

2m11.2875.5

Université de Montréal

Régulation transcriptionnelle du gène de l'ANF via des interactions combinatoires entre les protéines MEF2 et les facteurs GATA

par
Steves Morin

Programme de Biologie moléculaire
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 2000

© Steves Morin



①H
506
U54
2001
V.009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Régulation transcriptionnelle du gène de l'ANF via des interactions combinatoires entre les protéines MEF2 et les facteurs GATA

Présenté par:

Steves Morin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Jacques Drouin, président-rapporteur

Dr Mona Nemer, directeur de recherche

Dr Lee Wall, membre du jury

Mémoire accepté le:

SOMMAIRE

Chez les vertébrés, le développement et la différenciation du coeur sont caractérisés par un programme génétique unique. Des interactions combinatoires entre des facteurs de transcription ubiquitaires et spécifiques au coeur contribuent à générer les complexes transcriptionnels qui caractérisent le myocarde en développement. Le promoteur du gène de l'ANF, qui est spécifique au muscle cardiaque, contient plusieurs éléments régulateurs en *cis* où peuvent se lier divers facteurs de transcription. Les facteurs de transcription de la famille MEF2 sont des protéines à boîte MADS essentielles pour la différenciation des lignées musculaires mais leurs mécanismes d'action demeurent encore mal compris. Chez les mammifères, l'expression de l'isoforme MEF2C dans le coeur est la plus précoce apparaissant au jour embryonnaire E7.5. L'inactivation du gène codant pour MEF2C cause un arrêt du développement cardiaque accompagné d'une diminution de l'expression de plusieurs gènes cardiaques incluant l'ANF. Cependant, la plupart des promoteurs de ces gènes ne contiennent aucun ou que des sites de liaison de basse affinité pour les facteurs MEF2 et ne sont pas significativement activés par les différentes protéines MEF2 dans des cellules hétérologues, suggérant un mécanisme dépendant d'un co-facteur cardiaque. Les résultats présentés ici démontrent que les facteurs MEF2 sont recrutés aux promoteurs cibles par les facteurs de transcription à doigt de zinc cardiaque-spécifique GATA, et qu'ils potentialisent l'activité transcriptionnelle de ces derniers. La synergie MEF2-GATA-4 implique une interaction directe entre la boîte MADS de MEF2 et le doigt de zinc carboxy-terminal de GATA-4 et requiert les domaines de transactivation de ces deux

protéines. Cependant, ni des sites de liaison à l'ADN aux facteurs MEF2 ni leurs capacité à lier l'ADN sont requis pour cette coopération transcriptionnelle.

Ainsi, ce travail présente pour la première fois une interaction au niveau moléculaire entre la protéine cardiaque GATA-4 et les facteurs à boîte MADS MEF2, suggérant que la spécificité transcriptionnelle du muscle cardiaque est acquise *via* des interactions combinées entre les facteurs de transcription restreints au coeur et ubiquitaires.

TABLE DES MATIÈRES	
SOMMAIRE	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xii
DÉDICACE	xiii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1. TRANSCRIPTION DES GÈNES EUCARYOTES.....	1
1.1.1. Initiation de la transcription	2
1.1.2. Élongation et terminaison de la transcription.....	6
1.2. CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION DANS LE MUSCLE CARDIAQUE .	7
1.2.1. Éléments agissant en <i>cis</i> dans le promoteur du gène de l'ANF	10
1.2.1.1. Les éléments GATA	10
1.2.1.2. Le site NKE.....	13
1.2.1.3. La boîte CArG.....	14
1.2.1.4. L'élément de réponse au sérum de basse affinité (SRE de basse affinité).	15
1.2.1.5. Élément A/T riche distal	16
1.2.1.6. Les boîtes E.....	17
1.2.1.7. L'élément PERE.....	18
1.2.2. Les facteurs de transcription cardiaques	18
1.2.2.1. Les facteurs de transcription de la famille GATA	19
1.2.2.1.1. Études structure/fonction des protéines GATA.....	19
1.2.2.1.2. Patron d'expression des facteurs GATA cardiaques.....	22
1.2.2.1.3. Interactions des facteurs GATA avec d'autres protéines	23
1.2.2.1.4. Voies de signalisation impliquant le facteur GATA-4	25
1.2.2.2.1. Les facteurs de transcription de la famille MEF2.....	28
1.2.2.2.1.1. Études structure/fonction.....	28
1.2.2.2.1.2. Patron d'expression des protéines MEF2	31
1.2.2.2.1.3. Interactions des facteurs MEF2 avec d'autres protéines	32
1.2.2.2.1.4. Voies de signalisation impliquant les protéines MEF2.....	35
1.2.2.2.2. Le facteur de réponse au sérum (SRF)	38
1.2.2.3. Les facteurs de transcription de la famille NK-2	40
1.2.2.4. Les protéines de la famille HAND.....	41
1.3. DESCRIPTION DU PROJET	43

CHAPITRE 2. ARTICLE	44
GATA-DEPENDENT RECRUITEMENT OF MEF2 PROTEINS	44
2.1. RÉSUMÉ	45
2.2. ABSTRACT	46
2.3. INTRODUCTION	47
2.4. RESULTS	50
2.4.1. MEF2 proteins activate the ANF promoter via two distinct mechanisms.	50
2.4.2. Synergistic activation of the ANF promoter by MEF2 and GATA factors.	54
2.4.3. MEF2 factors physically interact in vitro and in vivo with GATA-4.	58
2.4.4. MEF2/GATA synergy does not require MEF2 DNA binding.	61
2.4.5. MEF2/GATA synergy : a mechanism for MEF2 action in the heart.	63
2.5. DISCUSSION.....	65
2.6. MATERIALS AND METHODS	69
2.6.1. Cell cultures and transfections	69
2.6.2. Plasmids	69
2.6.3. Recombinant protein production	70
2.6.4. In vitro protein-protein interactions	71
2.6.5. Electrophoretic mobility shift assays	72
2.6.6. Immunoprecipitations and immunoblots.....	72
2.7. ACKNOWLEDGEMENTS.....	73
2.8. REFERENCES	74
CHAPITRE 3. DISCUSSION	83
3.1. INTERACTIONS COMBINATOIRES DE PLUSIEURS FACTEURS DE TRANSCRIPTION SUR LE PROMOTEUR DE L'ANF.....	83
3.1.1. GATA-4 recrute les protéines MEF2 sur le promoteur de l'ANF.....	85
3.1.2. Les protéines MADS comme cofacteurs des protéines GATA.....	88
3.1.3. Les protéines MEF2 agissent comme co-facteurs pour des facteurs de transcription tissu-spécifique dans plusieurs lignées cellulaires.....	94
3.2. IMPLICATION DE LA COOPÉRATION MADS/GATA DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE	97
3.3. PERSPECTIVES FUTURES	100
CHAPITRE 4. RÉFÉRENCES.....	103

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1	3
Figure 1.2	5
Figure 1.3	9
Figure 1.4	11
Figure 1.5	21
Figure 1.6	26
Figure 1.7	29
Figure 1.8	34
Figure 1.9	37

CHAPITRE 2

Figure 2.1	51
Figure 2.2	53
Figure 2.3	56
Figure 2.4	57
Figure 2.5AB.....	59
Figure 2.5CDE	60
Figure 2.6	62
Figure 2.7	64

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A:	Adénine
α CA:	“ α -Cardiac actin”
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ANF:	“Atrial natriuretic factor”
ANG:	Angiotensine
ARN:	Acide ribonucléique
ARN pol:	ARN polymérase
ARF:	“A-rich factor”
ATF:	“Activating transcripton factor”
bHLH:	“basic helix-loop-helix”
BNP:	“B-type natriuretic peptide”
C:	Cytosine
CaMKIV:	“Ca ²⁺ -calmodulin-dependent protein kinase IV”
CBP:	“CREB-binding protein”
CREB:	“cAMP-response element binding protein”
CTD:	“Carboxy-terminal domain”
CTp:	“Cardiac troponin”
E:	Jour embryonnaire
E12-E47:	Produits du gène <i>E2A</i>
ET:	Endothéline
FOG:	“Friend of GATA-1”

G:	Guanine
HAND:	“Heart-autonomic nervous system-neural crest-derived cell types”
HDAC:	“Histone deacetylase”
HLH:	“Helix-loop-helix”
Id:	“Inhibitor of DNA-binding”
LCR:	“Locus control region”
LIM:	“ <i>Lim11-is11-mec3</i> ”
Luc:	Luciférase
MADS:	“MCM1-agamous-ARG80-deficiens-serum response factor”
MAP kinase:	“Mitogen-activated protein kinase”
MCK:	“Muscle creatine kinase”
MEF2:	“Myocyte-enhancer factor 2”
MBP:	“Maltose binding protein”
MKK:	MAP kinase kinase
MITR:	“MEF2 interacting transcription repressor”
MLC:	“Myosin light chain”
MHC:	“Myosin heavy chain”
NFE-2:	“Nuclear factor erythroid 2”
NFA-T:	“Nuclear factor of activated T cells”
NFkB:	“Nuclear factor- kappaB”
NKE:	“NK2-response element”
Pb:	paire de base
PF4:	“Rat platelet factor 4”

PKC:	“Protein kinase C”
PE:	Phényléphrine
PERE:	“Pe-response-element”
PEX:	“PE-induced complex”
Pol II:	ARN polymérase II
Pol IIa:	ARN polymérase II hypophosphorylée
Pol IIo :	ARN polymérase II hyperphosphorylée
RCPG:	Récepteurs couplés aux protéines G
skA :	“Skeletal actin”
SRB :	“Supressor of RNA pol II”
SRE :	“Serum response element”
SRF :	“Serum response factor”
T :	“Thymine”
TF _{II} :	Facteur de la transcription de base de classe II
TBP :	“TATA-binding protein”
TAF :	“TBP-associated factor”
TCF :	“Ternarycomplex factor”
TK :	Thymidine kinase
YY1:	Ying Yang 1

REMERCIEMENTS

Je voudrais d'abord remercier mon superviseur, Dr Mona Nemer, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans un endroit stimulant, pour son encouragement et son support constant, et pour ses précieux conseils qui ont souvent su bien me guider tant au niveau scientifique que personnel.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues et amis qui m'ont encouragés et très souvent supportés durant ces dernières années. En particulier Bruno Delorme, Erik Tremblay, Nassim-Youssef Dali, Sophie Debrus, Anne Aries, Pierre Paradis, Georges Nemer et Kevin McBride pour leurs précieux conseils qui ont grandement fait avancé mon projet durant ma maîtrise. Merci beaucoup à Lynda Robitaille pour son aide, très apprécié, durant la réalisation de ce projet. Merci également à Lise Laroche, pour qui le secrétariat n'a aucun secret. Merci également au Dr Jacques Drouin et à son équipe pour les nombreuses critiques constructives lors des réunions de laboratoire.

Je remercie spécialement Frédéric Charron, qui a su me donner sa passion pour la science et avec qui j'ai passé d'extraordinaires moments au labo et partout ailleurs.

Un dernier merci à Christine pour son amour et pour n'avoir jamais cessé de croire en moi.

DÉDICACE

À mon père

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. TRANSCRIPTION DES GÈNES EUCARYOTES

La base moléculaire du contrôle des gènes eucaryotes est un sujet de recherche actif parmi les multiples domaines de la biologie. Un mouvement cyclique de l'information génétique s'observe dans toutes les cellules et représente le "dogme central" de la biologie moléculaire. En effet, l'ADN dirige la synthèse de l'ARN, la transcription, et l'ARN dirige ensuite la synthèse des protéines, traduction, qui catalysent la synthèse à la fois de l'ARN et de l'ADN. L'analyse des mécanismes de régulation des gènes a permis de démontrer que cette régulation se produit pendant et après la transcription et que la combinaison de différents mécanismes de régulation des gènes entraîne le développement et la différenciation de l'organisme. Chez les eucaryotes, l'ADN, qui est transcrit en ARN transcrit primaire, doit être modifié dans le noyau cellulaire pour former l'ARN messager (ARNm) qui code l'information génétique copiée à partir de l'ADN. Le contrôle de l'expression des gènes peut s'exercer à plusieurs niveaux : i) la transcription (départ ou terminaison), ii) la maturation des transcrits primaires, iii) la stabilisation ou la déstabilisation des ARN, iv) la traduction des ARNm, et v) divers modifications post-traductionnelles et localisation intracellulaire. Parmi ceux-ci, l'étape cruciale de l'initiation de la transcription est la plus étudiée. Bien qu'on ait décrit plusieurs systèmes biologiques faisant appel à un ajustement de la terminaison de la transcription, ce mécanisme paraît rare chez les eucaryotes.

1.1.1. Initiation de la transcription

La région promotrice de la majorité des gènes eucaryotes de classe II, les gènes codant pour les protéines, contient trois types de séquences qui sont requises pour la transcription basale et pour l'activation de la transcription (Zawel and Reinberg, 1993). La boîte TATA, comprenant la séquence consensus TATAAA, est située entre -25 et -30 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la transcription (Weis and Reinberg, 1992). Certains promoteurs contiennent des éléments initiateurs (Inr) qui entourent le site d'initiation de la transcription (Ince and Scotto, 1995). La boîte TATA et les éléments Inr constituent les deux types d'éléments impliqués dans la transcription basale, tandis que les *enhancers*, des éléments en *cis*, activent ou inhibent la transcription contrôlant ainsi l'expression spatio-temporelle des gènes.

Plusieurs facteurs protéiques qui aident l'ARN polymérase II (ARN pol II) à reconnaître la boîte TATA et à démarrer la transcription ont été caractérisés. L'ordre d'assemblage du complexe de préinitiation a été élucidé à l'aide d'études de retard sur gel (Buratowski et al., 1989) (Cortes et al., 1992). Un des plus importants facteurs requis par l'ARN pol II est TF_{II}D, constitué de la protéine liant la boîte TATA (TBP, TATA binding protein) et plusieurs facteurs associés à la TBP (TAFs, TBP associated factors) (Gajewski et al., 1997). TF_{II}A stabilise la liaison de TF_{II}D sur la boîte TATA (Yean and Gralla, 1999) et TF_{II}B positionne l'ARN pol II près du site d'initiation de la transcription (Yamashita et al., 1992). Par la suite, TF_{II}F vient interagir directement avec les facteurs TF_{II}A, D et B. La liaison de TF_{II}F est essentielle pour le recrutement de l'ARN pol II au complexe de préinitiation de la transcription. Suite à la fixation de l'ARN pol II au complexe de préinitiation, les facteurs TF_{II}E et TF_{II}H viennent s'y joindre (Figure 1.1)

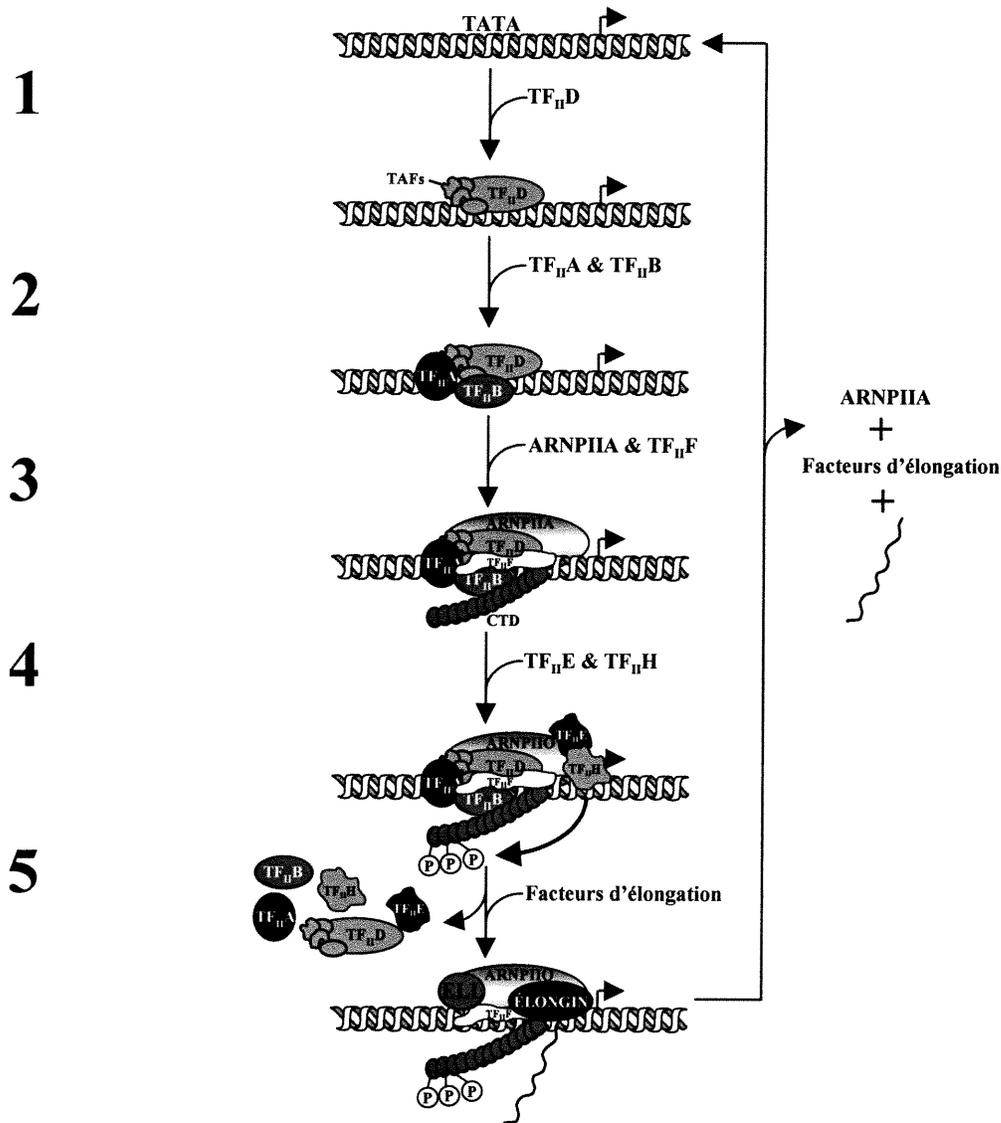


Figure 1.1 Ordre d'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription. 1) Le facteur multiprotéique TF_{II}D, contenant la protéine TBP, est le premier facteur à lier le promoteur. 2) Si le promoteur contient un élément Inr et une faible boîte TATA, le facteur TF_{II}I s'ajoute au complexe en stabilisant TF_{II}D. Cependant, si le promoteur contient une forte boîte TATA et aucun élément Inr, c'est le facteur TF_{II}A qui vient stabiliser TF_{II}D. TF_{II}B s'ajoute au complexe et positionne l'ARN pol III près du site d'initiation de la transcription. 3) TF_{II}F, qui interagit directement avec les facteurs TF_{II}A, D, et B, est essentiel pour le recrutement de l'ARN polymérase IIA, la forme non-phosphorylée. 4) Une fois l'ARN pol IIA fixée au complexe, les facteurs TF_{II}E et TF_{II}H se joignent à ce complexe. Par la suite, une série de phosphorylation, dont celle du CTD de l'ARN pol IIA (ARN pol IIO) par TF_{II}H active la transcription. 5) L'élongation de la transcription est assurée par des facteurs d'élongation comme l'élogin et ELL qui gouvernent l'activité de l'ARN pol II. Suite à la terminaison, le CTD est rapidement déphosphorylé et les facteurs d'élongation sont relâchés.

(Buratowski et al., 1989). L'ARN pol II est caractérisée par un domaine en C-terminal (CTD) contenant une série d'heptapeptides, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, qui sont essentiels pour son activité *in vivo* (Steinmetz, 1997). L'ARN pol II existe sous deux formes, pol IIA et pol IIO qui sont respectivement les formes non-phosphorylées et phosphorylées, du CTD. Plusieurs études ont démontré que la pol IIA interagit préférentiellement avec le complexe de préinitiation. De plus, il a été mis en évidence que seulement la pol IIA pouvait interagir directement avec la TBP. La pol IIO, quant à elle, catalyse l'élongation de la transcription, suggérant que l'ARN pol II devient phosphorylée suite à sa liaison au complexe de préinitiation. Ce sont les derniers facteurs ajoutés au complexe, soit TF_{II}E et TF_{II}H, qui permettent la phosphorylation de la pol IIA (Lu et al., 1992). TF_{II}H est également capable de phosphoryler des sous-unités des facteurs TF_{II}D, E et F. La phosphorylation du CTD converti la pol II, et donc le complexe de préinitiation, d'une forme transcriptionnelle inactive à une forme active (Steinmetz, 1997). Ces études *in vitro* ont été supportées par des expériences qui montrent que des drogues qui bloquent la phosphorylation du CTD inhibent la transcription *in vivo* (Lu et al., 1992; Ohkuma and Roeder, 1994; Dubois et al., 1994).

Récemment, à l'aide de la génétique de la levure, un groupe de neuf facteurs, les protéines SRB (suppressor of RNA pol II) qui interagissent avec l'ARN pol II, a été isolé (Koleske and Young, 1994; Hengartner et al., 1995). Ces protéines, qui sont essentielles pour la transcription chez la levure, sont parmi les premiers facteurs recrutés sur les promoteurs par les régulateurs transcriptionnels et sont présentes dans un large complexe à plusieurs sous-unités nommé le médiateur (Figure 1.2). L'ARN pol II associée au médiateur est appelée l'holoenzyme. *In vivo*, l'ADN qui est compacté dans les

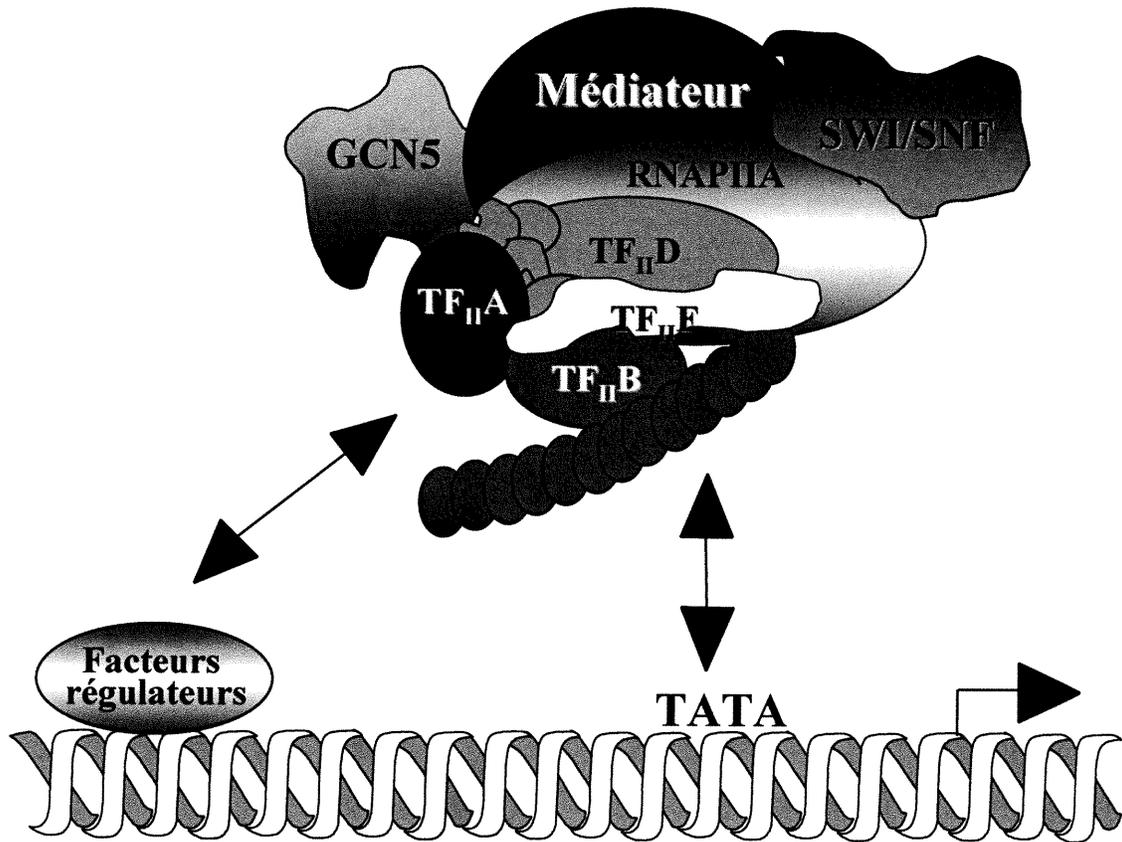


Figure 1.2 Modèle de recrutement de l'holoenzyme. L'holoenzyme (ARN pol II/médiateur) s'associe à des protéines capables de déstabiliser les nucléosomes, SWI/SNF et GCN5, rendant l'ADN accessible aux facteurs de transcription. Des facteurs régulateurs liant des séquences d'ADN spécifiques sur le promoteur des gènes pourraient recruter et/ou stabiliser l'holoenzyme pour initier la transcription.

nucléosomes à l'aide des histones est inaccessible aux facteurs de transcription. L'initiation de la transcription requiert donc des facteurs associés à l'holoenzyme, comme les protéines SWI/SNF, qui facilite l'association de la machinerie basale en présence des nucléosomes, et GCN5, une acétylase d'histone qui déstabilise les nucléosomes (Halle and Meisterernst, 1996). En plus de la machinerie basale et du complexe holoenzyme/médiateur, plusieurs autres protéines régulatrices sont requises pour l'activation de la transcription des gènes. Ces facteurs régulateurs lient des séquences d'ADN spécifiques dans le promoteur et pourraient stabiliser l'holoenzyme, régulant ainsi la transcription de ce gène (Figure 1.2) (Koleske and Young, 1995; Koleske et al., 1992). Ces résultats ont amené l'hypothèse de complexes transcriptionnels omnipotents dans la cellule, le transcriptosome, composés de l'holoenzyme et d'enzymes facilitant la remodelisation de la chromatine ainsi que la réparation de l'ADN (Koleske et al., 1992).

1.1.2. Élongation et terminaison de la transcription

La synthèse d'un ARNm mature et fonctionnel par l'ARN pol II est un processus complexe qui nécessite plusieurs étapes requérant l'action coopérative de plusieurs protéines. Ce processus discontinu est fréquemment interrompu par des sites d'arrêt intrinsèques sur la matrice (Shilatifard, 1998). Le rôle de ces différents facteurs d'élongation est de s'assurer que l'ARN pol II ne s'arrête pas de façon précoce. Durant les dernières années, des études fondamentales sur le stade de l'élongation de la transcription ont démontré l'existence de plusieurs familles de facteurs d'élongation gouvernant l'activité de l'ARN pol II. Parmi ceux-ci, ELL et l'élongin ont été impliqués dans des

cancers humains, démontrant que l'élongation constitue une étape critique dans la régulation de l'expression génique (Shilatifard, 1998).

La terminaison de la transcription est un processus encore très peu compris. Dans le cas de l'ARN pol I, les données obtenues suggèrent que des séquences riches en T seraient responsables de l'arrêt de la transcription par l'ARN pol I (Reeder and Lang, 1997). Suite à la terminaison, le CTD de l'ARN polIII est rapidement déphosphorylé et les facteurs d'élongation relâchés. L'ARN pol est donc libre pour être recruté par un nouveau complexe de préinitiation de la transcription.

1.2. CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION DANS LE MUSCLE CARDIAQUE

Chez les vertébrés, il existe trois types de muscles: lisse, cardiaque, et squelettique. L'étude de la transcription des gènes du muscle cardiaque a traîné derrière celle du muscle squelettique pendant plusieurs années. L'étude de la transcription dans le muscle squelettique fut grandement facilitée par la disponibilité de plusieurs lignées cellulaires de myoblastes squelettiques capables de se différencier en myotubes alors qu'aucune lignée cellulaire cardiaque n'existait et que l'on ne possédait aucun modèle *in vitro* de cardiogénèse. L'arrivée des souris transgéniques a permis d'effectuer des études *in vivo* qui démontrèrent que différents éléments régulateurs étaient requis pour la transcription d'un même gène dans les muscles cardiaques et squelettiques (Johnson et al., 1989).

Les études de transcription dans le muscle squelettique ont abouti à la découverte des facteurs bHLH (basic helix-loop-helix) myogéniques de la famille MyoD. Lorsque ces facteurs sont exprimés dans des cellules en culture, le programme génétique du

muscle squelettique mais non celui du muscle cardiaque, est induit. De plus, l'inactivation de ces gènes par recombinaison homologue chez la souris affecte le développement du muscle squelettique sans affecter celui du muscle cardiaque (Olson and Klein, 1994). Ces données confirment que les mécanismes d'activation de la transcription du muscle cardiaque et du muscle squelettique sont différents l'un de l'autre. En effet, à l'exception de certaines protéines comme les facteurs de transcription MEF2 (Myocyte-enhancer factor-2) et SRF (Serum response factor), qui sont exprimées dans les trois types de muscles, la majorité des facteurs de transcription importants pour l'engagement et la différenciation des cellules musculaires sont spécifiques à un des deux types musculaires. Des interactions combinatoires entre des facteurs de transcription spécifiques aux muscles cardiaques ou squelettiques pourraient réguler l'expression des gènes musculaires. Au niveau du muscle squelettique, la caractérisation de MyoD a été rapidement suivie de la découverte de trois autres facteurs de la même famille : myogénine, Myf-5, et MRF4, qui interagissent ensemble pour réguler le développement et la différenciation du muscle squelettique. Au cours des dernières années, plusieurs facteurs impliqués dans la cardiogénèse ont été caractérisés; néanmoins, l'élucidation de la cascade de régulation du muscle cardiaque est encore très incomplète (Figure 1.3). En effet, les mécanismes moléculaires impliquant les facteurs cardiaques GATA-4, Nkx2-5, et HAND, demeure des sujets très actifs pour la compréhension de la cascade de régulation transcriptionnelle des gènes cardiaques. L'élaboration de ces mécanismes peut être grandement facilitée par l'étude du contrôle transcriptionnel des gènes spécifiquement exprimés dans le coeur, tels les gènes codant pour les peptides natriurétiques.

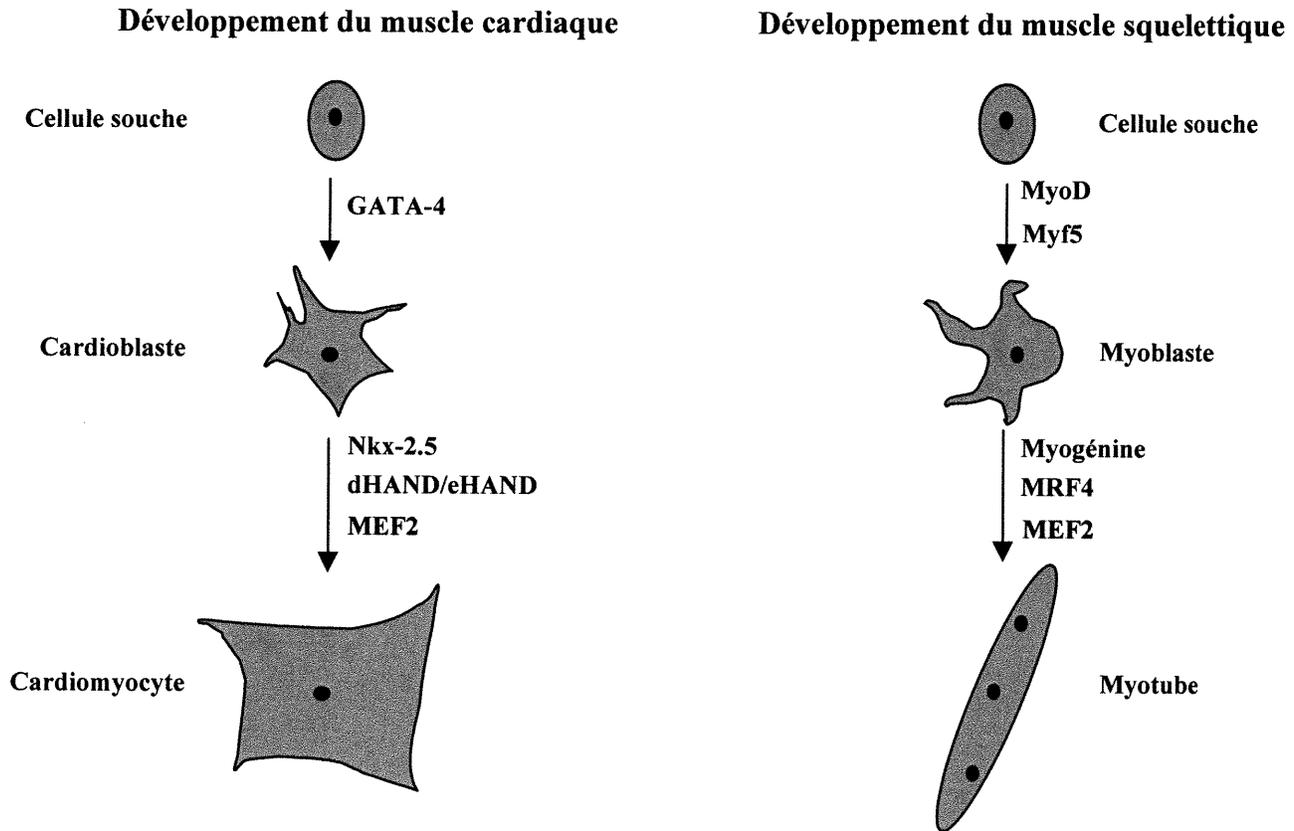


Figure 1.3 Développement des muscles squelettique et cardiaque. Différentes protéines bHLH de la famille MyoD (Myf5, MyoD, myogénine, et MRF4) sont exprimées lors du développement du muscle squelettique et leur hétérodimérisation peut contrôler certains aspects de la myogénèse ainsi que la détermination de la lignée cellulaire. Cependant, aucune expression des protéines bHLH myogéniques n'est observé au cours du développement du muscle cardiaque. Récemment, de nouveaux facteurs bHLH, dHAND et eHAND, exprimés précocement dans le développement du muscle cardiaque, ont été caractérisés comme étant impliqués dans la cardiogénèse. Les facteurs spécifiques au muscle cardiaque, GATA-4 et Nkx2-5, qui sont importants pour la différenciation des cellules cardiaques, interagissent ensemble pour réguler l'expression des gènes cardiaques. Les facteurs MEF2 joueraient un rôle de co-facteurs dans les muscles squelettique et cardiaque.

1.2.1. Éléments agissant en *cis* dans le promoteur du gène de l'ANF

Deux peptides natriurétiques sont synthétisés dans les cardiomyocytes, le peptide natriurétique de type A (ANP, plus souvent appelé ANF) et le peptide natriurétique de type B (BNP). Ces deux peptides sont sécrétés et agissent *via* des récepteurs spécifiques sur plusieurs tissus cibles pour augmenter la natriurèse, la diurèse, la vasodilatation et possèdent ainsi des effets hypotenseurs importants (Cantin et al., 1987; Rosenzweig and Seidman, 1991). L'étude du promoteur de l'ANF a contribué à élucider des mécanismes impliqués dans le contrôle spatio-temporel de l'expression des gènes dans le coeur. Durant le développement embryonnaire, le gène de l'ANF est exprimé dans les oreillettes ainsi que dans les ventricules. Cependant, l'expression postnatale du gène de l'ANF est restreinte spécifiquement aux oreillettes (Argentin et al., 1994). À l'aide de cultures primaires de cardiomyocytes de rats, il a été possible d'identifier des éléments régulateurs spécifiques des différents stades du développement cardiaque (Argentin et al., 1994) (Figure 1.4). En effet, les premières 700 pb du promoteur de l'ANF, qui sont suffisantes pour l'expression spécifique au muscle cardiaque (Argentin et al., 1994), contiennent de nombreux éléments agissant en *cis* qui régulent la transcription du gène de l'ANF (Figure 1.4).

1.2.1.1. Les éléments *GATA*

Les éléments *GATA*, qui ont d'abord été identifiés comme séquences activatrices dans les promoteurs érythroïdes et les régions de contrôle du locus (LCR) des gènes α - et β -globine (Orkin, 1995), sont caractérisés par la séquence (A/T)GATA(A/G). En plus de leur rôle dans l'expression tissu-spécifique des gènes érythroïdes, les éléments *GATA*

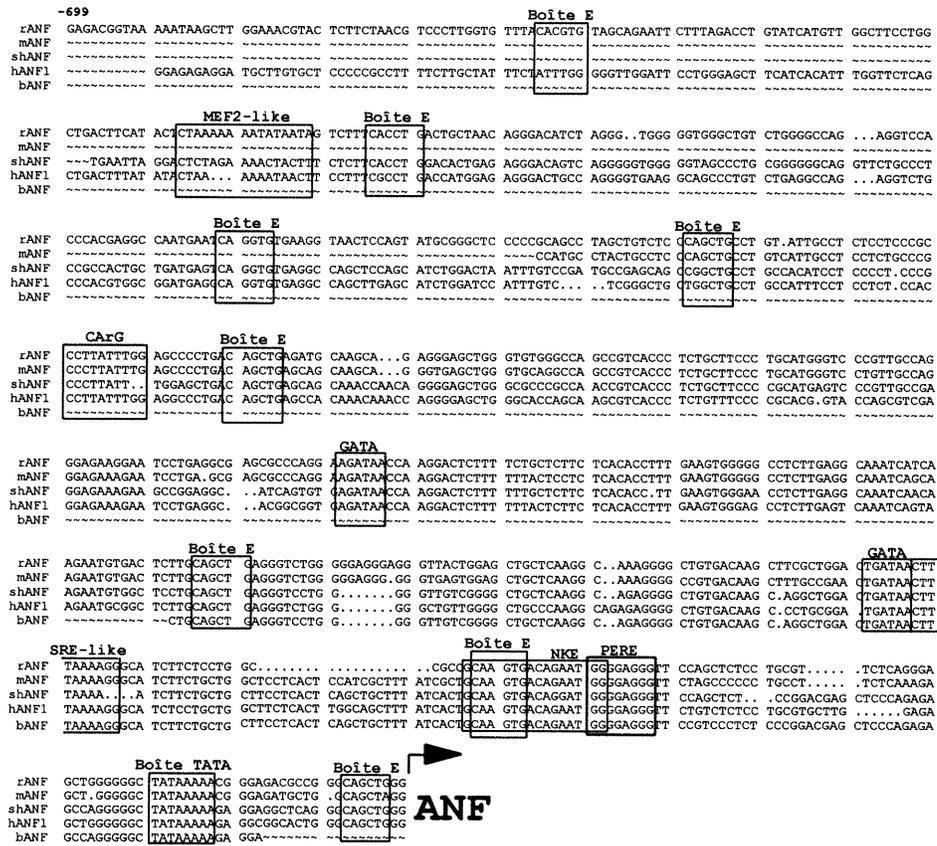


Figure 1.4 Alignement des 700 premières paires de bases des promoteurs de l'ANF de rat (rANF), de souris (sANF), du mouton (mANF), et du bovin (bANF). À noter la très grande conservation des éléments agissant en cis dans le promoteur de l'ANF des différentes espèces.

jouent également un rôle très important dans l'expression tissu-spécifique de plusieurs gènes exprimés dans divers types cellulaires comme l'endothélium (Wilson et al., 1990), les mégakaryocytes (Martin et al., 1990), les neurones (Lawson et al., 1996) et les lymphocytes (Joulin et al., 1991). Ces éléments GATA peuvent également agir comme boîte TATA pour plusieurs gènes comme le gène de la β -globine, du PF4 de rat (platelet factor-4), de l'érythropoïétine ainsi que du BNP (Aird et al., 1994; Grépin et al., 1994). D'après des expériences faites sur le promoteur de PF4, un gène transcriptionnellement actif dans les mégakaryocytes, la répression de l'expression de ce promoteur dans les cellules non-mégakaryocytaires pourrait être causée par une compétition entre les facteurs GATA et les facteurs du complexe de préinitiation de la transcription, comme TF_{II}D (Aird et al., 1994). Ces résultats proposent un mécanisme de répression transcriptionnelle des gènes contenant une boîte TATA modifiée en élément GATA dans un type cellulaire qui n'exprime pas ces gènes.

Plusieurs éléments GATA ont été découverts dans des promoteurs des gènes cardiaques comme l'ANF (Durocher et al., 1996), le BNP (Grépin et al., 1994), la troponine cardiaque C (cTpC) (Ip et al., 1994), la troponine cardiaque I (cTpI) (Murphy et al., 1997), la chaîne légère de myosine de type 3 (MLC3) (McGrew et al., 1996) et la chaîne lourde α de myosine (α MHC) (Molkentin et al., 1994). Dans les premières 700 pb du promoteur de l'ANF, suffisantes pour l'expression tissu-spécifique dans le muscle cardiaque (Argentin et al., 1994), deux éléments GATA, conservés entre les espèces, ont été identifiés comme étant essentiels à l'activité maximale du promoteur (Charron et al., 1999b). Les éléments GATA interagissent souvent avec d'autres éléments régulateurs voisins pour moduler la transcription. Par exemple, l'élément GATA proximal, situé à –

120 pb sur le promoteur de l'ANF, agit en coopération avec le site NKE (NK-2 element) à -90 pb (Durocher et al., 1997). La découverte de plusieurs éléments GATA dans différents promoteurs cardiaques et leur distribution très répandue suggère qu'ils jouent un rôle important dans l'établissement ou le maintien de l'expression des gènes cardiaques.

1.2.1.2. Le site NKE

Récemment, un nouvel élément cardiaque agissant en *cis* dans la région proximale du promoteur de l'ANF a été caractérisé comme le site de liaison du facteur de transcription à homéodomaine Nkx2-5 (NKE). L'élément NKE de l'ANF (GCAAGTGACAGAATGG) diffère légèrement d'un site NKE de haute affinité tel que déterminé par des expériences *in vitro* de sélection de sites (Chen and Schwartz, 1995). En fait, les deux séquences de nucléotides soulignées sont des sites de liaison de basse affinité pour Nkx2-5 (Durocher et al., 1996). Plusieurs autres promoteurs cardiaques contiennent des motifs NKE, dont le promoteur de l'actine cardiaque de type α (α CA) (Sepulveda et al., 1998), de α MHC et de la chaîne légère de myosine de type 2 (MLC2) (Durocher et al., 1996). Plusieurs études ont révélé que des éléments NKE agissent souvent en coopération avec d'autres séquences en *cis* d'un promoteur pour contrôler l'expression d'un gène. En effet, dans le cas du promoteur de l'ANF, le site NKE peut interagir avec un des sites GATA (Durocher et al., 1997), et dans le cas du promoteur de l' α CA, le NKE interagit avec un élément de réponse au sérum (SRE, Serum response element) (Chen and Schwartz, 1996b). Étant donné la proximité de l'élément NKE et du

site SRE-like sur le promoteur de l'ANF, des interactions Nkx2-5/SRF seraient également possible sur le promoteur de l'ANF.

1.2.1.3. La boîte CArG

Les boîtes CArG, possédant une séquence consensus CC(A/T)₆GG, sont impliquées dans deux différents types de réponses transcriptionnelles: la réponse immédiate des gènes précoces au sérum, médiée par le SRE, et l'activation transcriptionnelle de gènes musculaires durant la différenciation musculaire (Soulez et al., 1996). Par exemple, l'augmentation de la transcription du gène de la dystrophine lors de la différenciation des cellules musculaires, est induite par la liaison de SRF à l'élément CArG présent sur le promoteur (Galvagni et al., 1998). Ce même élément peut également être reconnu par une protéine à doigt de zinc multifonctionnelle, YY1 (Ying Yang 1), qui compétitionne la liaison de SRF au CArG et module ainsi de façon négative la transcription du gène de la dystrophine (Galvagni et al., 1998).

Plusieurs promoteurs cardiaques contiennent des boîtes CArG. Les séquences régulatrices du promoteur de l'isozyme M de la créatine kinase (MCK, Muscle creatine kinase) ont été finement caractérisées dans les muscles squelettique et cardiaque. Ce promoteur contient un élément CArG situé à -179 pb essentiel pour l'expression cardiaque-spécifique. Malgré le fait que cette boîte soit le site de liaison des protéines SRF et YY1 dans le muscle cardiaque et le muscle squelettique, le gène codant pour MCK est contrôlé par différents mécanismes dans ces deux types de muscles. Le promoteur du gène humain codant pour l' α CA contient deux boîtes CArG qui régulent mutuellement de façon positive l'expression de ce gène (Miwa and Kedes, 1987). À

l'image de la plupart des éléments régulateurs d'un promoteur, les boîtes CArG peuvent interagir avec d'autres éléments agissant en *cis* pour réguler la transcription d'un gène (Miwa and Kedes, 1987; Galvagni et al., 1997). Parmi les régulateurs spécifiques des différents stade du développement cardiaque, une boîte CArG parfaitement conservée entre les promoteurs humain et de rat est nécessaire pour la transcription du gène de l'ANF dans des ventricules adultes, alors que l'élément est inactif dans des ventricules aux stades embryonnaires ou nouveaux-nés (Argentin et al., 1994). D'autres études ont également démontré que des éléments contenant des motifs CArG contribuent à l'activité cardiaque-spécifique des promoteurs MCK {Vincent, Gualberto, et al. 1993 2832 /id} et α MHC {Thompson, Nadal-Ginard, et al. 1991 1784 /id}. Cette boîte CArG, située à -400 pb sur le promoteur de l'ANF, est une cible directe pour le facteur de transcription SRF mais non pour la protéine YY1 (Argentin et al., 1994).

1.2.1.4. L'élément de réponse au sérum de basse affinité (SRE de basse affinité)

Les 150 premières paires de bases du promoteur de l'ANF sont connues pour être suffisantes pour obtenir une grande activité de ce promoteur dans des cardiomyocytes (Durocher et al., 1996). En plus des éléments GATA et NKE, un élément SRE non parfait (CTTTAAAAGG) se situe à -112 pb du promoteur de l'ANF. En effet, seulement une paire de bases ne correspond pas au SRE parfait, soit CC(A/T)₆GG. La mutation de ce SRE de basse affinité (SRE-like) dans le contexte du promoteur de l'ANF contenant 135 pb se traduit par une perte de l'activité du promoteur ainsi que d'une perte de la liaison de la protéine SRF à cet élément (Sprenkle et al., 1995). Plus récemment, il a été démontré qu'en plus de réguler l'activité transcriptionnelle d'un gène en réponse à des facteurs de

croissance, l'élément SRE de basse affinité peut également contrôler l'expression de gènes inductibles en modulant l'habilité d'autres facteurs de transcription à stimuler la machinerie transcriptionnelle (Hines et al., 1999).

Durant l'hypertrophie cardiaque, une ré-induction des gènes fœtaux cardiaques, dont l'ANF, est observée (Knowlton et al., 1991; Boheler and Schwartz, 1992; Chien et al., 1991; von Harsdorf et al., 1994; Simpson, 1989; Karns et al., 1995). Les mécanismes impliqués dans l'activation transcriptionnelle du gène de l'ANF en réponse à un stimulus hypertrophique sont encore très mal connus. Cependant, des études ont démontré que le SRE de basse affinité est impliqué dans l'activation du promoteur de l'ANF en réponse aux agonistes α_1 -adrénergiques (Sprenkle et al., 1995; Hines et al., 1999).

1.2.1.5. Élément A/T riche distal

En plus du SRE de basse affinité et de la boîte CArG, les 700 premières pb du promoteur de l'ANF contiennent une autre séquence A/T riche située à -580 pb (Figure 1.4). Cette séquence (CTAAAAAATATAATA) est très similaire à un site de liaison pour les facteurs MEF2 [(C/T)TA(A/T)₄TA(A/G)]. Par contre, des études précédentes suggèrent que ces protéines MEF2 ne sont pas les protéines majoritaires liant cette séquence (Harris et al., 1997). À ce jour, aucune protéine n'a été caractérisée comme étant le facteur majoritaire liant cet élément. Comme le SRE-like, l'élément A/T riche distal pourrait être également impliqué dans la réponse hypertrophique puisqu'une mutation de cet élément réduit l'activation du promoteur en réponse à un agoniste α_1 -adrénergique (Harris et al., 1997).

Un élément similaire à l'A/T riche distal a également été caractérisé dans le promoteur du gène α MHC (Molkentin and Markham, 1994) et une protéine nommée ARF (A-rich factor) a été identifiée comme étant le facteur liant cet élément (Molkentin and Markham, 1994). Bien que la nature exacte (incluant la séquence primaire) de l'ARF reste à être élucidée, les résultats obtenus suggèrent que cette protéine nécessite un site de liaison constitué de TAAAAAAA, ce que l'on retrouve parfaitement dans l'élément A/T riche distal, suggérant que l'ANF pourrait être une cible potentielle du facteur ARF. De plus, des sites de liaison potentiels pour la protéine ARF sont également présents dans plusieurs autres gènes qui sont activés durant l'hypertrophie cardiaque (Molkentin and Markham, 1994).

1.2.1.6. Les boîtes E

La découverte des protéines bHLH de la famille MyoD et leur importance dans la myogénèse squelettique a provoqué beaucoup d'intérêt pour l'étude des protéines bHLH dans le coeur. Les protéines bHLH reconnaissent une séquence d'ADN nommée boîte E. Ces boîtes E, caractérisées par la séquence consensus CANNTG, sont retrouvées dans plusieurs promoteurs de gènes cardiaques, tels MLC-2 (Navankasattusas et al., 1994), α MHC (Gupta et al., 1994), α CA (Moss et al., 1994), et MCK (Shield et al., 1996). Des souris transgéniques où les boîtes E du promoteur MCK ont été mutées montrent une abolition de l'expression du transgène dans le muscle cardiaque, impliquant ces boîtes E dans la transcription cardiaque-spécifique (Shield et al., 1996). Les 700 premières pb du promoteur de l'ANF contiennent huit boîtes E, suggérant une régulation possible du gène de l'ANF par les protéines bHLH. Cependant, la ou les protéines qui interagissent avec

les boîtes E du promoteur de l'ANF ou d'autres promoteurs cardiaques sont encore inconnues.

1.2.1.7. L'élément PERE

À l'aide de culture primaire de cardiomyocytes de rats néonataux, un élément de réponse aux agonistes α_1 -adrénergique a été identifié dans la partie proximale du promoteur de l'ANF (Ardati and Nemer, 1993). Cet élément, nommée PERE (phényléphrine (PE) response element) et caractérisé par la séquence GGGGAGGG, est nécessaire et suffisant pour l'activation transcriptionnelle en réponse à la PE. Des expériences de retardement sur gel à l'aide d'extraits nucléaires de cardiomyocytes révèlent quatre complexes PEX (PE-induced complex) dont les complexes C1 et C2 qui sont augmentés lorsque les cellules sont traitées avec la PE (Ardati and Nemer, 1993). Cependant, l'identité des protéines contenues dans ces complexes et liant cette séquence reste indéterminée.

1.2.2. Les facteurs de transcription cardiaques

Durant la myogénèse cardiaque, plusieurs gènes codant pour des protéines requises dans la contractilité et dans les propriétés métaboliques du cœur sont transcriptionnellement activés. Plusieurs de ces gènes, comme MCK, les troponines I, C et T, l' α CA et α MHC, sont également exprimés dans le muscle squelettique, alors que d'autres, comme l'ANF, se retrouvent spécifiquement dans le cœur. Le chevauchement du patron d'expression des gènes spécifiques aux muscles cardiaques et aux muscles squelettiques suggère l'existence d'un système de régulation commun pour le contrôle de

l'expression des gènes musculaires. Cependant, des mécanismes propres au muscle cardiaque, incluant des facteurs de transcription spécifique au coeur, doivent également exister. L'identification des facteurs impliqués dans la cardiogénèse et dans la régulation de gènes spécifiques au coeur est fondamentale à la compréhension de la croissance et du développement cardiaque.

Contrairement au muscle squelettique, où les protéines de la famille MyoD jouent un rôle clé dans l'activation du programme de transcription et de différenciation musculaire (Figure 1.3), les facteurs et les mécanismes moléculaires impliqués dans la transcription et la différenciation cardiaque sont encore peu connus. Plusieurs groupes ont essayé d'isoler l'homologue de MyoD mais ces efforts ont tous été vains. Cependant, des stratégies génétiques comme l'inactivation de gènes spécifiques et les études transcriptionnelles *in vitro* des promoteurs cardiaques ont significativement contribuées à identifier des nouvelles voies de signalisation impliquées dans le développement du coeur. Cependant, et malgré la découverte de plusieurs facteurs impliqués dans la cardiogénèse, beaucoup de travail reste à faire afin de comprendre la cascade de régulation des gènes cardiaques et de la différenciation des cardiomyocytes (Figure 1.3).

1.2.2.1. Les facteurs de transcription de la famille GATA

1.2.2.1.1. Études structure/fonction des protéines GATA

Les membres de la famille des facteurs de transcription GATA sont des protéines à doigts de zinc connues pour avoir un rôle important dans l'expression tissu-spécifique de certains gènes et dans la différenciation cellulaire (Simon, 1995). Le membre fondateur de cette famille, GATA-1, est exprimé dans le système hématopoïétique où il

agit, entre autre, comme activateur clé des gènes de globine en se liant aux sites GATA consensus situés dans les promoteurs et les LCRs de ces gènes (Orkin et al., 1995) (Charron and Nemer, 1999a). Basée sur l'homologie de séquences des doigts de zinc de GATA-1, deux autres protéines exprimées principalement au niveau du système hématopoïétique, GATA-2 et -3, ont été identifiées par clonage moléculaire (Simon, 1995).

La découverte de plusieurs promoteurs cardiaques contenant des sites de liaison pour ces facteurs de transcription, dont l'ANF et le BNP, a amené à la caractérisation d'un nouveau membre, GATA-4, une protéine de 443 acides aminés, spécifique au coeur et aux gonades (Grépin et al., 1994; Viger et al., 1998). GATA-4 possède deux doigts de zinc constituant son domaine de liaison à l'ADN, ainsi que des domaines de transactivation en N- et en C-terminal (Figure 1.5A). Chez *Xenopus* et le poulet, deux autres facteurs GATA, GATA-5 et -6, ont été isolé par hybridation à basse stringence au domaine de liaison à l'ADN de GATA-1 et sont principalement exprimés dans le coeur et l'intestin (Laverriere et al., 1994; Jiang and Evans, 1996). Les homologues murin et de rats de ces facteurs ont également été caractérisés (Morrisey et al., 1997; Nemer et al., 1999; Qureshi et al., 1996; Morrisey et al., 1996). Une grande homologie est observée entre les facteurs GATA-4, -5 et -6 au niveau de leur séquence d'acides aminés. Cette homologie atteint 90% dans le domaine de liaison à l'ADN, 45% dans le domaine en N-terminal, et 35% dans la région C-terminale de ces protéines (Figure 1.5A) (Charron and Nemer, 1999b). Des études de transfection dans des cellules non-cardiaques ont démontré l'implication de GATA-4 dans la régulation de plusieurs gènes cardiaques incluant α MHC (Molkentin et al., 1994), cTpC (Ip et al., 1994), l'ANF (Durocher et al., 1997) et

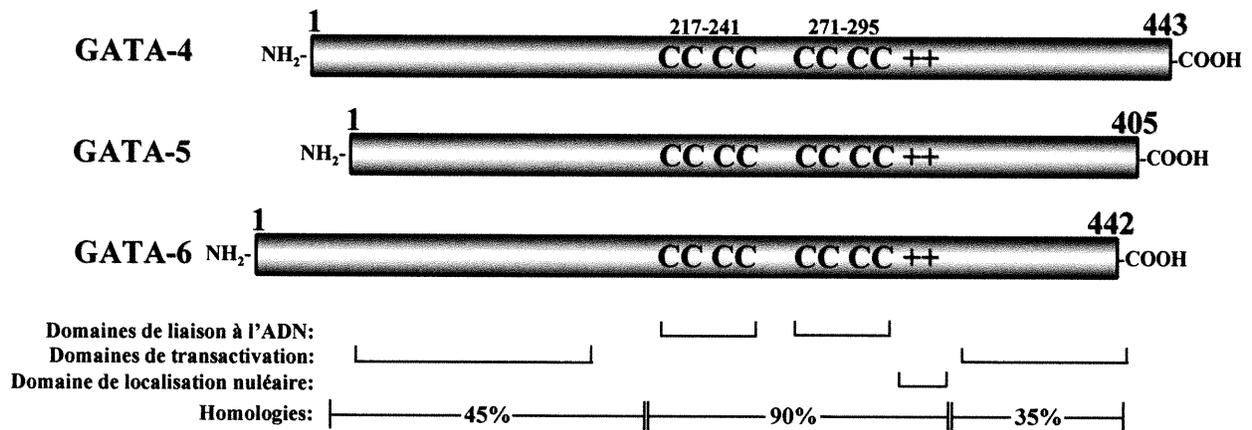


Figure 1.5 Structure des protéines GATA-4, GATA-5, et GATA-6 démontrant les domaines de liaison à l'ADN par des résidus cystéine (doigts de zinc), et deux domaines de transactivation en N- et C-terminal. La région basique adjacente au doigt de zinc en C-terminal constitue le domaine de localisation nucléaire.

le BNP (Grépin et al., 1994). De plus, l'expression transitoire de GATA-4 dans des cardiomyocytes de rats néonataux transactive les promoteurs de l'ANF et du BNP (Grépin et al., 1994; Thuerauf et al., 1994). Le rôle de GATA-4 dans la cardiogénèse a été déterminé par des expériences d'inactivation de gène et par des études de perte ou de gain de fonction. Le laboratoire du Dr Nemer a mis en évidence pour la première fois que GATA-4 joue un rôle dans la différenciation cardiaque. En effet, à l'aide d'une stratégie antisens dans des cellules pluripotentes P19, on observe une différenciation cardiaque incomplète accompagnée d'un grand nombre de cellules pré-cardiaques en apoptose, suggérant un rôle essentiel pour GATA-4 dans la survie, la prolifération et/ou la différenciation des cellules cardiaques (Grépin et al., 1995; Grépin et al., 1997). Ces études ont par ailleurs suggéré que, malgré son expression très précoce au cours du développement, GATA-4 n'est pas essentiel à la spécification des lignées cellulaires cardiaques. En effet, des souris déficientes en GATA-4 (*GATA-4^{-/-}*) développent tout de même le mésoderme splanchnique qui se différencie en myocytes cardiaques primitifs exprimant les protéines contractiles (Kuo et al., 1997). Cependant, ces pré-cardiomyocytes ne migrent pas du côté ventral pour former le tube cardiaque et il y a donc formation de structures cardiaques aberrantes dans les régions antérieure et dorsolatérale de l'embryon (Kuo et al., 1997; Molkenin et al., 1997).

1.2.2.1.2. Patron d'expression des facteurs GATA cardiaques

GATA-4, -5 et -6 sont régulés de façon différentielle lors du développement cardiaque où GATA-4 est le transcrit majoritaire dans les cardiomyocytes à tous les stades du développement. GATA-4 peut être détecté dans le mésoderme précardiaque dès

les jours embryonnaires E7.0-7.5. L'expression de GATA-4 précède celle des marqueurs les plus précoces de la différenciation cardiaque dont le gène de l'ANF (Laverrière et al., 1994; Jiang and Evans, 1996; Heikinheimo et al., 1994). À des stades plus tardifs, l'expression de GATA-4 peut être détectée à de haut niveau dans le myocarde et dans l'endocarde du coeur postnatal (Grépin et al., 1994; Heikinheimo et al., 1994). Il apparaît donc que GATA-4 soit un marqueur précoce des cellules cardiaques où il agit comme régulateur de la cardiogénèse. L'expression de GATA-5 est restreinte au coeur embryonnaire et majoritairement aux cellules de l'endocarde (Morrisey et al., 1997b; Laverrière et al., 1994; McCracken et al., 1997), tandis que GATA-6 se retrouve, tout comme GATA-4, dans le mésoderme pré-cardiaque et, plus tardivement, dans les cellules du myocarde et dans les muscles vasculaires lisses (Jiang and Evans, 1996; Morrisey et al., 1996; Gove et al., 1997).

1.2.2.1.3. Interactions des facteurs GATA avec d'autres protéines

Les facteurs de transcription de la famille GATA sont connus pour agir en coopération avec d'autres cofacteurs restreints à un type cellulaire. Par exemple, FOG (Friend of GATA-1), une protéine à multiple doigts de zinc, a été identifiée à l'aide du domaine conservé de liaison à l'ADN de GATA-1 en utilisant le système de double hybride (Tsang et al., 1997). FOG-1 est coexprimé avec GATA-1 durant le développement embryonnaire dans les cellules érythroïdes et les mégakaryocytes. Des études de structure/fonction ont également démontré que ce cofacteur interagit au niveau du premier doigt de zinc de GATA-1 (Tsang et al., 1997). Des protéines spécifiques aux cellules érythroïdes comme la protéine LIM RBTN2 (Osada et al., 1995), le facteur

basique leucine zipper NFE-2 (Walters and Martin, 1992), et la protéine à doigt de zinc EKLF (Merika and Orkin, 1995) sont aussi capable d'interagir avec GATA-1.

L'induction de la cardiogénèse est observée uniquement dans un environnement "permissif" lorsqu'on exprime ectopiquement GATA-4 dans les cellules P19 (Charron and Nemer, 1999a; Grépin et al., 1997), suggérant la nécessité de cofacteurs pour observer l'action de GATA-4. En effet, plusieurs facteurs de transcription spécifiques au coeur qui interagissent avec GATA-4 ont été identifiés. Nkx-2.5, un facteur de transcription à homéodomaine, interagit physiquement et fonctionnellement avec GATA-4 afin d'activer de façon synergique les gènes de l'ANF et de l' α CA (Durocher et al., 1997; Sepulveda et al., 1998). L'interaction GATA-4/Nkx2-5 serait essentielle pour médier les signaux de certains facteurs de croissance/différenciation notamment le BMP et le FGF (Durocher and Nemer, 1998; Monzen et al., 1999; Reifers et al., 2000). Le facteur de transcription NF-AT3 (Nuclear factor of activated T cells), qui médie l'hypertrophie cardiaque *via* la voie de la calcineurine, interagit également avec GATA-4, suggérant que GATA-4 pourrait jouer un rôle dans l'hypertrophie cardiaque (Charron and Nemer, 1999). Récemment, trois équipes différentes ont identifié une nouvelle protéine apparentée à FOG, FOG-2, qui est principalement exprimée dans le coeur embryonnaire et adulte, le cerveau, et les testicules (Tevosian et al., 1999; Svensson et al., 1999; Lu et al., 1999). FOG-2 interagit avec le premier doigt de zinc de GATA-4 résultant en une activation ou une répression de promoteurs cardiaques qui sont dépendant des facteurs GATA (Svensson et al., 1999) (Lu et al., 1999). Les embryons *FOG-2*^{-/-} meurent à la migestation accompagnés de plusieurs défauts dans la morphogénèse cardiaque (Tevosian et al., 2000; Svensson et al., 2000).

1.2.2.1.4. Voies de signalisation impliquant le facteur GATA-4

Durant le développement embryonnaire, le gène de l'ANF est exprimé dans les ventricules et les oreillettes. Cependant, peu après la naissance, cette expression est restreinte aux oreillettes (Argentin et al., 1994) (Chien et al., 1993). Durant l'hypertrophie cardiaque, une ré-expression du gène de l'ANF est observée dans le ventricule. Des facteurs humoraux comme l'angiotensine II (ANGII) (Baker et al., 1992) et la PE (McDonough et al., 1993) sont capables d'induire une hypertrophie cardiaque. Cependant, comment le signal hypertrophique se rend jusqu'au noyau pour activer le gène de l'ANF est inconnu. Morimoto et al. ont récemment démontré que GATA-4 est phosphorylé par les MAPK (Mitogen activated protein kinases) ERK1/2 suite à la stimulation des cardiomyocytes avec la PE (Morimoto et al., 2000). En effet, suite à l'élévation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire produit par la liaison des facteurs humoraux à leur récepteur, les différentes voies des MAPK sont activées et des facteurs de transcription spécifiques sont alors phosphorylés pour produire la réponse hypertrophique (Figure 1.6). L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire peut également activer la phosphatase calcineurine qui elle, provoque la translocation des facteurs NF-AT au noyau en déphosphorylant ceux-ci (Molkentin et al., 1998a). Une fois au noyau, NF-AT peut interagir directement avec GATA-4 pour réguler l'expression des gènes cibles (Figure 1.6). Ainsi, GATA-4 pourrait être le médiateur nucléaire de plusieurs voies de signalisation intracellulaire requises pour la fonction des cardiomyocytes.

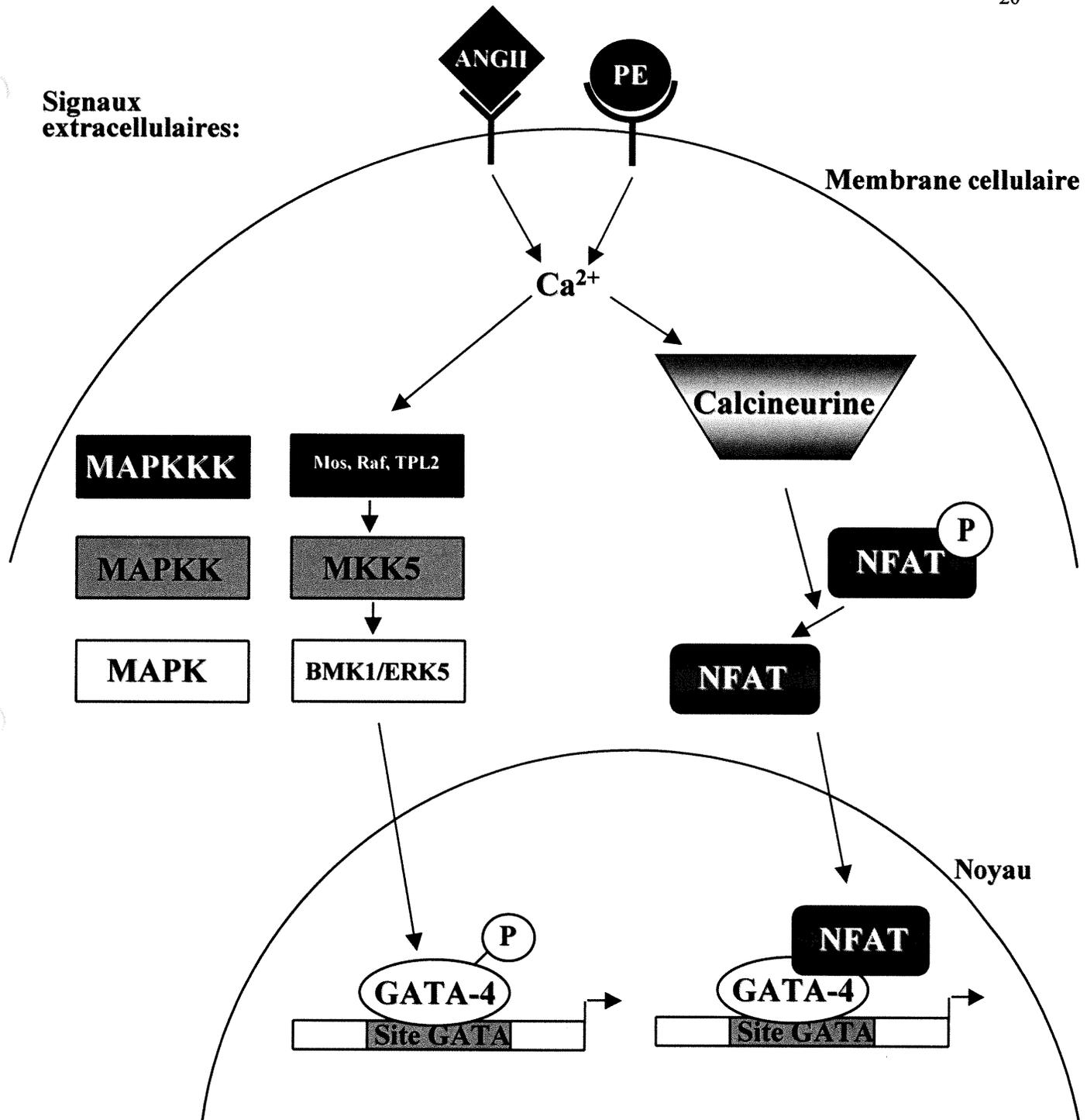


Figure 1.6 Voies de signalisation impliquant le facteur GATA-4. Suite à la liaison des facteurs humoraux ANG II et PE à leur récepteur, une élévation du Ca²⁺ intracellulaire active 2 voies de signalisation différentes impliquant GATA-4. Premièrement, l'activation de la phosphatase calcineurine provoque la déphosphorylation des facteurs NF-Ats qui, suite à leur translocation au noyau, interagissent directement avec GATA-4. Deuxièmement, il a été démontré que la voie des MAPKs ERK1/2 est capable de phosphoryler directement GATA-4 suite à un stimulus hypertrophique comme PE.

1.2.2.2. Les facteurs de transcription à boîtes MADS

Les facteurs de transcription à boîte MADS (MCM1-agamous-ARG80-déficients-Serum response factor) constitue une famille de protéines incluant les facteurs de transcription métazoaires SRF et MEF2, les facteurs de transcription de levure MCM1 et ARG80, et plusieurs produits de gènes homéotiques de plantes (Nurrish and Treisman, 1995). Les facteurs de transcription à boîte MADS jouent un rôle clé dans le contrôle de divers processus biologiques comme le développement de l'organe floral (Ma, 1994; Weigel and Meyerowitz, 1994), la transcription de gènes spécifiques à certains types de cellules ainsi que la réponse aux phéromones chez la levure (Dolan and Fields, 1991). Chez les humains, le facteur de transcription SRF régule l'expression des gènes précoces immédiats (Treisman, 1992) tandis que les protéines MEF2 sont impliquées dans la régulation des gènes spécifiques aux muscles (Buckingham, 1994).

La boîte MADS est un motif très conservé de 56 acides aminés retrouvé dans le domaine de liaison à l'ADN de plusieurs facteurs de transcription eucaryotes. La région N-terminale de la boîte MADS est principalement hydrophilique avec une grande proportion de résidus basiques, contrairement à la région C-terminale qui est principalement hydrophobique. Dans cette boîte, on note neuf résidus qui demeurent identiques parmi toutes les protéines à boîtes MADS connues. L'alignement de séquences de différentes boîtes MADS connues ne requière aucune insertion, suggérant une grande conservation dans la structure secondaire de ces éléments à travers les différents membres de cette famille. En plus de leur domaine de liaison à l'ADN hautement conservé, les protéines à boîte MADS possèdent des spécificités de liaison à l'ADN très similaires. La capacité de ces protéines à former des dimères reflète la symétrie en dyade de leurs sites

de liaison retrouvés dans plusieurs promoteurs. Les sites de liaisons les plus largement caractérisés sont les éléments CARG (site de liaison de SRF) et les séquences à boîte P (site de liaison de MCM1), consistant d'éléments riche en A/T.

1.2.2.2.1. Les facteurs de transcription de la famille MEF2

1.2.2.2.1.1. Études structure/fonction

Les membres de la famille de facteur de transcription MEF2 sont des protéines à boîte MADS qui ont été originellement identifiées comme l'activité de liaison à un élément régulateur spécifique aux muscles (élément MEF2) et présent dans les cellules musculaires différenciés (myotubes) mais pas dans les myoblastes (Gossett et al., 1989).

Chez les vertébrés, il y a quatre gènes *mef2*: *mef2a*, *-b*, *-c*, et *-d*, qui sont localisés sur différents chromosomes (Pollock and Treisman, 1991; Yu et al., 1992; Breitbart et al., 1993; Leifer et al., 1993; McDermott et al., 1993; Hobson et al., 1995; Molkenin and Olson, 1996). L'organisation des introns et des exons des gènes *mef2* de vertébrés et de la drosophile est identique dans les régions conservées des gènes, suggérant l'existence d'un gène *mef2* ancestral commun. En plus de la boîte MADS, les protéines MEF2 requièrent un domaine de 29 acides aminés unique aux facteurs MEF2 et appelé le domaine MEF2 pour une plus grande affinité de liaison à l'ADN et de dimérisation entre les différentes protéines de la famille MEF2 (Molkenin et al., 1996b) (Figure 1.7). Les protéines MEF2 peuvent homo- et hétérodimériser, mais ne peuvent hétérodimériser avec d'autres facteurs à boîtes MADS, suggérant que les acides aminés établissant l'interface de dimérisation ne sont pas conservés à l'extérieur de la famille MEF2. Ceci a été confirmé récemment par la

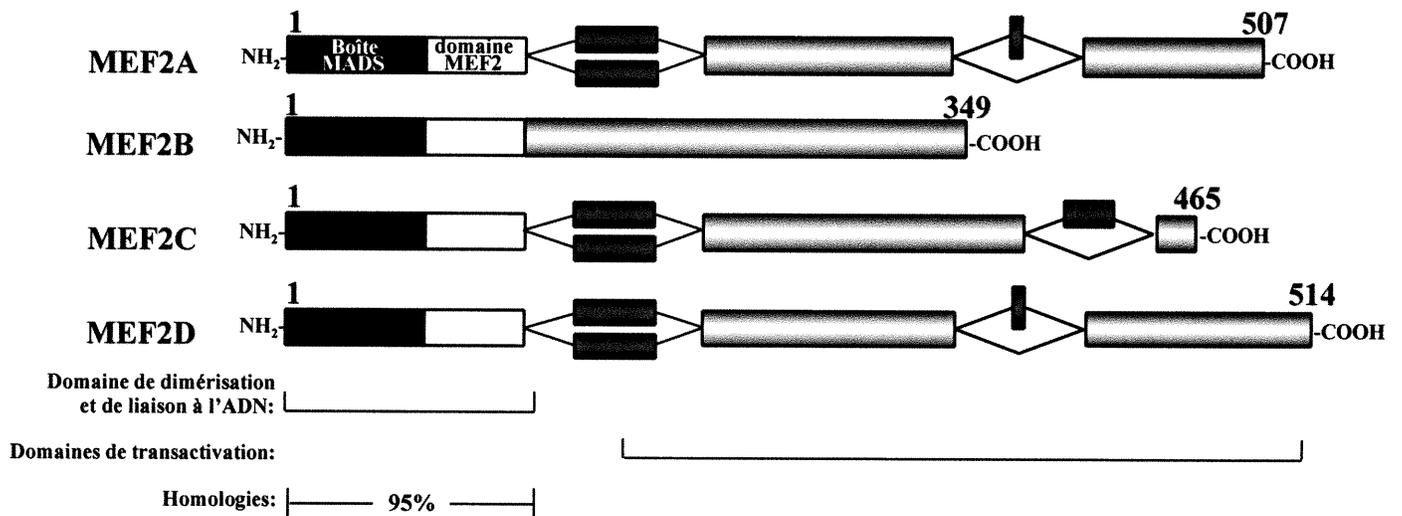


Figure 1.7 Structure des différentes protéines MEF2 où la boîte MADS correspond au domaine de liaison à l'ADN et le domaine MEF2 à la région de dimérisation de la protéine. Un domaine de transactivation est retrouvé dans la région C-terminale des protéines.

structure cristallographique de plusieurs protéines MADS liées à leur site, incluant MEF2, SRF et MCM1 (Santelli and Richmond, 2000; Pellegrini et al., 1995; Tan et al., 2000). Si la boîte MADS et le domaine MEF2 sont nécessaires et suffisants pour la liaison à l'ADN, l'activité transcriptionnelle n'est pas conférée par ces régions. En effet, les régions en C-terminales des protéines MEF2, qui sont sujettes à l'épissage alternatif, contiennent les domaines de transactivation (Figure 1.7).

Comme toutes les autres protéines à boîtes MADS, les protéines MEF2 lient une séquence riche en A/T, dont la séquence consensus est CTA(A/T)₄TAG (West et al., 1997). Des sites de liaison pour les protéines MEF2 ont été identifiés dans les promoteurs de plusieurs gènes exprimés dans les muscles cardiaque et squelettique dont l'aldolase A (Joh et al., 1991; Salminen et al., 1995), α MHC (Molkentin and Markham, 1993), *c-jun* (Han and Prywes, 1995), la desmine (Kuisk et al., 1996), la dystrophine (Klamut et al., 1997), Gax (Andres et al., 1995a), MRF4 (Black et al., 1995), MyoD (Dechesne et al., 1994; Pinney et al., 1995), MLC2 (Chambers et al., 1994), l' α SkA (Muscat et al., 1992) et les troponines C (Parmacek et al., 1994), I (Nakayama et al., 1996) et T (Wang et al., 1994).

Des évidences génétiques supportent l'idée que les protéines MEF2 contribuent à l'expression des gènes musculaires et à la myogénèse. Chez la drosophile, la mutation de *D-mef2* bloque la différenciation terminale des trois lignées musculaires, soit des muscles squelettique, cardiaque, et viscéral (Lilly et al., 1995). Les rôles que jouent les gènes *mef2* chez les vertébrés commencent seulement à être élucidés. Ceci est devenu possible suite à des études d'inactivation de gène chez la souris, où le premier gène *mef2* à avoir été inactivé est *mef2c* (*mef2c*^{-/-}) (Lin et al., 1997). Les embryons *mef2c*^{-/-} se développent

normalement jusqu'au jour embryonnaire E9.0, où ils montrent un ralentissement du développement ainsi qu'un épanchement péricardique, indiquant une insuffisance cardiaque. De plus, le tube cardiaque ne subit aucune courbure et le futur ventricule droit ne se forme pas. Dans ces embryons mutants, plusieurs gènes cardiaques, comme l'ANF, α MHC et α CA, ne sont pas exprimés, tandis que d'autres, comme MLC2V et MLC2A, sont exprimés normalement (Lin et al., 1997).

1.2.2.2.1.2. Patron d'expression des protéines MEF2

Durant l'embryogénèse des vertébrés, les transcrits *mef2* se retrouvent abondamment dans les lignées de cellules musculaires ainsi que dans d'autres types cellulaires (Edmondson et al., 1994; Imbalzano et al., 1994; Leifer et al., 1993; Leifer et al., 1994; Subramanian and Nadal-Ginard, 1996). Les gènes *mef2b* et *-c* sont les premiers de la famille à être exprimés avec des transcrits apparaissant au niveau des précurseurs mésodermiques au jour E7.75 qui donneront lieu au coeur (Edmondson et al., 1994; Imbalzano et al., 1994). Peu après, c'est-à-dire au jour E8.0, les transcrits des gènes *mef2a* et *-d* sont exprimés dans le myocarde en développement. Par la suite, les quatre gènes *mef2* continuent à être exprimés partout dans le coeur en développement. L'expression des gènes *mef2* est également détectée dans les lignées de cellules musculaires lisse et squelettique de façon concomitante avec l'activation de leurs programmes de différenciation.

En plus de leur expression au niveau des cellules musculaires, les membres de la famille MEF2 sont également exprimés dans le système nerveux central en développement. Chez les vertébrés, chaque gène *mef2* montre un patron d'expression

unique dans les différentes régions du cerveau (Leifer et al., 1994). Le temps d'expression des protéines MEF2 dans les cellules neurales correspond à l'activation de la différenciation neurale. Cependant, aucun gène neuronal cible n'a encore été identifié à ce jour.

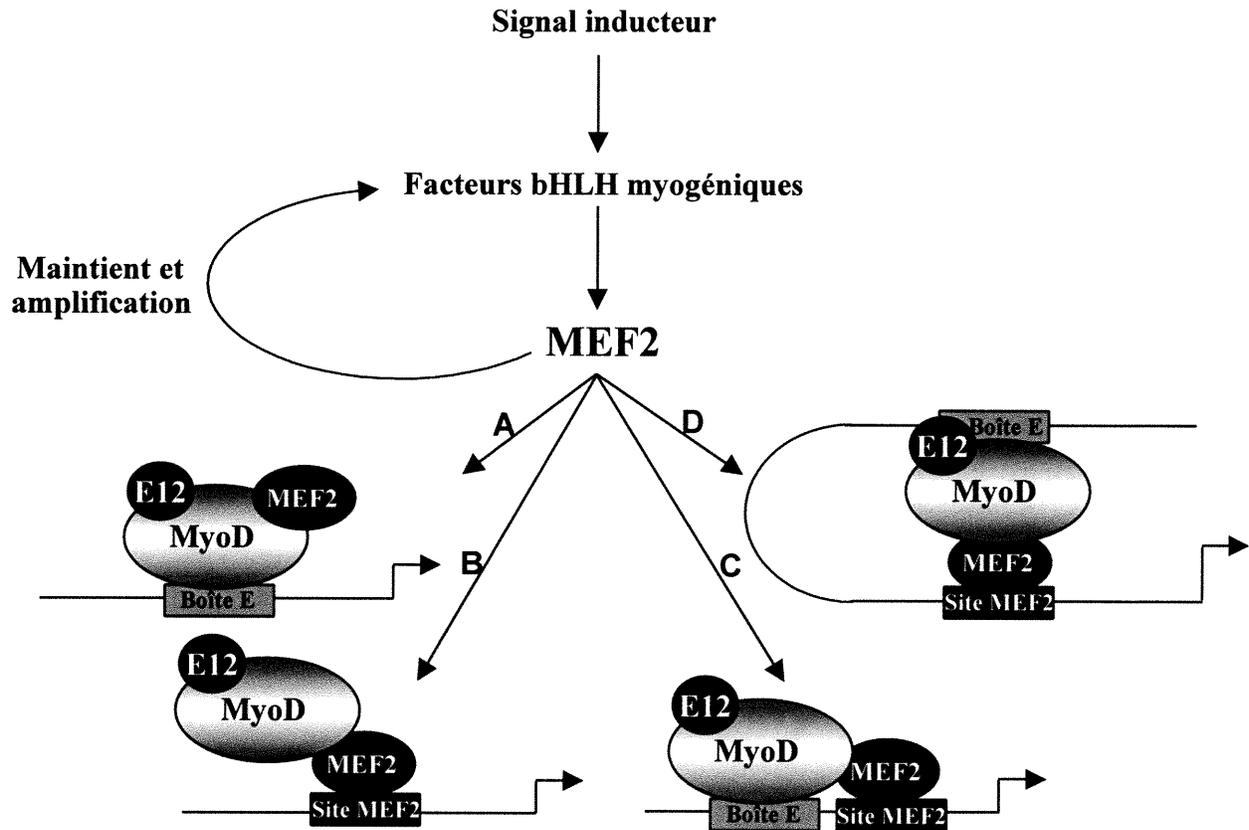
En dépit de l'expression répandue des ARNms *mef2* dans les tissus adultes et dans plusieurs lignées cellulaires, les protéines MEF2 et leur activité de liaison à l'ADN sont hautement enrichi dans les muscles, le coeur et le cerveau (Gossett et al., 1989; Suzuki et al., 1995; Yu et al., 1992). Cette disparité entre l'expression des ARNms *mef2* et les protéines MEF2 suggérait l'existence de mécanismes post-transcriptionnels pour la régulation des facteurs MEF2. En effet, il a été montré que la région 3' non-traduite de l'ARNm de *mef2a* contient une région conservée de 428 nucléotides qui confère une répression de la traduction préférentiellement dans les cellules non-musculaires (Black and Olson, 1998).

1.2.2.2.1.3. Interactions des facteurs MEF2 avec d'autres protéines

Les membres de la famille MEF2, comme les autres protéines à boîte MADS, interagissent avec plusieurs facteurs de transcription pour activer divers programmes d'expression de gènes. Par exemple, MEF2 agit en coopération avec les membres de la famille MyoD, soit MyoD, myogénine et MRF4 pour activer de façon synergique la myogénèse (Yun and Wold, 1996). En effet, la spécification et la différenciation des cellules musculaires squelettiques sont contrôlées par les membres de la famille MyoD qui hétérodimérisent avec les facteurs de transcription bHLH ubiquitaires, les protéines E, et lient une séquence spécifique d'ADN, la boîte E, située dans plusieurs promoteurs

de gènes spécifiques aux muscles (Molkentin and Olson, 1996). Chacun de ces facteurs myogéniques peut activer le programme de différenciation musculaire lorsqu'ils sont surexprimés dans des cellules non-musculaires probablement en coopération avec les facteurs MEF2. Plusieurs études ont démontré que cette synergie est médiée par une interaction directe entre la boîte MADS des protéines MEF2 et le domaine bHLH des facteurs myogéniques (Molkentin et al., 1995; Black et al., 1998). Ainsi, les protéines MEF2 auraient une fonction de co-régulateurs myogéniques, fonction essentielle pour l'initiation de la myogénèse. Quatre mécanismes possibles ont été proposés pour expliquer l'activation des gènes musculaires par les protéines myogéniques et les facteurs MEF2. La coopération entre ces deux familles de protéines peut nécessiter la présence des deux sites de liaison des deux protéines ou peut dépendre d'un mécanisme de recrutement où seulement une des deux protéines lie l'ADN (Figure 1.8) (Molkentin et al., 1995).

Les protéines MEF2 peuvent également interagir avec d'autres protéines bHLH comme MASH1, une protéine de la famille *achaete scute* exprimée dans les neurones; à l'instar de MyoD, MASH1 interagit directement avec la boîte MADS des protéines MEF2 *via* son domaine bHLH, suggérant un rôle similaire des protéines MEF2 dans l'activation synergique de la transcription des lignées myogénique et neuronales (Mao and Nadal-Ginard, 1996). Twist, une autre protéine bHLH, interagit également avec les protéines MEF2 (Spicer et al., 1996). Contrairement à son rôle d'activateur de la différenciation musculaire chez la drosophile, chez les vertébrés, Twist inhibe la myogénèse en interférant avec l'activité des protéines E, et inhibant l'activité transcriptionnelle des protéines MEF2 (Spicer et al., 1996; Hebrok et al., 1994; Rohwedel et al., 1995;



Adaptée de Molkenin J. D. et al. Cell 83: 1125 (1995)

Figure 1.8 Mécanismes possibles pour l'activation des gènes musculaires par les facteurs bHLH myogéniques et les facteurs MEF2. Les facteurs bHLH myogéniques, exprimés dans les myoblastes en réponse à un signal inducteur, induisent l'expression des facteurs MEF2. La liaison des facteurs MEF2 sur les promoteurs de plusieurs gènes myogéniques provoque un phénomène de maintien et d'amplification de leur expression. Les protéines bHLH myogéniques activent des gènes boîte-E-dépendant qui contiennent aussi des sites MEF2 (C et D). Seulement une des deux protéines [MEF2 (B) ou MyoD (A)] peut lier directement l'ADN et par une interaction directe, recruter la deuxième protéine au niveau du promoteur.

Gitelman, 1997). Plus récemment, il a été démontré que le récepteur transmembranaire Notch est capable d'inhiber l'activité myogénique en interagissant spécifiquement avec MEF2C (Wilson-Rawls et al., 1999). Contrairement à Twist et Notch, les coactivateurs p300 et CBP [CREB (cAMP response element binding protein) binding protein] influencent positivement la myogénèse en interagissant avec MyoD et MEF2C, suggérant ainsi un renforcement de la boucle d'autorégulation transcriptionnelle établie entre les protéines bHLH myogéniques et les facteurs MEF2 (Figure 1.8) (Sartorelli et al., 1997). Ainsi, dans les cellules musculaires, MEF2 interagit avec plusieurs régulateurs transcriptionnels pour potentialiser la différenciation et le maintien du phénotype myogénique.

1.2.2.2.1.4. Voies de signalisation impliquant les protéines MEF2

En plus de leur rôle dans la régulation de gènes musculaires, les protéines MEF2 sont également impliquées dans l'induction de certains gènes en réponse à l'activation de certaines voies de signalisation intracellulaire. L'activité transcriptionnelle de plusieurs promoteurs en réponse au sérum peut être médiée par les facteurs MEF2 (Han and Prywes, 1995), qui possèdent des sites potentiels de phosphorylation conservés dans leurs domaines de transactivation en C-terminal. Des études récentes démontrent que les MAPK BMK1/ERK5, qui sont activées par le sérum, phosphorylent MEF2C dans son domaine de transactivation pour augmenter la transcription du gène précoce immédiat *c-jun* (Kato et al., 1997). Une autre MAPK, la p38, activée par les MAP kinase kinases MKK3 et MKK6, est également capable de phosphoryler MEF2A (Zhao et al., 1999) et MEF2C (Han et al., 1997). La phosphorylation de ces facteurs en C-terminal n'affecte pas

l'activité de liaison à l'ADN des facteurs MEF2, suggérant une altération conformationnelle de la protéine ou une interaction avec d'autres cofacteurs. Cependant, la phosphorylation d'une sérine (Ser-59) contenu dans la boîte MADS des facteurs MEF2 par la CKII (casein kinase II) a pour effet d'augmenter la dimérisation et la liaison à l'ADN des protéines MEF2 (Molkentin et al., 1996b).

Dans plusieurs cas, les facteurs de transcription MEF2 sont modulés en réponse à une élévation du calcium intracellulaire (Figure 1.9). En effet, des stimuli hypertrophiques comme l'ANG II et la PE agissent au niveau de la membrane cellulaire pour élever le calcium intracellulaire et activer la phosphatase calcineurine dans le cytoplasme. La calcineurine déphosphoryle NF-AT3, résultant en sa translocation au noyau, où il peut interagir avec les facteurs MEF2 (Chin et al., 1998). Il est à noter que NF-AT3 peut également interagir avec GATA-4 une fois dans le noyau (voir section 1.2.2.1.3) (Molkentin et al., 1998). L'accumulation du calcium intracellulaire peut également activer la kinase CaMKIV (Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase IV), une enzyme nucléaire qui peut phosphoryler CREB (Westphal et al., 1998). Une fois phosphorylé, CREB recrute le coactivateur CBP qui peut interagir directement avec les facteurs de transcription MEF2 pour activer la transcription de certains gènes cibles (Figure 1.9) (Kwok et al., 1994; Sartorelli et al., 1997).

Ceci démontre que la dimérisation et la liaison à l'ADN des facteurs MEF2, qui sont la cible de plusieurs voies de signalisation intracellulaire, sont modulées directement ou indirectement par différentes kinases.

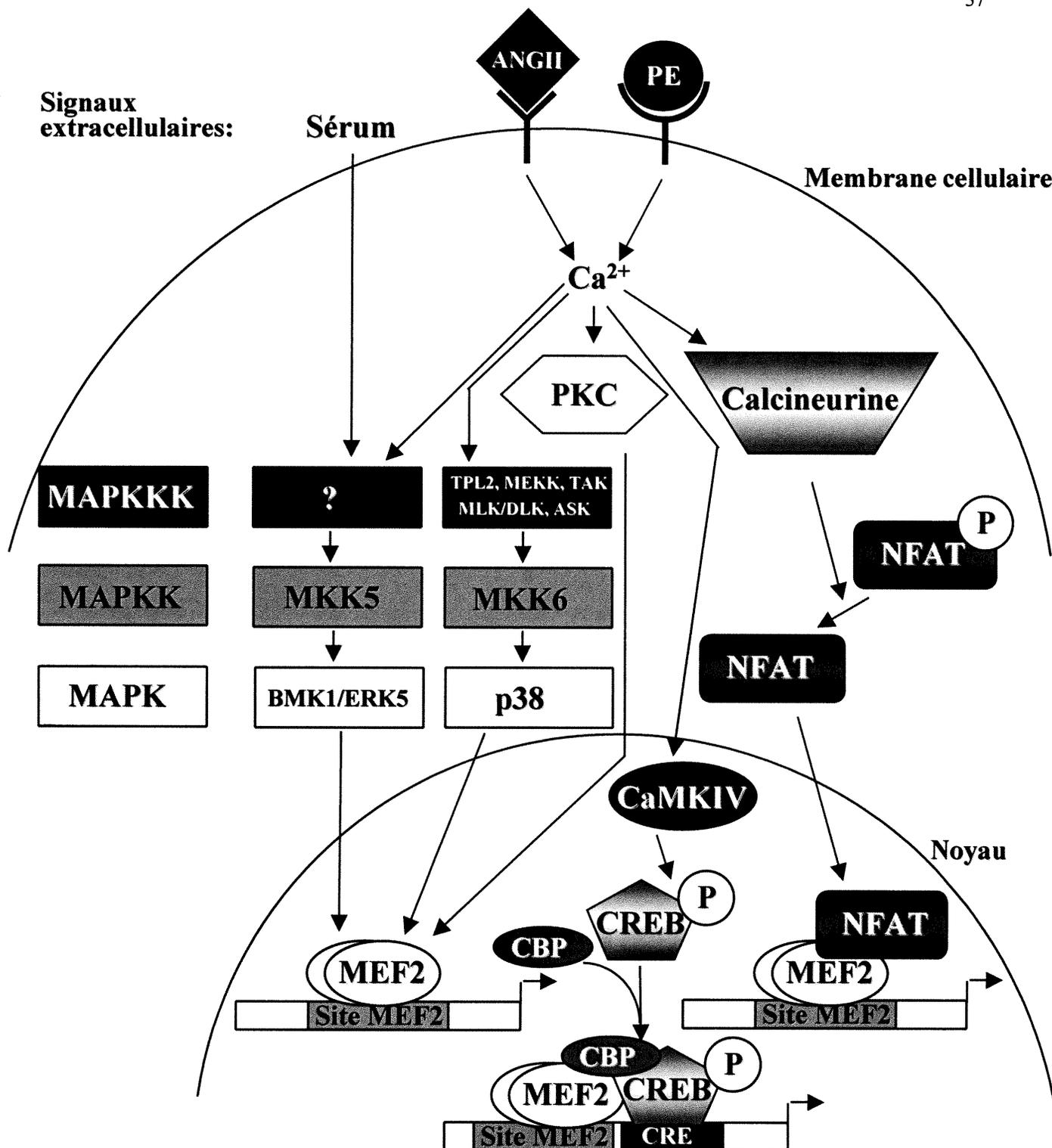


Figure 1.9 Voies de signalisation impliquant les facteurs MEF2. Suite à la liaison de facteurs humoraux comme ANG II et PE, une élévation du Ca^{2+} intracellulaire provoque l'activation de plusieurs cascades de signalisation dont celles des MAPK, BMK1/ERK5 et p38, qui ont été montrés pour phosphoryler directement les facteurs MEF2. Le Ca^{2+} intracellulaire peut également activer la PKC qui à son tour, active la CaMKIV. Une fois CREB phosphorylé par CaMKIV, CBP est recruté et interagit avec les facteurs MEF2 pour activer la transcription de gènes spécifiques. La phosphatase calcineurine peut aussi être activée par le Ca^{2+} . Cette phosphatase est connue, entre autre, pour déphosphoryler les facteurs NF- κ B, provoquant ainsi leur translocation au noyau. Une fois dans le noyau, les facteurs NF- κ B peuvent interagir avec les protéines MEF2.

1.2.2.2. Le facteur de réponse au sérum (SRF)

Le facteur de réponse au sérum, SRF, est une protéine nucléaire ubiquitaire à boîte MADS importante pour la prolifération et la différenciation cellulaire (Norman et al., 1988). SRF a largement été caractérisée au niveau structural (Pellegrini et al., 1995) et fonctionnel (Treisman, 1995). La boîte MADS, qui constitue le domaine de liaison à l'ADN, est déficiente en activité transcriptionnelle, d'où la nécessité de la région en C-terminale de SRF qui possède un domaine de transactivation essentiel pour l'activité transcriptionnelle. Les séquences d'ADN reconnues par SRF sont appelées les boîtes CArG et sont retrouvées dans les éléments de réponse au sérum (SRE) présents dans plusieurs promoteurs de gènes induits par les facteurs de croissance comme le proto-oncogène *c-fos* et des éléments nécessaires à l'activité muscle-spécifique de gènes musculaires comme les gènes d'actine.

Durant le développement embryonnaire de la souris, les transcrits *Srf* sont retrouvés principalement dans les muscles lisses des vaisseaux sanguins, dans le myocarde, ainsi que dans les myotomes (Belaguli et al., 1997). De fait, au jour embryonnaire E8.5, SRF se retrouve presque exclusivement dans le myocarde (Arsenian et al., 1998).

Plusieurs promoteurs cardiaques comme α - et β MHC (Thompson et al., 1991), α SkA (Lee et al., 1992), α CA (Miwa and Kedes, 1987; Chen and Schwartz, 1996a), et l'ANF (Argentin et al., 1994a), possèdent des motifs CArG où la protéine SRF se fixe pour réguler la transcription. Dans le cas du promoteur du gène de l'ANF, un élément CArG situé à -400 pb constitue un élément de régulation essentiel pour l'activité du promoteur dans des cellules cardiaques (voir section 1.2.1.2) (Argentin et al., 1994). Il a

été démontré qu'en plus de cet élément, SRF était capable de lier une autre séquence riche en A/T dans le promoteur de l'ANF, qui représente un SRE de basse affinité (Hines et al., 1999) (Morin et al., 2000).

SRF recrute souvent des protéines additionnelles pour activer un promoteur contenant un site SRE. Ces cofacteurs comprennent les facteurs du complexe tertiaire (TCFs, Ternary complex factors) (Treisman, 1994), qui appartiennent à la famille de facteur de transcription à domaine Ets (Dalton and Treisman, 1992; Hippskind et al., 1991). Les TCFs comprennent entre autres Elk-1 (Dalton and Treisman, 1992; Hippskind et al., 1991), Sap-1 (Dalton and Treisman, 1992) et Net/ERP/Sap-2 (Giovane et al., 1994; Lopez et al., 1994; Price et al., 1995). L'activité des TCFs est directement liée aux facteurs de croissance qui activent les voies de signalisation MAPK (Treisman, 1994). D'autres protéines interagissent avec SRF mais le rôle biologique de ces interactions n'est pas clair. Parmi celles-ci, les protéines CBP (CREB binding protein) et p300, deux molécules agissant comme adaptateurs transcriptionnels (Kim et al., 1998), la sous-unité p65 de NF κ B (Nuclear factor kappa B) (Franzoso et al., 1996), ainsi que l'homéoprotéine PHOX qui est capable de stabiliser la protéine SRF sur le site SRE du promoteur *c-fos* (Grueneberg et al., 1992). YY1, qui est capable de lier le SRE du promoteur *c-fos*, est également capable de stabiliser SRF sur ce SRE (Attar and Gilman, 1992; Gualberto et al., 1992; Natesan and Gilman, 1995). Le facteur de transcription cardiaque à homéodomaine Nkx2-5 peut également interagir fonctionnellement et physiquement avec SRF (Chen and Schwartz, 1996b; Chen et al., 1996a).

Le SRE, qui est un élément requis pour la régulation de plusieurs gènes précoces immédiats par les facteurs de croissance (Treisman, 1990), est également un point de

convergence pour plusieurs autres cascades de signalisation. Malgré la présence de plusieurs sites de phosphorylation sur SRF (Janknecht et al., 1992), l'implication de cette phosphorylation de SRF comme cible directe d'une voie de signalisation n'est pas très bien connu. En effet, en plus d'être phosphorylé directement (Miranti et al., 1995; Heidenreich et al., 1999), SRF pourrait également jouer le rôle d'un élément d'arrimage pour une autre protéine. Récemment, il a été montré que la p38, une enzyme de la famille MAP kinases, est incapable de phosphoryler SRF mais phosphoryle ATF6 (Activating transcription factor-6), une protéine ayant un motif leucine zipper qui interagit directement avec SRF (Thuerauf et al., 1998a; Zhu et al., 1997).

Récemment, le rôle de SRF *in vivo* a été étudié en générant des souris déficientes en SRF (*Srf*^{-/-}). Les résultats identifient SRF comme un nouveau régulateur essentiel à la formation du mésoderme chez les mammifères (Arsenian et al., 1998).

1.2.2.3. Les facteurs de transcription de la famille NK-2

Chez la drosophile, l'expression du gène codant pour MEF2 est sous le contrôle d'un autre facteur de transcription cardiaque essentiel, *Tinman* (*NK-4/msh-2*), une protéine à homéodomaine membre de la famille NK-2 (Gajewski et al., 1997). En plus d'être responsable de la détermination de la destinée cellulaire du mésoderme dorsal, le gène *Tinman* est également essentiel pour la division du mésoderme en primordia somitique, viscéral et cardiaque (Bodmer, 1995). L'inactivation du gène *Tinman* résulte en une absence des muscles viscéraux et cardiaques. L'homologue murin de *Tinman*, *Nkx2-5*, est exprimé principalement dans le muscle cardiaque embryonnaire et adulte, alors qu'il est indétectable dans le muscle squelettique et les autres tissus (Lints et al.,

1993). L'inactivation du gène *Nkx2-5* résulte en une morphogénèse anormale du coeur, un retard du développement, et une mort embryonnaire au jour E9.0-10.0 (Lyons et al., 1995). Le phénotype moins sévère que celui observé chez la drosophile est peut-être dû à une compensation par les autres protéines NK-2: *Nkx2-6* et *Nkx2-3*, qui sont aussi présentes dans le myocarde (Durocher et al., 1996a). À ce jour, très peu d'information est connue sur les mécanismes d'action de *Nkx2-5* au niveau moléculaire et sur ses cibles dans le muscle cardiaque. Le laboratoire du Dr Nemer a identifié le promoteur du gène de l'ANF comme étant une cible directe de *Nkx2-5*. De plus, la protéine GATA-4 agit en coopération avec *Nkx2-5* pour activer de façon synergique la transcription du gène de l'ANF (Durocher et al., 1996; Durocher et al., 1997) et d'autres gènes cardiaques (Sepulveda et al., 1998).

1.2.2.4. Les protéines de la famille HAND

Une nouvelle protéine bHLH a récemment été identifiée en utilisant la technique du double-hybride chez la levure et en criblant une librairie d'ADNc d'embryons de souris pour de nouveaux facteurs de transcription hétérodimérisant avec la protéine bHLH E12 (Cserjesi et al., 1995). Cette nouvelle protéine, nommé eHAND (extraembryonic membrane, heart, autonomic nervous system, neural crest-derived cell types), est exprimée dans le coeur entre les jours E8.5-10.5, et disparaît soudainement pour éventuellement se relocaliser au niveau des régions de formation des valves au jour E13.5. eHAND est également exprimé dans des tissus extraembryonnaires dont le système nerveux autonome et les dérivés de la crête neurale (Cserjesi et al., 1995). Un second membre de cette famille, dHAND, a été cloné par criblage à basse stringence et

montre un chevauchement de son patron d'expression avec eHAND. Au jour E7.75, l'expression de dHAND est détectée dans le mésoderme latéral et à partir du jour E8.5, son expression se localise dans tout le coeur en développement (Srivastava et al., 1995). Au jour E16.0, l'expression de dHAND n'est plus détectable.

Le rôle de ces deux protéines au niveau de la cardiogénèse a premièrement été étudié à l'aide d'une technique d'oligonucléotides antisens sur des embryons de poulet. Les résultats ont démontré que l'antisens de dHAND ou de eHAND pris séparément n'a aucun effet sur le développement embryonnaire. Cependant, lorsque ces deux antisens sont combinés, le développement est arrêté au niveau de la courbure du tube cardiaque, suggérant des rôles redondants de ces deux protéines dans la morphogénèse cardiaque (Srivastava et al., 1995). Cependant, contrairement à leur expression homogène durant le développement cardiaque chez le poulet, durant le développement du coeur chez la souris, dHAND et eHAND sont exprimés d'une façon complémentaire et sont restreints aux segments du tube cardiaque qui formeront les ventricules droits et gauches respectivement (Srivastava et al., 1997). En effet, dHAND et eHAND sont parmi les facteurs de transcription les plus précoces qui sont spécifiques à certaines chambres cardiaques. Les souris déficientes en eHAND meurent *in utero* et présentent des anomalies du développement cardiaque (Riley et al., 1998). L'inactivation de *dHAND* provoque également une mort *in utero* au jour E10.5 accompagnée de graves défauts du développement cardiaque (Srivastava et al., 1997). En effet, le ventricule droit de ces mutants ne se forme pas, démontrant que dHAND n'est pas seulement un marqueur moléculaire précoce du ventricule droit mais qu'il médie également sa différenciation. Ces résultats démontrent que la redondance des protéines HAND observée chez le poulet

est moindre chez la souris en raison du patron d'expression spécifique de ces protéines. En effet, eHAND n'est pas exprimée dans le segment qui formera le ventricule droit du coeur chez la souris et ne peut donc pas compenser pour la perte de l'expression de dHAND dans ce segment. Les souris où *dHAND* a été inactivé ont un défaut beaucoup moins sévère dans le ventricule gauche, là où eHAND est exprimée, suggérant une certaine compensation par eHAND. Sur le plan moléculaire, le mécanisme d'action des protéines HAND demeure obscur et les cibles directes de ces protéines au niveau du coeur n'ont pas encore été élucidées.

1.3. DESCRIPTION DU PROJET

Beaucoup de progrès a été fait dans l'identification des facteurs impliqués dans l'expression des gènes spécifiques au muscle squelettique. Cependant, les mécanismes régulant l'expression des gènes spécifiques au muscle cardiaque demeurent encore mal compris. La découverte de ces mécanismes est essentielle pour la compréhension du développement et de la différenciation cardiaques. Le gène de l'ANF est un très bon marqueur pour identifier des mécanismes régulateurs propres au muscle cardiaque étant donné que son expression est restreinte aux cardiomyocytes. Les souris où le gène *mef2c* a été inactivé n'expriment plus le gène de l'ANF, suggérant l'ANF comme une cible des facteurs de transcription de la famille MEF2. Sachant que les facteurs MEF2 lient une séquence riche en A/T, nous avons cherché à savoir si les éléments riche en A/T du promoteur de l'ANF étaient des cibles de ces protéines.

CHAPITRE 2. ARTICLE

**GATA-DEPENDENT RECRUITMENT OF MEF2 PROTEINS
TO TARGET PROMOTERS**

Steves Morin^{1,4}, Frédéric Charron^{1,2}, Lynda Robitaille¹, et Mona Nemer^{1,2,3}

¹Laboratoire de développement et différenciation cardiaques
Institut de recherches cliniques de Montréal
110, des Pins Ouest
Montréal QC Canada, H2W 1R7

²Department of Medicine, Division of Experimental Medicine
McGill University, Montréal QC Canada

³Département de Pharmacologie
Université de Montréal QC Canada

⁴Programme de Biologie Moléculaire
Université de Montréal

The EMBO Journal vol. 19 No. 9 pp. 2046-2055, 2000

2.1. RÉSUMÉ

Les protéines MEF2 sont des facteurs de transcription à boîte MADS qui sont largement exprimées dans toutes les lignées musculaires et dans les cellules neuronales mais leurs mécanismes d'action demeurent encore très peu compris. Chez les mammifères, le premier site d'expression des protéines MEF2 est le coeur, où l'isoforme MEF2C est détectable dès le jour embryonnaire E7.5. L'inactivation du gène codant pour MEF2C chez la souris provoque un arrêt du développement cardiaque et plusieurs gènes cardiaques, incluant l'ANF, ne sont plus exprimés. La plupart de ces gènes ne contiennent aucun ou, au mieux, des sites de basse affinité pour les protéines MEF2; de plus, leurs promoteurs ne sont pas activés significativement par MEF2 dans des cellules hétérologues, suggérant que l'action des protéines MEF2 nécessite un cofacteur cardiaque. Les résultats présentés ici démontrent que les protéines MEF2 sont recrutées aux promoteurs cibles par les facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille GATA, et que les protéines MEF2 potentialisent l'activité transcriptionnelle de ces facteurs GATA. De plus, nous montrons que l'interaction physique entre MEF2 et GATA-4 est médiée par leurs domaines de liaison à l'ADN respectif alors que la synergie fonctionnelle requiert en plus les domaines de transactivation en C-terminal des deux protéines. Cette capacité des protéines MEF2 et GATA-4 à coopérer pour activer l'expression d'un gène cardiaque n'est pas restreinte à l'ANF. Donc, nous proposons qu'en plus de servir de co-facteurs pour les protéines myogéniques de type bHLH dans le muscle squelettique, les facteurs MEF2 agissent comme co-facteurs pour les protéines GATA cardiaques et que ces interactions contribuent à l'expression des gènes cardiaques.

2.2. ABSTRACT

The myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins are MADS-box transcription factors that are essential for differentiation of all muscle lineages but their mechanisms of action remain largely undefined. In mammals, the earliest site of MEF2 expression is the heart where the MEF2C isoform is detectable as early as embryonic day 7.5. Inactivation of the *MEF2C* gene causes an arrest in cardiac development and severe downregulation of a number of cardiac markers including atrial natriuretic factor (ANF). However, most of the promoters either do not contain or contain only low affinity MEF2 binding sites, and are not significantly activated by any MEF2 proteins in heterologous cells. This suggests a dependence on a cardiac-enriched cofactor for MEF2 action. We provide evidence that MEF2 proteins are recruited to target promoters by the cell-specific GATA transcription factors, and that MEF2 potentiates the transcriptional activity of this family of tissue-restricted zinc finger proteins. Functional MEF2/GATA-4 synergy involves physical interaction between the MEF2 DNA-binding domain and the carboxy zinc finger of GATA-4 and requires the activation domains of both proteins. However, neither MEF2 binding sites nor MEF2 DNA binding capacity are required for transcriptional synergy. The results unravel a novel pathway for transcriptional regulation by MEF2 and provide a molecular paradigm for elucidating the mechanisms of action of MEF2 in muscle and non-muscle cells.

Keywords: GATA factors / heart development / MEF2 proteins / muscle transcription

2.3. INTRODUCTION

Members of the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) family of MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum response factor)-box transcription factors are evolutionary conserved proteins that are expressed at high levels in all muscle cells. MEF2 proteins are also found in non-muscle cells including brain and lymphoid tissue [reviewed in (Black and Olson, 1998)]. In mammals, the MEF2 family is composed of four members, MEF2A, MEF2B, MEF2C, and MEF2D, which form homo- and heterodimers that bind the consensus DNA sequence (T/C)TA(A/T)₄TA(G/A) present in many muscle and non-muscle promoters. MEF2 proteins contain a conserved N-terminal 56-amino acid MADS domain and an adjacent 29-amino acid MEF2 domain, which together mediate DNA binding and dimerization.

Genetic studies have provided evidence for an essential role of MEF2 proteins in muscle-specific gene expression and differentiation of all three muscle lineages. In *Drosophila*, mutation of the *D-mef2* gene results in embryos lacking differentiated skeletal, cardiac, and visceral muscle cells (Lilly et al., 1995; Bour et al., 1995; Ranganayakulu et al., 1995). In mice, inactivation of the MEF2C gene, which is the first MEF2 isoform expressed during embryonic development, leads to cardiac morphogenetic defects, vascular abnormalities, and lethality by embryonic day 9.5 (Lin et al., 1997; Lin et al., 1998; Bi et al., 1999). The mechanisms by which MEF2 proteins regulate myogenesis of both striated and smooth muscle cells and the identity of their downstream targets in these various tissues is only starting to be elucidated. At present, the mechanisms of action of MEF2 have been analyzed mostly in skeletal muscle where MEF2 appear to act as cofactor for the myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins,

MyoD, Myf5, myogenin, and MRF4 (Kaushal et al., 1994; Black et al., 1998; Molkenin et al., 1995). Thus, MEF2 proteins strongly potentiate the transcriptional activity of the bHLH myogenic factors and cooperate with them for inducing and maintaining the skeletal muscle phenotype. This cooperativity is mediated by direct interaction between the DNA-binding domains of MEF2 and myogenic proteins and necessitates a DNA-binding site for only one of the two factors. Therefore, in skeletal myocytes, MEF2 may modulate transcription by two distinct pathways: one involving DNA binding to MEF2 sites and another one involving recruitment of MEF2 to E-boxes in target promoters via the myogenic bHLH factors. Whether similar mechanisms underlie the action of MEF2 in cardiac and visceral muscle cells where the MyoD family of transcription factors is not expressed remains unknown.

MEF2 binding sites have been reported in several cardiac promoters and their mutation was shown to decrease promoter activity in cardiomyocytes; they include the MEF2 sites in the ventricular myosin light chain (MLC2V), cardiac troponin T, cardiac troponin I, α -myosin heavy chain (α -MHC) and Desmin (Yu et al., 1992; Zhu et al., 1991; Iannello et al., 1991; Molkenin and Markham, 1993; Kuisk et al., 1996; Di Lisi et al., 1998). Analysis of cardiac gene expression in mice with targeted mutation of the MEF2C gene confirmed that some of these genes, like α -MHC, required MEF2C for optimum transcription (Lin et al., 1997). In addition to α -MHC, two other cardiac-specific genes, not previously associated with MEF2 proteins, atrial natriuretic factor (ANF) and α -cardiac actin (α -CA), were completely absent in the hearts of MEF2C-deficient embryos. How MEF2C regulates transcription of these target genes remains unclear; the two α MHC MEF2 sites are low affinity MEF2 binding sites (Yu et al., 1992;

Molkentin and Markham, 1993), and MEF2 proteins are unable to activate α MHC-driven reporters in cotransfection assays although they can potentiate transactivation of the α MHC promoter by the thyroid hormone receptor (Lee et al., 1997). Moreover, ectopic expression of MEF2 proteins in explanted xenopus ectoderm failed to activate endogenous α MHC or α -CA genes (Chambers et al., 1994; Fu and Izumo, 1995). However, forced expression of MEF2 proteins in whole xenopus embryos results in precocious expression of endogenous α MHC and enlarged hearts (Fu and Izumo, 1995). Together, these studies suggest that MEF2 regulate transcription of α MHC and possibly other cardiac genes in conjunction with a cell-specific cofactor present in embryonic mesoderm (or endoderm) but not in ectoderm.

In the case of ANF, the cardiac promoter which is a known downstream target for the cardiac-specific transcription factors, GATA-4 and Nkx2-5, does not contain MEF2 consensus binding sites (Durocher et al., 1996; Charron et al., 1999b) (Durocher et al., 1997) suggesting an indirect action of MEF2 on ANF transcription possibly through modulation of GATA-4, Nkx2-5 or other ANF regulators; however, neither GATA-4 nor Nkx2-5 levels are altered in MEF2C^{-/-} embryos (Lin et al., 1997).

In this study, we provide evidence that MEF2 proteins are recruited by the cardiac-specific transcription factor GATA-4 to synergistically activate ANF and several other MEF2C target promoters including α MHC and α -CA. The MEF2/GATA-4 synergy is mediated by physical interaction between the respective DNA-binding domains and requires the transactivation domains of both factors. GATA binding sites are necessary and sufficient for cooperativity with MEF2. Other GATA factors, including GATA-6, which is expressed in cardiac and smooth muscle cells, and GATA-2

and -3, which are present in hemopoietic and neuronal cells, are also able to cooperate with MEF2 proteins. Together the data suggest that in addition to cooperating with the myogenic bHLH proteins in skeletal muscle differentiation, MEF2 proteins act as co-factors for the tissue-restricted zinc finger GATA proteins in cardiac myogenesis and raise the possibility that GATA factors may be essential components of MEF2 action in several other cell types.

2.4. RESULTS

2.4.1. MEF2 proteins activate the ANF promoter via two distinct mechanisms.

The absence of ANF transcripts in the heart of mice homozygous for a null mutation of the MEF2C gene (Lin et al., 1997) indicates that ANF is a downstream target for MEF2 proteins. We tested whether the effect of MEF2C was due to direct action on the ANF promoter be it via DNA binding or through recruitment by protein:protein interactions. The first 700 bp of the rat ANF promoter are sufficient to recapitulate cardiac specificity and spatio-temporal regulation of the endogenous gene in cultured cardiomyocytes (Argentin et al., 1994) and in transgenic mice (Durocher et al., 1998).

Sequence analysis of the entire 700 bp rat ANF promoter revealed no consensus MEF2 sites; the closest sequence homologies to MEF2 binding sites mapped to an A/T-rich element sharing similarities with a MEF2 consensus (Fig. 2.1A). To verify if this A/T-rich element could be recognized by cardiac-derived or recombinant MEF2 proteins, it was used in electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to compete MEF2-binding to the well-characterized muscle creatine kinase (MCK) MEF2 site. As seen in Figure 2.1B, several A/T-rich ANF elements including the TATA-box, the SRE-like, and the CArG-

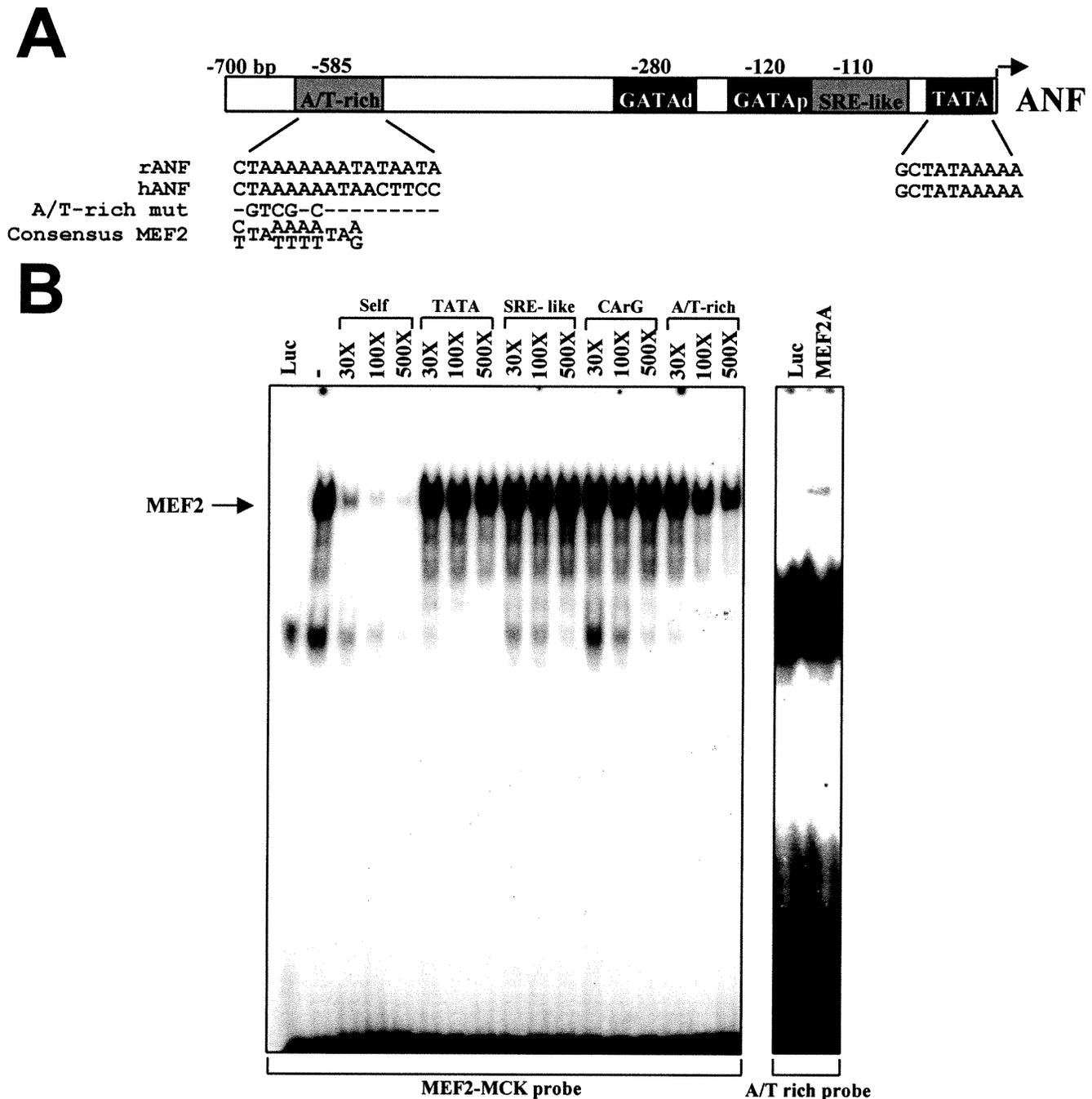


Figure 2.1 The ANF promoter harbors a low affinity MEF2-binding site. **A)** Schematic representation of the ANF promoter. Regulatory elements of the ANF promoter are boxed and their location relative to the transcription start site are indicated. The SRE-like element is a low affinity serum response element, the GATAd and GATAp elements are the distal and proximal GATA-binding sites respectively, and the A/T-rich element is a low affinity MEF2-binding site. The MEF2-binding site consensus is indicated. The A/T-rich mut sequence indicates the mutations introduced to abolish the A/T-rich element. rANF and hANF are the rat and human ANF promoter, respectively. **B)** The A/T-rich element is a low affinity MEF2-binding site. EMSAs were performed on the MEF2 element of the MCK promoter (MEF2-MCK) using in vitro translated MEF2A (left panel). In vitro translated Luciferase (Luc) has been used as negative control. The MEF2A-binding were competed with different elements of the ANF promoter. Only the A/T-rich element of the ANF promoter was able to compete the MEF2A binding. EMSAs were performed on the A/T-rich element using in vitro translated MEF2A and showed that MEF2 proteins bind with low affinity the A/T-rich element (right panel). Similar results were obtained with MEF2C and MEF2D.

box could not compete the MEF2 binding on the MCK probe even when used at a 500-fold molar excess. On the other hand, the distal A/T-rich element was able to displace the MEF2 binding although at a much lower efficiency than the MCK site itself. Identical results were obtained using MEF2C and MEF2D or cardiomyocyte nuclear extracts (data not shown). Consistent with its ability to recognize MEF2 proteins, the ANF A/T-rich probe was able to bind all three recombinant MEF2 proteins tested (MEF2A, MEF2C, and MEF2D) albeit with low affinity (Fig. 2.1B and data not shown). Finally, when cloned upstream of a minimal promoter, the ANF A/T-rich element could be transactivated 4-fold by cotransfection with MEF2 expression vectors in heterologous cells (Fig. 2.2B). These results suggest that the ANF promoter contains a very low affinity MEF2-binding site that could mediate MEF2 action.

Indeed, MEF2C and other MEF2 proteins activate the ANF promoter in a dose dependent manner in several non-cardiac cells (Fig. 2.2A). Interestingly, the magnitude of activation was much greater (4- to 6-fold higher) in HeLa cells than in most cell lines tested (including CV1, P19, and C2C12) with maximal ANF promoter induction of 15-fold. This difference in MEF2 responsiveness was also observed with the cardiac α MHC promoter which was induced by 10-fold in HeLa cells and was barely responsive in CV1 or P19 cells (Fig. 2.2B and data not shown); in contrast, a synthetic promoter harboring a multimerized MCK-MEF2 site upstream of a minimal ANF promoter was more similarly activated by MEF2 in HeLa (9-fold) and CV1 (6-fold) cells (Fig. 2.2B). The transfected MEF2 vectors produced similarly high levels of MEF2 proteins in all cell lines as assessed by gel shift assays (data not shown). Thus, the differences observed in the level of MEF2-dependent ANF and α MHC promoter activation may reflect cooperative

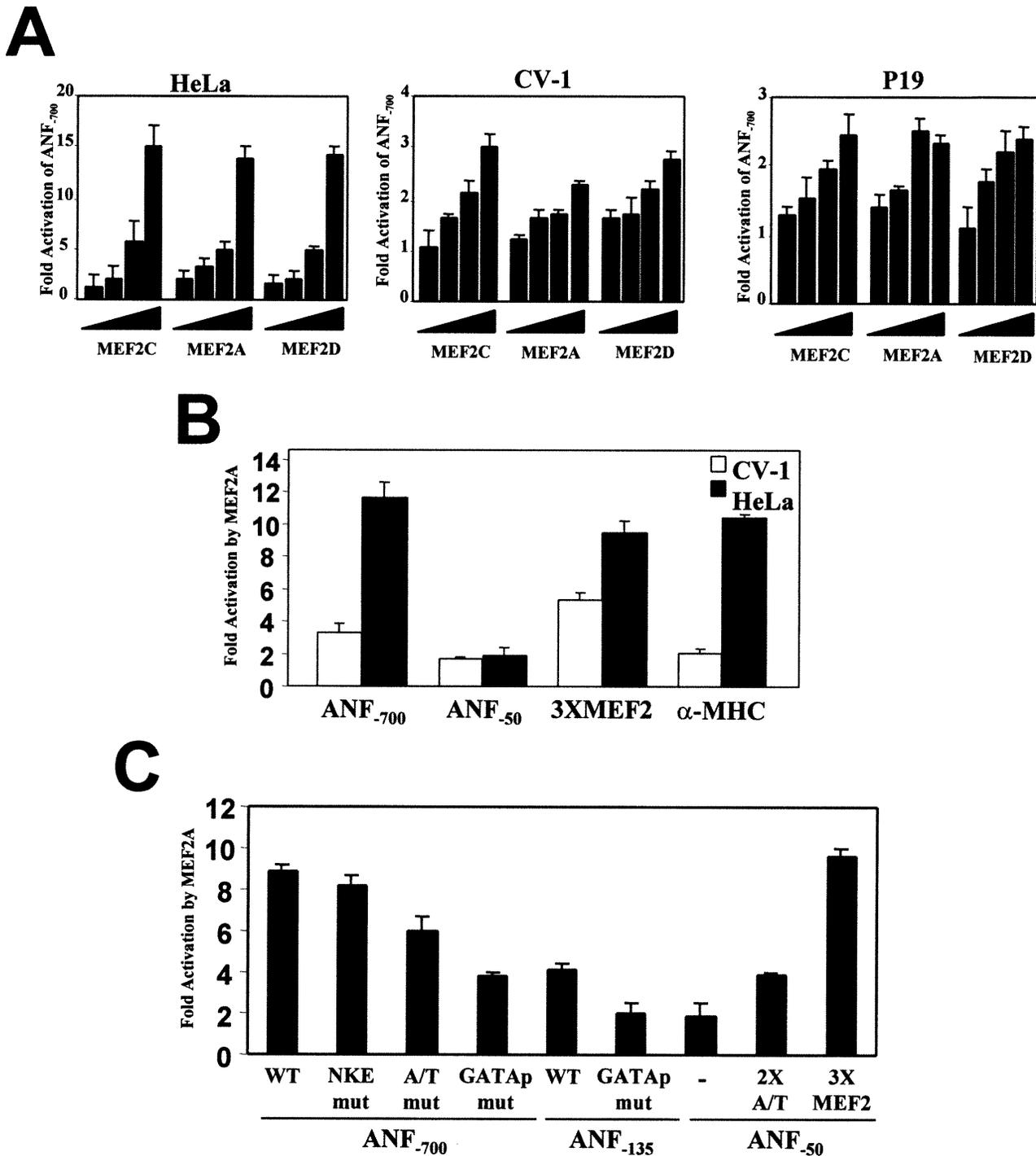


Figure 2.2 The low affinity A/T-rich and the proximal GATA elements contribute to MEF2-dependent ANF promoter activation. **A)** Dose-dependent ANF₇₀₀ promoter activation by MEF2A, MEF2C, and MEF2D in HeLa, CV-1, and P19 cell lines. Transient transfections were performed using 50 ng, 100 ng, 500 ng, and 1 mg of MEF2 expression vector. Note the fold-activation difference between HeLa and CV-1 or P19 cells. **B)** Preferential activation of the ANF₇₀₀ and α-MHC promoters by MEF2A in HeLa cells. Transfections were performed using 1 mg of MEF2A expression vector. Similar results were obtained using MEF2C and MEF2D. **C)** The low affinity A/T-rich and the proximal GATA elements contribute to MEF2-dependent ANF promoter activation. Transfections were performed in HeLa cells using 1 mg of MEF2A expression vector. Similar results were obtained using MEF2C and MEF2D. 3XMEF2 and 2XA/T are the MEF2-MCK and the ANF A/T-rich elements trimerized and dimerized, respectively, in front of the ANF₅₀ minimal promoter.

interaction between transfected MEF2 proteins and other cellular factors bound to the promoters.

Mutational analysis was used to test which DNA elements on the ANF promoter are required for activation by MEF2 (Fig. 2.2C). Consistent with its characterization as a weak affinity MEF2 site, the A/T-rich element was necessary for maximal MEF2 activation but its deletion or mutation reduced promoter activation by only 30%. Surprisingly, mutation of the proximal GATA element which can bind endogenous GATA-2 protein present in HeLa cells (Grépin et al., 1994), had a more drastic effect on MEF2 responsiveness suggesting that GATA factors may cooperate with MEF2. In fact, the proximal ANF promoter (ANF₋₁₃₅), which lacks any MEF2 binding site was induced 4- to 5-fold by MEF2 proteins and mutation of the GATA site therein reduced MEF2 responsiveness (Fig. 2.2C). This element is a high affinity binding site for GATA factors (Charron et al., 1999b) but does not bind MEF2 proteins (Fig. 2.1B). Together, these results suggest that MEF2 could act as a cofactor of promoter-bound GATA proteins to activate the ANF and possibly other cardiac promoters.

2.4.2. Synergistic activation of the ANF promoter by MEF2 and GATA factors.

Two members of the GATA family of zinc finger transcription factors, GATA-4 and GATA-6, are expressed in cardiac muscle cells and bind to and activate the ANF promoter (Charron et al., 1999b). To test whether either factor could recruit MEF2 proteins to target promoters, the effect of co-expressing them with MEF2 in heterologous cells was assayed on ANF promoter activity. Co-transfection of GATA-4 with MEF2A, MEF2C or MEF2D leads to a synergistic 40- to 50-fold activation of the ANF promoter

(Fig. 2.3A). MEF2 proteins were also able to cooperate to varying degrees with other GATA factors including the hemopoietic GATA-1, -2, and -3, and the other cardiac GATA factor, GATA-6, but not GATA-5 (Fig. 2.3B). The inability of MEF2C and MEF2A to synergize with GATA-5 and the more modest synergy achieved with GATA-2 and -3 are not due to different levels of GATA proteins produced as all expression vectors have been shown to produce similar protein levels (Viger et al., 1998; Nemer et al., 1999).

In order to map the promoter element(s) required for the synergy between MEF2 and GATA-4, various ANF promoter mutations were tested. Mutation of the low affinity MEF2-binding element (A/T-rich) or the distal GATA element reduced maximal MEF2/GATA-4 synergy by 35 to 40% (Fig. 2.4A). Mutation of the proximal GATA element in the context of the -700 or the -135 bp promoter completely abolished synergy indicating that this element is essential for MEF2/GATA-4 cooperation. Interestingly, the -135 bp ANF promoter was sufficient to produce 50% of the maximal synergy obtained with the longer promoter (ANF₋₇₀₀) and displayed the same response to the various MEF2/GATA combinations as the ANF₋₇₀₀ promoter (Fig. 2.3) suggesting that binding of GATA factors to the proximal GATA element may be sufficient to recruit MEF2 proteins to the promoter. Indeed, an artificial reporter driven by multimerized GATA binding sites could be synergistically activated by GATA and MEF2 proteins; however, neither the high affinity MCK MEF2 binding site nor the lower affinity ANF MEF2 element were sufficient to support MEF2/GATA cooperativity (Fig. 2.4B).

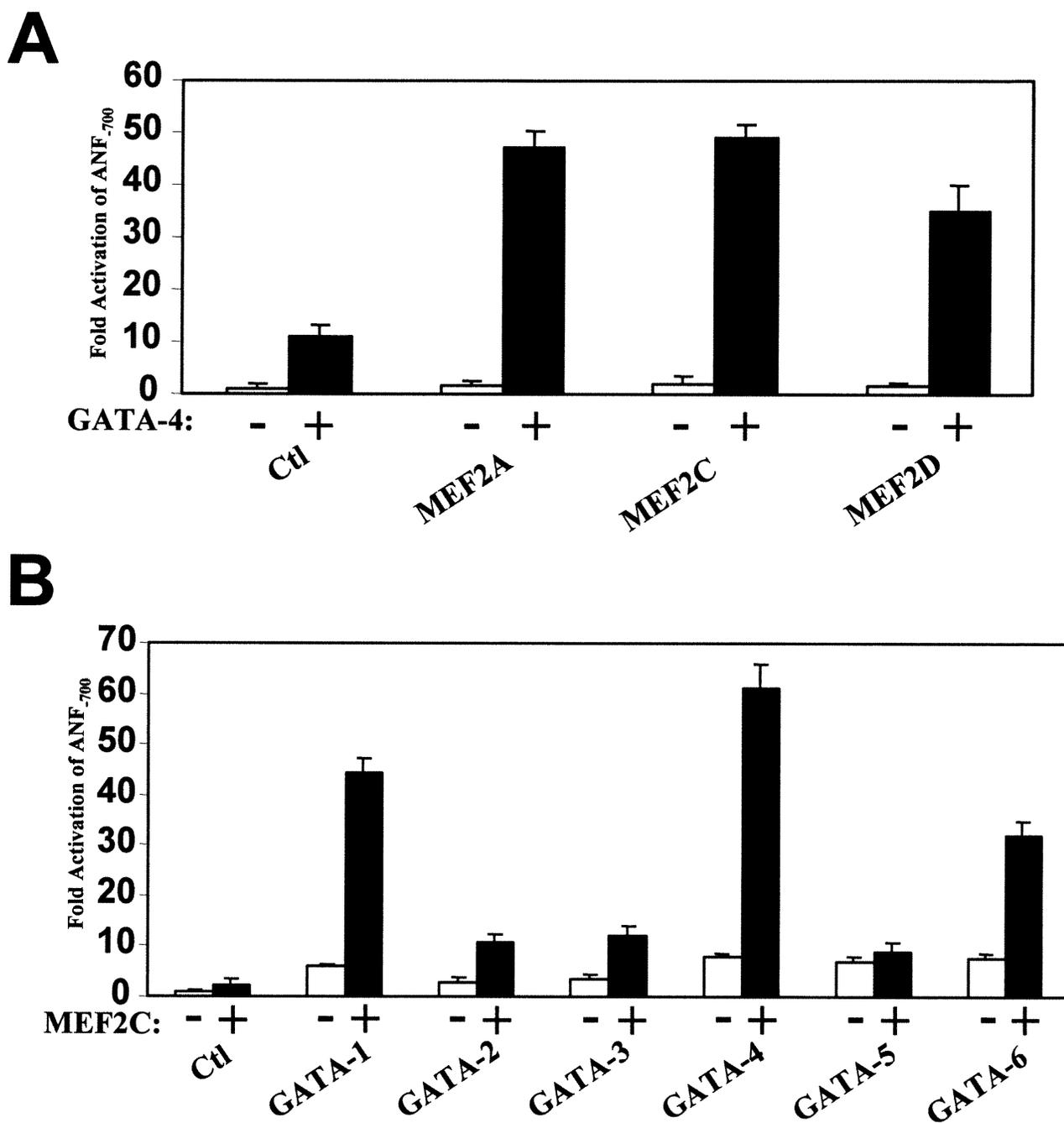


Figure 2.3 The MEF2 and GATA transcription factors cooperatively activate the ANF₋₇₀₀ promoter. **A)** MEF2A, MEF2C, and MEF2D functionally interact with GATA-4. Co-transfections were performed in HeLa cells on the ANF₋₇₀₀ promoter using of 1 μ g of MEF2A, MEF2C, or MEF2D expression vector in absence (-) or presence (+) of 1.5 μ g of GATA-4 expression vector. **B)** MEF2 proteins functionally interact with a subset of GATA proteins. Co-transfections were performed in HeLa cells on the ANF₋₇₀₀ promoter using 1.5 μ g of various GATA expression vectors in absence (-) or presence (+) of 1 μ g of MEF2C expression vector. Note that despite an expression level similar to other GATA factors, GATA-5 is not able to cooperate with MEF2 factors. Similar results were obtained using MEF2A and MEF2D.

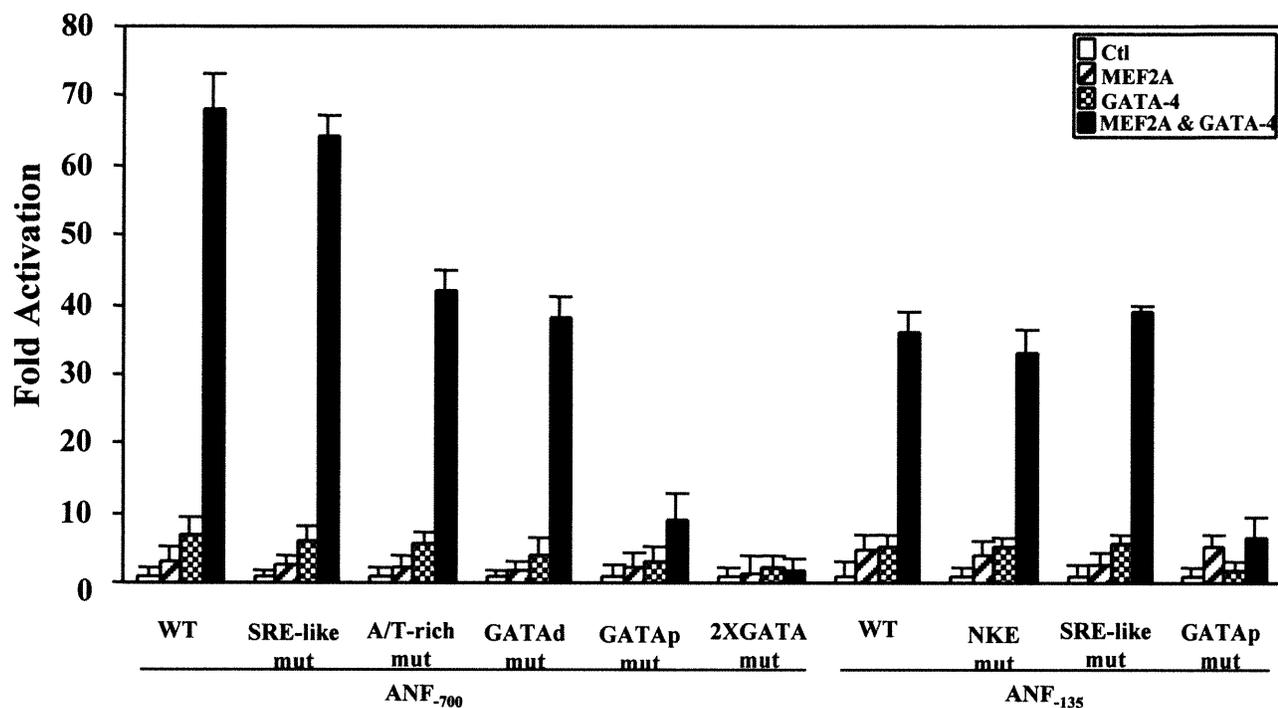
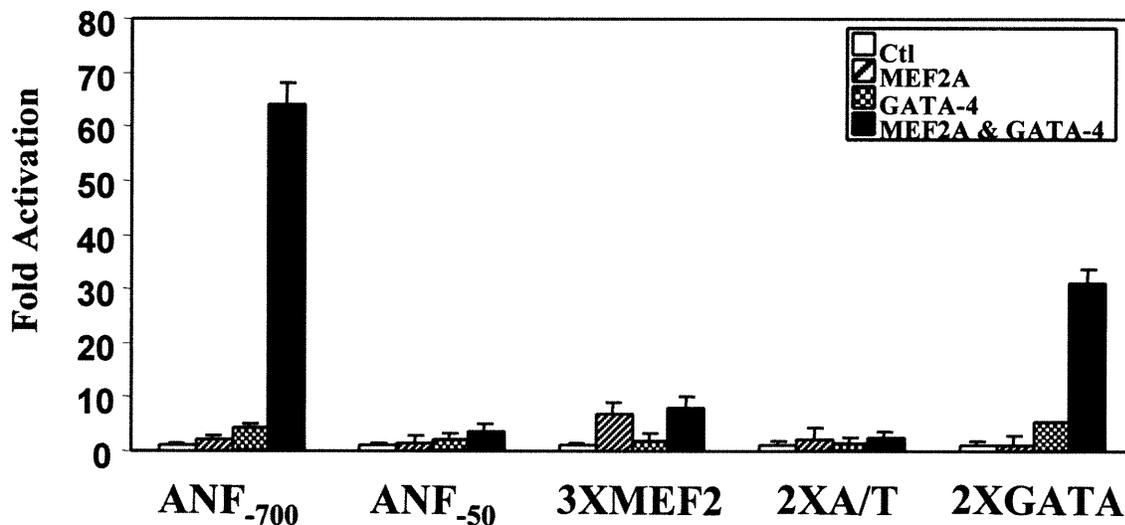
A**B**

Figure 2.4 The proximal GATA element is essential and sufficient to support functional interaction between MEF2 and GATA factors. Co-transfections were performed in HeLa cells on various ANF promoter constructs (**A**) and various isolated multimerized elements (**B**) using 1 mg of MEF2A and 1.5 mg of GATA-4 expression vectors. 2XGATA mut is the ANF₋₇₀₀ promoter with the proximal and distal GATA elements mutated. 3XMEF2 and 2XA/T are the MEF2-MCK and the ANF A/T-rich elements trimerized and dimerized, respectively, in front of the ANF₋₅₀ minimal promoter. 2XGATA is a dimer of the BNP GATA elements in front of the minimal BNP promoter.

2.4.3. MEF2 factors physically interact in vitro and in vivo with GATA-4.

The observation that MEF2A/GATA-4 synergy required only the GATA binding site implied that GATA-4 recruits MEF2 proteins to the ANF promoter through protein:protein interaction. Indeed, MEF2A and GATA-4 could be co-immunoprecipitated in vivo (Fig. 2.5A) suggesting physical interaction between the two proteins.

To determine if this interaction was direct, we performed in vitro pull-down assays using immobilized MBP-GATA-4 and in vitro-translated ³⁵S-labeled MEF2 proteins. MBP-GATA-4 was able to retain specifically MEF2A, MEF2C, and MEF2D but not the control luciferase (Fig. 2.5B) confirming that GATA-4 and MEF2 directly interact.

In order to map the interaction domain between MEF2 and GATA proteins, different mutants of GATA-4 were in vitro co-translated with MEF2A and coimmunoprecipitated using an antibody directed against the extreme C-terminal of GATA-4 (present in all mutants tested). MEF2A was able to interact with the full-length GATA-4 and the N-terminal activation domain-deleted mutant (201-443) (Fig. 2.5C). Deletion of the N-terminal zinc finger of GATA-4 (242-443) reduced but did not abrogate interaction with MEF2A. However, MEF2A was unable to interact with the G4m [which harbors a point mutation in the C-terminal zinc finger abolishing DNA-binding (Charron et al., 1999b)] or the 303-390 mutant, indicating that the C-terminal zinc finger structure and the basic region are essential for physical interaction with MEF2. The same approach was also used to map the GATA-4 interaction domain on MEF2 and revealed that the DNA-binding domain consisting of the MADS and MEF2

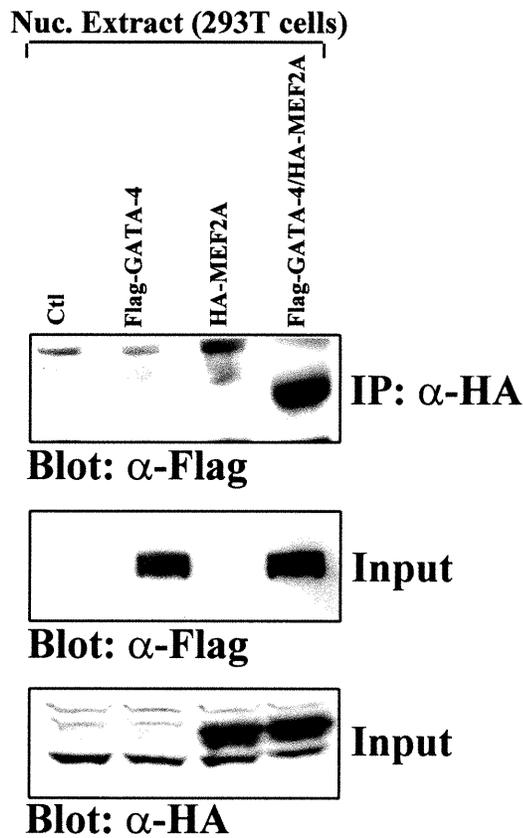
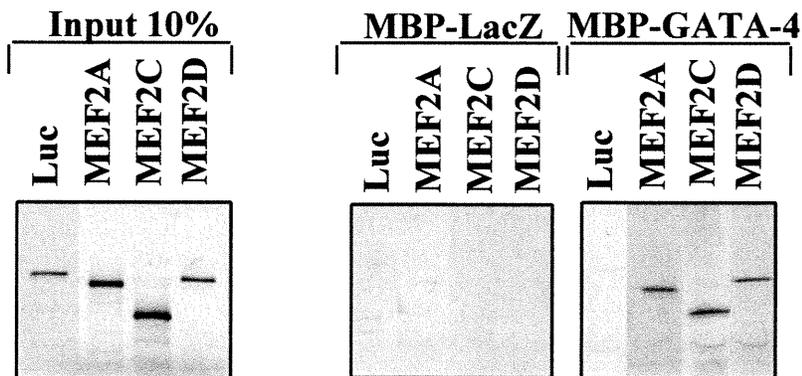
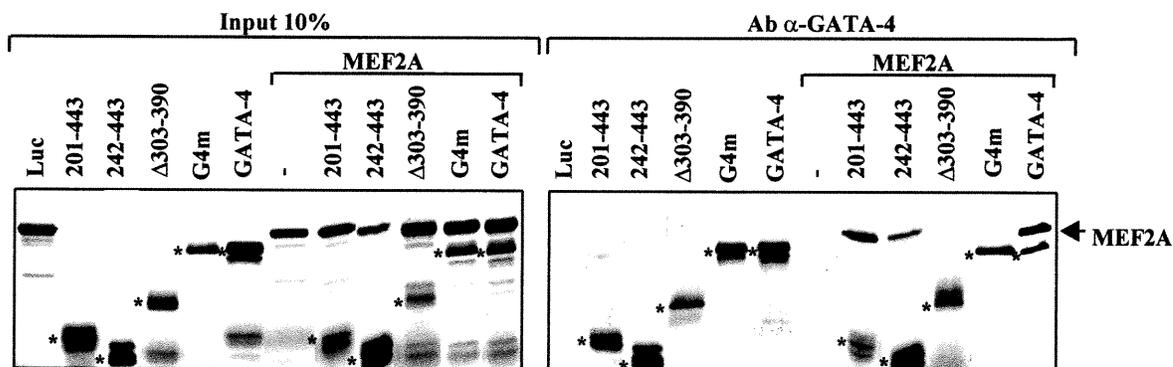
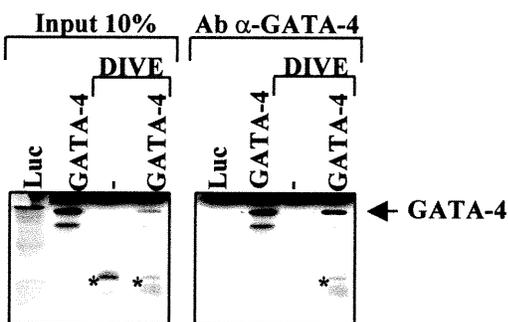
A**B**

Figure 2.5 MEF2 proteins physically interact with GATA-4. **A)** MEF2A interacts in vivo with GATA-4. Flag-GATA-4 and/or HA-MEF2A over-expressed in 293T cells were immunoprecipitated using an anti-HA antibody and subjected to immunoblotting using an anti-Flag antibody. **B)** MEF2A, MEF2C, and MEF2D directly interact with GATA-4. Pull-down assays were performed using immobilized, bacterially-produced MBP fusions (MBP-GATA-4 and MBP-LacZ as control) and in vitro translated, ^{35}S -labeled MEF2A, MEF2C, MEF2D, or luciferase (luc) protein. The protein complexes were resolved on a 10% SDS-PAGE.

C



D



E

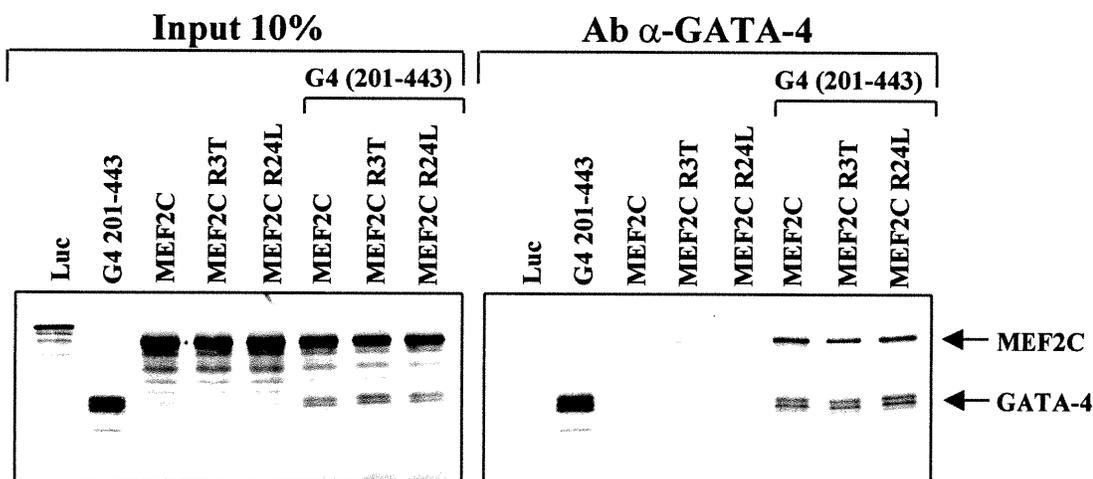


Figure 2.5 C) The physical interaction between GATA-4 and MEF2 requires the C-terminal zinc finger DNA-binding domain of GATA-4. Full-length GATA-4 and various GATA-4 mutants (see Fig. 2.6A for their schematic structure) were in vitro co-translated with MEF2A and co-immunoprecipitated using an antibody directed against the extreme C-terminal of GATA-4. The protein complexes were resolved on a 15% SDS-PAGE. D) The MADS domain of MEF2 is sufficient for interaction with GATA-4. MEF2A DIVE is a MEF2A C-terminal deletion mutant retaining only the MADS and MEF2 domains (aa 1-86). Co-immunoprecipitations were performed as described in (C). The protein complexes were resolved on a 20% SDS-PAGE. E) MEF2 DNA-binding defective mutants interact with GATA-4. MEF2C R3T and MEF2C R24L do not bind DNA but are still able to dimerize. A deleted GATA-4 construct [G4 (201-443)] was used to differentiate between GATA-4 and MEF2C, which have similar electrophoretic mobility. Co-immunoprecipitations were performed as described in (C). The protein complexes were resolved on a 10% SDS-PAGE.

domains (MEF2A DIVE, aa 1-86) is sufficient for interaction with GATA-4 (Fig. 2.5D). Interestingly, within the MADS domain, interaction with GATA factors and binding to DNA could be segregated as two DNA binding defective mutants (MEF2C R3T and MEF2C R24L) retained the ability to bind GATA-4 (Fig. 2.5E). These results suggest that GATA-4 and MEF2 physically interact through their DNA-binding domains.

2.4.4. MEF2/GATA synergy does not require MEF2 DNA binding.

To determine whether the activation domains of either or both GATA and MEF2 proteins are required, various GATA-4 mutants were tested for their capacity to synergistically activate the ANF promoter with MEF2A. The GATA-4 mutants which delete the N-terminal region (127-443 and 201-443) and the first zinc finger (242-443) were able to synergize with MEF2A (Fig. 2.6A). However, the GATA-4 mutants which delete the C-terminal transactivation domain (1-332, 201-332, and 242-332) were all unable to support MEF2 synergy. Consistent with a requirement for GATA-4 DNA binding (Fig. 2.4A) and the GATA-4 DNA binding domain for physical interaction with MEF2 (Fig. 2.5C), a point mutation in the second zinc finger that destroys DNA binding (G4m) abrogated MEF2 synergy (Fig. 2.6A). Functional synergy also required the activation domain of MEF2 and deletion of the C-terminal activation domain (MEF2A DIVE) completely abolished the synergy with GATA-4 (Fig. 2.6B). However, and consistent with the requirement for GATA but not MEF2 binding sites, MEF2C mutants that are DNA binding defective retained the ability to synergize with GATA-4 (Fig. 2.6B). These results indicate that GATA-4 is able to recruit DNA-binding defective MEF2 proteins to transcriptionally active complexes.

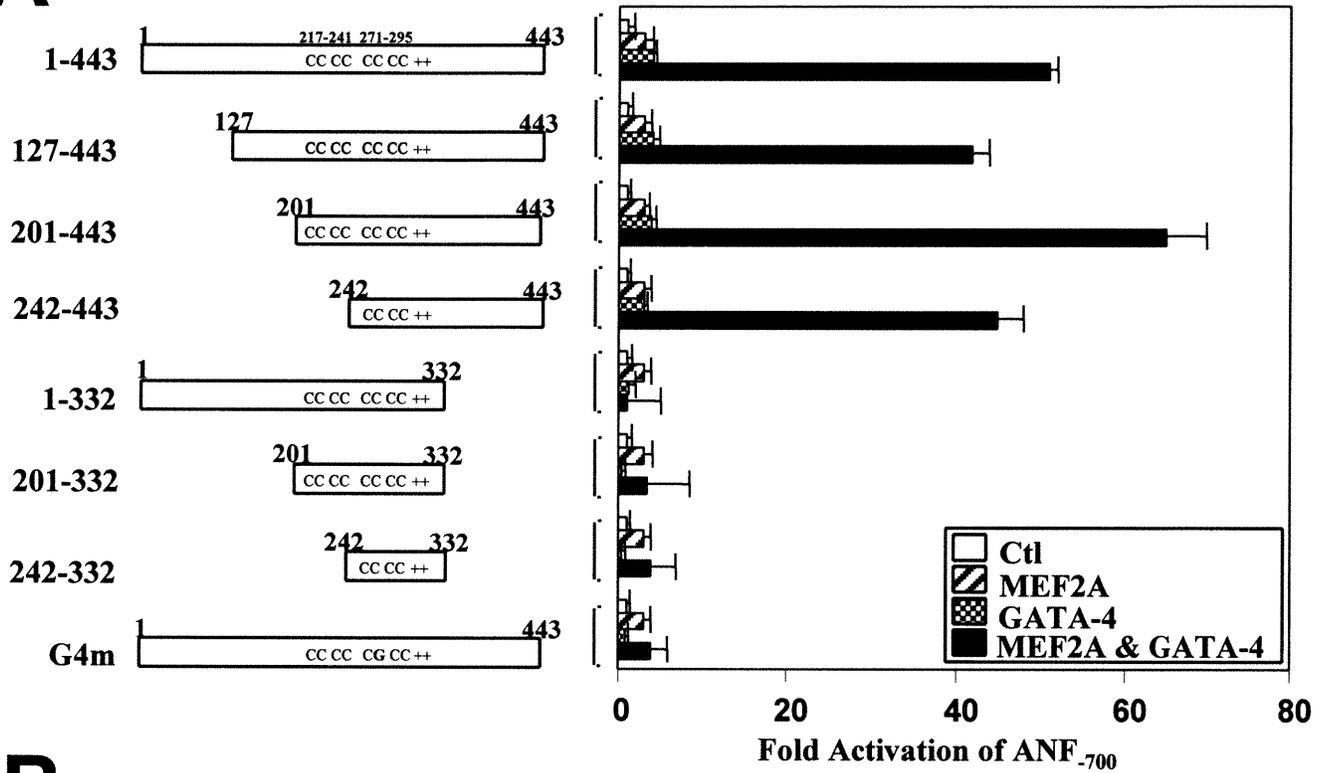
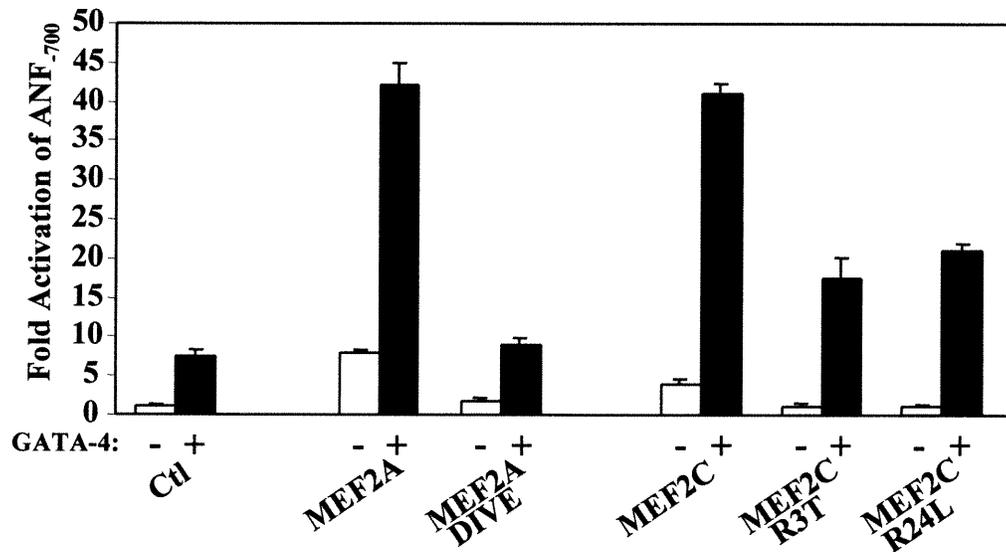
A**B**

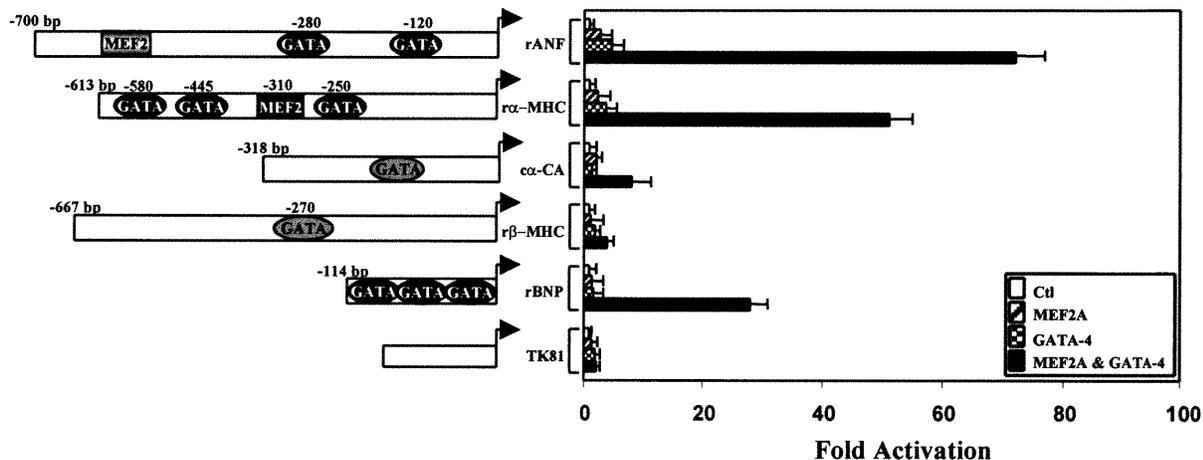
Figure 2.6 Mapping of the GATA-4 and MEF2 domains required for synergy. **A)** The C-terminal activation domain of GATA-4 is required for synergy with MEF2A. Co-transfections were performed in HeLa cells on the ANF.₇₀₀ promoter construct using 1 mg of MEF2 and 1.5 mg of GATA-4 expression vectors. **B)** The C-terminal activation domain of MEF2A, but not its DNA-binding capacity, is required for synergy with GATA-4. Co-transfections were performed as described in (A).

2.4.5. MEF2/GATA synergy : a mechanism for MEF2 action in the heart.

We next tested whether transcription of other cardiac genes is cooperatively activated by MEF2 and GATA-4. As seen in Figure 2.7A, in addition to ANF, the α MHC, α -CA and B-type natriuretic peptide (BNP) promoters are also synergistically activated by MEF2 and GATA-4. Both α MHC and α -CA are downregulated in MEF2C null mice and neither contain a high affinity MEF2 binding site although both are GATA targets (Charron et al., 1999b; Sepulveda et al., 1998). However, as evidenced by the β MHC promoter, not all GATA target promoters are synergistically activated by MEF2 suggesting that functional GATA/MEF2 synergy is promoter context dependent and may be targeted to a specific subset of cardiac genes.

Finally, to ascertain whether, in cardiac cells, MEF2 proteins are GATA cofactors, the effect of a dominant negative MEF2 protein on the activity of the proximal ANF promoter was determined. This promoter contains a GATA but no MEF2 binding site. Cotransfection of a MEF2 mutant which retains the ability to physically associate with GATA-4 but lacks the activation domain reduces by 50% the activity of the ANF promoter in primary cardiomyocyte cultures; in contrast, cotransfection with wild type MEF2A induces promoter activity by 80% (Fig. 2.7B). Both, activation by wild-type MEF2 and inhibition by its dominant negative form, are blunted by point mutation of the GATA binding site (Fig. 2.7B). These data are consistent with a role for MEF2 proteins as coactivators of GATA factors in cardiac muscle cells and point to a novel GATA-dependent pathway for transcriptional activation by MEF2.

A



B

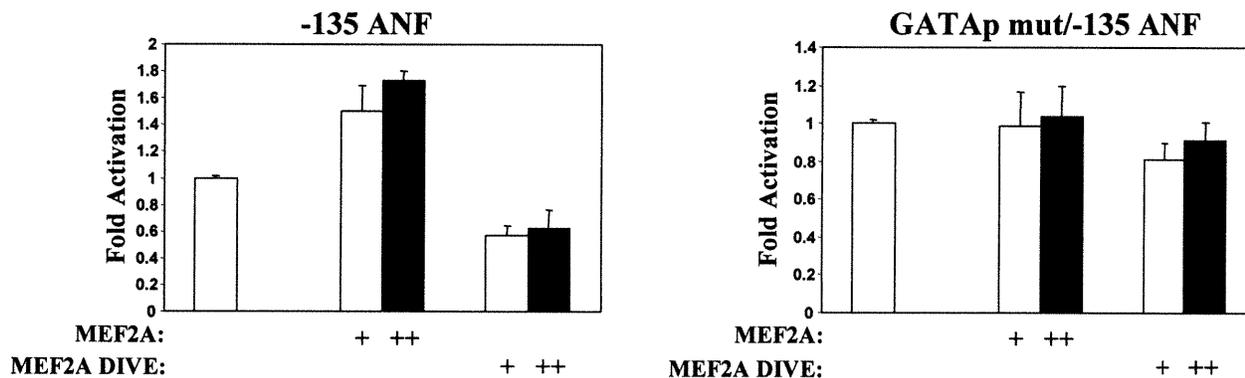


Figure 2.7 The MEF2/GATA-4 synergy: a mechanism for MEF2 action in the heart. **A)** The MEF2/GATA-4 synergy is not limited to the ANF promoter. HeLa cells were co-transfected with 1 mg of MEF2A and 1.5 mg of GATA-4 expression vectors and using various cardiac promoters. rANF is the rat -700 bp ANF promoter; ra-MHC is the rat -613 bp α -MHC promoter; ca-CA is the chicken -318 bp α -CA promoter; rb-MHC is the rat -667 bp β -MHC promoter; rBNP is the rat -114 bp BNP promoter; and TK81 is the thymidine kinase -81 bp promoter. Elements shaded in black and grey are high and low affinity sites, respectively. **B)** A dominant negative MEF2 protein decreases ANF promoter activity in cardiomyocytes. Primary culture of cardiomyocytes were transfected with the wild-type ANF₋₁₃₅ (left panel) or GATA-mutated ANF₋₁₃₅ promoter (GATAp mut/ANF₋₁₃₅; right panel) and no (-), 50 ng (+), or 1000 ng (++) of MEF2A or a dominant negative form of MEF2A (MEF2A DIVE).

2.5. DISCUSSION

The MEF2 transcription factors are key regulators of cardiac myogenesis and morphogenesis but the molecular basis for their actions are poorly understood. The data presented here provide evidence that, in cardiac myocytes, MEF2 proteins are recruited by the cardiac-specific GATA transcription factors to target promoters and functionally synergize with this family of tissue-restricted zinc finger proteins. This observation is reminiscent of the cooperative interaction between MEF2 proteins and the myogenic bHLH factors in skeletal muscles, and suggest that MEF2 proteins are able to interact with and potentiate the action of other classes of cell-specific transcription factors. Given the coexpression of MEF2 and GATA factors in several cell types including smooth muscle, neuronal, and T cells, the GATA-dependent MEF2 pathway described in this work may provide a molecular paradigm for understanding the mechanisms of action of MEF2 in many target cells.

GATA proteins are evolutionary conserved cell-restricted transcription factors that play crucial roles in differentiation. In vertebrates, six GATA factors have been identified and they are all expressed in a lineage-restricted and developmentally-controlled manner. GATA-1, -2, and -3 are predominantly expressed in hemopoietic cells while GATA-4, -5, and -6 are largely restricted to the heart and gut. Genetic and biochemical studies have revealed crucial roles for specific family members in hemopoietic, cardiac, neuronal, and endodermal cells (Grépin et al., 1995; Molkenin and Olson, 1997; Morrisey et al., 1998; Tsai et al., 1994; Pandolfi et al., 1995; Pevny et al., 1991). In addition to their essential roles in development, GATA factors are also required for the proper function of adult organs. GATA binding sites are present on

many hemopoietic and cardiac promoters, which are potently activated by GATA factors [reviewed in (Charron and Nemer, 1999)]. Moreover, GATA proteins act cooperatively with other classes of transcription factors including several zinc finger proteins, such as SP1 and FOG-1 (Friend of GATA-1) and homeodomain-containing factors like the cardiac-specific Nkx2-5 (Durocher et al., 1997; Tsang et al., 1997). The differential interactions of GATA proteins with other transcription factors are likely important for functional specificity of GATA proteins during embryonic development and in differentiated and adult cells.

In this study, we report for the first time that, in addition to interacting with homeodomain and zinc finger-containing proteins, GATA factors are also able to interact with members of the MADS-box family of transcription factors. This interaction involves physical contact between the C-terminal zinc finger DNA-binding domain and the adjacent basic region of GATA-4 and the MADS domain of MEF2. This, in turn, leads to synergistic activation of the ANF and other MEF2 target promoters independently of the DNA-binding activity of MEF2. Synergy is observed with two of the three cardiac GATA factors: GATA-4 and -6 but not with GATA-5; MEF2 synergy was also detected with GATA-1, -2, and -3 but to varying levels. Thus, all GATA factors are not equally competent to synergize with MEF2. The observation that GATA-4 and -6 but not -5 synergize with MEF2 is interesting given that GATA-4 and -5 but not -6 synergize with the cardiac homeodomain protein Nkx2-5 (Durocher et al., 1997b); this suggests that while MEF2 and Nkx2-5 interact with the same domain of GATA-4, they apparently do not recognize the same molecular determinants.

Although GATA factors physically contact MEF2 proteins through the DNA binding domain, DNA binding and GATA interaction are dissociable and neither physical nor functional interaction with GATA-4 on natural promoters requires MEF2 DNA binding. The ability of MEF2 to cooperate with MyoD in skeletal myogenesis and to synergize with MyoD in activating an artificial promoter driven by multimerized MyoD binding sites was also shown to be independent of MEF2 DNA binding capacity (Molkentin et al., 1995). DNA binding has been shown to be dispensable for some of the actions of two other sequence-specific DNA binding proteins, the glucocorticoid receptor (Reichardt et al., 1998) and the cell-specific homeodomain protein Pit1 (Dasen et al., 1999). However, in both cases, DNA-binding-independent activities involved transcriptional repression. In the present study, we show that transcriptional activation of several natural promoters by MEF2 proteins is independent of MEF2 binding sites and MEF2 DNA binding ability. Thus, both suppressive and activating functions of transcription factors may involve DNA-binding independent pathways.

In addition to the MADS domain, the activation domain of MEF2 is required for functional synergy with GATA-4 suggesting that MEF2 proteins potentiate transcriptional activity of GATA factors through recruitment and/or stabilization of coactivators in the GATA transcription complex. Such coactivators may include the CBP/p300 family as both MEF2 and GATA proteins have been shown to independently interact with these coactivators (Sartorelli et al., 1997; Kakita et al., 1999; Blobel et al., 1998). Alternatively, MEF2/GATA interaction may displace or overcome a corepressor of either or both factors. For example, MEF2 interaction with GATA-4 or -6 in the heart may displace FOG-2, a GATA-associated cofactor that represses GATA-4 activity

(Svensson et al., 1999; Lu et al., 1999a). Conversely, recruitment of MEF2 by GATA factors may displace the MEF2-associated corepressors MITR or the HDAC4 deacetylase (Miska et al., 1999; Sparrow et al., 1999).

In addition to cardiomyocytes, MEF2 proteins are coexpressed with members of the GATA family in several other cell types. Most notable is the presence of MEF2 proteins with GATA-6 in smooth muscle cells (Suzuki et al., 1996; Narita et al., 1996), and with GATA-3 in T lymphocytes (Zheng and Flavell, 1997), somites (George et al., 1994), and brain (Pandolfi et al., 1995). Given the demonstrated role of GATA factors in cell differentiation, the GATA-MEF2 synergy provides a general paradigm for understanding the role of MEF2 proteins as determining factors in diverse cell lineages.

Finally, it is tempting to speculate on the role of the MEF2/GATA synergy as a nuclear target of several signaling cascades including calcineurin and p38 MAP kinase. Both pathways, which are highly relevant to many human disorders such as ischemia, heart failure, and inflammatory diseases, have been shown to activate MEF2 in cardiac muscle (Kolodziejczyk et al., 1999), skeletal muscle (Zetser et al., 1999), neuronal (Mao et al., 1999), and T cells (Han et al., 1997; Blaeser et al., 2000). GATA factors have also been suggested as downstream targets of calcineurin in cardiac and skeletal muscle hypertrophy in connection with the calcineurin-activated NFAT factor (Molkentin et al., 1998; Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999). It would be interesting to test whether calcineurin or p38-dependent post-translational modifications of MEF2 or GATA proteins modulate the MEF2/GATA physical interaction and/or the resulting functional synergy.

2.6. MATERIALS AND METHODS

2.6.1. Cell cultures and transfections

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Transfections were carried out using calcium phosphate 24 h after plating. At 36 h post-transfection, cells were harvested and luciferase activity was assayed with a Berthold LB953 luminometer. The amount of reporter was kept at 1.5 μg per 35 mm dish and the total amount of DNA was kept constant (usually 7 μg). The amount of expression vector used is indicated in the figure legends. Primary cardiomyocyte cultures were prepared from 4-day-old Sprague-Dawley rats as previously described (Charron et al., 1999b). The results shown are the mean \pm SD of at least two independent experiments carried out in duplicate.

2.6.2. Plasmids

ANF-luciferase promoter constructs were cloned in the PXP-2 vector as described previously (Argentin et al., 1994; Durocher et al., 1996). The BNP-luc constructs were described in (Grépin et al., 1994), the $\beta\text{MHC-luc}$ and cardiac $\alpha\text{-actin-luc}$ reporters were described in (Abdellatif et al., 1994). The $\alpha\text{MHC-luc}$ vector was kindly provided by P.M. Buttrick (Buttrick et al., 1993). The construction of the various pCG-GATA-4 vectors was based on the original rat GATA-4 cDNA as previously described (Grépin et al., 1994a). The various deletions or point mutations of the ANF promoter and the pRSET-GATA-4 derivatives were generated as described previously (Charron et al., 1999b; Durocher et al., 1997). ANF constructs with mutations in the GATA elements or

in the NKE were previously described (Charron et al., 1999; Durocher et al., 1996). The A/T-rich mutation is shown in Figure 1; the SRE-like mutation replaces the TTT of the ANF-SRE by GGG thus destroying SRF binding. Heterologous promoters were generated by multimerizing the relevant oligonucleotides flanked by *Bam*HI and *Bgl*III sites upstream of the minimal (-50 bp) ANF-luciferase reporter. pcDNA-MEF2A DIVE was constructed by insertion of the XbaI-BamHI fragment of the corresponding pCGN-MEF2A DIVE construct into the XbaI-BamHI sites of the pcDNA-3 vector. MEF2 plasmids were kindly provided by E. N. Olson (Molkentin et al., 1996) and K. Walsh (Andres et al., 1995b). The MBP-GATA-4 plasmid was prepared by subcloning a XbaI-BamHI rat GATA-4 cDNA fragment containing the entire open reading frame and 1.2 kb of 3' untranslated sequences (Grépin et al., 1994) into the MBP-expressing pMalc-2 vector (New England Biolabs, Beverly MA, USA) cut with NheI-BamHI.

2.6.3. Recombinant protein production

Recombinant MBP-GATA-4 was obtained according to our previously described protocol (Durocher et al., 1997). Essentially, individual colonies were picked and grown in 500 ml LB up to an OD of 0.6 at 600 nm. Induction of the recombinant protein was carried out by adding Isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) at a final concentration of 0.5 mM during 2 hours at 37°C. The cultures were centrifuged and the bacteria were resuspended and lysed by sonication. Purification on amylose columns (New England Biolabs, Beverly MA) was performed according to the manufacturer's instructions.

In vitro transcribed/translated ³⁵S-labeled MEF2 and GATA proteins were produced in rabbit reticulocyte lysates using the TNT-coupled in vitro

transcription/translation system (Promega Corp., Madison, WI) from pcDNA-MEF2 derivatives using either T7 or Sp6 RNA polymerase.

2.6.4. In vitro protein-protein interactions

In vitro binding studies were performed using purified MBP-GATA-4 immobilized on an amylose-Sepharose resin (New England Biolabs) and in vitro transcribed / translated MEF2 proteins. Typically 2-6 μ l of 35 S-labeled MEF2 proteins were incubated in the presence of 300 ng of immobilized GATA-4 fusion protein in 500 μ l of binding buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.3% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 0.25% BSA) for 2 h at 4°C with agitation and then centrifuged for 2 min at 15 000 r.p.m. at room temperature. The resin was washed three times by vortexing in 500 μ l of binding buffer at room temperature and three other times by vortexing in 500 μ l of binding buffer without BSA. The protein complexes were released from the resin after boiling in Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE. Labeled proteins were visualized and quantified by autoradiography on phospho storage plates (PhosphorImager, Molecular Dynamics).

To determine the domains of GATA-4 and MEF2 required for physical interaction, full-length GATA-4 or mutated GATA-4 plasmids were used for in vitro co-transcription/co-translation with wild type or mutant MEF2A and MEF2C. The co-translated proteins were incubated in 500 μ L of binding buffer with 1 μ L of GATA-4 antibody (Santa-Cruz Biotechnology) for 2 h at 4°C with agitation and for an additional 2 h with 20 μ L of protein A/G Plus-Agarose added (Santa Cruz Biotechnology). Bound immunocomplexes were washed and visualized as mentioned above.

2.6.5. Electrophoretic mobility shift assays

Three μl of the in vitro translated MEF2A, MEF2C, and MEF2D proteins were used for the binding reactions performed essentially as previously described for GATA binding (Charron et al., 1999b) except that 100 ng of dI-dC was included in the binding reaction. Reactions were loaded on a 4% polyacrylamide gel and run at 200 V at room temperature in 0.25X Tris-borate-EDTA. The MEF2-MCK probe is as described in (Molkentin et al., 1996a). The rat ANF probes used were as follow:

TATA-box $^{-46}\text{TCAGGGAGCTGGGGGCTATAAAAACGGGAGACGCC}^{-11}$,

SRE-like $^{-124}\text{GATCCACTGATAACTTTAAAAGGGCATCTTCA}^{-99}$,

CArG $^{-417}\text{GATCCTCCCGCCCTTATTTGGAGCCCCTGA}^{-390}$,

A/T-rich $^{-597}\text{GATCCATACTCTAAAAAATATAATAGCTCTTTCA}^{-567}$.

2.6.6. Immunoprecipitations and immunoblots

Co-immunoprecipitations of Flag-GATA-4 and HA-MEF2A were carried out using nuclear extracts of 293T cells over-expressing the relevant proteins. Nuclear extracts were prepared as follows : 5 million 293T cells transfected with 15 μg of expression vectors were harvested 48 h post-transfection in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM Na Orthovanadate and scraped in 1 ml of ice-cold PBS containing 1 mM EDTA. The cells were resuspended in hypotonic buffer (20 mM HEPES pH7.9, 20 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.25 mM sodium molybdate, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml pepstatin, 2 mM DTT, 0.5 mM PMSF, and 100 nM okadaic acid) and swollen on ice for 15 min. Twenty five µl of 10% NP-40 was added and the microtubes were vortexed vigorously. The nuclei were then pelleted by centrifugation at 7000 r.p.m. at 4°C. The nuclear pellet was resuspended in 50-100 µl of high salt buffer (hypotonic buffer containing 20% glycerol and 0.4% NaCl) and shaken vigorously at 4°C for 1h. The nuclear extracts were cleared by centrifugation at 15 000 r.p.m. for 15 min at 4°C and the protein concentration was determined by the Bradford assay. Co-immunoprecipitation reactions were carried out on 50 µg of nuclear extracts using 1 µl of 12CA5 antibody in 500 µl of binding buffer without BSA, and bound immunocomplexes were washed and subjected to SDS-PAGE, as described previously (Durocher et al., 1997). Proteins were transferred on Hybond-PVDF membrane and subjected to immunoblotting. Anti-Flag M5 (Sigma) and 12CA5 (anti-HA) monoclonal antibodies were used at a dilution of 1/8000, revealed with an anti-mouse-HRP (Sigma) at a dilution of 1/50 000, and visualized using ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotechnology).

2.7. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Anne Aries and Pierre Paradis for generating some ANF mutants, and to Eric Olson, Jeffrey Molkenin, and Ken Walsh for the gift of MEF2 vectors. We thank Lise Laroche for secretarial assistance, and members of the Nemer laboratory for discussions and critical reading of this manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Medical Research Council (MRC). S.M. holds a studentship from the MRC; F.C. was funded by a research traineeship from the Heart and

Stroke Foundation of Canada and is presently recipient of a National Cancer Institute of Canada studentship. M.N. is a senior MRC scientist.

2.8. REFERENCES

- Abdellatif,M., MacLellan,W.R., and Schneider,M.D. (1994) p21 Ras as a governor of global gene expression. *J.Biol.Chem.* **269**, 15423-15426.
- Andres,V., Fisher,S., Wearsch,P., and Walsh,K. (1995) Regulation of GAX homeobox gene transcription by a combination of positive factors including myocyte-specific enhancer factor 2. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 4272-4281.
- Argentin,S., Ardati,A., Tremblay,S., Lihrmann,I., Robitaille,L., Drouin,J., and Nemer,M. (1994) Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 777-790.
- Bi,W., Drake,C.J., and Schwarz,J.J. (1999) The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiotensin 1 and VEGF. *Dev.Biol.* **211**, 255-267.
- Black,B.L., Molkenin,J.D., and Olson,E.N. (1998) Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol.Cell.Biol.* **18**, 69-77.
- Black,B.L. and Olson,E.N. (1998) Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**, 167-196.
- Blaeser,F., Ho,N., Prywes,R., and Chatila,T.A. (2000) Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J.Biol.Chem.* **275**, 197-209.

- Blobel,G.A., Nakajima,T., Eckner,R., Montminy,M., and Orkin,S.H. (1998) CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **95**, 2061-2066.
- Bour,B.A., O'Brien,M.A., Lockwood,W.L., Goldstein,E.S., Bodmer,R., Taghert,P.H., Abmayr,S.M., and Nguyen,H.T. (1995) Drosophila MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**, 730-741.
- Buttrick,P.M., Kaplan,M.L., Kitsis,R.N., and Leinwand,L.A. (1993) Distinct behavior of cardiac myosin heavy chain gene constructs in vivo. Discordance with in vitro results. *Circ.Res.* **72**, 1211-1217.
- Chambers,A.E., Logan,M., Kotecha,S., Towers,N., Sparrow,D., and Mohun,T.J. (1994) The RSRF/MEF2 protein SL1 regulates cardiac muscle-specific transcription of a myosin light-chain gene in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.* **8**, 1324-1334.
- Charron,F. and Nemer,M. (1999) GATA transcription factors and cardiac development. *Sem.Cell Dev.Biol.* **10**, 85-91.
- Charron,F., Paradis,P., Bronchain,O., Nemer,G., and Nemer,M. (1999) Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol.Cell.Biol.* **19**, 4355-4365.
- Dasen,J.S., O'Connell,S.M., Flynn,S.E., Treier,M., Gleiberman, AS, Szeto,D.P., Hooshmand,F., Aggarwal,A.K., and Rosenfeld,M.G. (1999) Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* **97**, 587-598.

- Di Lisi,R., Millino,C., Calabria,E., Altruda,F., Schiaffino,S., and Ausoni,S. (1998) Combinatorial *cis*-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene *in vitro* and *in vivo*. *J.Biol.Chem.* **273**, 25371-25380.
- Durocher,D., Charron,F., Warren,R., Schwartz,R.J., and Nemer,M. (1997) The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**, 5687-5696.
- Durocher,D., Chen,C.Y., Ardati,A., Schwartz,R.J., and Nemer,M. (1996) The ANF promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol.Cell.Biol.* **16**, 4648-4655.
- Durocher,D., Grépin,C., and Nemer,M. (1998). Regulation of gene expression in the endocrine heart. In Recent progress in hormone research. P.M.Conn, ed. (Bethesda USA: The Endocrine Society Press), pp. 7-23.
- Fu,Y.C. and Izumo,S. (1995) Cardiac myogenesis - overexpression of *xcsx2* or *xmef2a* in whole xenopus embryos induces the precocious expression of *xmhc-alpha* gene. *Roux's Arch.Dev.Biol.* **205**, 198-202.
- George,K.M., Leonard,M.W., Roth,M.E., Lieuw,K.H., Kioussis,D., Grosveld,F., and Engel,J.D. (1994) Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* **120**, 2673-2686.
- Grépin,C., Dagnino,L., Robitaille,L., Haberstroh,L., Antakly,T., and Nemer,M. (1994) A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol.Cell.Biol.* **14**, 3115-3129.

- Grépin,C., Robitaille,L., Antakly,T., and Nemer,M. (1995) Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks *in vitro* cardiac muscle differentiation. *Mol.Cell.Biol.* **15**, 4095-4102.
- Han,J., Jiang,Y., Li,Z., Kravchenko,V.V., and Ulevitch,R.J. (1997) Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* **386**, 296-299.
- Iannello,R.C., Mar,J.H., and Ordahl,C.P. (1991) Characterization of a promoter element required for transcription in myocardial cells. *J.Biol.Chem.* **266**, 3309-3316.
- Kakita,T., Hasegawa,K., Morimoto,T., Kaburagi,S., Wada,H., and Sasayama,S. (1999) p300 protein as a coactivator of GATA-5 in the transcription of cardiac-restricted atrial natriuretic factor gene. *J.Biol.Chem.* **274**, 34096-34102.
- Kaushal,S., Schneider,J.W., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. (1994) Activation of the myogenic lineage by *mef2a*, a factor that induces and cooperates with *myod*. *Science* **266**, 1236-40.
- Kolodziejczyk,S.M., Wang,L., Balazsi,K., DeRepentigny,Y., Kothary,R., and Megeney,L.A. (1999) MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr.Biol.* **9**, 1203-1206.
- Kuisk,I.R., Li,H., Tran,D., and Capetanaki,Y. (1996) A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Dev.Biol.* **174**, 1-13.

- Lee, Y., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V., and Izumo, S. (1997) Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2745-2755.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B.M., Schulz, R.A., and Olson, E.N. (1995) Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* **267**, 688-693.
- Lin, Q., Lu, J., Yanagisawa, H., Webb, R., Lyons, G.E., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (1998) Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development* **125**, 4565-4574.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C., and Olson, E.N. (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *mef2c*. *Science* **276**, 1404-1407:2.
- Lu, J.R., McKinsey, T.A., Xu, H.T., Wang, D.Z., Richardson, J.A., and Olson, E.N. (1999) FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4495-4502.
- Mao, Z., Bonni, A., Xia, F., Nadal-Vicens, M., and Greenberg, M.E. (1999) Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* **286**, 785-790.
- Miska, E.A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S.J., Pines, J., and Kouzarides, T. (1999) HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* **18**, 5099-5107.

- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995) Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**, 1125-1136.
- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1996b) Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2627-2636.
- Molkentin, J.D., Firulli, A.B., Black, B.L., Martin, J.F., Hustad, C.M., Copeland, N., Jenkins, N., Lyons, G., and Olson, E.N. (1996a) MEF2B is a potent transactivator expressed in early myogenic lineages. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3814-3824.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228.
- Molkentin, J.D. and Markham, B.E. (1993) Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **268**, 19512-19520.
- Molkentin, J.D. and Olson, E.N. (1997) GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy? *Circulation* **96**, 3833-3835.
- Morrissey, E.E., Tang, Z., Sigrist, K., Lu, M.M., Jiang, F., Ip, H.S., and Parmacek, M.S. (1998) GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **12**, 3579-3590.
- Musaro, A., McCullagh, K.J., Naya, F.J., Olson, E.N., and Rosenthal, N. (1999) IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* **400**, 581-585.

- Narita,N., Heikinheimo,M., Bielinska,M., White,R.A., Wilson, and DB (1996) The gene for transcription factor GATA-6 resides on mouse chromosome 18 and is expressed in myocardium and vascular smooth muscle. *Genomics* **36**, 345-348.
- Nemer,G., Qureshi,S.A., Malo,D., and Nemer,M. (1999) Functional analysis and chromosomal mapping of *GATA5*, a gene encoding a zinc finger DNA-binding protein. *Mam.Genome* **10**, 993-999.
- Pandolfi,P.P., Roth,M.E., Karis,A., Leonard,M.W., Dzierzak,E., Grosveld,F.G., Engel,J.D., and Lindenbaum,M.H. (1995) Targeted disruption of the *GATA3* gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* **11**, 40-44.
- Pevny,L., Simon,M.C., Robertson,E., Klein,W.H., Tsai,S.F., D'Agati,V., Orkin,S.H., and Costantini,F. (1991) Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor *GATA-1*. *Nature* **349**, 257-260.
- Ranganayakulu,G., Zhao,B., Dokidis,A., Molkenin,J.D., Olson,E.N., and Schulz,R.A. (1995) A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev.Biol.* **171**, 169-181.
- Reichardt,H.M., Kaestner,K.H., Tuckermann,J., Kretz,O., Wessely,O., Bock,R., Gass,P., Schmid,W., Herrlich,P., Angel,P., and Schutz,G. (1998) DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* **93**, 531-541.
- Sartorelli,V., Huang,J., Hamamori,Y., and Kedes,L. (1997) Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol.Cell.Biol.* **17**, 1010-1026.

- Semsarian,C., Wu,M.J., Ju,Y.K., Marciniac,T., Yeoh,T., Allen, DG, Harvey,R.P., and Graham,R.M. (1999) Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* **400**, 576-581.
- Sepulveda,J.L., Belaguli,N., Nigam,V., Chen,C.Y., Nemer,M., and Schwartz,R.J. (1998) GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol.Cell.Biol.* **18**, 3405-3415.
- Sparrow,D.B., Miska,E.A., Langley,E., Reynaud-Deonauth,S., Kotecha,S., Towers,N., Spohr,G., Kouzarides,T., and Mohun,T.J. (1999) MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *EMBO J.* **18**, 5085-5098.
- Suzuki,E., Evans,T., Lowry,J., Truong,L., Bell,D.W., Testa,J.R., and Walsh,K. (1996) The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen- responsive signals. *Genomics* **38**, 283-290.
- Svensson,E.C., Tufts,R.L., Polk,C.E., and Leiden,J.M. (1999) Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **96**, 956-961.
- Tsai,F.Y., Keller,G., Kuo,F.C., Weiss,M., Chen,J., Rosenblatt,M., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1994) An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**, 221-226.
- Tsang,A.P., Visvader,J.E., Turner,C.A., Fujiwara,Y., Yu,C., Weiss,M.J., Crosslely,M., and Orkin,S.H. (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **20**, 109-119.

- Viger,R.S., Mertineit,C., Trasler,J.M., and Nemer,M. (1998) Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development* **125**, 2665-2675.
- Yu,Y.T., Breitbart,R.E., Smoot,L.B., Lee,Y., Mahdavi,V., and Nadal-Ginard,B. (1992) Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* **6**, 1783-1798.
- Zetser,A., Gredinger,E., and Bengal,E. (1999) p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J.Biol.Chem.* **274**, 5193-5200.
- Zheng,W. and Flavell,R.A. (1997) The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596.
- Zhu,H., Garcia,A.V., Ross,R.S., Evans,S.M., and Chien,K.R. (1991) A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol.Cell.Biol.* **11**, 2273-2281.

CHAPITRE 3. DISCUSSION

Les facteurs MEF2 sont exprimés dans les cellules des muscles squelettique, cardiaque, et lisse (Edmondson et al., 1994; Chambers et al., 1994; Wong et al., 1994; Subramanian and Nadal-Ginard, 1996) et des sites de liaison pour ces facteurs sont essentiels pour l'expression des gènes musculaires dans ces trois types de muscles (Li et al., 1995). Des interactions combinatoires entre les facteurs MEF2 et des facteurs de transcription spécifiques aux muscles semblent jouer un rôle important dans la différenciation musculaire dans plusieurs systèmes. La spécification et la différenciation des cellules du muscle squelettique sont contrôlés par les facteurs bHLH myogéniques en coopération avec les protéines MEF2 (Molkentin et al., 1995). Les résultats présentés ici démontrent que la synergie entre les protéines MEF2 et le facteur de transcription GATA-4 régule l'expression de gènes cardiaques et suggère que les facteurs MEF2 sont des cofacteurs pour plusieurs familles de facteurs de transcription tissue-spécifique.

3.1. INTERACTIONS COMBINATOIRES DE PLUSIEURS FACTEURS DE TRANSCRIPTION SUR LE PROMOTEUR DE L'ANF

Durant ces dernières années, plusieurs facteurs de transcription possédant une expression restreinte ou enrichie dans le myocarde ont été identifiés. De plus, l'implication des facteurs de transcription exprimés de façon ubiquitaire dans la transcription cardiaque-spécifique commence à émerger. Une question fondamentale est comment ils participent ensemble à la formation d'un complexe transcriptionnel régulant

l'expression des gènes durant le développement cardiaque. Plusieurs études suggèrent fortement que des interactions combinatoires entre plusieurs facteurs de transcription sont nécessaires pour réguler l'expression des gènes cardiaques comme l'ANF. Le fait que GATA-4 et Nkx2-5 soient deux marqueurs très précoces des cellules précardiaques et que chacun de ces deux facteurs soient incapable d'initier à lui seul la cardiogénèse a amené l'hypothèse que ces deux protéines soient des cofacteurs mutuels. En effet, une interaction fonctionnelle et physique entre ces deux facteurs a été observée sur le promoteur de l'ANF, qui contient les sites de liaison pour GATA-4 et Nkx2-5 (Durocher et al., 1997; Sepulveda et al., 1998). D'autre part, GATA-4 interagit fonctionnellement et physiquement avec un autre membre de la famille GATA, GATA-6, pour activer de façon synergique le promoteur de l'ANF (Charron et al., 1999b; Sepulveda et al., 1998; Lee et al., 1998). Ces interactions GATA-4/Nkx2-5 et GATA-4/GATA-6 sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes cardiaques et pourraient être spécialement importantes durant la spécification des cardiomyocytes (Durocher and Nemer, 1998) et pour le maintien du phénotype cardiaque (Charron et al., 1999b), respectivement.

La structure modulaire des promoteurs des gènes cardiaques ne peut accommoder qu'un nombre limité de régulateurs cardiaque-spécifique. De ce fait, la spécificité spatio-temporelle serait générée grâce aux diverses interactions combinatoires au niveau de ces promoteurs. Ceci pourrait être particulièrement important pour la spécificité des chambres cardiaques ou l'asymétrie gauche-droite dans l'expression de certains gènes dans le coeur. Le NKE pourrait être un paradigme intéressant pour cette situation. En effet, au niveau du promoteur de l'ANF, le NKE se comporte comme un élément spécifique aux oreillettes, bien que son activité intrinsèque soit la même dans les

oreillettes et les ventricules (Durocher et al., 1996), suggérant fortement que l'activité chambre-spécifique du NKE reflète les interactions entre Nkx2-5 et d'autres facteurs liés aux éléments voisins sur le promoteur de l'ANF. Puisque le niveau de transcripts et d'activité de liaison à l'ADN de GATA-4 est similaire dans les oreillettes et les ventricules, la combinaison GATA-4/Nkx2-5 ne peut expliquer la spécificité du NKE aux oreillettes, suggérant d'autres cofacteurs de Nkx2-5 pour générer cette spécificité spatiale. Le facteur de transcription ubiquitaire SRF peut aussi coopérer avec Nkx2-5 pour réguler l'expression de gènes cardiaques (Chen and Schwartz, 1996) mais SRF est exprimée à un niveau semblable dans les oreillettes et les ventricules et pourrait difficilement expliquer l'activité chambre spécifique de Nkx2-5. En plus, Nkx2-5 semble participer activement à la transmission des signaux latéraux durant le développement du myocarde puisque l'expression asymétrique de eHAND dans le coeur semble être sous le contrôle de Nkx2-5 (Biben and Harvey, 1997). Ces résultats suggèrent que l'activité de Nkx2-5 est probablement modifiée directement, ou indirectement, par d'autres protéines.

3.1.1. GATA-4 recrute les protéines MEF2 sur le promoteur de l'ANF

Les facteurs de transcription de la famille MEF2 sont des régulateurs clés de la morphogénèse et de la myogénèse cardiaque (Lin et al., 1997). Chez les souris où le gène *MEF2C* a été inactivé, le gène de l'ANF n'est pas exprimé, suggérant que le promoteur de l'ANF est une cible pour MEF2C. Les résultats présentés ici démontrent que les facteurs MEF2 sont recrutés par le facteur de transcription cardiaque GATA-4 pour activer de façon synergique le promoteur de l'ANF, un mécanisme qui nous rappelle le recrutement des protéines MEF2 par les facteurs myogéniques pour activer l'expression des gènes du

muscle squelettique (Molkentin et al., 1995). En plus de servir de co-facteurs pour les facteurs myogéniques et les protéines à motif bHLH neurogéniques (Black et al., 1996; Mao and Nadal-Ginard, 1996), les protéines MEF2 jouent le rôle de cofacteurs pour les protéines GATA cardiaques dans la régulation de l'expression des gènes cardiaques.

Les données présentées ici montrent que les protéines MEF2 activent le promoteur de l'ANF dans des lignées de cellules hétérologues. L'utilisation de plusieurs mutants de délétions et de mutants ponctuels du promoteur de l'ANF nous a amené à caractériser l'élément A/T riche distal, les éléments GATA distal et proximal, et l'élément SRE-like comme des éléments de réponse à MEF2. Cependant, nous avons montré que, à l'exception de l'élément A/T riche distal qui est un élément de très basse affinité pour les facteurs MEF2, ces éléments ne lient pas directement les protéines MEF2, suggérant que les facteurs MEF2 sont plutôt recrutés par d'autres facteurs de transcription qui lient ces éléments. Nos résultats suggèrent fortement qu'un de ces facteurs est GATA-4. En effet, une interaction entre les facteurs MEF2 et GATA-4 peut être observée au niveau du promoteur de l'ANF (Figure 2.3 et 2.5). Cette interaction, médiée par le doigt de zinc en C-terminal et la région basique adjacente de GATA-4 et la boîte MADS des protéines MEF2, résulte en une activation synergique du promoteur de l'ANF et d'autres promoteurs cibles indépendamment de la liaison à l'ADN des facteurs MEF2. De plus, la mutation de l'élément GATA abolie complètement la synergie. Donc, nous proposons un mécanisme où GATA-4 recrute les protéines MEF2, pour activer de façon synergique le promoteur de l'ANF, un mécanisme qui nous rappelle celui observé entre les protéines MEF2 et MyoD au niveau du muscle squelettique (Molkentin et al., 1995). Les domaines de transactivation en C-terminal de GATA-4 et des facteurs MEF2 sont requis pour cette

interaction fonctionnelle. En effet, l'absence d'un seul de ces domaines abolie complètement la synergie (Figure 2.6) suggérant un recrutement de coactivateurs comme CBP/p300 pour former un complexe multiprotéique capable d'activer la transcription de façon synergique. CBP/p300 interagissent directement avec les protéines GATA d'une part (Blobel et al., 1998), et MEF2 d'autre part (Sartorelli et al., 1997). D'ailleurs, de nombreuses études suggèrent CBP/p300 comme point central de plusieurs interactions protéine/protéine. En effet, CBP/p300 sont extrêmement versatiles pour établir un pont entre les facteurs de transcription et la machinerie basale transcriptionnelle (Shikama et al., 1997). Le recrutement de ces coactivateurs pourrait alors établir un lien entre la combinaison MEF2/GATA et la machinerie transcriptionnelle de base et stabiliser cette dernière au niveau du promoteur (voir Figure 1.2). CBP/p300 possèdent également des activités acétyltransférases (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996) capable d'acétyler les histones, rendant du même coup, les promoteurs des gènes plus accessibles aux facteurs de transcription. On peut imaginer qu'étant donné la grosseur d'un complexe MEF2/GATA et l'espace de liaison à l'ADN très restreint dans la partie proximale du promoteur de l'ANF en raison des nombreux sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription, un recrutement de CBP/p300 par MEF2/GATA pourrait aider, voir même stabiliser, ce complexe sur le promoteur de l'ANF en acétylant les histones, ou en acétylant directement MEF2/GATA ou les facteurs contenus dans la machinerie transcriptionnelle de base, un mécanisme qui a déjà été observé pour TF_{II}E et TF_{II}F (Imhof et al., 1997). Une autre hypothèse très intéressante de l'effet d'un recrutement de CBP/p300 est l'établissement de liens entre des cascades de signalisations cellulaires séparées. Contrairement à un recrutement d'acétyltransférases par MEF/GATA, un

recrutement de déacétylases comme HDAC4, qui est déjà connu pour interagir directement avec MEF2A pour inhiber son activité transcriptionnelle (Miska et al., 1999), pourrait inhiber la synergie observée entre MEF2 et GATA-4. Ces recrutements pourraient dépendre du contexte cellulaire, expliquant pourquoi la synergie peut être observée sur certains promoteurs seulement. La combinaison MEF2/GATA pourrait également empêcher les deux facteurs d'interagir avec des protéines inhibitrices comme FOG-2 pour GATA-4 (Lu et al., 1999; Tevosian et al., 1999) et MITR pour MEF2 (Sparrow et al., 1999).

Tous les facteurs GATA ne sont pas égaux pour synergiser avec MEF2A: en plus de GATA-4, la synergie peut être observée avec GATA-1, -2, -3 et -6 à différents degrés, mais pas avec GATA-5. Ceci suggère que différents déterminants moléculaires résident dans les divers facteurs GATA. En effet, Nkx2-5 peut interagir fonctionnellement avec GATA-4 et GATA-5, mais non avec GATA-6, suggérant que même si les protéines MEF2 et Nkx2-5 interagissent avec le même domaine des facteurs GATA, ils ne reconnaissent pas les mêmes déterminants moléculaires. D'autre part, MEF2A, MEF2C, et MEF2D, sont tous capables de synergiser avec GATA-4. Il serait intéressant d'établir par des études de mutagenèse dirigée, les acides aminés précis requis pour l'interaction GATA/MEF2 ce qui aiderait grandement à comprendre le mécanisme moléculaire de leur synergie.

3.1.2. Les protéines MADS comme cofacteurs des protéines GATA

La spécificité fonctionnelle des facteurs GATA requiert des interactions avec d'autres cofacteurs restreints à certains types cellulaires. Récemment, FOG-2, une

protéine à doigts de zinc exprimé à de haut niveau dans le coeur, le cerveau, et les testicules, a été isolée par clonage moléculaire (Lu et al., 1999; Tevosian et al., 1999; Svensson et al., 1999). Ce cofacteur s'associe physiquement in vitro et in vivo avec le doigt de zinc en N-terminal de GATA-4. Cependant, son rôle dans l'expression des gènes cardiaques reste à être déterminé.

Dans le cadre de ce travail, nous avons démontré pour la première fois, qu'en plus d'interagir avec des protéines à homéodomaine et à doigt de zinc, GATA-4 est également capable d'interagir avec des facteurs de transcription à boîtes MADS. En plus des facteurs MEF2, un autre facteur de transcription à boîte MADS, SRF (serum response factor) joue un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes cardiaques (voir introduction section 1.2.2.2.2.). La protéine SRF active le promoteur de l'ANF via la boîte CArG située à -400 pb (Ardati and Nemer, 1993). Sachant que SRF fait partie de la même famille de facteur de transcription que les protéines MEF2, nous avons cherché à savoir si SRF était capable de coopérer avec les facteurs GATA cardiaques. En effet, la protéine SRF agit très souvent à l'aide de co-facteurs pour réguler l'expression des gènes contenant un SRE. Des études concernant la régulation du gène *c-fos* par SRF a amené à l'identification de plusieurs facteurs accessoires à SRF comme SAP-1, Elk-1, et Phox-1 (Dalton and Treisman, 1992b; Grueneberg et al., 1992b; Prywes and Roeder, 1986). Tout comme les facteurs MEF2, une interaction physique et fonctionnelle entre SRF et GATA-4 peut être observée au niveau du promoteur de l'ANF bien que le mécanisme d'interaction entre GATA et SRF soit différent de celui documenté entre MEF2 et GATA (Morin et al., 2000).

En raison de la coexpression des protéines MEF2 et GATA-4 à plusieurs stades du développement cardiaque et l'interaction physique et fonctionnelle entre ces deux protéines, la possibilité d'un éventuel complexe tertiaire MEF2/GATA-4 a été étudiée à l'aide d'expériences de retardement sur gel. Que se soit avec des protéines purifiées ou avec des extraits nucléaires surexprimant les protéines d'intérêts, aucun complexe tertiaire ou même changement des propriétés physiques de l'interaction MEF2 sur l'élément A/T riche distal ou GATA-4 sur l'élément GATA proximal n'a été observé (données non présentées). Ceci peut s'expliquer par le fait que, dans la combinaison MEF2/GATA, seulement GATA-4 est lié à l'ADN. La stringence des expériences de retardement sur gel ne permettraient donc pas de garder l'interaction entre MEF2 et GATA-4 contrairement à la combinaison SRF/GATA, où les deux protéines doivent lier l'ADN pour synergiser (Geissler et al., 1988). En effet, à l'inverse de la coopération MEF2/GATA-4, la coopération SRF/GATA-4 nécessite les sites de liaison pour les deux facteurs, suggérant fortement que SRF et GATA-4 doivent lier l'ADN afin de synergiser ensemble. Le fait que ces sites de liaison soient côte à côte sur le promoteur de l'ANF (SRE-like et GATAp) nous a amené à étudier si SRF et GATA-4 pouvaient s'aider mutuellement à lier l'ADN, un mécanisme qui a déjà été observé entre SRF et YY1, et SRF et Phox-1 (Natesan and Gilman, 1995; Grueneberg et al., 1992). Pour ce faire, des expériences de retardement sur gel similaires à celles faites pour étudier un éventuel complexe tertiaire MEF2/GATA-4 ont mis en évidence un complexe tertiaire migrant plus haut que la liaison SRF (données non présentées). Ce complexe, qui nécessite les sites de liaison pour GATA-4 et SRF suggère que ces deux facteurs de transcription peuvent lier l'ADN simultanément (Morin et al., 2000). Ainsi, malgré leur appartenance à une même famille

de facteur de transcription et le fait qu'ils soient capable de coopérer avec les facteurs GATA, les facteurs MEF2 et la protéine SRF possèdent des mécanismes d'activation transcriptionnelle du gène de l'ANF qui leurs sont propres.

Sachant que GATA-4, Nkx2-5, SRF, et MEF2C sont coexprimés durant les stades précoces du développement du myocarde, il est tentant de proposer un mécanisme où ces protéines seraient présentes dans un même complexe multiprotéique pour activer la transcription du gène de l'ANF. Nous savons déjà qu'il y a formation de complexes GATA/Nkx2-5, SRF/Nkx2-5, et ce travail démontre une interaction GATA/MEF2. De plus, des expériences préliminaires suggèrent que les facteurs MEF2 peuvent interagir fonctionnellement avec Nkx2-5 et SRF au niveau du promoteur de l'ANF (données non présentées). Il se peut que, durant des stades spécifiques du développement cardiaque, certains de ces complexes soient favorisés pour réguler l'expression de gènes cibles spécifiques ou pour initier la cardiogénèse. Étant donné leur expression très précoce et leurs sites de liaison retrouvés dans plusieurs gènes exprimés durant l'initiation de la cardiogénèse, une combinaison MEF2/GATA pourrait être à l'origine d'une partie de cette initiation. En effet, des données concernant MEF2C et Nkx2-5 dans l'initiation de la cardiogénèse dans des cellules P19 suggèrent des interactions combinatoires spécifiques pour initier la différenciation des cardiomyocytes (Janknecht and Hunter, 1996).

La combinaison MEF2/GATA se doit d'être elle-même régulée pour jouer adéquatement son rôle dans la régulation de l'expression de gènes cibles spécifiques. Dès lors, une question essentielle se pose. Quand les facteurs MEF2 et GATA agissent-ils seuls et quand agissent-ils en coopération? Il est possible de penser que suite à un stimulus quelconque à la surface cellulaire, des signaux intracellulaires puissent modifier

de façon post-traductionnelle les protéines en question, favorisant ou inhibant ainsi leur interaction. La phosphorylation est un des mécanismes de régulation post-traductionnelle les plus étudiés et largement répandus dans les mécanismes moléculaires. Molkenin et al. ont démontré que la phosphorylation de la sérine 59 de la boîte MADS de MEF2C augmente son activité de liaison à l'ADN (Molkenin et al., 1996b). De plus, des expériences de transfections ont démontrés que la mutation de cette sérine inhibe l'activité transcriptionnelle de MEF2C (Molkenin et al., 1996b). L'interaction MEF2/GATA nécessitant les domaines de liaison à l'ADN des deux protéines (Figure 2.5), on peut se demander si cette sérine est impliquée dans l'interaction MEF2/GATA. En effet, lors des expériences de transfection avec MEF2C ou MEF2C mutant, l'activation du gène rapporteur pourrait être médiée par des facteurs GATA endogènes, un effet semblable à celui observé lors de l'activation du promoteur de l'ANF par les facteurs MEF2 dans les cellules HeLa (Figure 2.2A). Ceci suggérerait un mécanisme de recrutement inverse de celui proposé pour l'activation du gène de l'ANF, c'est-à-dire un recrutement des protéines GATA par les facteurs MEF2. Ce genre de mécanisme a déjà été observé au niveau de l'expression des gènes du muscle squelettique impliquant les facteurs bHLH myogéniques (Molkenin et al., 1995).

La synergie entre MEF2A et GATA-4 est également observée sur le promoteur des gènes α MHC et α CA qui sont, comme le gène de l'ANF, régulés négativement chez les souris où le gène *MEF2C* a été inactivé. Ces résultats suggèrent que la synergie MEF2/GATA-4 n'est pas restreinte au promoteur de l'ANF et pourrait contribuer à la régulation de l'expression de plusieurs gènes cardiaques *in vivo*.

On peut facilement imaginer que la combinaison MADS/GATA ne soit pas restreinte aux vertébrés. Chez la levure, MCM1, un facteur de transcription à boîte MADS, est impliqué dans la réponse aux phéromones ainsi que dans la détermination des différents types cellulaires (Shore and Sharrocks, 1995). Des sites de liaison pour MCM1 sont présents dans les promoteurs de plusieurs gènes impliqués dans diverses fonctions comme la structure de la paroi cellulaire, le métabolisme cellulaire, et la progression du cycle cellulaire (Dolan and Fields, 1991b; Kuo and Grayhack, 1994). Tel, *SWI5*, un gène régulant le cycle cellulaire et *CLB1* et *CLB2*, des gènes codant pour des cyclines (Kuo and Grayhack, 1994). Certains facteurs GATA ont également été caractérisés chez la levure. En effet, Gln3p, Gat1p, Dal80p, et Deh1p, qui sont tous des protéines de la famille GATA, lient des séquences GATA de certains promoteurs comme *DAL7*, un gène codant pour la malate synthase (Rai et al., 1999).

Comme dans le cas des facteurs MEF2, MCM1 agit très souvent avec des cofacteurs, afin de réguler la transcription d'un gène. Parmi ceux-ci, $\alpha 1$, $\alpha 2$, et STE12, interagissent directement avec MCM1 (Shore and Sharrocks, 1995). Par contre, les cofacteurs des protéines de la famille GATA chez la levure ne sont pas très bien connus. Cependant, deux membres de cette famille, Dal80p et Deh1p, peuvent hétérodimériser ensemble pour réguler l'activité transcriptionnelle d'un gène (Svetlov and Cooper, 1998). Ceci n'est pas sans rappeler la coopération GATA-4/GATA-6 dans le cœur (Charron et al., 1999b). Une combinaison MCM1/GATA chez la levure pourrait très bien réguler des gènes importants dans le cycle cellulaire comme *SWI5* puisqu'en cherchant pour des sites de liaison pour des facteurs de transcription, des éléments GATA ont été trouvés dans ce

promoteur. Il serait donc possible d'utiliser le promoteur *SWI5* pour déterminer si un mécanisme de coopération MCM1/GATA existe chez la levure.

Les protéines à boîte MADS chez les plantes ne font pas exception à la règle. En effet, trois gènes codant pour des protéines MADS, A, B, et C, agissent seuls ou en combinaison pour dicter quels gènes organe-spécifique seront activés dans une région donnée de la fleur en développement. Malgré l'absence de documentation sur les protéines GATA florales, des sites de liaison pour celles-ci peuvent être trouvés dans le promoteur du gène *AGL1*, un gène codant pour un facteur de transcription à boîte MADS impliqué dans le développement de l'organe floral (Shore and Sharrocks, 1995).

3.1.3. Les protéines MEF2 agissent comme co-facteurs pour des facteurs de transcription tissu-spécifique dans plusieurs lignées cellulaires

Durant le développement du muscle squelettique, les facteurs bHLH myogéniques et les protéines MEF2 activent leur propre expression et l'expression de chacun d'eux résultant en l'établissement et le maintien du phénotype musculaire (Figure 1.6). Les protéines MEF2 sont nécessaires dans l'expression des gènes myogéniques *myogénine* et *MRF4* (Olson et al., 1995; Weintraub, 1993; Black et al., 1995; Naidu et al., 1995; Pin et al., 1997; Cheng et al., 1993). Les protéines MEF2 ne peuvent induire la myogénèse lorsque transfectées dans des fibroblastes mais augmentent dramatiquement la différenciation des cellules musculaires lorsque co-exprimées avec MyoD ou Myogénine (Molkentin et al., 1995). Cette coopérativité requiert des interactions directes entre les protéines MEF2 et les facteurs bHLH myogéniques. Un des mécanismes proposés était le

recrutement des protéines MEF2 par les facteurs bHLH myogéniques déjà liés à l'ADN pour réguler l'expression de gènes musculaires (Molkentin et al., 1995).

Le fait que les protéines MEF2 soient capables d'activer le promoteur de l'ANF sans lier directement l'ADN nous a mené à proposer un mécanisme où GATA-4 recrute les facteurs MEF2 pour activer l'expression des gènes cardiaques. Ce modèle dénote plusieurs similarités avec le recrutement des protéines MEF2 par les facteurs myogéniques: i) GATA-4 et MEF2 interagissent physiquement ensemble, ii) les domaines requis pour l'interaction sont le domaine de liaison à l'ADN de MEF2, soit la boîte MADS, et le doigt de zinc en C-terminal de GATA-4, qui constitue son domaine de liaison à l'ADN, et la région basique adjacente, iii) l'interaction physique conduit à une activation synergique du promoteur de l'ANF, iv) un site de liaison pour GATA-4 est nécessaire et suffisant pour observer la synergie.

Les facteurs de transcription qui sont responsables de l'engagement et de la différenciation du muscle lisse ne sont pas très bien connus mais les facteurs MEF2 et SRF semblent jouer des rôles importants pour l'expression tissu-spécifique de plusieurs gènes spécifiques au muscle lisse. Des sites MEF2 ont été identifiés comme des éléments régulateurs positifs du promoteur *Gax*, un gène codant pour une protéine à homéodomaine exprimée dans les cellules musculaires lisses (CMLs) (Skopicki et al., 1997; Andres et al., 1995). Récemment, des gènes MEF2-dépendant qui médient l'organisation des cellules endothéliales et la différenciation des CMLs ont été identifiés à l'aide des souris mutantes pour *mef2c* (Lin et al., 1997). Le facteur de transcription GATA-6, qui est exprimé dans le myocarde et les CMLs, peut également agir en

coopération avec les protéines MEF2 pour activer le promoteur de l'ANF, suggérant un rôle pour cette interaction dans la régulation de l'expression des gènes du muscle lisse.

En plus des facteurs bHLH myogéniques, les protéines MEF2 agissent en coopération avec d'autres protéines bHLH spécifiques à certains types cellulaires. Par exemple, dans les neurones, MEF2 interagit physiquement et fonctionnellement avec MASH1 (introduction section 1.2.2.2.1.3.) (Mao and Nadal-Ginard, 1996; Black et al., 1996). Parce que les protéines bHLH neurogéniques ne possèdent pas de résidus Ala-Thr myogéniques dans leurs régions basiques, d'autres déterminants protéiques à MASH1 devraient être compatibles avec l'interaction MEF2 et subséquamment transmettre le signal d'activation au complexe transcriptionnel de base. Cependant, les gènes cibles des facteurs MEF2 au niveau du système nerveux reste encore à être identifié. Sachant que les protéines GATA-2, et -3 jouent un rôle important dans les stades précoces de la différenciation neuronale (Nardelli et al., 1999), il est possible que les gènes neuronaux cibles des protéines MEF2 soient également des cibles des protéines GATA, et qu'une combinaison MEF2/GATA potentialise la neurogénèse induite par GATA-2/GATA-3 tel que déjà observée (Nardelli et al., 1999).

Les protéines MEF2 sont également exprimées dans les cellules T et B de la lignée lymphocytaire (Rao et al., 1998; Swanson et al., 1998). Dans les cellules T, GATA-3 est un régulateur essentiel de la différenciation lymphocytaire (Kuo and Leiden, 1999). Il serait intéressant de savoir si les protéines MEF2, qui sont la cible des voies MAPK dans ces cellules, exercent leur rôle, en partie, en interagissant avec GATA-3 pour réguler l'expression des gènes de manière tissu-spécifique ou en réponse à l'activation des cellules T par divers mécanismes.

3.2. IMPLICATION DE LA COOPÉRATION MADS/GATA DANS L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE

L'hypertrophie cardiaque est une complication très souvent observée lors de plusieurs maladies cardiovasculaires comme l'hypertension et l'infarctus du myocarde. Au même titre qu'une contrainte mécanique comme une surcharge de pression, plusieurs facteurs humoraux et facteurs de croissance dont les agonistes α_1 -adrénergique (Bishopric and Kedes, 1991; Knowlton et al., 1993), l'ANG II (Baker et al., 1992), et le facteur de croissance basique FGF (Fibroblast Growth Factor) (Bogoyevitch et al., 1994), induisent une hypertrophie des cardiomyocytes en culture. Au début des années 90, on a rapporté que l'endothéline-1 (ET-1), un peptide vasoactif, a un effet trophique sur les cardiomyocytes et induit l'hypertrophie de cardiomyocytes de rats néonataux en culture (Ito et al., 1991; Shubeita et al., 1990). En effet, suite à la stimulation avec l'ET-1, les cardiomyocytes montrent plusieurs caractéristiques de la réponse hypertrophique dont une augmentation du volume cellulaire, une réorganisation des sarcomères des cardiomyocytes, et une reprogrammation génétique incluant l'activation de l'expression des gènes précoces immédiats et des proto-oncogènes (Iwaki et al., 1990) ainsi qu'une ré-expression des gènes fœtaux cardiaques dont l'ANF. (Iwaki et al., 1990) (Chien et al., 1991; Knowlton et al., 1991; Chien et al., 1993; Hefti et al., 1997). Cependant, par quel mécanisme un stimulus hypertrophique comme l'ET-1 active le gène de l'ANF est encore mal compris.

Afin de produire son effet hypertrophique, l'ET-1 doit se lier à son récepteur à la surface des cardiomyocytes. Ce récepteur fait parti de la plus grande famille de récepteurs membranaires, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Les RCPG empruntent la voie Ras-MAP kinase pour transmettre le signal jusqu'au noyau (Marshall, 1994). Plusieurs groupes ont démontré que suite à une stimulation hypertrophique des cardiomyocytes, une activation de ces différentes kinases est observée (Komuro et al., 1991)

Connaissant l'implication de la protéine GATA-4 et des facteurs MEF2 dans l'hypertrophie cardiaque (Molkentin et al., 1998), des expériences de retardement sur gel à l'aide d'extraits nucléaires de cardiomyocytes non traités et traités à l'ET-1 ont été faites afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués. Ces résultats montrent une augmentation de liaison à l'ADN pour les facteurs de transcription MEF2 et GATA-4 avec les extraits traités à l'ET-1 (données non présentées). (Komuro et al., 1990; Sadoshima and Izumo, 1993; Yamazaki et al., 1993; Yamazaki et al., 1995; Davis, 1993; Clerk et al., 1998; Wang et al., 1998; Zechner et al., 1997; Clerk et al., 1998; Nagarkatti and Sha'afi, 1998) Sachant que la p38 peut être activé par l'ET-1 (Clerk et al., 1998) et qu'elle peut phosphoryler les facteurs MEF2 (Zhao et al., 1999) et augmenter leur capacité à lier l'ADN (Molkentin et al., 1996d; Han et al., 1997), l'augmentation de la liaison à l'ADN des protéines MEF2 en réponse à l'ET-1 suggère fortement une augmentation de la phosphorylation de ces facteurs lors de la réponse hypertrophique. Cette augmentation pourrait expliquer les résultats publiés par Chien et al. qui montraient que la partie A/T riche distal qui lie les facteurs MEF2 et qui est activée par MEF2 était induite en réponse à une stimulation hypertrophique dans les cardiomyocytes. GATA-4

peut aussi voir sa capacité à lier l'ADN augmenter avec l'ET-1 (données non présentées). Récemment, on a montré que GATA-4 est phosphorylé suite à un stimulus hypertrophique comme la phényléphrine (PE) (Morimoto et al., 2000), qui active les mêmes voies de signalisation que l'ET-1, suggérant la possibilité d'une augmentation semblable de la phosphorylation de GATA-4 lors d'un traitement à l'ET-1.

On peut imaginer que la coopération MEF2/GATA dans la régulation endogène des gènes prend tout son importance suite à un stimulus provoquant une activation de l'expression du gène cible. Dans des conditions normales, les facteurs MEF2 et GATAs contribueraient à l'activité basale du promoteur en question. Par exemple, la réactivation du gène de l'ANF lors de la réponse hypertrophique pourrait être due à la synergie entre MEF2 et GATA-4. En effet, le recrutement des facteurs MEF2 par GATA-4 pourrait être la dernière étape d'une cascade de signalisation retrouvée uniquement durant l'hypertrophie cardiaque. En l'absence de stimuli hypertrophiques, le recrutement n'aurait pas lieu et l'expression du gène de l'ANF ne serait pas réactivé.

En plus des facteurs MEF2 et GATA-4, une augmentation de liaison à l'ADN de la protéine SRF peut également être observée à l'aide d'extraits de cardiomyocytes traités à l'ET-1 (Morin et al., 2000). Cependant, la p38 ne peut phosphoryler SRF (Thuerauf et al., 1998), suggérant un mécanisme différent de celui des facteurs MEF2. ATF-6, qui peut être phosphorylé par la p38 (Thuerauf et al., 1998), peut interagir avec SRF et pourrait stabiliser SRF sur l'ADN et agissant ainsi comme un co-activateur de SRF durant la réponse hypertrophique (Zhu et al., 1997). Il serait intéressant de savoir si des modifications post-traductionnelles des protéines GATA ou des facteurs MEF2 par des

kinases comme la p38 peuvent moduler les interactions physiques et/ou fonctionnelles MEF2/GATA ou SRF/GATA.

3.3. PERSPECTIVES FUTURES

Malgré les énormes progrès accomplis durant les dernières années au sujet de la régulation de l'expression des gènes cardiaques, beaucoup de chemin reste à faire avant de comprendre comment la cardiogénèse est initiée et maintenue. La dissection des éléments agissant en *cis* dans les promoteurs cardiaques comme l'ANF ainsi que l'identification des facteurs de transcription régulant l'expression de ces gènes sont essentielles pour la compréhension du développement et de la différenciation cardiaques. La caractérisation d'une nouvelle voie transcriptionnelle impliquant les facteurs MEF2 sur le promoteur de l'ANF aide à éclaircir le réseau d'interactions moléculaires établissant l'activité cardiaque-spécifique de ce promoteur.

Les résultats présentés ici suggèrent que les facteurs MEF2 potentialisent l'activité transcriptionnelle des protéines GATA. Cette synergie pourrait être due à un recrutement et/ou à une stabilisation de coactivateurs comme CBP/p300 dans le complexe MEF2/GATA. Sachant que CBP/p300 peut interagir directement avec ces deux facteurs, il serait intéressant de savoir, à l'aide d'expériences de Tri-hybride, si ce coactivateur peut interagir avec ces deux protéines simultanément, formant un complexe tertiaire au niveau du promoteur de l'ANF et produisant ainsi une "superactivation" de la transcription du gène de l'ANF. Inversement, la synergie MEF2/GATA pourrait être due à un déplacement de corépresseurs comme FOG-2 pour GATA-4 ou MITR et HDAC4 pour MEF2. Des

expériences de transfections pourraient nous indiquer si la combinaison MEF2/GATA peut renverser les inhibitions causées par ces répresseurs. De plus, connaissant l'implication des facteurs GATA dans l'hypertrophie cardiaque, il serait intéressant de savoir si FOG -2 est un participant important des voies de signalisation impliquées dans l'hypertrophie cardiaque. En effet, l'augmentation de l'expression des gènes de l'ANF et du BNP observé lors de l'hypertrophie cardiaque peut être réprimé par FOG-2 (Svensson et al., 1999; Tevosian et al., 1999; Tevosian et al., 2000).

Le recrutement des facteurs MEF2 par les protéines GATA cardiaques n'est pas sans rappeler la coopération MEF2/MyoD dans le muscle squelettique. Cependant, malgré l'acharnement de plusieurs groupes, aucun n'a réussi à isoler l'homologue de MyoD dans le muscle cardiaque. Par contre, les protéines cardiaques HAND, de la famille bHLH, pourraient très bien être capable d'interagir avec les facteurs MEF2 pour réguler l'expression de certains gènes cardiaques. Des expériences semblables à celles décrites dans ce mémoire pourraient être faites afin de découvrir s'il y a coopération entre ces protéines et si les protéines HAND sont capables d'activer le gene de l'ANF *via* les boîtes E contenues dans son promoteur ou inversement *via* la séquence A/T riche distal ou encore les sites GATA, suite à un recrutement par les protéines MEF2 présente dans les complexes protéiques sur ces régions.

En plus des cardiomyocytes, les protéines MEF2 sont coexprimées avec les membres de la famille GATA dans plusieurs autres types cellulaires. Plus particulièrement on retrouve les protéines MEF2 avec GATA-6 dans les cellules du muscle lisse, et avec GATA-3 dans les lymphocytes T, les somites, et le cerveau. L'étude des promoteurs spécifiques à ces types cellulaires contenant des sites de liaison pour une

ou l'autre de ces protéines pourrait nous indiquer si la combinaison MEF2/GATA est vraiment un paradigme général dans diverses lignées cellulaires.

Finalement, il est possible que la synergie MEF2/GATA soit une cible de plusieurs cascades de signalisation incluant la calcineurine et la MAP kinase p38. Ces deux voies de signalisation, qui sont activées lors de plusieurs pathologies chez l'humain comme l'ischémie, l'insuffisance cardiaque, et les maladies inflammatoires, activent les facteurs MEF2 dans le muscle cardiaque (Kolodziejczyk et al., 1999), le muscle squelettique (Zetser et al., 1999), les cellules neuronales (Mao et al., 1999), et les cellules T (Han et al., 1997). Les protéines GATA sont également des cibles de la calcineurine durant l'hypertrophie des muscles cardiaque et squelettique en coopération avec les facteurs NFAT (Molkentin et al., 1998b; Musaro et al., 1999; Semsarian et al., 1999). Il serait intéressant de tester si des modifications post-traductionnelles engendrées par la calcineurine ou la p38 peuvent moduler l'interaction physique et/ou fonctionnelle MEF2/GATA.

CHAPITRE 4. RÉFÉRENCES

- Abdellatif,M., MacLellan,W.R., and Schneider,M.D. (1994). p21 Ras as a governor of global gene expression. *J. Biol. Chem.* *269*, 15423-15426.
- Aird,W.C., Parvin,J.D., Sharp,P.A., and Rosenberg,R.D. (1994). The interaction of GATA-binding proteins and basal transcription factors with GATA box-containing core promoters. a model of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* *269*, 883-889.
- Andres,V., Cervera,M., and Mahdavi,V. (1995a). Determination of the consensus binding site for MEF2 expressed in muscle and brain reveals tissue-specific sequence constraints. *J. Biol. Chem.* *270*, 23246-23249.
- Andres,V., Fisher,S., Wearsch,P., and Walsh,K. (1995b). Regulation of GAX homeobox gene transcription by a combination of positive factors including myocyte-specific enhancer factor 2. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4272-4281.
- Ardati,A. and Nemer,M. (1993). A nuclear pathway for α_1 -adrenergic receptor signaling in cardiac cells. *EMBO J.* *12*, 5131-5139.
- Argentin,S., Ardati,A., Tremblay,S., Lihmann,I., Robitaille,L., Drouin,J., and Nemer,M. (1994). Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 777-790.
- Arsenian,S., Weinhold,B., Oelgeschlager,M., Ruther,U., and Nordheim,A. (1998). Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* *17*, 6289-6299.
- Attar,R.M. and Gilman,M.Z. (1992). Expression cloning of a novel zinc finger protein that binds to the c-fos serum response element. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 2432-2443.
- Baker,K.M., Booz,G.W., and Dostal,D.E. (1992). Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin- angiotensin system. [Review]. *Annu. Rev. Physiol.* *54*, 227-241.
- Bannister,A.J. and Kouzarides,T. (1996). The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature* *384*, 641-643.
- Belaguli,N.S., Schildmeyer,L.A., and Schwartz,R.J. (1997). Organization and myogenic restricted expression of the murine serum response factor gene. A role for autoregulation. *J. Biol. Chem.* *272*, 18222-18231.
- Bi,W., Drake,C.J., and Schwarz,J.J. (1999). The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiotensin 1 and VEGF. *Dev. Biol.* *211*, 255-267.

- Biben,C. and Harvey,R.P. (1997). Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev.* *11*, 1357-1369.
- Bishopric,N.H. and Kedes,L. (1991). Adrenergic regulation of the skeletal alpha-actin gene promoter during myocardial cell hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *88*, 2132-2136.
- Black,B.L., Ligon,K.L., Zhang,Y., and Olson,E.N. (1996). Cooperative transcriptional activation by the neurogenic basic helix-loop-helix protein MASH1 and members of the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) family. *J. Biol. Chem.* *271*, 26659-26663.
- Black,B.L., Martin,J.F., and Olson,E.N. (1995). The mouse MRF4 promoter is trans-activated directly and indirectly by muscle-specific transcription factors. *J. Biol. Chem.* *270*, 2889-2892.
- Black,B.L., Molkentin,J.D., and Olson,E.N. (1998). Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 69-77.
- Black,B.L. and Olson,E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 167-196.
- Blaeser,F., Ho,N., Prywes,R., and Chatila,T.A. (2000). Ca²⁺-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J. Biol. Chem.* *275*, 197-209.
- Blobel,G.A., Nakajima,T., Eckner,R., Montminy,M., and Orkin,S.H. (1998). CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *95*, 2061-2066.
- Bodmer,R. (1995). Heart development in *drosophila* and its relationship to vertebrates. *TCM* *5*, 21-28.
- Bogoyevitch,M.A., Glennon,P.E., Andersson,M.B., Clerk,A., Lazou,A., Marshall,C.J., Parker,P.J., and Sugden,P.H. (1994). Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen- activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* *269*, 1110-1119.
- Boheler,K.R. and Schwartz,K. (1992). Gene expression in cardiac hypertrophy. *TCM* *2*, 176-182.
- Bour,B.A., O'Brien,M.A., Lockwood,W.L., Goldstein,E.S., Bodmer,R., Taghert,P.H., Abmayr,S.M., and Nguyen,H.T. (1995). *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* *9*, 730-741.

Breitbart,R.E., Liang,C.S., Smoot,L.B., Laheru,D.A., Mahdavi,V., and Nadal-Ginard,B. (1993). A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. *Development* 118, 1095-1106.

Buckingham,M. (1994). Molecular biology of muscle development. *Cell* 78, 15-21.

Buratowski,S., Hahn,S., Guarente,L., and Sharp,P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.

Buttrick,P.M., Kaplan,M.L., Kitsis,R.N., and Leinwand,L.A. (1993). Distinct behavior of cardiac myosin heavy chain gene constructs in vivo. Discordance with in vitro results. *Circ. Res.* 72, 1211-1217.

Cantin,M., Thibault,G., Ding,J., Gutkowska,J., Garcia,R., Hamet,P., and Genest,J. (1987). Natriuretic factors. The whole heart is an endocrine gland. *Nucl. Med. Biol.* 14, 313-322.

Chambers,A.E., Logan,M., Kotecha,S., Towers,N., Sparrow,D., and Mohun,T.J. (1994). The RSRF/MEF2 protein SL1 regulates cardiac muscle-specific transcription of a myosin light-chain gene in *Xenopus* embryos. *Genes Dev.* 8, 1324-1334.

Charron,F. and Nemer,M. (1999a). GATA transcription factors and cardiac development. *Sem. Cell Dev. Biol.* 10, 85-91.

Charron,F., Paradis,P., Bronchain,O., Nemer,G., and Nemer,M. (1999). Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4355-4365.

Chen,C.Y. and Schwartz,R.J. (1995). Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J. Biol. Chem.* 270, 15628-15633.

Chen,C.Y., Croissant,J., Majesky,M., Topouzis,S., McQuinn,T., Frankovsky,M.J., and Schwartz,R.J. (1996a). Activation of the cardiac alpha-actin promoter depends upon serum response factor, Tinman homologue, Nkx-2.5, and intact serum response elements. *Dev. Genet.* 19, 119-130.

Chen,C.Y. and Schwartz,R.J. (1996b). Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac α -actin gene transcription. *Mol. Biol. Cell* 16, 6372-6384.

Cheng,T.C., Wallace,M.C., Merlie,J.P., and Olson,E.N. (1993). Separable regulatory elements governing myogenin transcription in mouse embryogenesis. *Science* 261, 215-218.

Chien,K.R., Knowlton,K.U., Zhu,H., and Chien,S. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. [Review]. *FASEB J.* 5, 3037-3046.

Chien, K.R., Zhu, H., Knowlton, K.U., Miller-Hance, W., van-Bilsen, M., O'Brien, T.X., and Evans, S.M. (1993). Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu. Rev. Physiol.* *55*, 77-95.

Chin, E.R., Olson, E.N., Richardson, J.A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J.M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* *12*, 2499-2509.

Clerk, A., Michael, A., and Sugden, P.H. (1998). Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J. Cell Biol.* *142*, 523-535.

Cortes, P., Flores, O., and Reinberg, D. (1992). Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification and analysis of transcription factor IIA and identification of transcription factor IIJ. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 413-421.

Cserjesi, P., Brown, D., Lyons, G.E., and Olson, E.N. (1995). Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev. Biol.* *170*, 664-678.

Dalton, S. and Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* *68*, 597-612.

Dasen, J.S., O'Connell, S.M., Flynn, S.E., Treier, M., Gleiberman, A.S., Szeto, D.P., Hooshmand, F., Aggarwal, A.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Reciprocal interactions of Pit1 and GATA2 mediate signaling gradient-induced determination of pituitary cell types. *Cell* *97*, 587-598.

Davis, R.J. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. [Review]. *J. Biol. Chem.* *268*, 14553-14556.

Dechesne, C.A., Wei, Q., Eldridge, J., Gannoun-Zaki, L., Millasseau, P., Bougueleret, L., Caterina, D., and Paterson, B.M. (1994). E-box- and MEF-2-independent muscle-specific expression, positive autoregulation, and cross-activation of the chicken MyoD (CMD1) promoter reveal an indirect regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 5474-5486.

Di Lisi, R., Millino, C., Calabria, E., Altruda, F., Schiaffino, S., and Ausoni, S. (1998). Combinatorial *cis*-acting elements control tissue-specific activation of the cardiac troponin I gene *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* *273*, 25371-25380.

Dolan, J.W. and Fields, S. (1991). Cell-type-specific transcription in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* *1088*, 155-169.

Dubois, M.F., Nguyen, V.T., Bellier, S., and Bensaude, O. (1994). Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *J. Biol. Chem.* *269*, 13331-13336.

- Duboule,D. and Morata,G. (1994). Colinearity and functional hierarchy among genes of the homeotic complexes. *Trends Genet.* 10, 358-364.
- Durocher,D., Chen,C.Y., Ardati,A., Schwartz,R.J., and Nemer,M. (1996). The ANF promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4648-4655.
- Durocher,D., Charron,F., Warren,R., Schwartz,R.J., and Nemer,M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* 16, 5687-5696.
- Durocher,D., Grépin,C., and Nemer,M. (1998a). Regulation of gene expression in the endocrine heart. In *Recent progress in hormone research*, P.M.Conn, ed. (Bethesda USA: The Endocrine Society Press), pp. 7-23.
- Durocher,D. and Nemer,M. (1998b). Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev. Genet.* 22, 250-262.
- Edmondson,D.G., Lyons,G.E., Martin,J.F., and Olson,E.N. (1994). *Mef2* gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during mouse embryogenesis. *Development* 120, 1251-1263.
- Franzoso,G., Carlson,L., Brown,K., Daucher,M.B., Bressler,P., and Siebenlist,U. (1996). Activation of the serum response factor by p65/NF-kappaB. *EMBO J.* 15, 3403-3412.
- Fu,Y.C. and Izumo,S. (1995). Cardiac myogenesis - overexpression of *xcsx2* or *xmef2a* in whole xenopus embryos induces the precocious expression of *xmhc-alpha* gene. *Roux Arch. Dev. Biol.* 205, 198-202.
- Gajewski,K., Kim,Y., Lee,Y.M., Olson,E.N., and Schulz,R.A. (1997). D-mef2 is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development. *EMBO J.* 16, 515-522.
- Galvagni,F., Cartocci,E., and Oliviero,S. (1998). The dystrophin promoter is negatively regulated by YY1 in undifferentiated muscle cells. *J. Biol. Chem.* 273, 33708-33713.
- Galvagni,F., Lestingi,M., Cartocci,E., and Oliviero,S. (1997). Serum response factor and protein-mediated DNA bending contribute to transcription of the dystrophin muscle-specific promoter. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1731-1743.
- Geissler,E.N., Ryan,M.A., and Housman,D.E. (1988). The dominant-white spotting (W) locus of the mouse encodes the c- kit proto-oncogene. *Cell* 55, 185-192.
- George,K.M., Leonard,M.W., Roth,M.E., Lieuw,K.H., Kioussis,D., Grosveld,F., and Engel,J.D. (1994). Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 120, 2673-2686.
- Giovane,A., Pintzas,A., Maira,S.M., Sobieszczuk,P., and Wasylyk,B. (1994). Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev.* 8, 1502-1513.

- Gitelman,I. (1997). Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* *189*, 205-214.
- Gossett,L.A., Kelvin,D.J., Sternberg,E.A., and Olson,E.N. (1989). A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 5022-5033.
- Gove,C., Walmsley,M., Nijjar,S., Bertwistle,D., Guille,M., Partington,G., Bomford,A., and Patient,R. (1997). Over-expression of GATA-6 in *Xenopus* embryos blocks differentiation of heart precursors. *EMBO J.* *16*, 355-368.
- Grépin,C., Dagnino,L., Robitaille,L., Haberstroh,L., Antakly,T., and Nemer,M. (1994). A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 3115-3129.
- Grépin,C., Robitaille,L., Antakly,T., and Nemer,M. (1995). Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks *in vitro* cardiac muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4095-4102.
- Grépin,C., Nemer,G., and Nemer,M. (1997). Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* *124*, 2387-2395.
- Grueneberg,D.A., Natesan,S., Alexandre,C., and Gilman,M.Z. (1992). Human and *Drosophila* homeodomain proteins that enhance the DNA- binding activity of serum response factor. *Science* *257*, 1089-1095.
- Gualberto,A., Lepage,D., Pons,G., Mader,S.L., Park,K., Atchison,M.L., and Walsh,K. (1992). Functional antagonism between YY1 and the serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4209-4214.
- Gupta,M.P., Gupta,M., and Zak,R. (1994). An E-box/M-CAT hybrid motif and cognate binding protein(s) regulate the basal muscle-specific and camp-inducible expression of the rat cardiac alpha-myosin heavy chain gene. *J. Biol. Chem.* *269*, 29677-29687.
- Halle,J.P. and Meisterernst,M. (1996). Gene expression: increasing evidence for a transcriptosome. *Trends Genet.* *12*, 161-163.
- Han,J., Jiang,Y., Li,Z., Kravchenko,V.V., and Ulevitch,R.J. (1997). Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature* *386*, 296-299.
- Han,T.H. and Prywes,R. (1995). Regulatory role of MEF2D in serum induction of the c-jun promoter. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2907-2915.
- Harris,A.N., Ruiz-Lozano,P., Chen,Y.F., Sionit,P., Yu,Y.T., Lilly,B., Olson,E.N., and Chien,K.R. (1997). A novel A/T-rich element mediates ANF gene expression during cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 515-525.

- Hebrok,M., Wertz,K., and Fuchtbauer,E.M. (1994). M-twist is an inhibitor of muscle differentiation. *Dev. Biol.* 165, 537-544.
- Hefti,M.A., Harder,B.A., Eppenberger,H.M., and Schaub,M.C. (1997). Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 2873-2892.
- Heidenreich,O., Neininger,A., Schrott,G., Zinck,R., Cahill,M.A., Engel,K., Kotlyarov,A., Kraft,R., Kostka,S., Gaestel,M., and Nordheim,A. (1999). MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 274, 14434-14443.
- Heikinheimo,M., Scandrett,J.M., and Wilson,D.B. (1994). Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev. Biol.* 164, 361-373.
- Hengartner,C.J., Thompson,C.M., Zhang,J., Chao,D.M., Liao,S.M., Koleske,A.J., Okamura,S., and Young,R.A. (1995). Association of an activator with an RNA polymerase II holoenzyme. *Genes Dev.* 9, 897-910.
- Hines,W.A., Thorburn,J., and Thorburn,A. (1999). A low-affinity serum response element allows other transcription factors to activate inducible gene expression in cardiac myocytes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1841-1852.
- Hipskind,R.A., Rao,V.N., Mueller,C.G., Reddy,E.S., and Nordheim,A. (1991). Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* 354, 531-534.
- Hobson,G.M., Krahe,R., Garcia,E., Siciliano,M.J., and Funanage,V.L. (1995). Regional chromosomal assignments for four members of the MADS domain transcription enhancer factor 2 (MEF2) gene family to human chromosomes 15q26, 19p12, 5q14, and 1q12-q23. *Genomics* 29, 704-711.
- Iannello,R.C., Mar,J.H., and Ordahl,C.P. (1991). Characterization of a promoter element required for transcription in myocardial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3309-3316.
- Imbalzano,A.N., Kwon,H., Green,M.R., and Kingston,R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA. *Nature* 370, 481-485.
- Imhof,A., Yang,X.J., Ogryzko,V.V., Nakatani,Y., Wolffe,A.P., Ge, and H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* 7, 689-692.
- Ince,T.A. and Scotto,K.W. (1995). A conserved downstream element defines a new class of RNA polymerase II promoters. *J. Biol. Chem.* 270, 30249-30252.
- Ip,H.S., Wilson,D.B., Heikinheimo,M., Tang,Z., Ting,C.N., Simon,M.C., Leiden,J.M., and Parmacek,M.S. (1994). The GATA-4 transcription factor transactivates the cardiac

muscle-specific troponin C promoter-enhancer in nonmuscle cells. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 7517-7526.

Ito,H., Hirata,Y., Hiroe,M., Tsujino,M., Adachi,S., Takamoto,T., Nitta,M., Taniguchi,K., and Marumo,F. (1991). Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* *69*, 209-215.

Iwaki,K., Sukhatme,V.P., Shubeita,H.E., and Chien,K.R. (1990). alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. *J. Biol. Chem.* *265*, 13809-13817.

Janknecht,R., Hipskind,R.A., Houthaeve,T., Nordheim,A., and Stunnenberg,H.G. (1992). Identification of multiple SRF N-terminal phosphorylation sites affecting DNA binding properties. *EMBO J.* *11*, 1045-1054.

Janknecht,R. and Hunter,T. (1996). Versatile molecular glue. *Transcriptional control.* *Curr. Biol.* *6*, 951-954.

Jiang,Y.M. and Evans,T. (1996). The *Xenopus* GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev. Biol.* *174*, 258-270.

Joh,K., Takano,K., Mukai,T., and Hori,K. (1991). Analysis of upstream regulatory regions required for the activities of two promoters of the rat aldolase A gene. *FEBS Lett.* *292*, 128-132.

Johnson,J.E., Wold,B.J., and Haushchka,S.D. (1989). Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 3393-3399.

Joulin,V., Bories,D., Eleouet,J.F., Labastie,M.C., Chretien,S., Mattei,M.G., and Romeo,P.H. (1991). A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. *EMBO J.* *10*, 1809-1816.

Kakita,T., Hasegawa,K., Morimoto,T., Kaburagi,S., Wada,H., and Sasayama,S. (1999). p300 protein as a coactivator of GATA-5 in the transcription of cardiac-restricted atrial natriuretic factor gene. *J. Biol. Chem.* *274*, 34096-34102.

Karns,L.R., Kariya,K., and Simpson,P.C. (1995). M-CAT, CArG, and Sp1 elements are required for alpha 1- adrenergic induction of the skeletal alpha-actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. Transcriptional enhancer factor-1 and protein kinase C as conserved transducers of the fetal program in cardiac growth. *J. Biol. Chem.* *270*, 410-417.

Kato,Y., Kravchenko,V.V., Tapping,R.I., Han,J., Ulevitch,R.J., and Lee,J.D. (1997). BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J.* *16*, 7054-7066.

- Kaushal,S., Schneider,J.W., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. (1994). Activation of the myogenic lineage by mef2a, a factor that induces and cooperates with myod. *Science* 266, 1236-40.
- Kim,H.J., Kim,J.H., and Lee,J.W. (1998). Steroid receptor coactivator-1 interacts with serum response factor and coactivates serum response element-mediated transactivations. *J. Biol. Chem.* 273, 28564-28567.
- Klamut,H.J., Bosnoyan-Collins,L.O., Worton,R.G., and Ray,P.N. (1997). A muscle-specific enhancer within intron 1 of the human dystrophin gene is functionally dependent on single MEF-1/E box and MEF-2/AT-rich sequence motifs. *Nucl. Acids. Res.* 25, 1618-1625.
- Knowlton,K.U., Baracchini,E., Ross,R.S., Harris,A.N., Henderson,S.A., Evans,S.M., Glembotski,C.C., and Chien,K.R. (1991). Co-regulation of the atrial natriuretic factor and cardiac myosin light chain-2 genes during alpha-adrenergic stimulation of neonatal rat ventricular cells. Identification of cis sequences within an embryonic and a constitutive contractile protein gene which mediate inducible expression. *J. Biol. Chem.* 266, 7759-7768.
- Knowlton,K.U., Michel,M.C., Itani,M., Shubeita,H.E., Ishihara,K., Brown,J.H., and Chien,K.R. (1993). The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 268, 15374-15380.
- Koleske,A.J., Buratowski,S., Nonet,M., and Young,R.A. (1992). A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II CTD and TFIID. *Cell* 69, 883-894.
- Koleske,A.J. and Young,R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature* 368, 466-469.
- Koleske,A.J. and Young,R.A. (1995). The RNA polymerase II holoenzyme and its implications for gene regulation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 113-116.
- Kolodziejczyk,S.M., Wang,L., Balazsi,K., DeRepentigny,Y., Kothary,R., and Megeney,L.A. (1999). MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr. Biol.* 9, 1203-1206.
- Komuro,I., Kaida,T., Shibasaki,Y., Kurabayashi,M., Katoh,Y., Hoh,E., Takaku,F., and Yazaki,Y. (1990). Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J. Biol. Chem.* 265, 3595-3598.
- Komuro,I., Katoh,Y., Kaida,T., Shibasaki,Y., Kurabayashi,M., Hoh,E., Takaku,F., and Yazaki,Y. (1991). Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 266, 1265-1268.

- Kuisk,I.R., Li,H., Tran,D., and Capetanaki,Y. (1996). A single MEF2 site governs desmin transcription in both heart and skeletal muscle during mouse embryogenesis. *Dev. Biol.* *174*, 1-13.
- Kuo,C.T. and Leiden,J.M. (1999). Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu. Rev. Immunol.* *17*, 149-187.
- Kuo,C.T., Morrisey,E.E., Anandappa,R., Sigrist,K., Lu,M.M., Parmacek,M.S., Soudais,C., and Leiden,J.M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* *11*, 1048-1060.
- Kuo,M.H. and Grayhack,E. (1994). A library of yeast genomic MCM1 binding sites contains genes involved in cell cycle control, cell wall and membrane structure, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 348-359.
- Kwok,R.P., Lundblad,J.R., Chrivia,J.C., Richards,J.P., Bachinger,H.P., Brennan,R.G., Roberts,S.G., Green,M.R., and Goodman,R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB [see comments]. *Nature* *370*, 223-226.
- Laverriere,A.C., MacNeill,C., Mueller,C., Poelmann,R.E., Burch,J.B., and Evans,T. (1994). GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* *269*, 23177-23184.
- Lawson,M.A., Whyte,D.B., and Mellon,P.L. (1996). GATA factors are essential for activity of the neuron-specific enhancer of the gonadotropin-releasing hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3596-3605.
- Lee,T.C., Shi,Y., and Schwartz,R.J. (1992). Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal alpha-actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 9814-9818.
- Lee,Y., Nadal-Ginard,B., Mahdavi,V., and Izumo,S. (1997). Myocyte-specific enhancer factor 2 and thyroid hormone receptor associate and synergistically activate the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2745-2755.
- Lee,Y., Shioi,T., Kasahara,H., Jobe,S.M., Wiese,R.J., Markham,B.E., and Izumo,S. (1998). The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates atrial natriuretic factor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3120-3129.
- Leifer,D., Golden,J., and Kowall,N.W. (1994). Myocyte-specific enhancer binding factor 2C expression in human brain development. *Neuroscience* *63*, 1067-1079.
- Leifer,D., Krainc,D., Yu,Y.T., McDermott,J., Breitbart,R.E., Heng,J., Neve,R.L., Kosofsky,B., Nadal-Ginard,B., and Lipton,S.A. (1993). MEF2C, a MADS/MEF2-family transcription factor expressed in a laminar distribution in cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *90*, 1546-1550.

- Li,L., Cserjesi,P., and Olson,E.N. (1995). Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev. Biol.* 172, 280-292.
- Lilly,B., Zhao,B., Ranganayakulu,G., Paterson,B.M., Schulz,R.A., and Olson,E.N. (1995). Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267, 688-693.
- Lin,Q., Lu,J., Yanagisawa,H., Webb,R., Lyons,G.E., Richardson,J.A., and Olson,E.N. (1998). Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development* 125, 4565-4574.
- Lin,Q., Schwarz,J., Bucana,C., and Olson,E.N. (1997). Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *mef2c*. *Science* 276, 1404-1407:2.
- Lints,T.J., Parsons,L.M., Hartley,L., Lyons,I., and Harvey,R.P. (1993). *Nkx-2.5*: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419-431.
- Lopez,M., Oettgen,P., Akbarali,Y., Dendorfer,U., and Libermann,T.A. (1994). ERP, a new member of the ets transcription factor/oncoprotein family: cloning, characterization, and differential expression during B-lymphocyte development. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3292-3309.
- Lu,H., Zawel,L., Fisher,L., Egly,J.M., and Reinberg,D. (1992). Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C- terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* 358, 641-645.
- Lu,J.R., McKinsey,T.A., Xu,H.T., Wang,D.Z., Richardson,J.A., and Olson,E.N. (1999). FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4495-4502.
- Lyons,I., Parsons,L.M., Hartley,L., Li,R., Andrews,J.E., Robb,L., and Harvey,R.P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev.* 9, 1654-1666.
- Ma,H. (1994). The unfolding drama of flower development: recent results from genetic and molecular analyses. *Genes Dev.* 8, 745-756.
- Mao,Z., Bonni,A., Xia,F., Nadal-Vicens,M., and Greenberg,M.E. (1999). Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science* 286, 785-790.
- Mao,Z. and Nadal-Ginard,B. (1996). Functional and physical interactions between mammalian achaete-scute homolog 1 and myocyte enhancer factor 2A. *J. Biol. Chem.* 271, 14371-14375.

- Mao,Z. and Nadal-Ginard,B. (1996b). Functional and physical interactions between mammalian achaete-scute homolog 1 and myocyte enhancer factor 2A. *J. Biol. Chem.* *271*, 14371-14375.
- Marshall,C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Genetics Dev.* *4*, 82-89.
- Martin,D.I., Zon,L.I., Mutter,G., and Orkin,S.H. (1990). Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* *344*, 444-447.
- McCracken,S., Fong,N., Yankulov,K., Ballantyne,S., Pan,G., Greenblatt,J., Patterson,S.D., Wickens,M., and Bentley,D.L. (1997). The c-terminal domain of rna polymerase ii couples mrna processing to transcription. *Nature* *385*, 357-61: 3.
- McDermott,J.C., Cardoso,M.C., Yu,Y.T., Andres,V., Leifer,D., Krainc,D., Lipton,S.A., and Nadal-Ginard,B. (1993). hMEF2C gene encodes skeletal muscle- and brain-specific transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 2564-2577.
- McDonough,P.M., Brown,J.H., and Glembotski,C.C. (1993). Phenylephrine and endothelin differentially stimulate cardiac PI hydrolysis and ANF expression. *Am. J. Physiol.* *264*, H625-H630.
- McGrew,M.J., Bogdanova,N., Hasegawa,K., Hughes,S.H., Kitsis,R.N., and Rosenthal,N. (1996). Distinct gene expression patterns in skeletal and cardiac muscle are dependent on common regulatory sequences in the MLC1/3 locus. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4524-4538.
- Merika,M. and Orkin,S.H. (1995). Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor gata-1 with the kruppel family proteins sp1 and eklf. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2437-47: 5.
- Miranti,C.K., Ginty,D.D., Huang,G., Chatila,T., and Greenberg,M.E. (1995). Calcium activates serum response factor-dependent transcription by a Ras- and Elk-1-independent mechanism that involves a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3672-3684.
- Miska,E.A., Karlsson,C., Langley,E., Nielsen,S.J., Pines,J., and Kouzarides,T. (1999). HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *EMBO J.* *18*, 5099-5107.
- Miwa,T. and Kedes,L. (1987). Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human alpha-cardiac actin genes. *Mol. Cell. Biol.* *7*, 2803-2813.
- Molkentin,J.D. and Markham,B.E. (1993). Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* *268*, 19512-19520.

- Molkentin, J.D., Kalvakolanu, D.V., and Markham, B.E. (1994). Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the α -myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 4947-4957.
- Molkentin, J.D. and Markham, B.E. (1994). An M-CAT binding factor and an RSRF-related A-rich binding factor positively regulate expression of the alpha-cardiac myosin heavy-chain gene in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 5056-5065.
- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1995). Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* *83*, 1125-1136.
- Molkentin, J.D., Black, B.L., Martin, J.F., and Olson, E.N. (1996a). Mutational analysis of the DNA binding, dimerization, and transcriptional activation domains of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 2627-2636.
- Molkentin, J.D., Li, L., and Olson, E.N. (1996b). Phosphorylation of the MADS-box transcription factor MEF2C enhances its DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 17199-17204.
- Molkentin, J.D., Firulli, A.B., Black, B.L., Martin, J.F., Hustad, C.M., Copeland, N., Jenkins, N., Lyons, G., and Olson, E.N. (1996c). MEF2B is a potent transactivator expressed in early myogenic lineages. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 3814-3824.
- Molkentin, J.D. and Olson, E.N. (1996d). Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 9366-9373.
- Molkentin, J.D., Lin, Q., Duncan, S.A., and Olson, E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* *11*, 1061-1072.
- Molkentin, J.D. and Olson, E.N. (1997). GATA4: a novel transcriptional regulator of cardiac hypertrophy? *Circulation* *96*, 3833-3835.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., and Olson, E.N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* *93*, 215-228.
- Monzen, K., Shiojima, I., Hiroi, Y., Kudoh, S., Oka, T., Takimoto, E., Hayashi, D., Hosoda, T., Habara-Ohkubo, A., Nakaoka, T., Fujita, T., Yazaki, Y., and Komuro, I. (1999). Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7096-7105.
- Morimoto, T., Hasegawa, K., Kaburagi, S., Kakita, T., Wada, H., Yanazume, T., and Sasayama, S. (2000). Phosphorylation of GATA-4 is involved in alpha 1-adrenergic agonist-responsive transcription of the endothelin-1 gene in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *275*, 13721-13726.

Morin, S., Paradis, P., Aries, A., Wilkes, B. C., and Nemer, M. SRF/GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein coupled receptor. Submitted . 2000.

Ref Type: Journal (Full)

Morrissey,E.E., Ip,H.S., Lu,M.M., and Parmacek,M.S. (1996). GATA-6 - a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev. Biol.* 177, 309-322.

Morrissey,E.E., Ip,H.S., Tang,Z.H., Lu,M.M., and Parmacek,M.S. (1997). GATA-5 - a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev. Biol.* 183, 21-36.

Morrissey,E.E., Tang,Z., Sigrist,K., Lu,M.M., Jiang,F., Ip,H.S., and Parmacek,M.S. (1998). GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 12, 3579-3590.

Moss,J.B., McQuinn,T.C., and Schwartz,R.J. (1994). The avian cardiac alpha-actin promoter is regulated through a pair of complex elements composed of E boxes and serum response elements that bind both positive- and negative-acting factors. *J. Biol. Chem.* 269, 12731-12740.

Murphy,A.M., Thompson,W.R., Peng,L.F., and Jones,L.2. (1997). Regulation of the rat cardiac troponin I gene by the transcription factor GATA-4. *Biochem. J.* 322, 393-401.

Musaro,A., McCullagh,K.J., Naya,F.J., Olson,E.N., and Rosenthal,N. (1999). IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* 400, 581-585.

Muscat,G.E., Perry,S., Prentice,H., and Kedes,L. (1992). The human skeletal alpha-actin gene is regulated by a muscle- specific enhancer that binds three nuclear factors. *Gene Expr.* 2, 111-126.

Nagarkatti,D.S. and Sha'afi,R.I. (1998). Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1651-1664.

Naidu,P.S., Ludolph,D.C., To,R.Q., Hinterberger,T.J., and Konieczny,S.F. (1995). Myogenin and MEF2 function synergistically to activate the MRF4 promoter during myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2707-2718.

Nakayama,M., Stauffer,J., Cheng,J., Banerjee-Basu,S., Wawrousek,E., and Buonanno,A. (1996). Common core sequences are found in skeletal muscle slow- and fast-fiber-type-specific regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2408-2417.

Nardelli,J., Thiesson,D., Fujiwara,Y., Tsai,F.Y., and Orkin,S.H. (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev. Biol.* 210, 305-321.

Narita,N., Heikinheimo,M., Bielinska,M., White,R.A., Wilson, and DB (1996). The gene for transcription factor GATA-6 resides on mouse chromosome 18 and is expressed in myocardium and vascular smooth muscle. *Genomics* 36, 345-348.

Natesan,S. and Gilman,M. (1995). YY1 facilitates the association of serum response factor with the c-fos serum response element. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5975-5982.

Navankasattusas,S., Sawadogo,M., van Bilsen,M., Dang,C.V., and Chien,K.R. (1994). The basic helix-loop-helix protein upstream stimulating factor regulates the cardiac ventricular myosin light-chain 2 gene via independent cis regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7331-7339.

Nemer,G., Qureshi,S.A., Malo,D., and Nemer,M. (1999). Functional analysis and chromosomal mapping of *GATA5*, a gene encoding a zinc finger DNA-binding protein. *Mam. Genome* 10, 993-999.

Norman,C., Runswick,M., Pollock,R., and Treisman,R. (1988). Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell* 55, 989-1003.

Nurrish,S.J. and Treisman,R. (1995). DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4076-4085.

Ogryzko,V.V., Schiltz,R.L., Russanova,V., Howard,B.H., and Nakatani,Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.

Ohkuma,Y. and Roeder,R.G. (1994). Regulation of TFIIF ATPase and kinase activities by TFIIE during active initiation complex formation. *Nature* 368, 160-163.

Olson,E.N. and Klein,W.H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. *Genes Dev.* 8, 1-8.

Olson,E.N., Perry,M., and Schulz,R.A. (1995). Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. *Dev. Biol.* 172, 2-14.

Orkin,S.H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J. Biol. Chem.* 270, 4955-4958.

Osada,H., Grutz,G., Axelson,H., Forster,A., and Rabbitts,T.H. (1995). Association of erythroid transcription factors: complexes involving the lim protein rbtn2 and the zinc-finger protein gata1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9585-9: 2.

Pandolfi,P.P., Roth,M.E., Karis,A., Leonard,M.W., Dzierzak,E., Grosveld,F.G., Engel,J.D., and Lindenbaum,M.H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* 11, 40-44.

- Parmacek, M.S., Ip, H.S., Jung, F., Shen, T., Martin, J.F., Vora, A.J., Olson, E.N., and Leiden, J.M. (1994). A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 1870-1885.
- Pellegrini, L., Tan, S., and Richmond, T.J. (1995). Structure of serum response factor core bound to DNA. *Nature* *376*, 490-498.
- Pevny, L., Simon, M.C., Robertson, E., Klein, W.H., Tsai, S.F., D'Agati, V., Orkin, S.H., and Costantini, F. (1991). Erythroid differentiation in chimaeric mice blocked by a targeted mutation in the gene for transcription factor GATA-1. *Nature* *349*, 257-260.
- Pin, C.L., Ludolph, D.C., Cooper, S.T., Klocke, B.J., Merlie, J.P., and Konieczny, S.F. (1997). Distal regulatory elements control MRF4 gene expression in early and late myogenic cell populations. *Dev. Dynamics* *208*, 299-312.
- Pinney, D.F., de la Brousse, F.C., Faerman, A., Shani, M., Maruyama, K., and Emerson, C.P.J. (1995). Quail myoD is regulated by a complex array of cis-acting control sequences. *Dev. Biol.* *170*, 21-38.
- Pollock, R. and Treisman, R. (1991). Human SRF-related proteins: DNA-binding properties and potential regulatory targets. *Genes Dev.* *5*, 2327-2341.
- Price, M.A., Rogers, A.E., and Treisman, R. (1995). Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *EMBO J.* *14*, 2589-2601.
- Prywes, R. and Roeder, R.G. (1986). Inducible binding of a factor to the c-fos enhancer. *Cell* *47*, 777-784.
- Qureshi, S.T., Bronchain, O., Nemer, M., and Malo, D. (1996). Mapping of the *Gata6* gene to mouse chromosome 18. *Mam. Genome* *7*, 705-706.
- Rai, R., Daugherty, J.R., Cunningham, T.S., and Cooper, T.G. (1999). Overlapping positive and negative GATA factor binding sites mediate inducible DAL7 gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 28026-28034.
- Ranganayakulu, G., Zhao, B., Dokidis, A., Molkentin, J.D., Olson, E.N., and Schulz, R.A. (1995). A series of mutations in the D-MEF2 transcription factor reveal multiple functions in larval and adult myogenesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *171*, 169-181.
- Rao, S., Karray, S., Gackstetter, E.R., and Koshland, M.E. (1998). Myocyte enhancer factor-related B-MEF2 is developmentally expressed in B cells and regulates the immunoglobulin J chain promoter. *J. Biol. Chem.* *273*, 26123-26129.
- Reeder, R.H. and Lang, W.H. (1997). Terminating transcription in eukaryotes: lessons learned from RNA polymerase I. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 473-477.

Reichardt,H.M., Kaestner,K.H., Tuckermann,J., Kretz,O., Wessely,O., Bock,R., Gass,P., Schmid,W., Herrlich,P., Angel,P., and Schutz,G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell* 93, 531-541.

Reifers,F., Walsh,E.C., Leger,S., Stainier,D.Y., and Brand,M. (2000). Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (fgf8/acerebellar). *Development* 127, 225-235.

Riley,P., Anson-Cartwright,L., and Cross,J.C. (1998). The Hand1 bHLH transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis. *Nature Genetics* 18, 271-275.

Rohwedel,J., Horak,V., Hebrok,M., Fuchtbauer,E.M., and Wobus,A.M. (1995). M-twist expression inhibits mouse embryonic stem cell-derived myogenic differentiation in vitro. *Exp. Cell Res.* 220, 92-100.

Rosenzweig,A. and Seidman,C.E. (1991). Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 229-255.

Sadoshima,J. and Izumo,S. (1993). Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J.* 12, 1681-1692.

Salminen,M., Spitz,F., Fiszman,M.Y., Demignon,J., Kahn,A., Daegelen,D., and Maire,P. (1995). Myotube-specific activity of the human aldolase A M-promoter requires an overlapping binding site for NF1 and MEF2 factors in addition to a binding site (M1) for unknown proteins. *J. Mol. Biol.* 253, 17-31.

Santelli,E. and Richmond,T.J. (2000). Crystal structure of MEF2A core bound to DNA at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 297, 437-449.

Sartorelli,V., Huang,J., Hamamori,Y., and Kedes,L. (1997). Molecular mechanisms of myogenic coactivation by p300: direct interaction with the activation domain of MyoD and with the MADS box of MEF2C. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1010-1026.

Semsarian,C., Wu,M.J., Ju,Y.K., Marciniak,T., Yeoh,T., Allen, DG, Harvey,R.P., and Graham,R.M. (1999). Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca²⁺-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature* 400, 576-581.

Sepulveda,J.L., Belaguli,N., Nigam,V., Chen,C.Y., Nemer,M., and Schwartz,R.J. (1998). GATA-4 and Nkx-2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: role for regulating early cardiac gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3405-3415.

Shield,M.A., Haugen,H.S., Clegg,C.H., and Hauschka,S.D. (1996). E-box sites and a proximal regulatory region of the muscle creatine kinase gene differentially regulate expression in diverse skeletal muscles and cardiac muscle of transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5058-5068.

Shikama,N., Lyon,J., and Lathangue,N.B. (1997). The P300/CBP family - integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in Cell Biology* 7, 230-236.

Shilatifard,A. (1998). Factors regulating the transcriptional elongation activity of RNA polymerase II. *FASEB J.* 12, 1437-1446.

Shore,P. and Sharrocks,A.D. (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229, 1-13.

Shubeita,H.E., McDonough,P.M., Harris,A.N., Knowlton,K.U., Glembotski,C.C., Brown,J.H., and Chien,K.R. (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* 265, 20555-20562.

Simon,M.C. (1995). Gotta have GATA. *Nature Genetics* 11, 9-11.

Simpson,P.C. (1989). Proto-oncogenes and cardiac hypertrophy. [Review]. *Annu. Rev. Physiol.* 51, 189-202.

Skopicki,H.A., Lyons,G.E., Schatteman,G., Smith,R.C., Andres,V., Schirm,S., Isner,J., and Walsh,K. (1997). Embryonic expression of the GAX homeodomain protein in cardiac, smooth, and skeletal muscle. *Circ. Res.* 80, 452-462.

Soulez,M., Tuil,D., Kahn,A., and Gilgenkrantz,H. (1996). The serum response factor (SRF) is needed for muscle-specific activation of CArG boxes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 418-422.

Sparrow,D.B., Miska,E.A., Langley,E., Reynaud-Deonauth,S., Kotecha,S., Towers,N., Spohr,G., Kouzarides,T., and Mohun,T.J. (1999). MEF-2 function is modified by a novel co-repressor, MITR. *EMBO J.* 18, 5085-5098.

Spicer,D.B., Rhee,J., Cheung,W.L., and Lassar,A.B. (1996). Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272, 1476-1480.

Sprenkle,A.B., Murray,S.F., and Glembotski,C.C. (1995). Involvement of multiple cis elements in basal- and alpha- adrenergic agonist-inducible atrial natriuretic factor transcription - roles for serum response elements and an sp-1- like element. *Circ. Res.* 77, 1060-1069.

Srivastava,D., Cserjesi,P., and Olson,E.N. (1995). A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science* 270, 1995-1999.

Srivastava,D., Thomas,T., Lin,Q., Kirby,M.L., Brown,D., and Olson,E.N. (1997). Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bhlh transcription factor, dhand. *Nature Genetics* 16, 154-160.

- Steinmetz,E.J. (1997). Pre-mrna processing and the ctd of rna polymerase ii - the tail that wags the dog. *Cell* 89, 491-494: 6.
- Subramanian,S.V. and Nadal-Ginard,B. (1996). Early expression of the different isoforms of the myocyte enhancer factor-2 (MEF2) protein in myogenic as well as non-myogenic cell lineages during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 57, 103-112.
- Suzuki,E., Evans,T., Lowry,J., Truong,L., Bell,D.W., Testa,J.R., and Walsh,K. (1996). The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen- responsive signals. *Genomics* 38, 283-290.
- Suzuki,E., Guo,K., Kolman,M., Yu,Y.T., and Walsh,K. (1995). Serum induction of MEF2/RSRF expression in vascular myocytes is mediated at the level of translation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3415-3426.
- Svensson,E.C., Huggins,G.S., Lin,H., Clendenin,C., Jiang,F., Tufts,R., Dardik,F.B., and Leiden,J.M. (2000). A syndrome of tricuspid atresia in mice with a targeted mutation of the gene encoding Fog-2. *Nature Genetics* 25, 353-356.
- Svensson,E.C., Tufts,R.L., Polk,C.E., and Leiden,J.M. (1999). Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 956-961.
- Svetlov,V.V. and Cooper,T.G. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* GATA factors Dal80p and Deh1p can form homo- and heterodimeric complexes. *J. Bacteriol.* 180, 5682-5688.
- Swanson,B.J., Jack,H.M., and Lyons,G.E. (1998). Characterization of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) expression in B and T cells: MEF2C is a B cell-restricted transcription factor in lymphocytes. *Mol. Immunol.* 35, 445-458.
- Tan,S., Hunziker,Y., Pellegrini,L., and Richmond,T.J. (2000). Crystallization of the yeast MATalpha2/MCM1/DNA ternary complex: general methods and principles for protein/DNA cocrystallization. *J. Mol. Biol.* 297, 947-959.
- Tevosian,S.G., Deconinck,A.E., Cantor,A.B., Rieff,H.I., Fujiwara,Y., Corfas,G., and Orkin,S.H. (1999). FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 950-955.
- Tevosian,S.G., Deconinck,A.E., Tanaka,M., Schinke,M., Litovsky, SH, Izumo,S., Fujiwara,Y., and Orkin,S.H. (2000). FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 101, 729-739.
- Thompson,W.R., Nadal-Ginard,B., and Mahdavi,V. (1991). A MyoD1-independent muscle-specific enhancer controls the expression of the β -myosin heavy chain gene in skeletal and cardiac muscle cells. *J. Biol. Chem.* 266, 22678-22688.

- Thuerlauf,D.J., Arnold,N.D., Zechner,D., Hanford,D.S., DeMartin,K.M., McDonough,P.M., Prywes,R., and Glembotski,C.C. (1998). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates the transcriptional induction of the atrial natriuretic factor gene through a serum response element. A potential role for the transcription factor ATF6. *J. Biol. Chem.* 273, 20636-20643.
- Thuerlauf,D.J., Hanford,D.S., and Glembotski,C.C. (1994). Regulation of rat brain natriuretic peptide transcription. A potential role for GATA-related transcription factors in myocardial cell gene expression. *J. Biol. Chem.* 269, 17772-17775.
- Treisman,R. (1990). The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin. Cancer Biol.* 1, 47-58.
- Treisman,R. (1992). The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* 17, 423-426.
- Treisman,R. (1994). Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Genetics Dev.* 4, 96-101.
- Treisman,R. (1995). Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J.* 14, 4905-4913.
- Tsai,F.Y., Keller,G., Kuo,F.C., Weiss,M., Chen,J., Rosenblatt,M., Alt,F.W., and Orkin,S.H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.
- Tsang,A.P., Visvader,J.E., Turner,C.A., Fujiwara,Y., Yu,C., Weiss,M.J., Crossley,M., and Orkin,S.H. (1997). FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 20, 109-119.
- Viger,R.S., Mertineit,C., Trasler,J.M., and Nemer,M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development* 125, 2665-2675.
- von Harsdorf, R., Shen, Y. T., Dietz, R., Nadal-Ginard, B., and Vatner, S. Identification of a cis-acting regulatory element which confers inducibility of the ANF-gene in developing cardiac hypertrophy. *Circulation (Dallas TX)* 90[4], I-197. 1994. Ref Type: Abstract
- Walters,M. and Martin,D.I. (1992). Functional erythroid promoters created by interaction of the transcription factor GATA-1 with CACCC and AP-1/NFE-2 elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10444-10448.
- Wang,G., Yeh,H.I., and Lin,J.J. (1994). Characterization of cis-regulating elements and trans-activating factors of the rat cardiac troponin T gene. *J. Biol. Chem.* 269, 30595-30603.

- Wang, Y., Huang, S., Sah, V.P., Ross, J.J., Brown, J.H., Han, J., and Chien, K.R. (1998). Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* *273*, 2161-2168.
- Weigel, D. and Meyerowitz, E.M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell* *78*, 203-209.
- Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* *75*, 1241-1244.
- Weis, L. and Reinberg, D. (1992). Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J.* *6*, 3300-3309.
- West, A.G., Shore, P., and Sharrocks, A.D. (1997). DNA binding by MADS-box transcription factors: a molecular mechanism for differential DNA bending. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 2876-2887.
- Westphal, R.S., Anderson, K.A., Means, A.R., and Wadzinski, B.E. (1998). A signaling complex of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase IV and protein phosphatase 2A. *Science* *280*, 1258-1261.
- Wilson-Rawls, J., Molkentin, J.D., Black, B.L., and Olson, E.N. (1999). Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 2853-2862.
- Wilson, D.B., Dorfman, D.M., and Orkin, S.H. (1990). A non-erythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 4854-4862.
- Wong, M.W., Pisegna, M., Lu, M.F., Leibham, D., and Perry, M. (1994). Activation of Xenopus MyoD transcription by members of the MEF2 protein family. *Dev. Biol.* *166*, 683-695.
- Yamashita, S., Wada, K., Horikoshi, M., Gong, D.W., Kokubo, T., Hisatake, K., Yokotani, N., Malik, S., Roeder, R.G., and Nakatani, Y. (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding drosophila transcription factor tffiib. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *89*, 2839-43: 8.
- Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., Mizuno, T., Takano, H., Hiroi, Y., Ueki, K., Tobe, K., and et al (1995). Mechanical stress activates protein kinase cascade of phosphorylation in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Clin. Invest.* *96*, 438-446.
- Yamazaki, T., Tobe, K., Hoh, E., Maemura, K., Kaida, T., Komuro, I., Tamemoto, H., Kadowaki, T., Nagai, R., and Yazaki, Y. (1993). Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* *268*, 12069-12076.

- Yean,D. and Gralla,J.D. (1999). Transcription reinitiation rate: a potential role for TATA box stabilization of the TFIID:TFIIA:DNA complex. *Nucl. Acids. Res.* 27, 831-838.
- Yu,Y.T., Breitbart,R.E., Smoot,L.B., Lee,Y., Mahdavi,V., and Nadal-Ginard,B. (1992). Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* 6, 1783-1798.
- Yun,K. and Wold,B. (1996). Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. [Review] [68 refs]. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 877-889.
- Zawel,L. and Reinberg,D. (1993). Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* 44, 67-108.
- Zechner,D., Thuerauf,D.J., Hanford,D.S., McDonough,P.M., and Glembotski,C.C. (1997). A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J. Cell Biol.* 139, 115-127.
- Zetser,A., Gredinger,E., and Bengal,E. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J. Biol. Chem.* 274, 5193-5200.
- Zhao,M., New,L., Kravchenko,V.V., Kato,Y., Gram,H., di Padova,F., Olson,E.N., Ulevitch,R.J., and Han,J. (1999). Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Mol. Cell. Biol.* 19, 21-30.
- Zheng,W. and Flavell,R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89, 587-596.
- Zhu,C., Johansen,F.E., and Prywes,R. (1997). Interaction of ATF6 and serum response factor. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4957-4966.
- Zhu,H., Garcia,A.V., Ross,R.S., Evans,S.M., and Chien,K.R. (1991). A conserved 28-base-pair element (HF-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2273-2281.