799-1809.

14. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 1998;281:108-111.
15. Merscher S, Funke B, Epstein JA, Heyer J, Puech A, Lu MM, Xavier RJ, Demay MB, Russell RG, Factor S, Tokooya K, Jore BS, Lopez M, Pandita RK, Lia M, Carrion D, Xu H, Schorle H, Kobler JB, Scambler P, Wynshaw-Boris A, Skoultschi AI, Morrow BE, Kucherlapati R. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. *Cell*. 2001;104:619-629.
16. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultz J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. 1997;15:30-35.
17. Pehlivan T, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slauch R, Van Rheeden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet*. 1999;83:201-206.
18. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001;104:557-567.
19. Marian AJ, Roberts R. The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:655-670.
20. Sadamatsu K, Urabe Y, Tsutsui H, Tagawa H, Maruoka F, Igarashi-Saito K, Takeda K, Kawachi Y, Yasui H, Takeshita A. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ regulatory protein gene expression in human right atrium under hemodynamic overload. *Heart Vessels*. 1999;14:208-215.
21. Poetter K, Jiang H, Hassanzadeh S, Master SR, Chang A, Dalakas MC, Rayment I, Sellers JR, Fananapazir L, Epstein ND. Mutations in either the essential or regulatory light chains of myosin are associated with a rare myopathy in human heart and skeletal muscle. *Nat Genet*. 1996;13:63-69.
22. Satoh M, Takahashi M, Sakamoto T, Hiroe M, Marumo F, Kimura A. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;262:411-417.
23. Keller DI, Carrier L, Schwartz K. Genetics of familial cardiomyopathies and arrhythmias. *Swiss Med Wkly*. 2002;132:401-407.
24. Wehrens XH, Vos MA, Doevendans PA, Wellens HJ. Novel insights in the congenital long QT syndrome. *Ann Intern Med*. 2002;137:981-992.

25. Mably JD, Liew CC. Factors involved in cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. *Circ Res*. 1996;79:4-13.
26. Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res*. 2002;90:509-519.
27. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev*. 1994;8:1007-1018.
28. Zhou MD, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. Retinoid-dependent pathways suppress myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7391-7395.
29. Rubattu S, Volpe M. The atrial natriuretic peptide: a changing view. *J Hypertens*. 2001;19:1923-1931.
30. Cameron VA, Aitken GD, Ellmers LJ, Kennedy MA, Espiner EA. The sites of gene expression of atrial, brain, and C-type natriuretic peptides in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta. *Endocrinology*. 1996;137:817-824.
31. Chen Z, Friedrich GA, Soriano P. Transcriptional enhancer factor 1 disruption by a retroviral gene trap leads to heart defects and embryonic lethality in mice. *Genes Dev*. 1994;8:2293-2301.
32. Moens CB, Stanton BR, Parada LF, Rossant J. Defects in heart and lung development in compound heterozygotes for two different targeted mutations at the N-myc locus. *Development*. 1993;119:485-499.
33. Machida N, Brissie N, Sreenan C, Bishop SP. Inhibition of cardiac myocyte division in c-myc transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1895-1902.
34. Chisaka O, Capecchi MR. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene hox-1.5. *Nature*. 1991;350:473-479.
35. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 1997;11:1061-1072.
36. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. 1997;11:1048-1060.
37. Shivdasani RA. Molecular regulation of vertebrate early endoderm development. *Dev Biol*. 2002;249:191-203.

38. Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:85-91.
39. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 1997;16:5687-5696.
40. Grepin C, Dagnino L, Robitaille L, Haberstroh L, Antakly T, Nemer M. A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1994;14:3115-3129.
41. Molkenkin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol.* 1994;14:4947-4957.
42. Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech.* 2000;50:522-531.
43. Murphy AM, Thompson WR, Peng LF, Jones L. Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem J.* 1997;322 (Pt 2):393-401.
44. Di Lisi R, Millino C, Calabria E, Altruda F, Schiaffino S, Ausoni S. Combinatorial cis-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* 1998;273:25371-25380.
45. Reiter JF, Alexander J, Rodaway A, Yelon D, Patient R, Holder N, Stainier DY. Gata5 is required for the development of the heart and endoderm in zebrafish. *Genes Dev.* 1999;13:2983-2995.
46. Bhalla SS, Robitaille L, Nemer M. Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *J Biol Chem.* 2001;276:11439-11445.
47. Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development.* 2002;129:4045-4055.
48. Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS. GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol.* 1997;183:21-36.
49. Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem.* 1994;269:23177-23184.
50. Tada M, Smith JC. T-targets: clues to understanding the functions of T-box proteins. *Dev Growth Differ.* 2001;43:1-11.

51. Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature*. 1990;343:617-622.
52. Packham EA, Brook JD. T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet*. 2003;12:R37-R44.
53. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*. 2001;106:709-721.
54. Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular expression of tbx5 inhibits normal heart chamber development. *Dev Biol*. 2000;223:169-180.
55. Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol*. 1999;211:100-108.
56. Srivastava D, Cserjesi P, Olson EN. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science*. 1995;270:1995-1999.
57. Firulli AB, McFadden DG, Lin Q, Srivastava D, Olson EN. Heart and extra-embryonic mesodermal defects in mouse embryos lacking the bHLH transcription factor Hand1. *Nat Genet*. 1998;18:266-270.
58. Riley P, Anson-Cartwright L, Cross JC. The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nat Genet*. 1998;18:271-275.
59. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*. 1995;9:1654-1666.
60. Biben C, Harvey RP. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev*. 1997;11:1357-1369.
61. Srivastava D, Thomas T, Lin Q, Kirby ML, Brown D, Olson EN. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet*. 1997;16:154-160.
62. Gomez-Skarmeta JL, Modolell J. Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development. *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12:403-408.
63. Cavodeassi F, Modolell J, Gomez-Skarmeta JL. The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development*. 2001;128:2847-2855.
64. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by Irx4. *Science*. 1999;283:1161-1164.

65. Bruneau BG, Bao ZZ, Tanaka M, Schott JJ, Izumo S, Cepko CL, Seidman JG, Seidman CE. Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene *Irx4* is modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev Biol* . 2000;217:266-277.
66. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science*. 1997;276:1404-1407.
67. Bi W, Drake CJ, Schwarz JJ. The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiotensin 1 and VEGF. *Dev Biol*. 1999;211:255-267.
68. Harvey RP. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol*. 1996;178:203-216.
69. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 1993;119:419-431.
70. Komuro I. Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and development. *Jpn Circ J*. 2001;65:353-358.
71. Barron M, Gao M, Lough J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev Dyn*. 2000;218:383-393.
72. Durocher D, Chen CY, Ardani A, Schwartz RJ, Nemer M. The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for *Nkx-2.5* in the myocardium. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4648-4655.
73. Grepin C, Nemer G, Nemer M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development*. 1997;124:2387-2395.
74. Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*. 2002;109 Suppl:S67-S79.
75. Ranger AM, Grusby MJ, Hodge MR, Gravalles EM, de la Brousse FC, Hoey T, Mickanin C, Baldwin HS, Glimcher LH. The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* . 1998;392:186-190.
76. Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD, Orkin SH. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev*. 2001;15:839-844.
77. Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4355-4365.

78. Charron F, Tsimiklis G, Arcand M, Robitaille L, Liang Q, Molkentin JD, Meloche S, Nemer M. Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev.* 2001;15:2702-2719.
79. Matsuo H. Discovery of a natriuretic peptide family and their clinical application. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001;79:736-740.
80. Zivin RA, Condra JH, Dixon RA, Seidah NG, Chretien M, Nemer M, Chamberland M, Drouin J. Molecular cloning and characterization of DNA sequences encoding rat and human atrial natriuretic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81:6325-6329.
81. Aburaya M, Hino J, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Isolation and identification of rat brain natriuretic peptides in cardiac atrium. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:226-232.
82. Venugopal J. Cardiac natriuretic peptides--hope or hype? *J Clin Pharm Ther.* 2001;26:15-31.
83. Walther T, Schultheiss HP, Tschope C, Stepan H. Natriuretic peptide system in fetal heart and circulation. *J Hypertens.* 2002;20:785-791.
84. Cowie MR, Mendez GF. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis.* 2002;44:293-321.
85. Hystad ME, Klinge R, Spurkland A, Attramadal H, Hall C. Contrasting cardiac regional responses of A-type and B-type natriuretic peptide to experimental chronic heart failure. *Scand J Clin Lab Invest.* 2000;60:299-309.
86. Potter LR, Hunter T. Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem.* 2001;276:6057-6060.
87. John SW, Krege JH, Oliver PM, Hagaman JR, Hodgins JB, Pang SC, Flynn TG, Smithies O. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension. *Science.* 1995;267:679-681.
88. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, Matsuda S, Shiono S, Nishimoto H, Nakao K. Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest.* 1994;93:1911-1921.
89. Suda M, Ogawa Y, Tanaka K, Tamura N, Yasoda A, Takigawa T, Uehira M, Nishimoto H, Itoh H, Saito Y, Shiota K, Nakao K. Skeletal overgrowth in transgenic mice that overexpress brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:2337-2342.

90. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*. 1995;378:65-68.
91. Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, Maeda N. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest*. 2001;107:975-984.
92. Raizada V, Thakore K, Luo W, McGuire PG. Cardiac chamber-specific alterations of ANP and BNP expression with advancing age and with systemic hypertension. *Mol Cell Biochem*. 2001;216:137-140.
93. Yoshimura M, Yasue H, Ogawa H. Pathophysiological significance and clinical application of ANP and BNP in patients with heart failure. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79:730-735.
94. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994;90:195-203.
95. Steinhilber ME. Structure, expression, and genomic mapping of the mouse natriuretic peptide type-B gene. *Circ Res*. 1993;72:984-992.
96. Tsai SF, Strauss E, Orkin SH. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. *Genes Dev*. 1991;5:919-931.
97. Merika M, Orkin SH. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol*. 1993;13:3999-4010.
98. Bieker JJ. Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem*. 2001;276:34355-34358.
99. Turner J, Crossley M. Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci*. 1999;24:236-240.
100. Philipsen S, Suske G. A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:2991-3000.
101. Matthews JM, Sunde M. Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life*. 2002;54:351-355.
102. Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*. 1993;13:2776-2786.

103. Dang DT, Pevsner J, Yang VW. The biology of the mammalian Kruppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32:1103-1121.
 104. Dovat S, Ronni T, Russell D, Ferrini R, Cobb BS, Smale ST. A common mechanism for mitotic inactivation of C2H2 zinc finger DNA-binding domains. *Genes Dev.* 2002;16:2985-2990.
 105. Kaczynski J, Cook T, Urrutia R. Sp1- and Kruppel-like transcription factors. *Genome Biol.* 2003;4:206.
 106. Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature.* 1995;375:316-318.
 107. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature.* 1995;375:318-322.
 108. Conkright MD, Wani MA, Anderson KP, Lingrel JB. A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:1263-1270.
 109. Shindo T, Manabe I, Fukushima Y, Tobe K, Aizawa K, Miyamoto S, Kawai-Kowase K, Moriyama N, Imai Y, Kawakami H, Nishimatsu H, Ishikawa T, Suzuki T, Morita H, Maemura K, Sata M, Hirata Y, Komukai M, Kagechika H, Kadowaki T, Kurabayashi M, Nagai R. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat Med.* 2002;8:856-863.
 110. Matsumoto N, Laub F, Aldabe R, Zhang W, Ramirez F, Yoshida T, Terada M. Cloning the cDNA for a new human zinc finger protein defines a group of closely related Kruppel-like transcription factors. *J Biol Chem.* 1998;273:28229-28237.
 111. Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. FKLF, a novel Kruppel-like factor that activates human embryonic and fetal beta-like globin genes. *Mol Cell Biol.* 1999;19:3571-3579.
 112. Crossley M, Whitelaw E, Perkins A, Williams G, Fujiwara Y, Orkin SH. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. *Mol Cell Biol.* 1996;16:1695-1705.
 113. P.M.Crossley, Y. Fujiwara S. H. Orkin. Deficiency of the CACC-element binding protein, BKLF, leads to a progressive myeloproliferative disease and impaired expression of SHP-1. *Blood* 90 (suppl. 1), 575. 1997.
- Ref Type: Generic

114. Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet.* 1999;22:356-360.
115. Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem.* 1996;271:20009-20017.
116. Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:2969-2976.
117. Wani MA, Means RT, Jr., Lingrel JB. Loss of LKLF function results in embryonic lethality in mice. *Transgenic Res.* 1998;7:229-238.
118. Wani MA, Wert SE, Lingrel JB. Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J Biol Chem.* 1999;274:21180-21185.
119. Asano H, Li XS, Stamatoyannopoulos G. FKLf-2: a novel Kruppel-like transcriptional factor that activates globin and other erythroid lineage genes. *Blood.* 2000;95:3578-3584.
120. Scohy S, Gabant P, Van Reeth T, Hertveldt V, Dreze PL, Van Vooren P, Riviere M, Szpirer J, Szpirer C. Identification of KLF13 and KLF14 (SP6), novel members of the SP/XKLF transcription factor family. *Genomics.* 2000;70:93-101.
121. Song A, Chen YF, Thamtrakoln K, Storm TA, Krensky AM. RFLAT-1: a new zinc finger transcription factor that activates RANTES gene expression in T lymphocytes. *Immunity.* 1999;10:93-103.
122. Martin KM, Cooper WN, Metcalfe JC, Kemp PR. Mouse BTEB3, a new member of the basic transcription element binding protein (BTEB) family, activates expression from GC-rich minimal promoter regions. *Biochem J.* 2000;345 Pt 3:529-533.
123. Black AR, Black JD, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol.* 2001;188:143-160.
124. Donze D, Townes TM, Bieker JJ. Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem.* 1995;270:1955-1959.
125. Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development.* 2002;129:2619-2628.

126. Ohnishi S, Laub F, Matsumoto N, Asaka M, Ramirez F, Yoshida T, Terada M. Developmental expression of the mouse gene coding for the Kruppel-like transcription factor KLF5. *Dev Dyn.* 2000;217:421-429.
127. Lei L, Ma L, Nef S, Thai T, Parada LF. mKlf7, a potential transcriptional regulator of TrkA nerve growth factor receptor expression in sensory and sympathetic neurons. *Development.* 2001;128:1147-1158.
128. Sun R, Chen X, Yang VW. Intestinal-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 5) is a positive regulator of cellular proliferation. *J Biol Chem.* 2001;276:6897-6900.
129. Yoon HS, Chen X, Yang VW. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J Biol Chem.* 2003;278:2101-2105.
130. Kuo CT, Veselits ML, Leiden JM. LKLF: A transcriptional regulator of single-positive T cell quiescence and survival. *Science.* 1997;277:1986-1990.
131. Dang DT, Mahatan CS, Dang LH, Agboola IA, Yang VW. Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene.* 2001;20:4884-4890.
132. Dang DT, Bachman KE, Mahatan CS, Dang LH, Giardiello FM, Yang VW. Decreased expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients. *FEBS Lett.* 2000;476:203-207.
133. Foster KW, Frost AR, McKie-Bell P, Lin CY, Engler JA, Grizzle WE, Ruppert JM. Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.* 2000;60:6488-6495.
134. Okano J, Opitz OG, Nakagawa H, Jenkins TD, Friedman SL, Rustgi AK. The Kruppel-like transcriptional factors Zf9 and GKLf coactivate the human keratin 4 promoter and physically interact. *FEBS Lett.* 2000;473:95-100.
135. Miller KA, Eklund EA, Peddinghaus ML, Cao Z, Fernandes N, Turk PW, Thimmapaya B, Weitzman SA. Kruppel-like factor 4 regulates laminin alpha 3A expression in mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 2001;276:42863-42868.
136. Dang DT, Zhao W, Mahatan CS, Geiman DE, Yang VW. Opposing effects of Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) and Kruppel-like factor 5 (intestinal-enriched Kruppel-like factor) on the promoter of the Kruppel-like factor 4 gene. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:2736-2741.

137. Zhang W, Shields JM, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Yang VW. The gut-enriched Kruppel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. *J Biol Chem.* 1998;273:17917-17925.
138. Turner J, Crossley M. Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J.* 1998;17:5129-5140.
139. Chen X, Bieker JJ. Erythroid Kruppel-like factor (EKLF) contains a multifunctional transcriptional activation domain important for inter- and intramolecular interactions. *EMBO J.* 1996;15:5888-5896.
140. Martin KM, Ellis PD, Metcalfe JC, Kemp PR. Selective modulation of the SM22alpha promoter by the binding of BTEB3 to TGGG repeats. *Biochem J.* 2003;Pt.
141. Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, Owens GK. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J Biol Chem.* 2000;275:37798-37806.
142. Higaki Y, Schullery D, Kawata Y, Shnyreva M, Abrass C, Bomszyk K. Synergistic activation of the rat laminin gamma1 chain promoter by the gut-enriched Kruppel-like factor (GKLF/KLF4) and Sp1. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:2270-2279.
143. Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CS, Yang VW. Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett.* 1997;419:239-243.
144. Anderson KP, Kern CB, Crable SC, Lingrel JB. Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Kruppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol Cell Biol.* 1995;15:5957-5965.
145. Southwood CM, Downs KM, Bieker JJ. Erythroid Kruppel-like factor exhibits an early and sequentially localized pattern of expression during mammalian erythroid ontogeny. *Dev Dyn.* 1996;206:248-259.
146. Bieker JJ, Southwood CM. The erythroid Kruppel-like factor transactivation domain is a critical component for cell-specific inducibility of a beta-globin promoter. *Mol Cell Biol.* 1995;15:852-860.
147. Evans T, Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell.* 1989;58:877-885.

148. Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339:446-451.
149. Crossley M, Tsang AP, Bieker JJ, Orkin SH. Regulation of the erythroid Kruppel-like factor (EKLF) gene promoter by the erythroid transcription factor GATA-1. *J Biol Chem*. 1994;269:15440-15444.
150. Sogawa K, Imataka H, Yamasaki Y, Kusume H, Abe H, Fujii-Kuriyama Y. cDNA cloning and transcriptional properties of a novel GC box-binding protein, BTEB2. *Nucleic Acids Res*. 1993;21:1527-1532.
151. Watanabe N, Kurabayashi M, Shimomura Y, Kawai-Kowase K, Hoshino Y, Manabe I, Watanabe M, Aikawa M, Kuro-o M, Suzuki T, Yazaki Y, Nagai R. BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene. *Circ Res*. 1999;85:182-191.
152. Hoshino Y, Kurabayashi M, Kanda T, Hasegawa A, Sakamoto H, Okamoto E, Kowase K, Watanabe N, Manabe I, Suzuki T, Nakano A, Takase S, Wilcox JN, Nagai R. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation*. 2000;102:2528-2534.
153. Jenkins TD, Opitz OG, Okano J, Rustgi AK. Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr virus ED-L2 promoters by gut-enriched Kruppel-like factor. *J Biol Chem*. 1998;273:10747-10754.
154. Dang DT, Zhao W, Mahatan CS, Geiman DE, Yang VW. Opposing effects of Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) and Kruppel-like factor 5 (intestinal-enriched Kruppel-like factor) on the promoter of the Kruppel-like factor 4 gene. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:2736-2741.
155. Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem*. 1996;271:31384-31390.
156. Chen X, Johns DC, Geiman DE, Marban E, Dang DT, Hamlin G, Sun R, Yang VW. Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J Biol Chem*. 2001;276:30423-30428.
157. Banerjee SS, Feinberg MW, Watanabe M, Gray S, Haspel RL, Denkinger DJ, Kawahara R, Hauner H, Jain MK. The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem*. 2003;278:2581-2584.

158. Conkright MD, Wani MA, Lingrel JB. Lung Kruppel-like factor contains an autoinhibitory domain that regulates its transcriptional activation by binding WWP1, an E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2001;276:29299-29306.
159. Kuo CT, Veselits ML, Barton KP, Lu MM, Clendenin C, Leiden JM. The LKLF transcription factor is required for normal tunica media formation and blood vessel stabilization during murine embryogenesis. *Genes Dev.* 1997;11:2996-3006.
160. Kaczynski JA, Conley AA, Fernandez ZM, Delgado SM, Zhang JS, Urrutia R. Functional analysis of basic transcription element (BTE)-binding protein (BTEB) 3 and BTEB4, a novel Sp1-like protein, reveals a subfamily of transcriptional repressors for the BTE site of the cytochrome P4501A1 gene promoter. *Biochem J.* 2002;366:873-882.
161. Song A, Patel A, Thamatrakoln K, Liu C, Feng D, Clayberger C, Krensky AM. Functional domains and DNA-binding sequences of RFLAT-1/KLF13, a Kruppel-like transcription factor of activated T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2002;277:30055-30065.
162. Song CZ, Keller K, Murata K, Asano H, Stamatoyannopoulos G. Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKLF2. *J Biol Chem.* 2002;277:7029-7036.
163. Ellenrieder V, Zhang JS, Kaczynski J, Urrutia R. Signaling disrupts mSin3A binding to the Mad1-like Sin3-interacting domain of TIEG2, an Sp1-like repressor. *EMBO J.* 2002;21:2451-2460.
164. Martin KM, Metcalfe JC, Kemp PR. Expression of Klf9 and Klf13 in mouse development. *Mech Dev.* 2001;103:149-151.
165. Nikolcheva T, Pyronnet S, Chou SY, Sonenberg N, Song A, Clayberger C, Krensky AM. A translational rheostat for RFLAT-1 regulates RANTES expression in T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2002;110:119-126.
166. Song A, Nikolcheva T, Krensky AM. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunol Rev.* 2000;177:236-245.
167. Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res.* 1995;77:1-6.
168. Swiderski RE, Reiter RS, Nishimura DY, Alward WL, Kalenak JW, Searby CS, Stone EM, Sheffield VC, Lin JJ. Expression of the Mfl gene in developing mouse hearts: implication in the development of human congenital heart defects. *Dev Dyn.* 1999;216:16-27.

169. de la Pompa JL, Timmerman LA, Takimoto H, Yoshida H, Elia AJ, Samper E, Potter J, Wakeham A, Marengere L, Langille BL, Crabtree GR, Mak TW. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature*. 1998;392:182-186.
170. Licht JD, Grossel MJ, Figge J, Hansen UM. Drosophila Kruppel protein is a transcriptional repressor. *Nature*. 1990;346:76-79.
171. Schuh R, Aicher W, Gaul U, Cote S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schroder C, Kemler R. . A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell*. 1986;47:1025-1032.
172. Schock F, Sauer F, Jackle H, Purnell BA. Drosophila head segmentation factor buttonhead interacts with the same TATA box-binding protein-associated factors and in vivo DNA targets as human Sp1 but executes a different biological program. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:5061-5065.
173. Schock F, Purnell BA, Wimmer EA, Jackle H. Common and diverged functions of the Drosophila gene pair D-Sp1 and buttonhead. *Mech Dev*. 1999;89:125-132.
174. Lutfiyya LL, Johnston M. Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of SUC2 expression. *Mol Cell Biol*. 1996;16:4790-4797.
175. Vautard G, Cotton P, Fevre M. The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1999;453:54-58.
176. Stein T, Kricke J, Becher D, Lisowsky T. Azf1p is a nuclear-localized zinc-finger protein that is preferentially expressed under non-fermentative growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 1998;34:287-296.
177. Newcomb LL, Hall DD, Heideman W. AZF1 is a glucose-dependent positive regulator of CLN3 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 2002;22:1607-1614.
178. Shioi G, Shoji M, Nakamura M, Ishihara T, Katsura I, Fujisawa H, Takagi S. Mutations affecting nerve attachment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2001;157:1611-1622.
179. Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*. 2000;408:325-330.
180. Oates AC, Pratt SJ, Vail B, Yan Y, Ho RK, Johnson SL, Postlethwait JH, Zon LI. The zebrafish *klf* gene family. *Blood*. 2001;98:1792-1801.

181. Kawahara A, Dawid IB. Critical role of *bik1f* in erythroid cell differentiation in zebrafish. *Curr Biol*. 2001;11:1353-1357.
182. Huber TL, Perkins AC, Deconinck AE, Chan FY, Mead PE, Zon LI. *neptune*, a Kruppel-like transcription factor that participates in primitive erythropoiesis in *Xenopus*. *Curr Biol*. 2001;11:1456-1461.
183. Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. 1998;93:215-228.
184. Bhavsar PK, Dellow KA, Yacoub MH, Brand NJ, Barton PJ. Identification of cis-acting DNA elements required for expression of the human cardiac troponin I gene promoter. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:95-108.
185. Dellow KA, Bhavsar PK, Brand NJ, Barton PJ. Identification of novel, cardiac-restricted transcription factors binding to a CACC-box within the human cardiac troponin I promoter. *Cardiovasc Res*. 2001;50:24-33.
186. Sikes ML, Gomez RJ, Song J, Oltz EM. A developmental stage-specific promoter directs germline transcription of D beta J beta gene segments in precursor T lymphocytes. *J Immunol*. 1998;161:1399-1405.
187. Turner J, Crossley M. Basic Kruppel-like factor functions within a network of interacting haematopoietic transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999;31:1169-1174.
188. Martin DI, Orkin SH. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev*. 1990;4:1886-1898.
189. Whitelaw E, Tsai SF, Hogben P, Orkin SH. Regulated expression of globin chains and the erythroid transcription factor GATA-1 during erythropoiesis in the developing mouse. *Mol Cell Biol*. 1990;10:6596-6606.
190. Chen ML, Kuo CL. A conserved sequence block in the murine and human T cell receptor Jalpha loci interacts with developmentally regulated nucleoprotein complexes in vitro and associates with GATA-3 and octamer-binding factors in vivo. *Eur J Immunol*. 2001;31:1696-1705.
191. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404:193-197.
192. Hattori N, Kawamoto H, Fujimoto S, Kuno K, Katsura Y. Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. *J Exp Med*. 1996;184:1137-1147.

193. Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F, Engel JD. Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet.* 2000;25:209-212.
194. Morin S, Paradis P, Aries A, Nemer M. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol Cell Biol.* 2001;21:1036-1044.
195. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature.* 1988;332:78-81.
196. Gumina RJ, Kirschbaum NE, Piotrowski K, Newman PJ. Characterization of the human platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 promoter: identification of a GATA-2 binding element required for optimal transcriptional activity. *Blood.* 1997;89:1260-1269.

