

Université de Montréal

**SIGNALISATION NUCLEAIRE PAR LES RECEPTEURS α 1-
ADRENERGIQUES VIA DES INTERACTIONS COMBINATOIRES**

Par
Lalwa Rahbani

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

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

Décembre, 2004

© Lalwa Rahbani



W

4

U58

2005

V.049

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Signalisation nucléaire par les récepteurs α 1-adrénergiques
Via des interactions combinatoires**

11616085

Présenté par :
Lalwa Rahbani

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Audrey Claing, président-rapporteur

Dr Mona Nemer, directeur de recherche

Dr Jean-Philippe Gratton, membre du jury

SOMMAIRE

Les catécholamines sont des régulateurs importants de la fonction cardiaque, incluant la régulation de la contractilité ainsi que la croissance des cardiomyocytes. Ces effets sont médiés par deux classes de récepteurs adrénergiques, soit les récepteurs de type α_1 et β . Les récepteurs α_1 -adrénergiques médient l'effet direct sur la croissance ou l'hypertrophie des cardiomyocytes. En plus d'affecter la taille des cellules, les agents α_1 -agonistes causent une reprogrammation génétique qui inclut l'activation transcriptionnelle du gène de l'ANF. Bien que plusieurs voies de signalisation intracellulaire soient activées en réponse au traitement des cardiomyocytes par des agonistes α_1 -adrénergiques, celles qui lient l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques à la régulation transcriptionnelle demeurent incertaines. Des travaux antérieurs au laboratoire ont identifié une séquence régulatrice sur le gène de l'ANF qui est essentielle à la réponse aux agonistes α_1 -adrénergiques. Par clonage moléculaire, nous avons récemment isolé le facteur de transcription, PEX1, qui interagit avec cette séquence. PEX1 est une protéine à multiples doigts de zinc dont l'expression semble être stimulée rapidement suite à l'activation des récepteurs α_1 -adrénergiques. Notre étude montre que PEX1 lie la séquence régulatrice de l'ANF, en collaboration avec GATA-4 et SRF, deux régulateurs cardiaques majeurs, et en active la transcription. L'étude suggère fortement un rôle pour PEX1 dans la signalisation nucléaire des récepteurs α_1 -adrénergiques, via des interactions combinatoires, et leur implication dans l'hypertrophie cardiaque.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE.....	III
TABLE DES MATIERES	IV
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	VI
REMERCIEMENTS.....	IX
CHAPITRE I. INTRODUCTION.....	1
1.1. LES VOIES DE SIGNALISATION DES RCPGs.....	2
1.1.1. Évènements membranaires.....	2
1.1.2. Évènements cytoplasmiques	3
1.1.2.1. Signalisation induite par G _s	4
1.1.2.2. Signalisation induite par G _i	5
1.1.2.3. Signalisation induite par G _q	5
1.1.2.4. Signalisation induite par G _{12/13}	6
1.1.3. Évènements nucléaires	7
1.2. REGULATION ADRENERGIQUE DANS LE COEUR.....	9
1.2.1. La contractilité par β-Ars.....	9
1.2.2. Régulation de la croissance par les α1-ARs.....	10
1.3. LES RECEPTEURS α1-ADRENERGIQUES (α1-ARs).....	11
1.3.1. Structures et expressions des différents sous-types.....	11
1.3.2. Les différentes voies de signalisation induites par les α1-ARs	12
1.3.2.1. Évènements cytoplasmiques.....	12
1.3.2.2. Évènements nucléaires.....	14
1.3.3. Rôles fonctionnels des voies α1-adrénergiques dans divers systèmes	15
1.3.3.1. Les rôles fonctionnels des α1-ARs dans le système nerveux central	15
1.3.3.2. Les rôles fonctionnels des α1-ARs dans le système hépatique	16
1.3.3.4. Les rôles fonctionnels des α1-ARs dans le système vasculaire.....	16
1.3.3.5. Les rôles fonctionnels des α1-ARs dans le système cardiaque	18
1.4. SIGNALISATION CELLULAIRE DURANT L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE	
.....	20
1.4.1. Rôle de la PI3K dans la régulation de la croissance cardiaque	20
1.4.2. Rôle des protéines G monomériques ou ' petites G '.....	22
1.4.2.1. Implication de Rho dans l'hypertrophie cardiaque.....	23
1.4.2.2. Implication de Ras dans l'hypertrophie cardiaque.....	23
1.4.3. Rôle des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs).....	24
1.4.3.1. Ras-Raf-MEK-ERK (Extracellular signal Regulated Kinase).....	25
1.4.3.2. C-Jun-NH2 terminal kinases (JNKs)	26

1.4.3.3. p38 mitogen activated protein kinases (p38Ks).....	27
1.4.4. Le calcium, un second messenger critique.....	28
1.4.4.1. Rôle de CaMK dans la transcription génique et l'hypertrophie.....	28
1.4.4.2. Rôle de la calcineurine dans l'hypertrophie.....	29
1.5. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION CARDIAQUE DURANT	
L'HYPERTROPHIE	30
1.5.1. Induction des gènes précoces immédiats.....	30
1.5.2. L'ANF un modèle puissant pour analyser la transcription cardiaque	31
1.5.2.1. Les éléments GATA	32
1.5.2.2. La boîte CArG (ou SRE).....	33
1.5.2.3. L'élément A/T riche distal.....	34
1.5.2.4. L'élément PERE.....	35
1.5.3. Implication des facteurs de transcription dans la réponse	
hypertrophique.....	35
1.5.3.1. Les facteurs de transcription GATA	36
1.5.3.2. Les facteurs de transcription MEF2.....	37
1.5.3.3. Le facteur de transcription NFAT	38
1.5.3.4. Le facteur de transcription SRF.....	39
01.6. DESCRIPTION DU PROJET.....	40
CHAPITRE II. ARTICLE	42
AN α 1-ADREBERGIC INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN IS A GATA-4/SRF	
COFACTOR.....	42
Résumé	43
Abstract	45
Introduction.....	47
Results.....	50
Discussion	53
Material and Methods	56
Reference List	58
CHAPITRE III. DISCUSSION.....	63
3.1. Transcription durant l'hypertrophie cardiaque	64
3.1.1. Rôle de PEX1 dans l'activation transcriptionnelle de l'ANF	64
3.1.2. Implication des interactions combinatoires entre GATA-4, SRF et PEX1	
dans l'hypertrophie	66
3.1.3. Rôle de PEX1 dans la régulation de divers gènes α 1-inductibles.....	68
3.2. Signalisation nucléaire par les récepteurs α 1adrénergiques : un mécanisme	
général	70
3.2.1. Au niveau du muscle lisse	70
3.2.2. Au niveau neuronal.....	72
3.2.3. Au niveau hépatique	73
3.3. Perspectives futures.....	74
References.....	77

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

α CA : "α-Cardiac actin"

AA : Acide arachidonique

AC : Adenylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANF : "Atrial natriuretic factor"

ANGII : Angiotensine II

ARN : Acide ribonucléique

BNP : "B-type natriuretic peptide"

CBP : "CREB-binding protein"

CREB : "cAMP-response element binding protein"

E: Jour embryonnaire

ERK: Extracellular signal regulated kinase

ET-1: Endothéline-1

JNK : C-Jun-NH2 terminal kinase

Luc : Luciférase

MADS : "MCM1-agamous-ARG80-deficiens-serum response factor"

MAPK : "Mitogen-activated protein kinase"

MEF2 : "Myocyte-enhancer factor 2"

MBP : "Maltose binding protein"

MLC : "Myosin light chain"

MHC : "Myosin heavy chain"

NFA-T: "Nuclear factor erythroid 2"

NKE : "NK2-response element"

Pb : paire de base

PKC : "Protein kinase C"

PE : Phényléphrine

PERE : "Pe-response-element"

PEX1 : "PE-induced complex"

PKC : Protéine kinase C

PLC : Phospholipase C

RCPG : Récepteurs couples aux protéines G

skA : "Skeletal actin"

SNC : Système nerveux central

SRE : "Serum response element"

SRF : "Serum response factor"

A ma famille ...

REMERCIEMENTS

Un grand merci à mon superviseur Dr Mona NEMER, pour ces précieux conseils, son support constant et la formation scientifique et professionnelle qu'elle a su si patiemment me donner.

Je tiens également à remercier mes collègues de travail, notamment Anne Ariès et Romain Georges qui ont suivi pas à pas la naissance de ce travail, me prodiguant leurs conseils toujours judicieux.

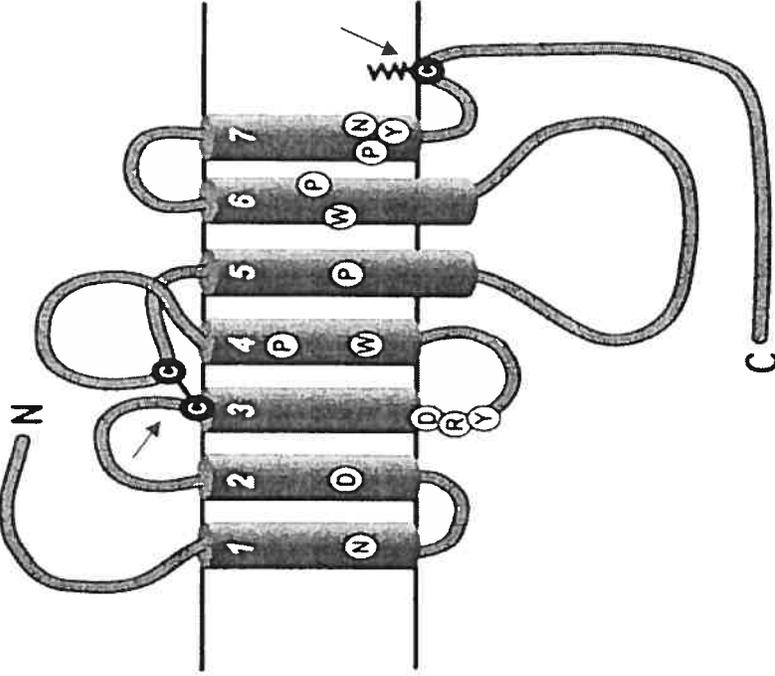
Merci également à Pierre Paradis qui m'a toujours encadrée durant ces deux dernières années, à Chantal Lefebvre qui était toujours là au bon moment et dont la présence fut appréciée et à Lise Laroche pour son aide précieuse dans le domaine du secrétariat.

Ma gratitude va également à ma famille, qui n'a jamais cessé de croire en moi et qui a su me donner le support moral et la motivation personnelle pour la réalisation de ce projet.

CHAPITRE I. INTRODUCTION

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires ; leur capacité à recruter et réguler les protéines G (d'où le nom) suite à un signal, permet de tracer les multiples voies de signalisation intracellulaires aboutissant à une grande variété de réponses telles que la régulation de canaux ioniques, la sécrétion hormonale, ainsi que la modulation de l'activité enzymatique et de l'expression génique. Chargés de reconnaître et transmettre divers messages, ces récepteurs répondent à une panoplie de ligands variant de signaux exogènes (lumière et odorants), à une diversité de ligands endogènes qui incluent hormones, neurotransmetteurs, ions calciques, nucléotides, lipides, acides aminés et peptides tels que les larges glycoprotéines ¹. De plus, l'expression de ces récepteurs dans divers organes et types cellulaires fait des RCPGs des cibles moléculaires intéressantes, et qui actuellement représentent la cible de plus de 30 % des agents pharmaceutiques sur le marché ².

Les RCPG possèdent une structure générale relativement conservée, constituée d'une longue chaîne d'acides aminés, comportant un domaine N-terminal extracellulaire, 7 domaines transmembranaires reliés par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires, et un domaine C-terminal intracellulaire ³. Ils sont classifiés en quatre sous-familles partageant chacune une séquence consensus : la famille A qui inclut les récepteurs apparentés à la rhodopsine et au β 2-adrénérique, la famille B avec les récepteurs du glucagon, la famille C avec les récepteurs du calcium et des neurotransmetteurs et la famille F/S (Frizzled) ². La famille A constitue de loin la famille la plus large et la plus étudiée. Elle se subdivise en 6 sous-groupes majeurs qui se caractérisent par une série de résidus-clés hautement conservés. En effet, un pont disulfure relie la deuxième boucle extracellulaire à la troisième, tandis qu'une cystéine palmitoylée dans la région C-terminale fait partie d'une quatrième boucle intracellulaire ³ (Figure1).



Famille A. Rhodopsine / récepteurs $\beta 2$ -adrénergiques-like

récepteurs biogéniques d'amine (**adrénergique**, sérotonine, dopamine, muscarinique, histamine)

CCK, endothéline, tachykinine, neuropeptide Y, TRH, neurotensine, bombesin, et récepteurs de secretagogues d'hormone de croissance plus opsines vertébrés

Opsines invertébrés et récepteurs de bradykinine
Adénosine, cannabinoïdes, melanocortin, et récepteurs olfactifs

fMLP, C5A, GnRH, eicosanoïde, leukotriène, FSH, LH, TSH, opioïde, oxytocine, vasopressine, somatostatine, et récepteurs activés par les protéases

1.1. LES VOIES DE SIGNALISATION DES RCPGs

1.1.1. Évènements membranaires

À l'origine, il était supposé que les RCPGs étaient exclusivement localisés à la surface des cellules où ils étaient facilement accessibles aux ligands hydrophiles. Cependant, il s'est avéré que plusieurs RCPGs, notamment les récepteurs α 1-A et -D adrénergiques, sont présents dans des compartiments intracellulaires quand ils sont exprimés dans un système hétérologue ⁴⁻⁶. De plus, les sites de liaison aux RCPGs diffèrent selon les ligands ; par exemple dans le cas des neurotransmetteurs de faibles poids moléculaires (épinephrine, norépinephrine, dopamine, sérotonine, histamine, acétylcholine), le domaine de liaison du récepteur au ligand est présent à l'intérieur d'une poche hydrophile formée par l'arrangement des hélices transmembranaires ³. Dans ce cas, l'interaction énergétique la plus importante est un pont ionique entre l'amine chargée du ligand, et la chaîne carboxylique d'un résidu Asp conservé dans le domaine transmembranaire 3 (TM3) des récepteurs amines biogéniques ⁷. Bien que la majorité des ligands pour ces récepteurs classiques à petites molécules lient des régions internes du récepteurs, quelques antagonistes agissent cependant sur des régions extracellulaires du récepteur, tels que les antagonistes au récepteur α 1B-adrénergique, où l'interaction est directe avec 3 résidus de la deuxième hélice extracellulaire ⁸. D'autres ligands tels que les hormones peptidiques, ne vont lier que des domaines extracellulaires. Par conséquent, les modes de liaison des agonistes et antagonistes aux RCPGs sont aussi diversifiés que la nature chimique des ligands. Il en demeure que le mécanisme fondamental de l'activation des RCPGs est conservé durant l'évolution étant donné la capacité des différents récepteurs à activer les mêmes voies de signalisation intracellulaires et à travers les mêmes classes de protéines G.

1.1.2. Évènements cytoplasmiques

La stimulation d'un RCPG par un ligand aboutit à un changement de conformation, responsable de l'activation d'une protéine G (Guanine nucleotide-binding protein). Cette protéine hétérotrimérique, présente du côté cytosolique de la membrane plasmique, va assurer la transduction du signal du récepteur à l'effecteur. Plusieurs approches chimériques, appliquées dans les systèmes muscariniques et adrénergiques, impliquent la troisième hélice intracellulaire comme interface d'interaction aux différentes sous-unités α des protéines G. De plus, en contraste à cette troisième hélice intracellulaire responsable de déterminer la spécificité aux protéines G, la deuxième hélice intracellulaire serait importante pour l'efficacité d'activation de la protéine ^{9,10}. Les sous-unités α sont des protéines hydrophiles, qui contiennent le site de liaison des nucléotides guanyliques, GDP (guanosine diphosphate) et GTP (guanosine triphosphate), ainsi que les sites d'interaction avec le récepteur, l'effecteur et le dimère $\beta\gamma$. A l'état basal, la sous-unité α lie de préférence le GDP pour former un hétérotrimère inactif avec le complexe $\beta\gamma$. L'activation du récepteur entraîne une dissociation du GDP qui sera substitué avec une molécule de GTP sur la sous-unité α . De plus, le complexe $\beta\gamma$ se sépare de la sous-unité α ¹¹. Pendant longtemps, la seule fonction connue du dimère $\beta\gamma$ était de lier la sous-unité α et d'entraîner la désactivation du récepteur. Ce n'est que plus tard que plusieurs études ont montré la capacité de ce dimère à activer différents effecteurs, tels que les phosphoinositides 3-kinases (PI3Ks) ¹². Ensuite, pour retourner à l'état inactif, une activité GTPase hydrolyse le phosphate terminal du GTP qui se transforme alors en GDP, entraînant une réassociation de l'hétérotrimère $\alpha/\beta\gamma$. Ce système qui paraît simple, est cependant plus complexe, étant donné la présence d'autres protéines capables de moduler le signal à travers les RCPGs, notamment les RGS (Regulators of G-protein signaling), qui viennent affecter la sensibilité de la transduction du signal ¹³.

Ces protéines G hétérotrimériques, responsables de médier le signal initié par les RCPG, sont regroupés en quatre grandes familles selon le degré

d'homologie de séquence de la sous-unité α : Gs est couplé aux récepteurs de façon à stimuler l'adénylate cyclase (AC) ; Gi/o est couplé aux récepteurs de façon à inhiber l'AC et potentialiser l'activation des canaux potassiques et l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendant ; Gq/11 active la phospholipase C (PLC β) ; et enfin G12/13 active la petite GTPase Rho. Ces différentes voies de signalisation médiées par les protéines G sont impliquées dans différents systèmes ; en effet, G α o intervient essentiellement dans le système nerveux, Gi dans le système immunitaire, Gs et Gi/o dans le système endocrinien et métabolique. Enfin, ces voies participent également dans des phénomènes pathologiques cardiovasculaires tels que l'implication de Gq/11 dans l'hypertension, dans l'hypertrophie cardiaque et dans l'activation plaquettaire ¹⁴.

1.1.2.1. Signalisation induite par Gs

La signalisation induite par Gs, exprimée de façon ubiquitaire, représente la voie la plus étudiée depuis plusieurs décennies. L'initiation de la cascade débute par la stimulation d'un récepteur RCPG qui entraîne la dissociation de la protéine Gs. La sous-unité α lie le GTP pour stimuler l'adénylate cyclase (AC) et augmenter les concentrations intracellulaires de l'AMP cyclique (AMPc). Il en résulte l'activation des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (PKA). Les sous-unités actives de la PKA migrent ensuite vers le noyau afin de phosphoryler des facteurs de transcription qui serviront d'effecteurs nucléaires. Plusieurs groupes ont étudié les phénotypes qui résultent de l'inactivation du gène de G α s. En effet, les souris homozygotes pour la délétion du gène meurent à un stade embryonnaire précoce ¹⁵, alors que les hétérozygotes souffrent d'une augmentation de l'absorption insulino-dépendante du glucose ¹⁶ ; d'autres phénotypes métaboliques et endocriniens sont aussi observés ¹⁷. Ainsi, G α s semble jouer un rôle essentiel au cours du développement, et son dosage est important pour le fonctionnement de plusieurs organes. D'autres études plus

récentes ont rapporté l'implication de $G_{\alpha s}$ en amont de la voie de signalisation médiée par une protéine G monomérique Rap-1, cette dernière activant les MAPKs ¹⁸.

1.1.2.2. Signalisation induite par G_i

Jusqu'à récemment, cette voie était connue pour inhiber l'AC. Cependant, plusieurs études chez la souris ont montrées que G_i pouvait activer différentes voies de signalisation par la stimulation d'autres effecteurs ¹⁴. En effet, au niveau du système immunitaire, G_i joue un rôle dans la signalisation des récepteurs aux « chemokines », où le dimère $\beta\gamma$ de la protéine G_i régule la migration des lymphocytes T via la PI3K, et la génération d' O_2 via la PLC β ¹⁹; ²⁰. En outre, G_i joue un rôle dans l'activation plaquettaire, voie dans laquelle la PI3K représente également un des effecteurs principaux ²¹. Au niveau du cœur, des études par Valenzuela et al. ²², ont impliqué G_i/o dans l'activité des canaux calciques de types L ($I_{Ca,L}$) suite à une stimulation M2 muscarinique. En effet, ils ont rapporté que l'inactivation des deux isoformes de G_i/o ($G_{\alpha/o-/-}$) chez la souris, affecte la régulation des $I_{Ca,L}$ dans le cœur. Cette série d'exemples met en évidence la diversité des signaux activés par les protéines G_i dans divers types cellulaires.

1.1.2.3. Signalisation induite par G_q

La famille des G_q est formée de 4 sous-unité α : α_q et α_{11} les deux membres majeurs, sont exprimés dans plusieurs types cellulaires, α_{14} et α_{16} ont une distribution plus restreinte. α_q et α_{11} médient l'activation des isoformes β de la phospholipase C (PLC). Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) pour former deux seconds messagers. D'une part l'inositol trisphosphate (IP₃) qui va lier son récepteur présent à la surface du réticulum endoplasmique et permettre le relâchement du calcium intracellulaire, et d'autre part, le diacylglycerol (DAG) qui va agir avec le calcium libéré pour activer la protéine kinase C (PKC) ²³. La PKC sera à son tour responsable de la phosphorylation d'autres protéines. Au niveau du système nerveux central

(SNC), les souris ne possédant pas le G_q souffrent de problèmes de coordination motrice ²⁴. Des études plus récentes dans l'hippocampe ont montré l'implication des $G_{q/11}$ dans la plasticité synaptique ²⁵. Au niveau du cœur, plusieurs travaux ont suggéré un lien entre l'activation de G_q et la réponse hypertrophique ; de fait, G_q est activé par divers agents hypertrophiques tels que l'Angiotensine II (Ang II), l'Endothéline-1 (ET-1) et les agonistes α_1 -adrénergiques ²⁶. Par ailleurs, la surexpression de G_q sous le contrôle du promoteur α -MHC chez la souris, entraîne une hypertrophie cardiaque et des altérations au niveau des marqueurs moléculaires ²⁷. En revanche, une inhibition de la signalisation par G_q dans des souris transgéniques (par la surexpression d'un inhibiteur de la G_q , G_{qi} , qui empêche l'interaction G_q avec la forme activé du récepteur) a permis la réduction de la réponse hypertrophique suite à une surcharge de pression ²⁸, ainsi qu'une résistance à l'insuffisance cardiaque suite à une stimulation chronique par des agents hypertrophiques ²⁹.

1.1.2.4. Signalisation induite par $G_{12/13}$

Malgré la similitude des protéines $G_{\alpha_{12}}$ et $G_{\alpha_{13}}$ à la famille G_s , leurs interactions directes avec des effecteurs demeurent peu connues. Toutefois, il est généralement accepté que $G_{\alpha_{12}}$ et $G_{\alpha_{13}}$ modulent l'activité de la petite GTPase Rho à travers RhoGEF (Rho Guanine nucléotide Exchange Factor), pour réguler de multiples réponses cellulaires telles que la réorganisation du cytosquelette et la modulation de la croissance cellulaire ³⁰. Une étude par ³¹ a démontré que A-kinase anchoring protein (AKAP-lbc) joue le rôle d'une protéine adaptatrice dans les fibroblastes pour permettre la liaison sélective de $G_{\alpha_{12}}$ à Rho *in vitro*. Étant donné l'expression forte de AKAP-lbc dans le cœur, Kurose et al. ont suggéré que cette protéine pourrait être un RhoGEF au niveau du cœur ³⁰. Au niveau du cœur, les voies de signalisation et la fonction de $G_{12/13}$ sont encore sous investigation. Des travaux par Nagata et al. ³², ont révélé que $G_{\alpha_{12}}$ et $G_{\alpha_{13}}$ sont nécessaires pour une régulation normale de $I_{Ca,L}$, et que $G_{\alpha_{12}}$ est

spécifiquement important pour l'inhibition de la contractilité et des courants calciques dans les cardiomyocytes suite à une stimulation muscarinique. Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré l'implication de $G_{12/13}$ dans l'hypertrophie induite par la voie α_1 -adrénergique. En effet, suite à une stimulation des récepteurs α_1 -adrénergiques, un inhibiteur spécifique de $G_{\alpha_{12}}$ et $G_{\alpha_{13}}$, est capable d'inhiber l'activation de c-Jun-NH2 terminal kinase (JNK) et la réponse hypertrophique qui en résultent^{33,34}. Cependant, la plupart des études effectuées actuellement sont faites *in vitro* dans des modèles de transfection, il reste donc à déterminer l'implication de cette voie dans les réponses physiologiques ou pathophysiologiques *in vivo*.

1.1.3. Evènements nucléaires

L'activation des diverses voies de signalisation par les RCPGs aboutissent finalement à la modulation de l'activité de facteurs de transcription, qui à leur tour régulent l'expression génique. Certains exemples classiques seront mentionnés afin d'illustrer les évènements nucléaires engendrés par l'activation des RCPGs. Dans le cas de la voie induite par G_s , l'activation de la PKA se caractérise par une dissociation de ses différentes sous-unités, suivie de la translocation de sa sous-unité catalytique du cytoplasme vers le noyau, qui permettra finalement la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding protein) sur la sérine 133³⁵. CREB, un membre de la superfamille des "basic leucine zipper", lie le site CRE (cAMP Response Element) et recrutera à son tour le coactivateur CBP (CREB- Binding Protein) afin d'activer la transcription génique^{36,37}.

Un autre exemple de seconds messagers activés par les RCPGs sont les JNKs (c-NH₂ Jun Kinases). Ce membre de la famille des MAPKs entraîne l'activation de facteurs de transcription. Parmi les différentes cibles de JNK, AP-1 est considéré comme un des effecteurs nucléaires classiquement étudié³⁸. Au niveau du cœur des études ont rapporté une augmentation de l'activité cardiaque de AP-1 suite à une activation de JNK dans des modèles de rats soumis à des

injections d'angiotensine (Ang II) ³⁹. Cette hausse de l'activité de AP-1, qui résulte de l'hétérodimérisation des protéines c-Jun et c-Fos, régule l'expression de divers gènes contenant le site consensus de AP-1 ⁴⁰ ; c'est le cas du gène codant pour la chaîne légère de la myosine (MLC-2v), dont l'expression est induite lorsque Jun et ses partenaires sont activés par des agents hypertrophiques au niveau des cardiomyocytes de poulet ⁴¹. Au niveau du système nerveux, l'activation de c-Jun médiée par les JNKs favorise l'action neuro-dégénérative de JNK ⁴².

Par ailleurs, la calcineurine représente un autre exemple d'effecteur, responsable de l'activation des facteurs de transcription afin de médier une réponse aux RCPGs. Cependant, contrairement aux autres seconds messagers qui entraînent une phosphorylation de leurs cibles, la calcineurine (nom commun pour calcium/calmodulin-dependent serine phosphatase), est responsable de déphosphoryler et activer les NFATs (Nuclear factor of activated T cells) ⁴³. En effet, les NFATs présents au niveau du cytoplasme sous la forme phosphorylée, se déplacent dans le noyau une fois activés, et lient sous forme de monomères ou de dimères le site consensus GGAAAAT présent dans la région promotrice de plusieurs gènes ⁴⁴. L'activation des multiples membres de la famille NFAT a été rapportée dans divers systèmes ; ils ont été impliqués dans la régulation de l'expression des cytokines dans les cellules immunitaires ⁴³, dans la croissance hypertrophique du muscle squelettique ⁴⁵, dans le développement normal des valves cardiaques ⁴⁶, et dans l'hypertrophie cardiaque ⁴⁷.

Ces exemples montrent l'importance des voies médiées par les RCPGs dans divers systèmes, tant au niveau cytoplasmique qu'au niveau nucléaire. En effet, le contrôle strict des facteurs de transcription par les divers seconds messagers est à la base d'une réponse cellulaire normale. Dans le cadre de ce projet, seule la régulation adrénergique sera traitée, avec l'emphase sur les récepteurs α 1-adrénergiques dans le coeur, leur implication dans l'hypertrophie cardiaque et la régulation transcriptionnelle des réponses qu'ils médient.

1.2. REGULATION ADRENERGIQUE DANS LE COEUR

L'activation du système nerveux sympathique (SNS) est nécessaire au maintien de l'homéostasie cardiovasculaire. Cette réponse médiée par l'action des catécholamines, norépinéphrine (NE) et épinéphrine (E), se fait à travers les deux classes de récepteurs adrénergiques : α et β . Parmi les neuf sous-types de ARs identifiés ⁴⁸, au moins six sont exprimés par les cardiomyocytes. Ceux-ci incluent les 3 β -ARs (β 1, β 2, β 3) et les 3 sous-types de α 1-ARs (α A, α B, α D). Cependant aucun des sous-types des α 2 ne semble être exprimé ⁴⁹. Il est actuellement accepté que β 1- est le sous-type majeur dans les cardiomyocytes du coeur adulte normal. Cependant dans le cas de plusieurs pathologies cardiaques, et notamment l'insuffisance cardiaque, ce premier est diminué au profit de β 2 ⁵⁰. β 2- est le seul sous-type des ARs à être exprimé dans les fibroblastes ⁵¹.

Le type de récepteur activé et son niveau d'expression, ainsi que le couplage aux différentes protéines G, vont déterminer la nature de la réponse aux catécholamines. Au niveau du coeur, cette réponse implique les récepteurs β -adrénergiques dans la régulation de la contractilité, et les récepteurs α 1 dans la croissance hypertrophique des myocytes.

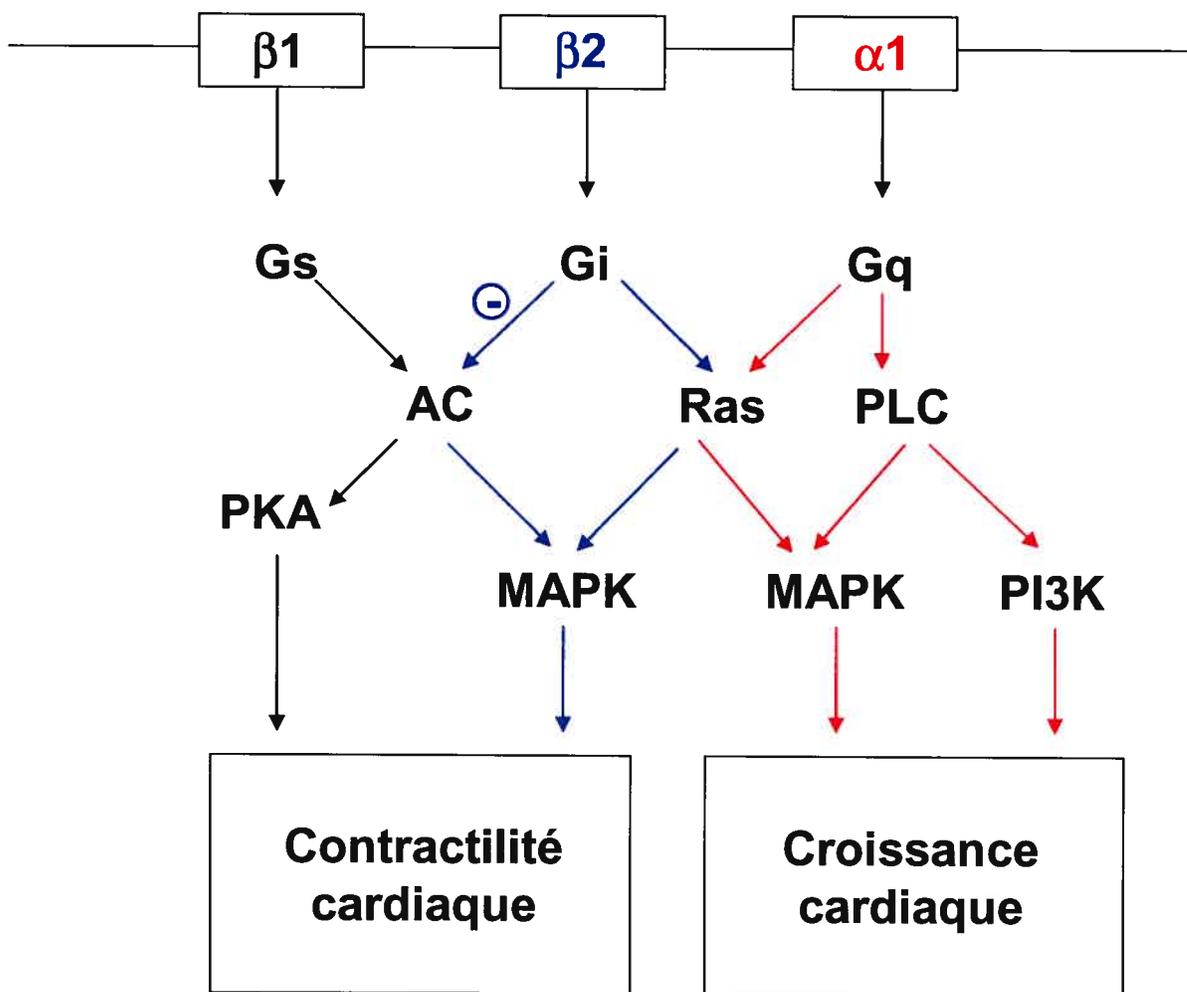
1.2.1. La contractilité par β -ARs

Il est généralement accepté que la stimulation des β -ARs est le facteur le plus déterminant dans l'augmentation du débit cardiaque suite à un changement de l'environnement tel que le stress et l'exercice. Les β 1-ARs qui représentent le sous-type majeur dans le coeur, régulent la contractilité ainsi que le rythme du coeur plutôt que la croissance cardiaque. Ces récepteurs activent l'AC via la protéine Gs, entraînant la production de l'AMPc et l'activation de la PKA. Cette dernière phosphoryle les différentes cibles impliquées dans la mobilisation du calcium afin de réguler la contractilité ⁵². À long terme, ces effets compensatoires

au stress, contrôlés par la PKA, sont nuisibles puisqu'ils aboutissent à une cardiomyopathie dilatée et à une mort subite⁵³. Toutefois, la signalisation via les deux récepteurs β 1- et β 2- dans le coeur diffère⁵⁴. En plus d'interagir avec les protéines Gs, les β 2-ARs peuvent également être couplés à des voies de signalisation indépendantes de Gs et de l'AMPc. En effet, ils peuvent agir à travers les sous-unités α et $\beta\gamma$ des protéines Gi^{55,56} pour inhiber l'activité de l'AC et stimuler plusieurs voies des MAPKs⁵⁴. Ces récepteurs, contrairement aux β 1-ARs, semblent avoir un effet anti-apoptotique quand ils sont surexprimés à faible niveau dans le coeur⁵⁷. Toutes ces études suggèrent qu'une thérapie potentielle serait de combiner les antagonistes aux β 1-ARs avec des activateurs modérés des β 2-ARs (figure 2).

1.2.2. Régulation de la croissance par les α 1-ARs

Les récepteurs α 1-adrénergiques jouent un rôle majeur dans la croissance cardiaque^{58; 59}. Classiquement couplés aux protéines Gq pour engendrer l'activation de la PLC^{60,61}, les trois sous-types des α 1-ARs (α 1-A, α 1-B et α 1-D) peuvent agir individuellement via différentes protéines G pour activer divers effecteurs (qui seront décrits en détail dans la section suivante) et induire la transcription génique⁶². Malgré l'implication des α 1-ARs bien établie dans la réponse hypertrophique, une grande variété d'autres agonistes indépendants des récepteurs adrénégiques, notamment l'endothéline1 (ET-1) et l'angiotensine II (AngII), peuvent également stimuler les RCPGs et déclencher une réponse hypertrophique. Ces divers agonistes activent plusieurs voies communes aux α 1-ARs. Néanmoins, la ou les voies de signalisation qui lient les α 1-ARs aux divers événements cellulaires et génétiques demeurent mal définies. Le but de mon travail de recherche consistait à étudier les mécanismes transcriptionnels induits par les α 1-ARs dans le coeur. Un aperçu général sur l'expression, les voies de signalisation et les rôles fonctionnels des α 1-ARs dans divers systèmes sera



Les récepteurs adrénergiques dans le coeur
 (figure adaptée de Keys et Koch, 2004)

présenté, avec l'emphase sur le coeur durant le développement normal et pathologique.

1.3. LES RECEPTEURS α 1-ADRENERGIQUES (α 1-ARs)

1.3.1. Structures et expressions des différents sous-types

Les récepteurs α 1-adrénergiques (α 1-ARs) représentent une des 3 sous-familles de récepteurs adrénergiques (α 1, α 2 et β) médiant les actions neurotransmittrices et hormonales des catécholamines naturelles, adrénaline et noradrénaline, pour réguler différentes fonctions dans plusieurs organes cibles. Les trois sous-types connus chez l'homme (α 1A, α 1B, α 1D) sont encodés par des gènes présents sur des chromosomes différents⁶³. De plus, ils jouent des rôles-clés dans divers processus physiologiques tels que la croissance du muscle lisse et cardiaque, la modulation du métabolisme hépatique, la neurotransmission sympathique et la régulation de l'activité musculaire dans l'appareil génito-urinaire⁶⁴. Les études d'expression des différents sous-types de récepteurs α 1, ont été majoritairement faites chez l'humain et le rat. Dans la plupart des cas, ces 3 sous-types sont co-exprimés dans les mêmes tissus et cellules. En effet, ils existent en grand nombre dans le cerveau⁶⁵ et dans le coeur⁶⁶, mais également dans plusieurs types de muscles lisses⁶⁷. En revanche, le foie exprime seul le sous-type α 1B- chez le rat⁶⁸ et le sous-type α 1A- chez l'humain⁶⁶. Les autres organes comme la rate, les poumons, les reins et la peau expriment plus faiblement les 3 sous-types de récepteurs α 1-adrénergiques.

Les trois isoformes des α 1-ARs sont homologues au niveau de leurs domaines transmembranaires, mais diffèrent dans leurs régions C et N-terminales. Ainsi, malgré leur action classique à travers les protéines Gq/11 pour activer la PLC⁶⁹, les α 1-ARs peuvent aussi activer d'autres voies de signalisation, coopérant avec des partenaires protéiques différents⁶. Les

différences entre les 3 sous-types de α 1-ARs au niveau de la distribution tissulaire, des propriétés de liaison aux protéines G, des voies de signalisation diverses et des mécanismes de régulation, sont à l'origine des diverses réponses générées

1.3.2. Les différentes voies de signalisation induites par les α 1-ARs

1.3.2.1. Evènements cytoplasmiques

Il est généralement accepté que les α 1-ARs appartenant à la plus grande famille des RCPG couplés aux protéines Gq/11, activent la PLC, induisent l'augmentation du calcium intracellulaire et aboutissent à l'activation de la PKC. Cependant, en plus d'activer la voie classique des PKC, les α 1-ARs peuvent également déclencher une variété de voies de signalisation médiées par divers seconds messagers tels que les MAPKs (Mitogen-activated protein kinases)⁷⁰, les phospholipases A2 (PLA2)⁷¹ et D (PLD)⁷², impliquées dans le relâchement de l'acide arachidonique (AA), et les Jak/STATs⁷³. Il reste toutefois à déterminer si ces voies ont lieu après ou en parallèle à la voie classique. Remarquablement, malgré la diversité des effecteurs et de leurs réponses transcriptionnelles respectives, l'ensemble de ces cascades semblent agir à travers les protéines G⁷⁴.

Les MAPKs jouent un rôle important dans la régulation d'une variété de fonctions cellulaires. Cependant, leurs mécanismes d'activation demeurent sous investigation. Certaines études supportent l'idée que les deux sous-unités α et $\beta\gamma$ sont impliquées dans la transduction du signal à travers des voies de signalisation différentes⁷⁵. Au niveau hépatique, l'activation des α 1-ARs stimule la régénération du foie et la prolifération des hépatocytes via plusieurs MAPKs, notamment à travers les voies p38 et JNK-dépendantes⁷⁶. Au niveau du coeur, les 3 MAPKs (ERK, JNK et p38) sont impliquées dans l'hypertrophie cardiaque induite par les agonistes α 1-adrénergiques⁷⁷ (cette partie sera discutée en détail dans les sections qui suivent). Les α 1-ARs sont également impliqués dans

la régulation de la croissance du muscle lisse, où l'hypertrophie causée suite à une stimulation à la norepinephrine (NE), serait médiée par la cascade des ERKs (extracellular signal regulated kinases) via les récepteurs $\alpha 1D$ ⁷⁸. D'autre part, des études dans les PC12 (type cellulaire qui se différencie en un phénotype neuronal) transfectées avec des récepteurs $\alpha 1A$ ($\alpha 1A$ –PC12) et stimulées par la NE, ont rapporté l'implication des 3 membres principaux des MAPKs dans la différenciation des PC12 ⁷⁰. De plus, ces divers membres des MAPKs sont également activés par d'autres sous-types de récepteurs $\alpha 1$. En effet, les $\alpha 1B$ -ARs activent les p38 et ERKs sans les JNKs, et les $\alpha 1D$ -ARs activent seuls les ERKs ⁷⁹. Ces nombreuses études exposent le rôle important et complexe des MAPKs dans la médiation des effets $\alpha 1$ -adrénergiques au niveau des divers organes.

Par ailleurs, d'autres effecteurs ont été impliqués dans la médiation des voies $\alpha 1$ -adrénergiques, et notamment par leur capacité à déclencher un relâchement de l'acide arachidonique. En effet, les premières études réalisées par Burch et al. ⁸⁰, ont montré que l'activation des $\alpha 1$ -ARs induit le relâchement de l'AA dans un type cellulaire spécifique de la thyroïde de rat. Depuis, plusieurs études ont confirmé ce relâchement dans divers types cellulaires mais à travers des seconds messagers différents. Des travaux par Kanterman et al. ⁸¹, ont impliqué le calcium extracellulaire dans le relâchement de l'AA dans les neurones de la moelle épinière, et ont suggéré un rôle pour la PLA2. Par la suite, des études dans des cellules de rein (Mardin-Darby canine kidney cells) ont confirmé l'implication de la PLA2 suite à la stimulation des $\alpha 1$ -ARs ; cette activation bloquée par des inhibiteurs de la voie des MAPKs et de la PKC, suggère que la régulation du relâchement de l'acide arachidonique par les $\alpha 1$ -ARs se fait via la phosphorylation de la PLA2 par les MAPKs, le tout médié par la voie classique de la PKC ⁷¹. D'autres études plus récentes dans une lignée de fibroblastes de rat (rat-1 fibroblasts), impliquent l'activation de la PLD dans le relâchement de l'acide arachidonique suite à la stimulation des $\alpha 1A$ -ARs par la phényléphrine (PE). Cette activité serait inhibée par des chélateurs du calcium

extracellulaire, impliquant un rôle pour le calcium dans l'activation de la PLD suite à une stimulation des α 1-ARs ⁷². Toutes ces études supportent l'hypothèse que les voies de signalisation médiées par les α 1-ARs ne sont pas linéaires, mais que les différents seconds messagers activant des cibles spécifiques font partie d'un réseau où convergent divers signaux.

1.3.2.2. Evènements nucléaires

Au niveau transcriptionnel, les différents sous-types des α 1-ARs et leurs nombreux seconds messagers entraînent des réponses diverses. En effet, des études de transfections stables des différents sous-types de récepteurs α 1-adrénergiques dans les PC12 stimulées à la NE, ont souligné que le profil d'activation transcriptionnelle diffère entre les divers isoformes ⁸². Ces travaux montrent qu'en plus des différences qui existent au niveau de l'activation des effecteurs, les sous-types α 1B et α 1D sont moins efficaces que α 1A dans l'activation de divers rapporteurs qui incluent luc-NFAT, luc-AP-1, luc-CRE, luc-SRE et luc-NF κ B ⁶². Par ailleurs, d'autres travaux ont impliqué les STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) comme cibles nucléaires des récepteurs α 1A-adrénergiques dans les pC12 ; ces derniers une fois phosphorylés, vont dimériser ; leur translocation au noyau va leur permettre de lier des sites consensus spécifiques et donc altérer la transcription ⁷³. L'ensemble de ces études montre que les différents sous-types ont des affinités différentes pour les seconds messagers et résultent par conséquent en une expression génique variée.

Par ailleurs, les voies de signalisation médiées par les α 1-ARs au niveau du cœur, ont été intensivement étudiées dans les dernières décennies. Ces récepteurs régulent différentes réponses impliquées dans la croissance cardiaque, et notamment dans des conditions pathologiques telles que l'hypertrophie. Les différents sous-types (α 1A, α 1B, α 1D), bien que colocalisés

dans les cardiomyocytes, sont à l'origine de ces multiples réponses intracellulaires, qui varient aussi selon l'âge et l'espèce. Les diverses voies impliquées dans la réponse adrénérgique au niveau du cœur, seront étudiées individuellement en parallèle avec leur implication dans l'hypertrophie.

1.3.3. Rôles fonctionnels des voies α 1-adrénergiques dans divers systèmes

1.3.3.1. Les rôles fonctionnels des α 1-ARs dans le système nerveux central

Les α 1-ARs jouent un rôle clé dans la médiation de la neurotransmission sympathique dans le système central et périphérique. Cependant, le manque de sélectivité des agonistes et antagonistes aux différents sous-types, et leur difficulté à franchir la barrière hémato-céphalique, n'ont fait que retarder les études sur le rôle fonctionnel de ces récepteurs ⁸³. De nombreuses études dans le système central ont impliqué les α 1-ARs comme médiateurs de l'action des neurotransmetteurs pour moduler l'activité neuronale ⁸⁴. En effet, des souris transgéniques surexprimant des récepteurs α 1B- constitutivement actifs dans tous les tissus qui normalement expriment ces récepteurs, et qui incluent le cerveau, ont été générées. Elles sont caractérisées par un dysfonctionnement locomoteur relié à l'âge et une neuro-dégénérescence apoptotique ⁸⁵, ainsi qu'une plus grande susceptibilité à l'épilepsie ⁸⁶. De plus, des études de perte de fonction du récepteur α 1B-AR chez la souris, ont rapporté une activité exploratrice diminuée et un comportement anticipé altéré, suggérant l'implication des α 1B-ARs dans la modulation de la mémoire et de l'activité exploratoire en réponse au stress ⁸⁷; ⁸⁸. Au niveau de la signalisation, ces effets sont médiés dans le cervelet et l'hippocampe par Gq et G11, les deux membres principaux des protéines G exprimés dans le SNC, et ceci à travers l'activation de la PLC β ¹⁴. Toutefois, malgré la densité majeure des α 1-ARs et leur rôle capital dans le SNC ⁸⁹, les mécanismes moléculaires à la base des différentes fonctions demeurent mal caractérisés et sous investigation.

1.3.3.2. Les rôles fonctionnels des α 1-ARs dans le système hépatique

Au niveau du foie, les catécholamines sont impliquées dans diverses fonctions hépatiques. A court terme, ces hormones sont responsables de moduler le métabolisme hépatique, et potentialisent la glycolyse et la gluconéogenèse^{90,91}. Cependant, à plus long terme, la stimulation des α 1-ARs par les catécholamines influence la croissance et la différenciation des hépatocytes, et module une augmentation de la synthèse de l'ADN^{92,93} et de divers protéines⁹⁴, *in vitro* et *in vivo*. Les voies de signalisation impliquées dans la médiation de ces réponses distinctes demeurent peu connues. Plusieurs voies ont été rapportées suite à l'activation des récepteurs α 1-adrénergiques, notamment l'augmentation intracellulaire de l'inositol 1,4,5 triphosphate, accompagnée d'une élévation de calcium⁹⁵. Des travaux plus récents ont montré que suite à une hépatectomie partielle, l'activation rapide de la voie des protéines kinases B/AKT joue un rôle anti-apoptotique impliqué dans la régénération du foie⁹⁶. Au niveau transcriptionnel, les catécholamines ont été impliqués dans la stimulation des gènes immédiats précoces, c-fos et c-jun, suggérant que ces premiers peuvent réguler l'expression hépatique des gènes contenant les séquences AP-1 dans leur région promotrice^{97,98}.

1.3.3.4. Les rôles fonctionnels des α 1-ARs dans le système vasculaire

Les α 1-ARs jouent un rôle critique dans la régulation par le système nerveux sympathique de la fonction cardiovasculaire. Les 3 sous-types α 1A-, α 1B- et α 1D- participent à cette régulation, tel que le démontrent plusieurs études de gain et de perte de fonction⁹⁹. Ainsi, les souris homozygotes pour des délétions du gène α 1B-AR (α 1B^{-/-}) sont viables et ne présentent aucune anomalie au niveau de la croissance¹⁰⁰. Cependant, on note une diminution de la réponse de pression et de contractilité aux catécholamines au niveau de

l'aorte, suggérant un rôle des $\alpha 1B$ -ARs dans la réponse hypertensive à travers une contraction vasculaire ¹⁰⁰. De plus, d'autres études ont rapporté que suite à une infusion chronique de noradrénaline, une hypertrophie cardiaque et un remodelage vasculaire sont observés chez une souris de type sauvage, un phénotype absent chez les souris délétères pour les récepteurs $\alpha 1B$ ¹⁰¹. Ces travaux soulignent donc l'implication de ce récepteur dans le système cardiovasculaire. De plus, des études d'inactivation des $\alpha 1$ -ARs ($\alpha 1A$ -/-), et le remplacement de la séquence codante de $\alpha 1A$ par un gène rapporteur LacZ, ont permis de déterminer par coloration β -galactosidase la localisation de ces récepteurs surtout au niveau des croisements de vaisseaux ¹⁰². Cette distribution pourrait donner des indices quant à la voie qu'utilise le système nerveux sympathique pour contrôler la circulation sanguine à travers des vaisseaux particuliers. Des études de perte de fonction sur des vaisseaux sanguins isolés, impliquent aussi les isoformes $\alpha 1A$ - et $\alpha 1D$ - dans le contrôle de la vasoconstriction ¹⁰³. Par ailleurs, l'inactivation chez la souris du gène encodant le récepteur $\alpha 1D$ -AR résulte en une réponse diminuée de la pression ainsi qu'une vasoconstriction déficiente suite à une stimulation par les catécholamines ¹⁰⁴. Plus récemment, le double K/O des récepteurs $\alpha 1A$ et $\alpha 1B$ ($\alpha 1_{A/B}$ -/-) a souligné la présence de $\alpha 1D$ dans le cœur, et son implication dans la médiation de la vasoconstriction ¹⁰⁵. L'inactivation des gènes de chacun de ces sous-types chez la souris a donc permis de décerner les différentes fonctions *in vivo* de ces récepteurs, particulièrement dans les tissus vasculaires et cardiaques.

1.3.3.5. Les rôles fonctionnels des α 1-ARs dans le système cardiaque

Malgré l'implication des α 1-ARs dans divers systèmes, ces récepteurs ont été majoritairement étudiés dans le cœur. Les nombreuses études sur l'expression spatio-temporelle des différents sous-types des α 1-ARs permettent peu à peu de comprendre le rôle fonctionnel de ces premiers dans le cœur. Toutefois, les mécanismes responsables de réguler la croissance cardiaque normale et pathologique par les α 1-ARs demeurent mal définis et méritent plus d'investigation.

Des résultats controversés concernant l'expression des α 1-ARs dans les différents types cellulaires du cœur ont été rapportés chez le rat. En effet, des études par Stewart et al. ont montré l'absence des α 1-ARs dans les cultures néonatales de fibroblastes cardiaques ⁴⁹. Quelques années plus tard, Luther et al. ont souligné la faible présence des 3 sous-types de α 1-ARs dans la fraction, néonatale et adulte, des cellules non-myocytaires ¹⁰⁶. Les conditions de culture des cellules peuvent être à l'origine de cette différence, ainsi que les différents types cellulaires qui peuvent exister dans une fraction non-myocytaire. En effet, les tissus du cœur contiennent un amalgame de cellules, et cette fraction est alors un système hétérologue contenant en plus des fibroblastes, des cellules endothéliales, des cellules du muscle lisse et des mastocytes, qui représentent un tiers des cellules totales dans les cultures néonatales chez le rat ¹⁰⁷. D'autres travaux ont montré que malgré la présence des α 1-ARs dans les cultures de fibroblastes adultes, ces récepteurs ne couplent pas aux protéines G dans les fibroblastes mais peuvent médier une réponse dans les cardiomyocytes, suggérant une communication intercellulaire ("cross-talk") importante entre les cardiomyocytes et les fibroblastes ⁵¹. Les α 1-ARs des deux types cellulaires jouent donc un rôle significatif dans la réponse hormonale des tissus cardiaques intacts, mais médient des réponses distinctes. Les fonctions qui incluent des effets inotropiques et chronotropiques sont propres aux cardiomyocytes ; en revanche l'expansion de la matrice extracellulaire est une fonction des

fibroblastes. D'autres fonctions comme la régulation de la prolifération, la différenciation, et la croissance, impliqueraient les deux types cellulaires.

En plus de varier d'un type cellulaire à l'autre, le profil de distribution des α 1-ARs varie également entre les cultures néonatales de cardiomyocytes et les cultures de cœurs adultes. Ces différences âge-dépendantes vont entraîner plusieurs cascades de signalisation qui seront à l'origine des différentes réponses biologiques. La plupart des études sur l'expression de ces récepteurs montrent que l'ARNm de chacun des trois sous-types α 1A, α 1B et α 1D existe en tout temps dans les cardiomyocytes néonataux et adultes, cependant la distribution relative de ces derniers diffère. En effet, le sous-type α 1A est prédominant dans les myocytes à l'âge adulte ¹⁰⁸ ; en revanche, le récepteur α 1B est majoritaire dans la fraction de culture néonatale non-myocytaire et son expression diminue avec l'âge ^{106,109}. En ce qui concerne α 1D, il est généralement accepté qu'il est présent dans le cœur, surtout au niveau du ventricule droit ¹¹⁰ mais reste faible même après le développement ¹⁰⁶. Des études par le groupe de Wenham et al ont souligné, par des analyses de compétition avec une variété d'antagonistes spécifiques aux différents sous-types, que malgré la présence du messenger des trois sous-types dans les cultures néonatales de cardiomyocytes de rat, seuls les sites de liaison de α 1A et α 1B ont été détectés ¹¹¹. Une stimulation des α 1-ARs dans des embryons en culture au jour E8 entraîne un *situs invertus*, caractérisé par un "looping" cardiaque inversé, possiblement lié à la cascade des CaMKII (Calcium-calmodulin dependent kinase) ¹¹². Ces résultats suggèrent l'importance du rôle des α 1-ARs durant le développement embryonnaire précoce. En plus, d'un rôle fonctionnel au niveau du développement normal, les α 1-ARs ont été également impliqués dans la régulation de la croissance hypertrophique dans le cœur ¹¹³. Les multiples voies de signalisations responsables de médier la réponse hypertrophique par les α 1-ARs seront traitées en détail.

1.4. SIGNALISATION CELLULAIRE DURANT L'HYPERTROPHIE CARDIAQUE

À l'origine, l'hypertrophie cardiaque est une adaptation du cœur à une variété de stimuli mécaniques, hormonaux et pathologiques, qui se traduit par une augmentation de la taille et non du nombre des cellules cardiaques ¹¹⁴. Ce mécanisme compensatoire qui empêche la détérioration du cœur, se voit cependant servir la fonction inverse quand exposé longtemps au stress, pouvant ainsi entraîner une insuffisance cardiaque. Cette hypertrophie, connue alors sous le nom d'hypertrophie pathologique, se traduit par des événements cellulaires divers tels qu'une augmentation de la synthèse des protéines, une réorganisation du cytosquelette, et une réactivation des gènes embryonnaires. Malgré les différentes cascades cellulaires qui médient ces réponses hypertrophiques, les voies α 1-adrénérgiques jouent un rôle critique. En effet, ces cascades médiées principalement par Gq, se poursuivront avec l'activation de différents effecteurs, les principaux étant les PI3Ks, les MAPKs, le calcium et les petites protéines G .

1.4.1. Rôle de la PI3K dans la régulation de la croissance cardiaque

Les phosphoinositides 3-kinases (PI3Ks) sont une famille de kinases lipidiques qui induisent différentes voies de signalisation par la phosphorylation du groupe hydroxyle à la position 3 des lipides membranaires phosphoinositides. Elles vont réguler, dans divers systèmes, plusieurs fonctions physiologiques telles que la prolifération, la croissance et la survie cellulaire, mais aussi la migration et le mouvement des cellules ¹¹⁵. Cependant au niveau du cœur, étant donné la capacité limitée des cardiomyocytes à proliférer, les voies médiées par la PI3K jouent un rôle essentiellement dans la régulation de la croissance et la survie avec un effet moindre sur la prolifération des cellules cardiaques. In vitro, la PI3K utilise le phosphatidylinositol (PI), le PI-4-phosphate (PI-4-P) et le PI-4-5-bis-phosphate (PI-4, 5-P₂) comme substrat pour générer le PI(3)P, le PI(3, 4)P₂, et le PI(3, 4, 5)P₃ respectivement, le dernier étant le produit physiologique

majeur ¹¹⁶. Trois classes de PI3Ks (classes I, II et III) existent, pourtant seule l'expression de la classe I est reconnue et étudiée au niveau des tissus cardiaques. En effet, cette classe constituée de 4 membres, représente un point de convergence des cascades intracellulaires médiées par différents récepteurs. Dans un premier temps, les PI3K α , β et δ sont activées par les voies des récepteurs tyrosines kinases, tandis que les PI3K γ sont impliquées dans les voies initiées par les RCPG, particulièrement par le complexe $\beta\gamma$ des protéines G ¹¹⁷. Dans les deux cas, plusieurs travaux ont rapporté le rôle des PI3Ks dans la réponse hypertrophique cardiaque. Une surexpression constitutive *in vivo* de la forme active de p110 α , une sous-unité catalytique de la PI3K, a permis de déceler une augmentation de la taille du cœur. Inversement, une surexpression du dominant négatif a entraîné une réduction de la taille de ce dernier ¹¹⁸, ce qui suggère une corrélation directe entre l'activité de la PI3K α et la taille du cœur. De plus, des études plus récentes de Crackower et al. ont montré que la sous-unité p110 α permet de médier la réponse hypertrophique cardiaque, tandis que p110 γ régule négativement la fonction contractile en inhibant la production d'AMPc, sans affecter la taille des cardiomyocytes ¹¹⁹. En effet, une augmentation de l'activité de la PI3K γ a été rapportée suite à une constriction aortique ¹²⁰, suggérant l'implication majeure des membres de la PI3K dans diverses réponses hypertrophiques.

Par ailleurs, les différentes réponses cellulaires médiées par les PI3Ks, résultent de l'activation de diverses enzymes et protéines membranaires responsables du transport (trafficking proteins), telles que les PDKs (kinases phosphoinositide-dépendantes), les kinases S6, et les PKB/Akt ¹²¹⁻¹²³. En effet, plusieurs travaux ont rapporté l'implication de AKT, un effecteur majeur impliqué dans la régulation de la croissance et la contractilité des cardiomyocytes ¹²⁴. L'expression d'un dominant négatif de la p110 α PI3K entraîne une inhibition de l'activité de l'Akt, et aboutit à une diminution de la taille des cardiomyocytes et de la synthèse des protéines ¹¹⁵. D'autre part, la surexpression cœur-spécifique de la forme active de l'Akt chez la souris aboutit à une augmentation de la taille du cœur ^{115,125}, ce qui implique l'Akt dans le contrôle de la taille des cardiomyocytes.

Toutefois, la surexpression d'un dominant négatif de l'AKT n'altère pas la taille de ces derniers, laissant suggérer la participation d'un autre effecteur. En effet, malgré des études qui ont souligné l'importance de S6K pour les effets hypertrophiques de AKT ¹²⁶, cette kinase impliquée dans l'initiation de la traduction de l'ARNm pourrait également médier une forme d'hypertrophie indépendamment de la voie PI3K/Akt. La voie PI3K-p70S6K est également importante dans la régulation de la taille des cellules cardiaques même suite à d'autres stimuli tels que le stress oxydatif ¹²⁷.

Malgré l'implication de la PI3K dans la taille des cellules, le rôle majeur de cette première demeure au niveau de la synthèse des protéines, dont l'augmentation est caractéristique de l'hypertrophie. En effet, l'activation de la p70S6K en aval de la PI3K a été identifiée comme une étape critique dans l'augmentation de la synthèse protéique suite à une stimulation β -adrénergique dans les cardiomyocytes adultes ¹²⁸. Cette kinase est responsable de la phosphorylation de la protéine S6 de la sous-unité 40S des ribosomes, qui a donc pour conséquence d'augmenter l'activité traductionnelle. Par ailleurs, l'activation de la p70S6K dans les cultures de cardiomyocytes néonataux est impliquée dans la croissance hypertrophique suite à une stimulation aux agonistes α 1-adrénergiques ¹²⁹. Cependant, des travaux plus récents montrent que l'activation de S6K, suite à une stimulation à la PE, n'est pas diminuée par un inhibiteur de la PI3K ; de plus, les transgéniques exprimant le dominant négatif de la PI3K réduisent l'hypertrophie physiologique et non pathologique, suggérant que d'autres voies sont à l'origine des réponses hypertrophiques médiées par les récepteurs α 1-adrénergiques ¹³⁰.

1.4.2. Rôle des protéines G monomériques ou ' petites G '

Les petites protéines G possèdent un rôle important dans plusieurs fonctions cellulaires, dont la régulation de la croissance et la prolifération cellulaire. Ces protéines qui lient le GDP à l'état inactif, sont activées par l'échange du GDP par un GTP. Leur activité GTPase intrinsèque va permettre

l'hydrolyse du GTP lié en GDP, et ainsi le retour à l'état inactif ¹³¹. Au niveau du cœur, parmi les 5 sous-familles (Ras, Rho, ADP ribosylation factors (ARF), Rab et Ran) de la famille des petites protéines G, seule l'implication de Ras et Rho a été rapportée ^{132,133}. En effet, le rôle de ces derniers dans l'hypertrophie n'a fait que croître.

1.4.2.1. Implication de Rho dans l'hypertrophie cardiaque

La sous-famille Rho contient trois membres (RhoA, Rac1 et Cdc42) responsables de réguler l'organisation de l'actine cytosquelettique dans divers types cellulaires ¹³³. Au niveau du cœur, RhoA et Rac1 ont été impliqués dans l'hypertrophie cardiaque. En effet, des mutants permettant d'inhiber RhoA, empêchent l'hypertrophie induite par la PE ¹³² ou Gq ¹³⁴. Des études plus récentes ont rapporté l'implication de la cascade Gq-Rho kinase dans l'hypertrophie du ventricule gauche induite par l'hypertension ¹³⁵. En revanche, d'autres travaux récents par Hilal-Dandan et al. ont montré l'induction d'une hypertrophie des cardiomyocytes néonataux suite à une stimulation au LPA (lysophosphatidic acid) indépendante de la voie Gq classique, mais via Gi et Rho ¹³⁶. Au niveau transcriptionnel, une surexpression de RhoA entraîne une augmentation de l'expression de l'ANF, marqueur universel de l'hypertrophie ¹³⁷. Ces études ne représentent que le début d'une série d'études concernant les multiples voies potentielles régulées par Rho, et leurs rôles dans l'hypertrophie cardiaque.

1.4.2.2. Implication de Ras dans l'hypertrophie cardiaque

Les isoformes classiques de Ras (HRas, NRas, KRas et Rap) sont responsables de réguler la survie, la croissance et la division cellulaire. Au niveau du cœur, certains ont été détectés dans les cultures primaires de cardiomyocytes néonataux ¹³⁸, où ils lient et activent plusieurs protéines, dont c-

Raf (ou encore MAPK kinase kinase), PI3K et Ral.GDC¹³⁹. Parmi les différentes cascades impliquées dans la régulation de l'hypertrophie cardiaque suite à une stimulation à la PE, plusieurs études ont souligné le rôle déterminant de Ras et Raf dans l'induction des marqueurs morphologiques et biochimiques de l'hypertrophie^{140,141}. En effet, la surexpression coeur-spécifique de V12Ras, une forme mutée active de Ras, cause une hypertrophie ventriculaire et une insuffisance cardiaque dans le modèle murin¹⁴². De plus, le traitement des cardiomyocytes par la PE, augmente la proportion de la forme active de Ras¹⁴³. D'autres études plus récentes impliquent Ras dans l'activation de la synthèse des protéines par la PE¹⁴⁴. Cependant, malgré le rôle capital de Ras dans la médiation des réponses hypertrophiques, les mécanismes cellulaires demeurent mal compris.

1.4.3. Rôle des Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)

De façon générale, la voie de signalisation des MAPKs se caractérise par une série de kinases agissant de manière successive pour aboutir à la double phosphorylation et l'activation des kinases terminales p38, JNKs, et extracellular signal-regulated kinase (ERKs)¹⁴¹. Ces trois sous-groupes forment les trois branches majeures des voies de signalisation par les MAPKs. De plus, ces différents sous-groupes, activés dans les cardiomyocytes par des signaux neurohormonaux (Angiotensine II, Endothéline 1, catécholamines), vont jouer un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire au niveau du cœur^{145,146}. En effet, le traitement des cardiomyocytes par des α 1-agonistes tels que la PE, est le modèle principal pour l'induction des critères de l'hypertrophie : augmentation de la taille cellulaire, réorganisation du cytosquelette, et induction de certains gènes coeur-spécifiques. Cependant, les différentes voies impliquées dans ce réseau de signalisation sont loin d'être comprises, et plusieurs études demeurent contradictoires. *In vitro*, ceci peut s'expliquer par la présence de plusieurs paramètres, tels que les conditions de l'expérience et le stade de développement des cardiomyocytes.

1.4.3.1. Ras-Raf-MEK-ERK (Extracellular signal Regulated Kinase)

L'importance des MAPKs a commencé avec les premières études qui ont rapporté le rôle des ERKs dans la croissance mitogénique dans différents types cellulaires ¹⁴⁷. Depuis, plusieurs travaux ont impliqué ERK dans la voie de signalisation médiée par Ras, particulièrement Ras-Raf-MEK-ERK ¹⁴¹. Cette voie constituée de plusieurs protéines kinases, est hautement régulée par diverses interactions protéiques tout au long de la cascade ¹⁴⁸. Au niveau du cœur, ERK représente l'effecteur hypertrophique majeur ^{144,149}. En effet, MEK-ERK médie l'hypertrophie des cardiomyocytes adultes stimulés par les récepteurs α 1-adrénergiques ¹⁵⁰. De plus, des travaux ont rapporté l'implication de la voie Ras-ERK dans la stimulation de la synthèse protéique suite à des agents hypertrophiques tels que la PE ¹⁴⁴. Cependant, il serait prudent de noter que quelques travaux ont rapporté des résultats différents ou même contradictoires, dans lesquels ERK serait nécessaire pour médier l'action anti-hypertrophique de l'ANF ^{151,152}. Ces divergences peuvent résulter du fait que l'expression de ERK varie entre les cardiomyocytes néonataux ¹⁵³ et adultes ^{150,154}, avec un effet plus pro-hypertrophique à l'âge adulte.

Au niveau de la transcription, ERK facilite la phosphorylation de multiples régulateurs transcriptionnels tels que GATA-4 ¹⁵⁵, qui vont à leur tour contrôler l'expression de divers gènes cardiaques. Toutefois, malgré les évidences croissantes des rôles des MAPKs dans la régulation de l'expression génique, ni la surexpression de la forme active de Ras ou de ERK ¹⁵⁶, ni l'inhibition de MEK ¹⁵³, n'entraînent un changement au niveau de l'expression du gène de l'ANP induit par la PE, suggérant que les ERKs seuls ne suffisent pas à la médiation de la croissance hypertrophique et à l'expression génique qui s'en suit. De plus, la surexpression cœur-spécifique de la forme active de MEK1 ¹⁵⁷ et la surexpression de Ras ¹⁴² aboutissent à une hypertrophie concentrique et à un remodelage pathologique du ventricule respectivement. Ces phénotypes différents peuvent refléter une capacité à Ras d'induire d'autres voies.

1.4.3.2. C-Jun-NH2 terminal kinases (JNKs)

JNK représente le deuxième membre de la famille des MAPKs, et est activé par une variété de stress physiques, chimiques et biologiques ¹⁵⁸, d'où son nom de protéine kinase activée par le stress (Stress-Activated protein kinase, SAPK). Au niveau du cœur, la cascade médiée par JNK est peu caractérisée, L'activation de JNK par la PE place cette kinase comme membre potentiel pouvant contribuer à la réponse hypertrophique ¹⁵⁹. Les premières études concernant la cascade séquentielle des JNKs, implique Ras, une protéine qui lie le GTP, responsable de coupler et activer MEKK1 (MAPKKK) ; cette dernière va entraîner l'activation de MEK4 (MAPKK), aboutissant à l'activation finale de JNK (MAPK) ¹⁶⁰. JNK va à son tour phosphoryler c-Jun, qui va dimériser avec c-fos et résulter en l'activation de la transcription AP-1 dépendante ³⁸. En plus de l'activation Gq/11- dépendante de la voie des JNKs par la PE, des travaux ont également rapporté une activation partiellement dépendante par les G α 12/13 ³³. Le rôle de la cascade MEKK-JNKK-JNK dans la régulation de l'hypertrophie des cardiomyocytes reste toutefois mal défini. Des études par Bogoyevitch (1996), ont souligné que la surexpression de la forme active de MEKK1 induit une augmentation modeste de la taille des cellules, ainsi qu'une élévation de l'activité des promoteurs cardiaques (ANP, β MHC, α Ska), toutes deux des caractéristiques majeures de l'hypertrophie ¹⁶¹. De plus, des études par Ramirez et al. ¹⁴⁵, ont par la suite montré que Ras et c-JUN-NH2 médient, à travers MEKK et non Raf, la régulation de l'expression génique de l'ANF stimulée par la PE. En effet, en comparant l'activation de ERK avec celle de JNK suite à une stimulation α 1-adrénergique, ERK est activé dans les 5 minutes qui suivent ^{77,153} alors que JNK n'augmente que 20 minutes après ¹⁴⁵. Cette différence cinétique d'activation est en accord avec les études de Bokemeyer et al., qui ont montré que l'activation de JNK induit l'activité des MAP kinase phosphatase-1, une activité qui corrèle avec la diminution de l'activité des ERKs ¹⁶². Le maintien de JNK dans la progression de l'hypertrophie des cardiomyocytes peut s'expliquer par le

fait que les changements morphologiques et biochimiques qui en résultent, ne sont pas déclenchés immédiatement suite à la stimulation mais requièrent un certain temps. D'autres travaux ont rapporté par des études d'inactivation de gènes, que MEKK1, qui réprime de façon spécifique l'activité de JNK, est essentiel pour l'hypertrophie cardiaque ¹⁶³; ceci est consistant avec un rôle de JNK dans l'hypertrophie. Cependant, des travaux par Liang et al. ont démontré par des pertes de fonctions un rôle anti-hypertrophique de JNK ¹⁶⁴. Ainsi, malgré les nombreuses études qui impliquent cette protéine dans les maladies cardiovasculaires, la relation entre l'activation de JNK et la fonction cardiaque dans l'hypertrophie reste à déterminer.

1.4.3.3. p38 mitogen activated protein kinases (p38Ks)

La p38 kinase représente le membre le plus récent des MAPKs ; sa place et son rôle dans la cascade sont encore sous investigation. Dans un cœur intact, la p38 kinase est activée par tout genre de stress dont l'ischémie et ischémie/réperfusion ^{161,165}, et le stress oxydatif ¹⁶⁶. MKK3 ¹⁶⁷ et MKK6 ¹⁶⁸, deux membres en amont de la p38, ont été caractérisés et activent spécifiquement la p38. Des études controversées demeurent quant au rôle exact de la p38, à savoir si cette protéine a un rôle protecteur ou médiateur de l'hypertrophie. Les premières études ont montré l'élévation et la contribution de la p38 dans l'effet de protection contre le préconditionnement ⁷⁷. En contraste, des études plus récentes reportent le rôle central de la p38 dans l'hypertrophie. En effet, la surexpression de MKK6 ¹⁵¹, ou MKK3 ¹⁶⁹, entraîne l'augmentation de la taille cellulaire, l'induction de l'activité des promoteurs (ANP, BNP et α -SkA) et une réorganisation sarcomérique; des changements qui permettent de recréer le même phénotype qu'avec une stimulation à la PE. Ceci démontre donc le rôle capital de MKK6 et p38 dans la régulation de l'hypertrophie. D'autres études suggèrent que la cascade de la p38-MAPK est nécessaire au maintien des cellules durant l'hypertrophie, plutôt qu'à l'effet directe dans la stimulation de la réponse hypertrophique ¹⁷⁰. Cet effet cytoprotecteur se fait à travers la

phosphorylation des HSP25/27 (heat shock protein) et entraîne une désagrégation associée avec la protection de l'actine squelettique ¹⁷⁰. Par ailleurs, les travaux de ¹⁷¹, ont montré que l'agoniste hypertrophique PE qui stimule la phosphorylation et l'activité de liaison de CREB, implique de multiples voies de signalisation à savoir ERKs, p38MAPK, MSK1 et PKA.

1.4.4. Le calcium, un second messager critique

Le calcium (Ca^{2+}) joue un rôle critique comme second messager dans la signalisation cellulaire. En effet, la concentration intracellulaire du calcium est hautement régulée pour maintenir des fonctions physiologiques telles que la contractilité cardiaque, squelettique et le relâchement des hormones. L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire entraîne l'activation de multiples cascades régulées par divers enzymes. Ces derniers possèdent des localisations cellulaires différentes et répondent, par conséquent, différemment à la mobilisation du Ca^{2+} . De plus, plusieurs études impliquent l'amplitude et la fréquence du signal de Ca^{2+} comme déterminant-clé des différentes réponses transcriptionnelles. En effet, CaMK (Calmodulin-dependent protein kinase), médiatrice ubiquitaire du Ca^{2+} ¹⁷², se voit activée en réponse à une fréquence forte et irrégulière du Ca^{2+} ¹⁷³; en contraste, la calcineurine est activée suite à une fréquence de Ca^{2+} faible et soutenue ¹⁷⁴. Toutes les deux ont des rôles importants et synergétiques au niveau de la régulation transcriptionnelle des cardiomyocytes ¹⁷⁵.

1.4.4.1. Rôle de CaMK dans la transcription génique et l'hypertrophie

Les CaMKs qui appartiennent à la famille des sérine/thréonine, sont exprimées dans une grande variété de tissus. Cependant, au niveau du cœur, CaMKII représente l'isoforme majeur ¹⁷². Plusieurs études impliquent particulièrement les différents variants de CaMKII δ , δB et δC , localisés au noyau et dans le cytoplasme respectivement ^{176,177}. Le rôle des CaMKs dans la

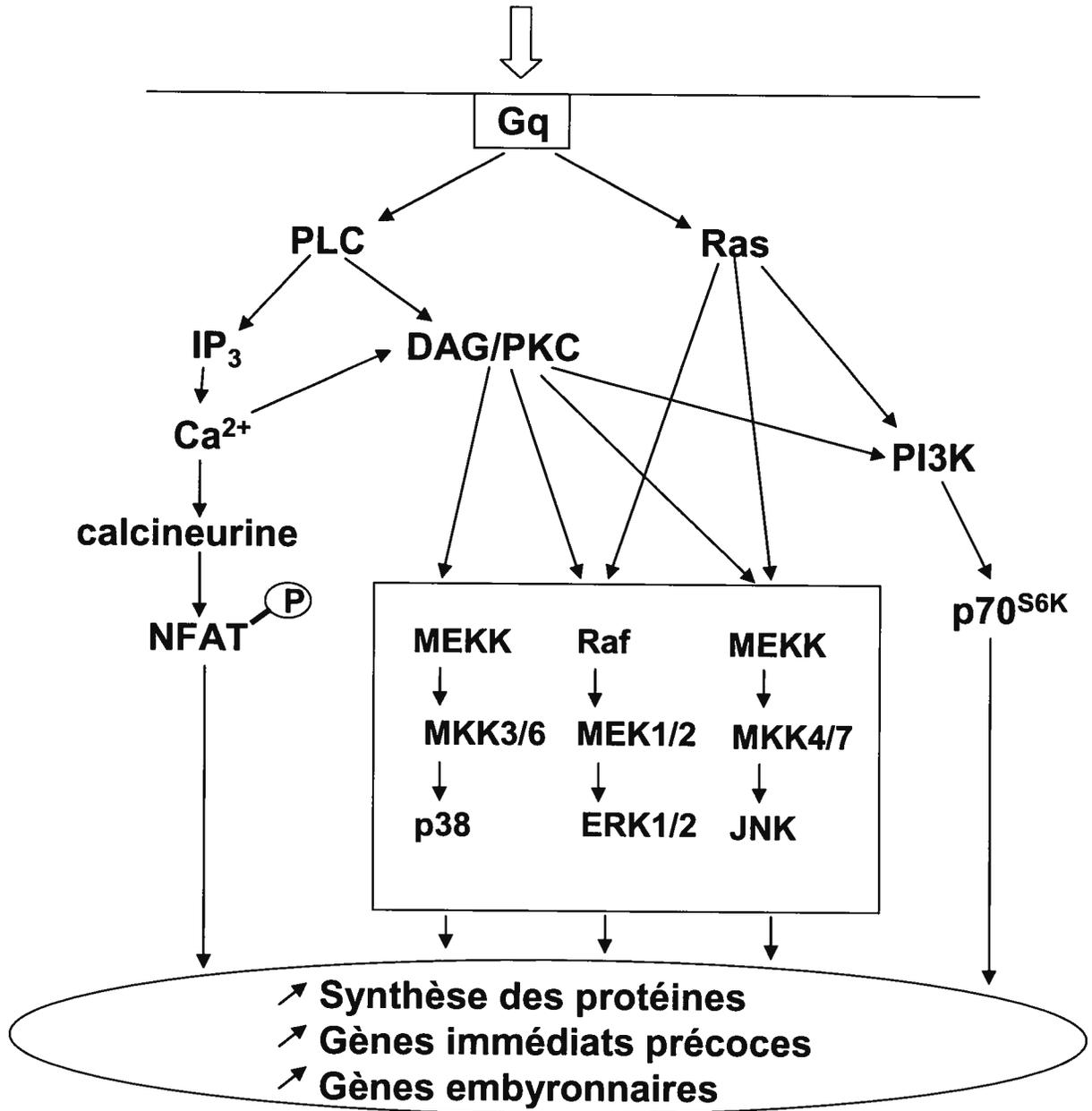
régulation de l'expression génique a été rapporté à travers l'activation de multiple facteurs de transcription, dont l'activation de SRF ¹⁷⁸, AP-1 ¹⁷⁹ et MEF ¹⁷⁵. D'autres études avec des cardiomyocytes isolés ont impliqué CaMKII dans l'hypertrophie cardiaque induite par des agonistes tels que l'endothéline-1 et la PE ^{177,180,181}. De plus, des études plus récentes ont montré une hypertrophie cardiaque chez des souris transgéniques surexprimant CaMKII δ B ¹⁸². Ces différentes études soulignent l'importance croissante de la voie des CaMKs dans la régulation de l'expression génique de gènes impliqués dans l'hypertrophie cardiaque.

1.4.4.2. Rôle de la calcineurine dans l'hypertrophie

La calcineurine est une protéine phosphatase activée par des élévations constantes de calcium intracellulaire. Plusieurs études ont impliqué la calcineurine dans l'induction de l'hypertrophie cardiaque. En effet, des études *in vitro* de la surexpression de la calcineurine dans des cardiomyocytes néonataux via des adénovirus, entraîne une hypertrophie ¹⁸³. De plus, la cyclosporine A, inhibiteur de la calcineurine, diminue la réponse hypertrophique des cardiomyocytes induite par des agents tels que la PE et l'endothéline-1 ^{47,181}. D'autres études *in vivo* de surexpression coeur-spécifique d'un mutant constitutivement actif de la calcineurine, entraîne également une hypertrophie ⁴⁷.

Ainsi, les nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, ont permis d'identifier les divers seconds messagers impliqués dans la réponse hypertrophique. Toutefois, la régulation ultime se fait au niveau nucléaire, où ces diverses cascades convergent vers des mécanismes transcriptionnels impliquant l'activation des facteurs de transcription, et les interactions combinatoires qui en résultent. Une étude détaillée de la régulation du promoteur de l'ANF, marqueur universel de l'hypertrophie, ainsi que des divers facteurs de transcription impliqués dans cette régulation génique, sera présentée (figure 3).

Récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques



Voies de signalisation des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques

1.5. REGULATION DE LA TRANSCRIPTION CARDIAQUE DURANT L'HYPERTROPHIE

Sur plus d'une décennie, un grand nombre d'études s'est intéressé aux différentes signalisations intracellulaires qui relient l'activation du récepteur présent à la surface de la cellule, avec l'expression génique et la croissance hypertrophique qui l'accompagne ¹⁸⁴. *In vitro*, la stimulation d'une culture primaire de cardiomyocytes ventriculaires néonataux par des agents pro-hypertrophiques, et notamment les agonistes α 1-adrénergiques, représente le modèle classique pour l'activation de plusieurs gènes cardiaques. *In vivo*, des modèles transgéniques ont permis d'élucider une multitude de voies majeures aboutissant à l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque ¹⁸⁵. Ce mécanisme de réinduction de gènes dépend d'une part du stimulus utilisé, et d'autre part des sites de liaison et des facteurs de transcription impliqués. En effet, parmi les divers gènes cibles des voies adrénériques, l'induction des gènes précoces immédiats tels que c-fos et c-jun, la réactivation de gènes embryonnaires tels que l'ANF (atrial natriuretic factor), β -MHC (β -myosin heavy chain), et skeletal actin (α -SkA), ainsi que l'augmentation de la régulation de certains facteurs de transcription tissu-spécifiques, représentent les caractéristiques hypertrophiques principales au niveau de l'expression génique.

1.5.1. Induction des gènes précoces immédiats

Il est généralement accepté que le promoteur du gène c-fos et particulièrement les deux éléments majeurs de sa région promotrice, CRE (cAMP response element) et SRE (serum response element), sont stimulés par des facteurs de croissance via la phosphorylation des facteurs de transcription CREB et SRF, entraînant ainsi l'expression du proto-oncogène c-fos dans divers systèmes ^{186,187}. La protéine c-FOS qui en résulte, forme un hétérodimère avec c-JUN via le domaine leucine zipper qui va lier le site consensus (TGACTCA) de AP-1. Ce dernier fonctionne comme facteur de transcription responsable de

réguler la prolifération et la différenciation cellulaire ^{188,189}. Au niveau du cœur, plusieurs modèles expérimentaux ont montré une corrélation entre la formation de AP-1 et la croissance hypertrophique suite à une stimulation des cardiomyocytes par l'angiotensine II et les β -agonistes d'une part ^{39,190,191}, et par la PE d'autre part ¹⁹². De plus, une étude très récente par Taimor et al. compare l'effet de deux stimuli (α et β -agonistes) sur l'activité de AP-1 ¹⁹³. Cette étude montre pour la première fois de façon directe, que AP-1 est un médiateur essentiel de la croissance des cardiomyocytes suite à une stimulation α 1-adrénergique. Les nombreuses études sur c-fos ne déterminent cependant pas si c-fos représente un effecteur direct de la réponse hypertrophique, ou s'il fait partie d'une cascade responsable d'entraîner d'autres mécanismes transcriptionnels pour aboutir à une réponse finale. Ce n'est que récemment qu'on a commencé à adresser les interactions de c-fos avec des facteurs de transcription. En effet, plusieurs études ont rapporté une réactivation du gène c-fos et une augmentation du facteur de transcription GATA-4 dans le cas d'une hypertrophie ^{155,194}. Plus récemment, notre laboratoire a identifié une nouvelle voie impliquée dans la transcription par c-fos, à travers l'induction de l'activité transcriptionnelle de GATA-4, un régulateur cardiaque majeur ¹⁹⁵, favorisant ainsi un rôle médiateur pour ces gènes immédiats précoces, qui à leur tour seraient responsables d'activer des facteurs de transcription et réguler d'autres gènes pour aboutir à une réponse finale.

1.5.2. L'ANF un modèle puissant pour analyser la transcription cardiaque

Le facteur natriurétique des oreillettes (ANF) est un peptide hormonal cardiaque possédant des propriétés natriurétiques, diurétiques et vasodilatatrices. Suite à un stress mécanique ou neurohormonal, des mécanismes compensateurs sont déclenchés. Ils entraînent une hypertrophie myocardique qui vise à réduire la contrainte imposée au cœur et diminuer l'énergie consommée ¹⁹⁶. Sur le plan cellulaire, l'activation d'un mécanisme de contre-régulation via les peptides natriurétiques (ANP et BNP) va exercer un effet vasodilatateur. Mais

éventuellement, cette situation de compensation progresse et se transforme en hypertrophie pathologique marquée par une augmentation de la taille des cellules, et sur le plan transcriptionnel par l'activation des gènes embryonnaires. La ré-expression de l'ANF est donc un marqueur spécifique de la réponse hypertrophique ¹⁹⁷, et l'étude du promoteur a été capitale dans la compréhension des différents mécanismes impliqués dans la régulation spatio-temporelle de l'expression des divers gènes cardiaques. Le profil d'expression de ce gène est particulier ; il est présent aussi bien dans les oreillettes que dans les ventricules durant le développement, cependant son expression postnatale se voit limitée aux oreillettes ¹⁹⁸. L'étude détaillée des différents éléments de réponse présents dans les premières 700 pb du promoteur, montrées suffisantes pour récapituler le profil d'expression cardiaque, a permis d'identifier des éléments importants pour la réponse tissu-spécifique d'une part, tels que GATA, SRE et NKE et pour la réponse inductive telle que le site AP-1, d'autre part. Par ailleurs, certains sites impliqués dans la réponse tissu-spécifique à l'origine, sont aussi impliqués dans la réponse hormonale, tels que SRE et GATA ¹⁹⁹, et pourraient donc être à l'origine de la réinduction de certains gènes embryonnaires, impliquée dans l'hypertrophie pathologique.

1.5.2.1. Les éléments GATA

Les éléments GATA, caractérisés par la séquence (A/T)GATA(A/G), ont été identifiés dans les promoteurs de plusieurs gènes. Au niveau du coeur, l'élément GATA est présent sur le promoteur du BNP (Brain Natriuretic Factor), identifié par le groupe Grépin ²⁰⁰, et médie l'activation de l'expression génique de ce promoteur suite à un stress hémodynamique ²⁰¹, et à une stimulation par des agonistes β -adrénergiques ²⁰². GATA a également été montré présent dans les promoteurs de la chaîne lourde α de myosine (α MHC) ²⁰³ et β -MHC ²⁰⁴, et notamment au niveau de l'ANF ²⁰⁰. En effet, deux éléments GATA, conservés parmi les différentes espèces, se sont avérés nécessaires à l'activité maximale des 700 premières paires de bases (pb) du promoteur de l'ANF : le GATA

proximal à -120 pb et le GATA distal à -280 pb ²⁰⁵. Ces éléments, qui lient les protéines à deux doigts de zinc appartenant à la famille GATA, sont principalement impliqués dans la réponse tissu-spécifique.

La famille GATA est constituée de six membres (GATA1-6) impliqués dans l'expression tissu-spécifique de certains gènes, et dans la différenciation cellulaire ²⁰⁶. Parmi les six membres identifiés, seuls GATA-4, -5 et -6 sont exprimés dans le cœur ²⁰⁷ et possèdent une grande homologie au niveau de leur séquence d'acides aminés, notamment dans le domaine de liaison à l'ADN ²⁰⁵. Ces facteurs jouent un rôle crucial durant le développement embryonnaire. L'expression de GATA-4 durant le développement précoce, fait de ce facteur un marqueur essentiel des cellules cardiaques. En effet, notre laboratoire a rapporté pour la première fois, à l'aide d'une stratégie antisens dans les cellules P19 (qui ont la capacité de se différencier en cellules cardiaques), l'implication de GATA-4 dans la différenciation cardiaque ^{208,209}. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de réguler les divers gènes impliqués dans la cardiogenèse demeurent sous investigation. Plusieurs travaux ont souligné l'importance des interactions des facteurs GATA-4 avec d'autres protéines, et l'implication de ces interactions combinatoires dans la régulation transcriptionnelle tant au niveau physiologique que pathologique (détaillées dans la section 1.5.3.1.).

1.5.2.2. La boîte CArG (ou SRE)

Les boîtes CArG identifiées par la séquence CC(A/T)6GG, représentent des éléments régulateurs importants dans l'activité transcriptionnelle des gènes musculaires. En effet, ces éléments de régulation sont présents dans plusieurs promoteurs et divers modèles animaux ; tels que α -cardiac actin (α -CA) chez la souris ²¹⁰, chez le Xénope ²¹¹, chez l'humain ²¹² et chez le poulet ²¹³ ; mais aussi dans α -skeletal actin (α -SKA) ²¹⁴, et particulièrement dans l'ANF ^{198,215} où des études récentes chez le Xénope ont également identifié un site CArG ²¹⁶. Les

boites CARG sont requises pour l'activité de ces promoteurs et dépendent de la liaison avec le facteur de réponse au sérum (SRF). SRF, membre de la famille des MADS ²¹⁷, joue un rôle important dans la différenciation musculaire, ainsi que dans la médiation de la réponse immédiate des gènes précoces au sérum, et donc de la croissance ²¹⁸ (voir détails dans section 1.5.3.4.).

Sur le promoteur de l'ANF, deux sites SRE ont été identifiés : un site distal à -400 pb et un site proximal de basse affinité, dont la séquence est CTTTAAAAGG. Ce dernier, situé à -122 pb, est responsable de contrôler l'activité des premières 135 pb du promoteur de l'ANF à travers la liaison de la protéine SRF, et a la capacité de moduler d'autres facteurs de transcription dans le but d'augmenter la transcription ²¹⁹. De plus, ce site de basse affinité s'est avéré essentiel dans la médiation des voies hypertrophiques suite à une stimulation par des α 1-agonistes ^{215,220}, des études consistantes avec nos résultats actuels.

1.5.2.3. L'élément A/T riche distal

En plus du site SRE de basse affinité, le promoteur (-700pb) de l'ANF contient une autre séquence A/T riche (CTAAAAAATATAATA) située dans la région distale (-580pb). L'identité de la protéine qui lie ce site n'est pas encore déterminée, mais il semble être un site de basse affinité pour les protéines MEF-2 ²²¹. Chez les vertébrés, quatre membres ont été identifiés : MEF2-A, MEF2-B, MEF2-C, et MEF2-D. Cependant, seul MEF2-C est impliqué dans la régulation transcriptionnelle dans le cœur. En effet, l'inactivation de MEF2-C entraîne un arrêt du "looping" cardiaque et de la formation du ventricule droit durant le développement, ainsi qu'une diminution de la régulation de certains gènes cardiaques ^{222,223}. Son implication potentielle dans le cœur fait l'objet de nombreuses études actuellement et sera présentée en détail dans la section 1.5.3.2.

1.5.2.4. L'élément PERE

Notre laboratoire a identifié un nouvel élément régulateur PERE (Phenylephrine response element), responsable de médier l'action des agonistes α 1-adrénergiques sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'ANF. Son rôle dans d'autres promoteurs cardiaques est présentement sous investigation. Cet élément situé à -70pb sur le promoteur de l'ANF, caractérisé par la séquence GGGGAGGG²²⁴, est parfaitement conservé chez divers espèces, suggérant un rôle important conservé à travers l'évolution. De plus, un site PERE-like a été identifié à -180 pb. Une nouvelle protéine identifiée dans notre laboratoire sous le nom de PEX1 (Phenylephrine induced-complex) (Debrus et al, in progress) interagit avec PERE suggérant son implication nucléaire dans la voie α 1-adrénergique.

En effet, des études par Debrus et al. (en progrès) ont montré que l'ARNm de PEX1 est augmenté dans les cardiomyocytes stimulés avec des agonistes α 1-adrénergiques, et que cette induction est concomitante avec l'ARNm de l'ANF. De plus, l'expression dynamique de PEX1 durant le développement cardiaque coïncide parfaitement avec celle de l'ANF, et leur profil d'expression dans un cœur hypertrophié est très similaire. Ces études montrent que PEX1 fait partie d'un complexe nucléaire qui lie PERE sur le promoteur de l'ANF. Cependant, le rôle de PEX1 dans le développement cardiaque et pathologique ainsi que les divers partenaires qui y participent demeurent à élucider.

1.5.3. Implication des facteurs de transcription dans la réponse hypertrophique

Tel que mentionné précédemment, l'hypertrophie cardiaque est accompagnée d'une re-programmation génétique, incluant la ré-expression de certains gènes embryonnaires. L'induction du gène de l'ANF suite à une stimulation α 1-adrénergique, sert de modèle *in vitro* pour l'expression génique durant l'hypertrophie cardiaque. Cependant, les mécanismes de régulation à la

base de cette expression génique demeurent incertains. Les nombreuses études durant la dernière décennie ont mis en évidence l'importance des facteurs de transcription dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des gènes cardiaques durant la croissance normale et pathologique. Les facteurs impliqués dans l'hypertrophie cardiaque, appartiennent généralement à plusieurs grandes familles de facteurs de transcription, notamment la famille GATA, la famille des MADS et la famille des NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) ²²⁵.

1.5.3.1. Les facteurs de transcription GATA

La famille des facteurs de transcription GATA, formée de six membres (GATA-1-6), est caractérisée par les deux doigts de zinc conservés et responsables de la liaison spécifique à l'ADN. Malgré l'importance des GATA-1-2-3 dans la régulation des cellules souches hématopoïétiques ^{226,227}, GATA-4-5-6 sont exprimés dans divers tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme et notamment au niveau du cœur ²²⁸. Les protéines GATA-4 jouent un rôle clé dans l'expression des gènes cardiaques. Ces protéines subissent des modifications post-traductionnelles qui viennent affecter leur capacité d'interagir avec l'ADN et/ou leur localisation dans les cardiomyocytes, ainsi que leurs divers rôles dans les réseaux de régulation cardiaque. Plusieurs études ont montré que le traitement des cardiomyocytes néonataux par un agoniste α 1-adrénérgique tel que la PE, aboutit à une augmentation de la phosphorylation de GATA-4, accompagnée d'une capacité plus grande de liaison à l'ADN ²²⁹. Dans le modèle murin, cette phosphorylation au niveau de la Ser-105 serait médiée par la voie des MAPKs et notamment ERK ¹⁵⁵. De plus, en remontant dans la cascade, RhoA serait le premier membre dans cette hiérarchie, responsable de médier la réponse hypertrophique ^{194,230}. En plus de la voie des MAPKs, GATA-4 a également été montré comme la cible des GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β). En effet, GSK-3 β fonctionne comme un régulateur négatif de l'hypertrophie cardiaque ; il interagit physiquement avec GATA-4, entraîne une phosphorylation du domaine N-terminal de ce dernier, et empêche la transcription GATA-4-

dépendante ²³¹. GATA-4 peut également subir d'autres modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation. En effet, des études récentes ont montré que GATA-4 peut être régulé dans les cardiomyocytes hypertrophiés via une acétylation à travers des mécanismes p300-dépendants. Suite à une stimulation à la PE, une augmentation de l'expression de p300 ainsi que du niveau de GATA-4 acétylé est observé ²³². De plus, des souris transgéniques surexprimant p300 dans le cœur développent une hypertrophie cardiaque associée avec une augmentation de GATA-4 acétylé et de sa liaison à l'ADN ²³². En ce qui concerne les différentes interactions protéines –protéines, plusieurs études ont travaillé sur la coopération de GATA-4 avec de nombreux facteurs de transcriptions tels que FOG-2 ²³³, GATA-6 ²³⁴, Nkx2.5 ^{235,236} SRF ^{199,237}. De surcroît, les études récentes s'intéressent de plus en plus aux différents complexes que forment ces facteurs de transcription et aux interactions combinatoires qui en résultent ^{199,238}. Ces dernières seront élaborées davantage dans la discussion.

1.5.3.2. Les facteurs de transcription MEF2

En plus de la régulation de certains gènes cardiaques durant le développement, MEF2-C est également impliqué dans la régulation transcriptionnelle dans les coeurs postnataux ²³⁹. En effet, ce facteur de transcription a la capacité de réguler l'expression des gènes inductibles durant l'hypertrophie cardiaque, notamment le promoteur MLC2 (myosin light chain-2) ²⁴⁰. Plusieurs études ont essayé de comprendre les différents mécanismes par lesquels MEF2 agit durant l'hypertrophie. Un grand nombre d'études a suggéré l'implication de la p38-MAPK dans l'hypertrophie à travers la phosphorylation de MEF2 ²⁴¹. D'autres études suggèrent la voie des ERK5- MEF2 comme voie potentielle ; en effet, ERK5 participe dans la régulation du gène c-fos en réponse à des agents de croissance d'une part ²⁴², et plus récemment, une autre étude a montré l'activation de ERK5 dans les cardiomyocytes stimulés à la PE ²⁴³. De plus, malgré l'implication de la voie PI3K-Akt-MEF2 dans la différenciation

du muscle squelettique^{244,245} des études ont montré qu'une surexpression de la forme active de PI3K ou Akt se manifeste par une augmentation de la taille des cardiomyocytes sans affecter la fonction cardiaque¹¹⁵, ce qui pourrait suggérer une participation partielle durant l'hypertrophie cardiaque. Finalement, MEF2 est un effecteur essentiel dans la voie de signalisation du calcium. En effet, les CaMKs impliquées dans l'hypertrophie¹⁷⁵, phosphorylent les HDACs (histone deacetylases) résultant en la dissociation du complexe HDAC-MEF2 et la répression de l'expression génique induite par MEF2¹⁸². En plus des différentes voies de signalisation qui convergent d'une part vers MEF2, les divers partenaires de ce facteur de transcription viennent rajouter à la complexité de ce réseau de régulation cardiaque. En effet, MEF2 interagit avec plusieurs protéines et notamment GATA-4 pour réguler le promoteur de l'ANF²²¹; une interaction qui pourrait être aussi impliquée dans l'hypertrophie cardiaque.

1.5.3.3. Le facteur de transcription NFAT

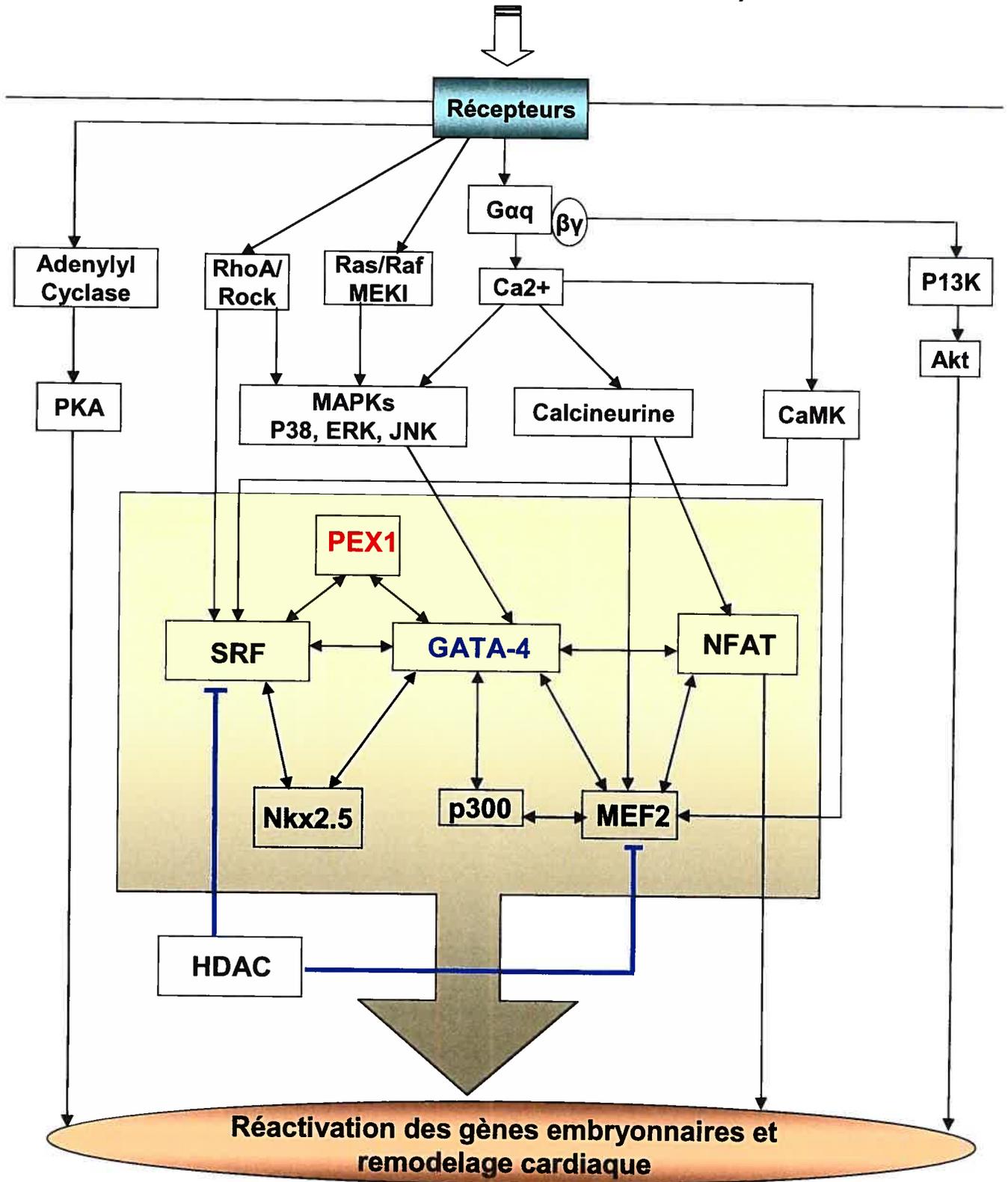
Les NFATs (Nuclear factors of activated T cells) appartiennent à une famille multigénique de facteurs de transcription, présents dans le cytoplasme à l'état basal. En présence de calcium, les NFATs sont déphosphorylés par la calcineurine, et transloqués au noyau, où ils agissent comme facteurs de transcription²⁴⁶. Parmi les 5 membres de la famille NFAT caractérisés, 4 membres (NFATc1-4) sont régulés par l'activité de la calcineurine²⁴⁷. Au niveau nucléaire, NFATc est régulé par plusieurs co-facteurs, notamment AP-1, GATA-4 and MEF2, pour stabiliser son interaction avec l'ADN²⁴⁷. Au noyau, NFATc est sous l'influence de diverses voies de signalisation impliquant majoritairement des kinases telles que les MAPKs, et permettant ainsi sa phosphorylation et son exportation vers le cytoplasme²⁴⁸. L'implication de NFATc4 dans l'hypertrophie cardiaque est actuellement acceptée. Des études de transgéniques ont montré que la surexpression cœur-spécifique de NFATc4 entraîne une hypertrophie cardiaque avancée, et dans certains cas la mort subite²⁴⁸. Cependant, la régulation calcium-dépendante de NFATc demeure incertaine, et la source de

calcium impliquée est sous-investigation. Quelques travaux ont étudié l'effet des agents hypertrophiques sur la voie calcineurine-NFATc, et ont remarqué qu'une inhibition spécifique de la calcineurine bloque l'hypertrophie des cardiomyocytes stimulés par des agonistes ²⁴⁹, mais les mécanismes d'action sont encore à déterminer.

1.5.3.4. Le facteur de transcription SRF

Serum response element (SRF) représente un des membres fondateurs de la famille des facteurs de transcription à boîte MADS. Ce facteur hautement exprimé durant l'embryogenèse, joue un rôle essentiel dans la différenciation du muscle squelettique et cardiaque ²¹⁹. Il régule une grande variété de gènes associés avec la croissance et la différenciation cellulaire. Il agit sous forme d'homodimère par une interaction au site consensus de SRE, ou encore la boîte CArG ²⁵⁰. Au niveau du cœur, SRF joue un rôle capital dans le contrôle et le maintien du programme cardiaque, démontré par l'étude de Arsenian et al., où une inactivation du gène de SRF empêche la différenciation du mésoderme et le développement cardiaque ²⁵¹. En contraste, une surexpression cœur-spécifique de SRF entraîne une cardiomyopathie hypertrophique suivie d'une insuffisance cardiaque dans le modèle murin ²⁵². D'autres études ont identifié l'importance des gènes cardiaques cibles tels que l'ANF, qui ont par la suite permis d'identifier les interactions distinctes de SRF avec d'autres protéines régulatrices cardiaques comme GATA-4, Nkx2.5 et TEF-1 et myocardine ^{210,237,253,254}. De surcroît, de plus en plus d'évidence associent les complexes protéiques contenant SRF, avec les réponses hypertrophiques médiées par la réinduction des gènes embryonnaires tels que l'ANF, skeletal α -actin et β -MHC ^{220,255,256} cependant les voies exactes impliquées dans la traduction des signaux intracellulaires en réponses hypertrophiques demeurent partiellement déterminées (Figure 4).

Signaux neurohormonaux (ANGII, ET-1, catécholamines)



1.6. DESCRIPTION DU PROJET

Par conséquent, la régulation de l'expression des gènes cardiaques durant le développement normal et pathologique est contrôlée en grande partie au niveau transcriptionnel. Dans des conditions de stress, une réponse hypertrophique est déclenchée dans les cellules musculaires cardiaques entraînant une réactivation ventriculaire du gène de l'ANF. Cette réexpression représente le marqueur universel de l'hypertrophie cardiaque causée par une variété de stimuli incluant surcharge cardiaque²⁵⁷, étirement mécanique²⁵⁸, et une stimulation α 1-adrénergique²²⁴. Les premières 700 pb du promoteur de l'ANF de rat sont suffisantes pour récapituler la régulation spatio-temporelle du gène endogène dans les cardiomyocytes en culture¹⁹⁸, et dans les souris transgéniques²⁵⁹. Cependant, étant donné les nombreux éléments de réponse présents sur le promoteur de l'ANF, les mécanismes qui relient les activités transcriptionnelles suite à une stimulation α 1-adrénergique à la réponse hypertrophique même, demeurent inconnus. De plus, il reste à déterminer si l'activation de l'ANF résulte des produits des gènes précoces immédiats ou si elle est régulée par une combinaison de facteurs de transcription indépendants. En effet, des études dans notre laboratoire ont identifié pour la première fois un élément de réponse PERE (Phenylephrine response element) dans le promoteur de l'ANF, responsable de médier l'activation transcriptionnelle de ce dernier suite à une stimulation α 1-adrénergique²²⁴. Cet élément de réponse représenté par la séquence GGGGAGGG, est parfaitement conservé entre les gènes de l'ANF des différentes espèces, renforçant l'importance de son rôle dans la régulation de l'ANF. Cette étude a représenté la première étape dans l'identification d'une nouvelle voie permettant la réactivation du gène de l'ANF. Dans le but d'élucider davantage ce mécanisme, des études préliminaires dans le laboratoire ont permis la caractérisation de protéines pouvant lier le site PERE, qui ont été appelées PEX1s (phenylephrine induced complexes)²²⁴. Cette caractérisation préliminaire s'est poursuivie par une étude plus approfondie pour isoler le/les

facteur(s) de transcription en question. Par le système du simple hybride ²⁶⁰ et à travers une librairie de cDNA de cardiomyocytes, notre laboratoire a isolé le cDNA d'un nouveau facteur de transcription PEX1 à plusieurs doigts de Zinc, appartenant à la famille Kruppel et qui lie le site PERE (Debrus et al, in progress).

Sachant que les voies α 1-adrénergiques sont impliquées dans la croissance et l'hypertrophie cardiaque, et que l'ANF représente un bon modèle d'étude de la régulation de la transcription cardiaque, le but de cette étude visait à élucider les partenaires potentiels de PEX1 sur l'ANF. Deux régulateurs cardiaques essentiels GATA-4 et SRF, impliqués dans les voies médiées par les RCPG d'une part, et dans l'hypertrophie d'autre part, semblaient des candidats potentiels. Par des études de structure-fonction, nous avons déterminé des interactions combinatoires entre GATA, SRF et PEX1, capables de moduler l'activation de l'ANF, ainsi que d'autres gènes cardiaques.

CHAPITRE II. ARTICLE

AN α 1-ADREBERGIC INDUCIBLE ZINC FINGER PROTEIN IS A GATA-4/SRF COFACTOR

Loulwa Rahbani^{1,3}, Sophie Debrus¹, et Mona Nemer^{1,2,3*}

¹Laboratoire de développement et différenciation cardiaques
Institut de Recherches cliniques de Montreal
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

***Corresponding author.** Mailing address : Institut de Recherches cliniques de Montreal, 110avenue des Pins Ouest, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7.
Phone : (514) 987-5680. Fax : (514)987-5575. XXXXXXXXXX

Manuscript in preparation for Molecular and Cellular Biology

Résumé

Une grande variété d'effets biologiques est médiée par les récepteurs α 1-adrénergiques (α 1-AdRs) qui appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Au niveau du cœur, les voies de signalisation α 1-adrénergiques ont été impliquées dans la régulation de la croissance et de la contractilité des cardiomyocytes, ainsi que dans la pathogenèse de l'hypertrophie cardiaque *in vivo*. Au niveau moléculaire, l'hypertrophie est caractérisée par une reprogrammation génétique par laquelle la réinduction de l'ANF (facteur natriurétique des oreillettes) est le marqueur universel. Pour cette raison, le promoteur cardiaque de l'ANF est largement utilisé pour élucider les mécanismes transcriptionnels au cours du développement et de la pathogenèse cardiaques. Nous avons précédemment montré que la capacité de réponse du promoteur de l'ANF à l'Endothéline1, une hormone hypertrophique qui agit également via les RCPG, nécessite l'action combinée de deux facteurs de transcription, SRF et GATA-4, qui forment un complexe ternaire sur le promoteur proximal de l'ANF. De plus, nous avons trouvé que les agonistes α 1-adrénergiques ciblent aussi les sites GATA/SRE ainsi qu'un autre élément adjacent, PERE (Phenylephrine Response Element), qui lie un facteur de transcription PEX1, récemment identifié au laboratoire. Les résultats présentés ici démontrent que PEX1 reconstitue l'activité du promoteur de l'ANF lorsque co-transfecté avec SRF ou GATA-4 dans des cellules non-cardiaques, et qu'une activation maximale est atteinte en présence des trois protéines. Des études de structure-fonction ainsi que d'interactions protéines-protéines *in vitro*, ont permis de démontrer que PEX1 interagit physiquement avec SRF et GATA-4. De plus, la capacité de ces protéines à coopérer pour activer la transcription des gènes cardiaques ne se limite pas à l'ANF. Compte tenu que l'expression de PEX1 est induite par les agonistes α 1-adrénergiques, PEX1 pourrait agir comme un cofacteur inductible du complexe SRF/GATA, et contribuer à la régulation de l'expression de plusieurs gènes cardiaques cibles de la voie adrénérergique.

Mots clés : récepteurs α 1-adrénergiques, transcription dans le coeur, facteurs GATA, SRF, hypertrophie.

Abstract

A wide variety of biological effects are mediated by the G-protein coupled α 1-adrenergic receptors (α 1-AdRs). At the level of the heart, α 1-adrenergic signaling has been implicated in the regulation of myocyte growth and contractility, and in the pathogenesis of cardiac hypertrophy *in vivo*. The cardiac ANF promoter is commonly used to clarify the possible nuclear pathways that mediate cell-specific transcriptional responses. The objective of this study was to elucidate nuclear signaling by α 1-adrenergic agonists using the ANF promoter as transcriptional target. We have previously shown that the responsiveness of the ANF promoter to Endothelin1, a hypertrophic agent, which also acts through a GPCR, required the combined action of serum response factor (SRF) and the tissue-specific GATA-4 protein, which form a ternary complex over a 30-bp cis element harboring juxtaposed SRF and GATA binding sites. We found that α 1-agonists also target the composite GATA/SRE site as well as another cis-regulatory element within the proximal promoter termed PERE. We recently identified a novel protein of the Kruppel family (PEX1), which recognizes the PERE element. In this study, we provide evidence, using transient transfection of HeLa cells and structure-function studies, that PEX1 enhances ANF promoter activation when co-transfected with either SRF or GATA-4, and that maximal activation is achieved in presence of all three proteins. In addition, pull-down experiments revealed that PEX1 physically interacts with both SRF and GATA-4, suggesting that it may act as an inducible cofactor to the SRF/GATA complex. The capacity of these proteins to induce cardiac gene expression is not limited to the ANF promoter and is observed on other α 1-inducible genes such as α -cardiac actin (α -CA), α -skeletal actin (α -SkA) and β -Myosin heavy chain (β -MHC). We propose that PEX1 acts as an α 1-inducible cofactor that mediates the nuclear action of α 1-adrenergic receptors in the heart, and likely other target organs.

Keywords: α 1-adrenergic receptors, heart transcription, GATA factors, SRF, hypertrophy.

INTRODUCTION

A wide variety of biological effects are mediated by the G-protein coupled α 1-adrenergic receptors (α 1-AdRs). Many of them play important roles in the mediation of sympathetic nervous system responses, particularly those involved in cardiovascular homeostasis. Moreover, α 1-adrenergic signaling in the heart has been implicated in the regulation of myocyte growth and contractility, and in the pathogenesis of cardiac hypertrophy *in vivo*¹⁻⁴. Stimulation of α 1-AdRs results in the activation of many signal transduction pathways including the phosphatidylinositol 3-kinases (PI₃-K)^{5,6}, mitogen-activated kinases (MAPKs)⁷, and calcium-mediated signaling^{8,9}, all of which have been shown to mediate hypertrophic responses. It is generally accepted that despite the various signaling cascades mediating the α 1-responses, these second messengers ultimately all converge on common nuclear effectors responsible for regulating specific gene programs^{10; 11; 12}. In fact, cooperative interactions between different families of transcription factors as well as their cofactors, play a crucial role in the regulation of gene expression^{13; 14}. However, the different signaling pathways and transcription factors that link receptor activation to changes in gene expression remain unclear.

Many transcription factors have been linked to α 1-mediated gene transcription and to genetic events in hypertrophy. In particular, a zinc finger protein, GATA-4, which plays a crucial role in the control of normal heart development¹⁵, is a convergent point for various signaling cascades activated in cardiac hypertrophy^{16, 17}. GATA-4 has also been shown to respond to various hypertrophic stimuli including phenylephrine (PE) and endothelin-1 (ET-1), by post-translational modifications, such as phosphorylation or acetylation^{18; 19}, or differential recruitment of various co-factors such as NFAT3²⁰, GATA-6²¹ and SRF²². In fact, overexpression of GATA-4 in cultured cardiomyocytes or in transgenic mice hearts is sufficient to induce cardiac hypertrophy²³. Furthermore, expression of dominant negative GATA-4 or antisense GATA-4 mRNA, blocked sarcomeric reorganization induced by PE and ET-1²³,

suggesting that GATA-4 is a nuclear effector of at least some of the α 1-mediated hypertrophic response. However, it is noteworthy that blocking GATA-4, at both the mRNA or protein level, was not sufficient to abolish the ANF activation following hypertrophic stimuli, suggesting the involvement of other regulators in transducing α 1-signaling to gene transcription.

Another factor that has been linked to the hypertrophic response is Serum Response Factor (SRF), a member of the MADS family of transcriptional activators. SRF binds as a homodimer to the serum response element (SRE), also referred to as the CArG box, located in the promoter region of target genes including numerous cardiac-restricted and contractile genes²⁴. Several studies have associated SRF and its cofactors with hypertrophic responses including re-induction of certain fetal genes such as ANF, skeletal α -actin and β -MHC genes^{25 26: 27}. *In vivo*, SRF overexpression in transgenic mice was shown to cause cardiac hypertrophy²⁸. Finally, our report suggested that the SRE may partially mediate α 1-adrenergic activation of the ANF promoter²⁹, however whether this is due to changes in SRF or other cofactors remains undefined.

We have previously mapped a proximal element PERE (Phenylephrine response element), which mediates α 1-adrenergic signaling on the ANF promoter³⁰, and is conserved on the ANF gene of different species, suggesting an evolutionary conserved regulatory function. We furthered the study and isolated, by the yeast one-hybrid interaction system, a cDNA that encodes a nuclear zinc finger protein, PEX1 that binds over this element (Debrus et al, in progress). PEX1 belongs to the Krüppel family, and contains 13 zinc fingers. By Immunohistochemistry the expression profile of PEX1 was determined, using specific anti-PEX1 antibody. The results showed a remarkably similar pattern of expression with ANF, highly regulated during embryonic development, severely diminished in the postnatal heart, and re-induced in hypertrophic hearts.

ANF (Atrial Natriuretic Factor) is a critical marker for α 1- and other hormone-induced transcriptional changes. In this context, we have previously shown that the responsiveness of the ANF promoter to Endothelin1, a hypertrophies agent which acts also through a GPCR, required the combined

action of serum response factor (SRF) and tissue-specific GATA-4 protein, which form a ternary complex over a 30-bp cis element harboring juxtaposed SRF and GATA binding sites²². Additionally, we found that α 1-agonists target in addition to PERE, the composite GATA/SRE site. In the present study, we investigated the potential interaction between the SRF/GATA complex and PEX1. Using transfection assays, we found that PEX1 synergistically enhances the transcriptional activity of both SRF and GATA-4 on the ANF promoter. Mutational analyses were used to determine the specific regulatory elements that mediate the synergy, as well as the domains in each protein required for the different interactions. In addition, we provide evidence that the SRF-GATA-PEX1 triple synergy is mediated by physical interaction between the respective proteins. Finally, we show that transcriptional cooperativity is not restricted to the ANF gene, and is observed over several α 1-inducible cardiac genes, suggesting a more general mechanism for nuclear signaling by α 1-adrenergic receptors involving recruitment of an α 1-inducible co-factor, PEX1, to a GATA/SRF complex.

RESULTS

Synergistic activation of the ANF promoter by PEX1, GATA and SRF factors

The ANF promoter contains multiple regulatory elements in its proximal region, some of which have been implicated in hormonal responses²². They include the SRE, GATA and PERE (Figure 1A). Given the implication of both the SRE and PERE in the nuclear signaling of GPCRs^{30; 29}, the involvement of GATA in hypertrophic cardiac growth²³, and the evolutionary conservation of these elements on the ANF promoter (Figure 1A), we tested whether SRF, PEX1 and GATA-4 may functionally cooperate. Our results show that PEX1 enhanced ANF promoter activation when co-transfected with either SRF or GATA-4, and maximal activation was achieved in presence of all three proteins (Figure 1B). This cooperative interaction was seen on both the (-700 bp) and the (-135 bp) ANF promoters, confirming the essential role of the proximal elements in the activation of the ANF promoter.

SRE and GATA-binding sites are essential for PEX1-GATA-SRF synergy

Mutational analyses were carried out to determine which elements on the proximal ANF promoter are required for the synergy. As mentioned previously, the proximal ANF SRE is a low-affinity binding site for SRF, previously shown to contribute to ANF promoter activation in response to α 1-adrenergic stimulation³¹. In addition, functional GATA response elements are necessary for the ANF promoter induction by various hypertrophic agonists³². Interestingly, the action of PEX1 did not require binding to its cognate element (data not shown). In contrast, mutation of either the GATA or SRE elements severely reduced PEX1-dependent synergy (Figure 2). Similar results were obtained using the proximal ANF promoter, suggesting that the low-affinity SRE and the proximal GATA site are indispensable for the multiproteic-complex-mediated ANF activation. These results suggest that PEX1 transcriptional effects can be mediated through DNA-binding independent recruitment to GATA-4 and/or SRF, mainly through the proximal regulatory sequences.

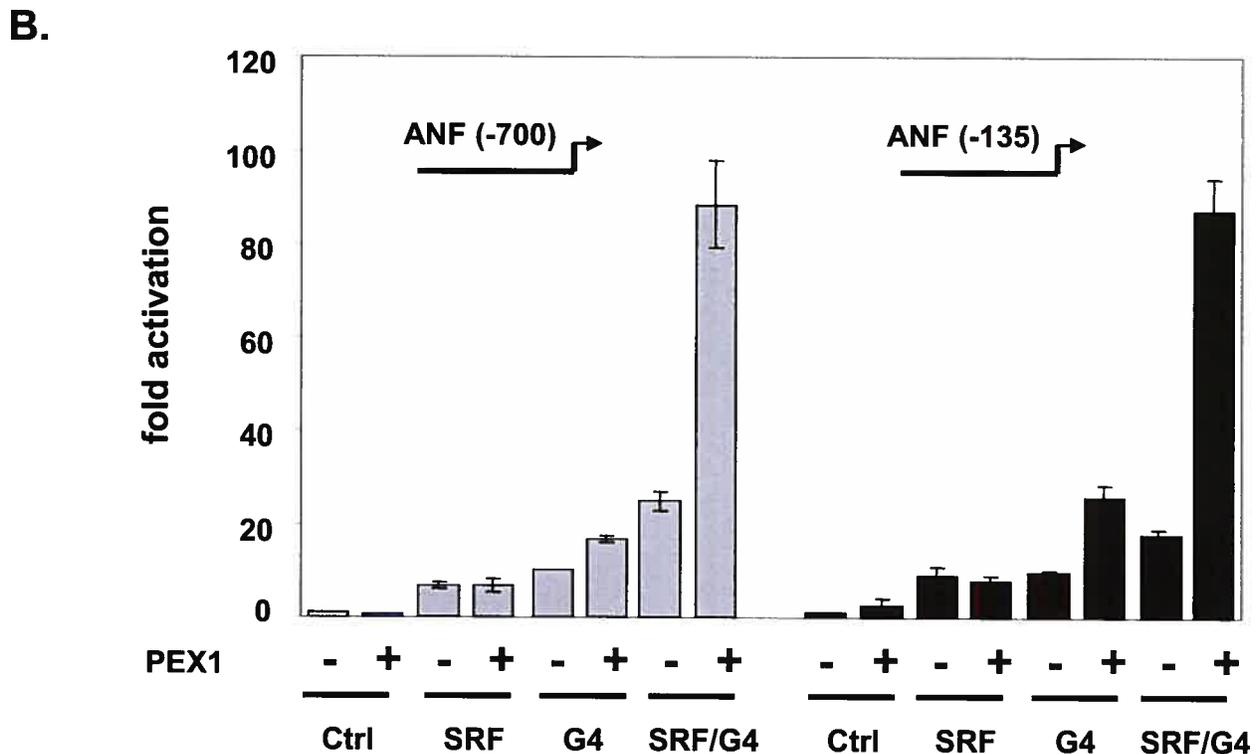
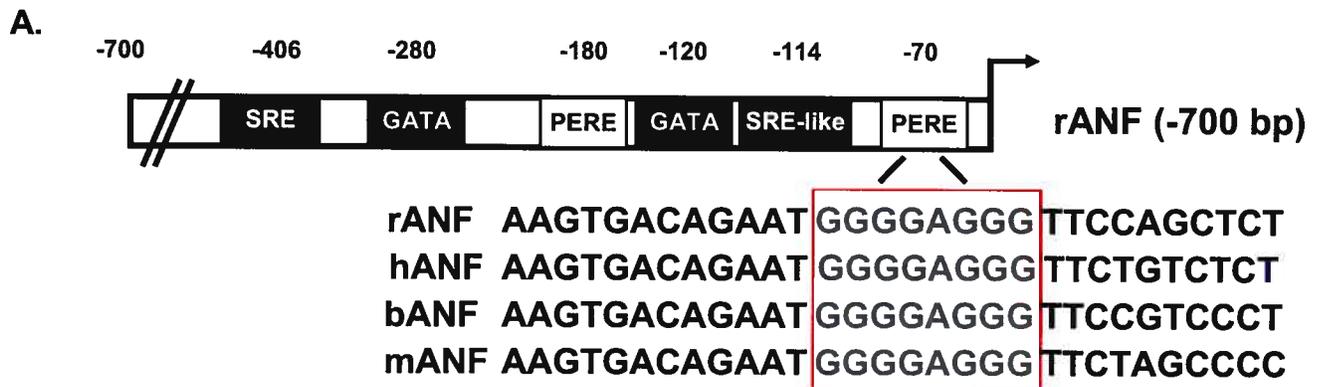


Figure1. Synergistic activation of the ANF promoter by PEX1, GATA-4 and SRF factors. (A) Localization of the various regulatory elements, pertinent to our study, on the ANF-700 promoter. Note PERE conservation among various species. (B) All 3 proteins were transfected in HeLa cells. 10ng of GATA-4, 100ng of SRF and 100ng of PEX1 were used for all of the following transactivation assays. The proximal ANF promoter (ANF-135) is sufficient to support functional interaction between GATA-4, SRF and PEX1. Experiments were carried out at least 3 times, in duplicate, unless mentioned otherwise. The data shown are the mean \pm SD.

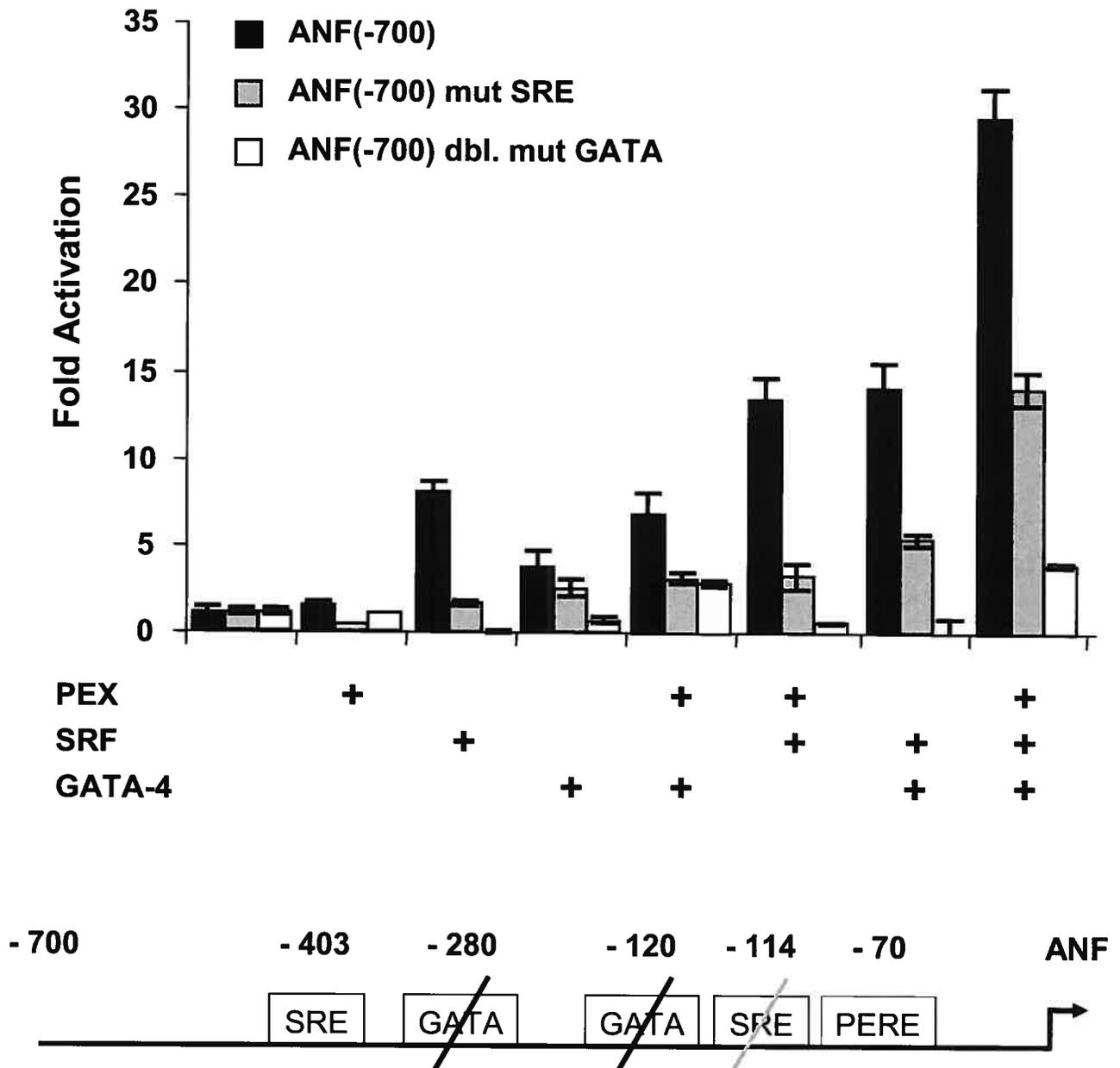


Figure 2. The low affinity SRE and the proximal GATA element are required for PEX1-dependent ANF promoter activation. Mutations of both GATA and SRE elements severely abolish functional activation, as compared to less drastic effects of mutated PERE (data not shown). Similar results were obtained using the proximal ANF promoter, confirming the importance of the proximal SRE and GATA elements.

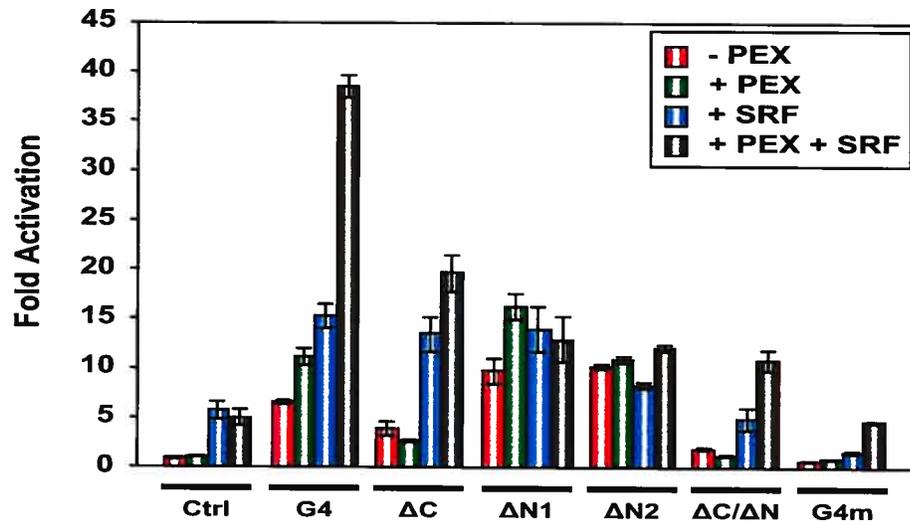
Mapping of the protein domains required for functional interaction

In order to determine the GATA-4 and SRF domains required for synergy with PEX1, various deletion mutants were used. Deletion of C-terminal activation domain of GATA-4 (1-360) severely affects the synergy with PEX1. Progressive deletions of the N-terminal activation domain (96-440 and 180-440) show an additive response with PEX1 rather than a synergy. Consistent with these results, GATA-4 mutants harboring no transcriptional activation domain (201-332) do not synergize with either PEX1 or SRF, but seem to stabilize the multi-factor complex by their DNA-binding activity. Furthermore, a GATA-4 mutant in the second zinc finger bearing no DNA-activity, but still able to localize to the nucleus, completely abolished ANF activation (Figure 3A). These results confirm the importance of GATA-4 binding to its cognate element for functional interaction.

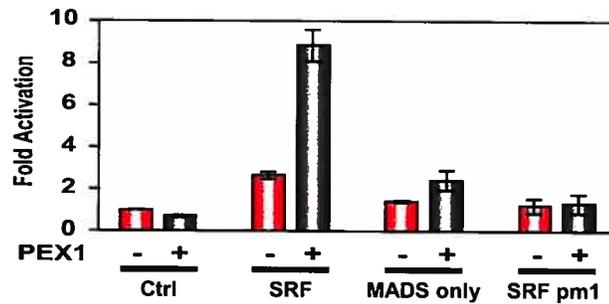
Two SRF mutants were used in transfection assays to determine the protein domains needed for the synergy with PEX1. A point mutation in the SRF DNA-binding domain (SRF pm1), preventing its interaction with DNA, strictly blocks the synergistic activation with PEX1. In addition, a deletion mutant only harboring the DNA binding domain (MADS Only), also leads, but to a lesser extent, to a decrease in ANF activation, suggesting a role for transactivation domains (Figure 3B). These results are consistent with a requirement for SRF to bind to DNA, and synergize with PEX1.

We furthered our study by determining which domains of PEX1 are needed for this combinatorial interaction. Results showed that, although the N-terminal of PEX1 was sufficient for the interaction with SRF, the triple GATA4-SRF-PEX1 synergy required the intact PEX1 protein (Figure 3C). Taken together, these results show that PEX1 functionally interacts with both SRF and GATA-4 to synergistically activate transcription from the ANF promoter.

A



B



C

	Nuclear localization	Synergies		
		+SRF	+G4	+SRF/G4
PEX1-FL [1-407] 	+	+	+	+++
PEX1-NT [1-115] 	+	+	-	-
PEX1-CT [116-407] 	+	-	-	-

Figure3. Mapping of the GATA-4, SRF and PEX1 domains involved in functional interaction. Co-transfections in HeLa cells were carried out on the ANF_700 promoter using 1.5 μ g of reporter, 10 ng of GATA-4, 100 ng of SRF and 100 ng of PEX1. (A) Both the C-terminal transactivation domain, and to a lesser extent, the N-terminal domain are required for synergy as shown by (Δ C 1-360 and Δ N mutants 96-440; 180-440). Mutations in DNA binding domain abolish all synergistic effects (G4m). (B) SRF binding domain is essential, since mutations in MADS domain block the synergy, but is insufficient as shown by the MADS only mutant's incapacity to synergize with other factors. (C) Both PEX1 mutants (Nt and Ct) are insufficient to mediate functional interaction, requiring the intact protein for functional activation. The results were carried out twice, in duplicate.

Physical interaction in vitro

The ability of PEX1 to enhance transcription in the absence of its binding site suggested that it may be recruited to the promoter through physical interaction with GATA-4 and/ or SRF. To assay for physical interaction, *in vitro* pull-down experiments were carried out using purified and tagged proteins along with *in vitro*-translated 35S-labeled proteins. In figure 4A, MBP-tagged PEX1 was able to specifically retain *in vitro*-translated GATA-4. The MBP-SRF and *in vitro*-translated GATA-4 interaction was used as a positive control, since GATA and SRF were previously shown to be co-regulators and physically interact^{24; 22}. On the other hand, MBP-tagged SRF was shown to interact with *in vitro*-translated PEX1 (Figure 4B), using once more, SRF-GATA-4 interaction as a positive control. These pull downs demonstrate a direct interaction between PEX1 and GATA-4, and PEX1-SRF, consistent with the role of PEX1 as a co-regulator, recruited to the promoter by GATA-4 and SRF, resulting in a physical interaction responsible of mediating ANF activation.

Cooperative activation of PEX1/GATA-4/SRF on α 1-inducible cardiac genes

We then tested whether transcription of other cardiac genes were cooperatively activated by the triple synergy. In addition to ANF, we found that other α 1-inducible cardiac genes, cardiac actin, α -skeletal actin^{33; 20} and β -MHC^{34; 35}, are synergistically activated by PEX1, GATA4 and SRF (Figure 5A). Bioinformatics search for putative binding sites on the different promoters identified a combination of all three elements PERE, GATA and SRE on each of the following α 1-inducible promoters. Together, the data obtained suggest that PEX1 acts as a hormone/growth factor inducible cofactor for SRF and GATA-4, and synergistically activate transcription of several α 1-inducible cardiac genes.

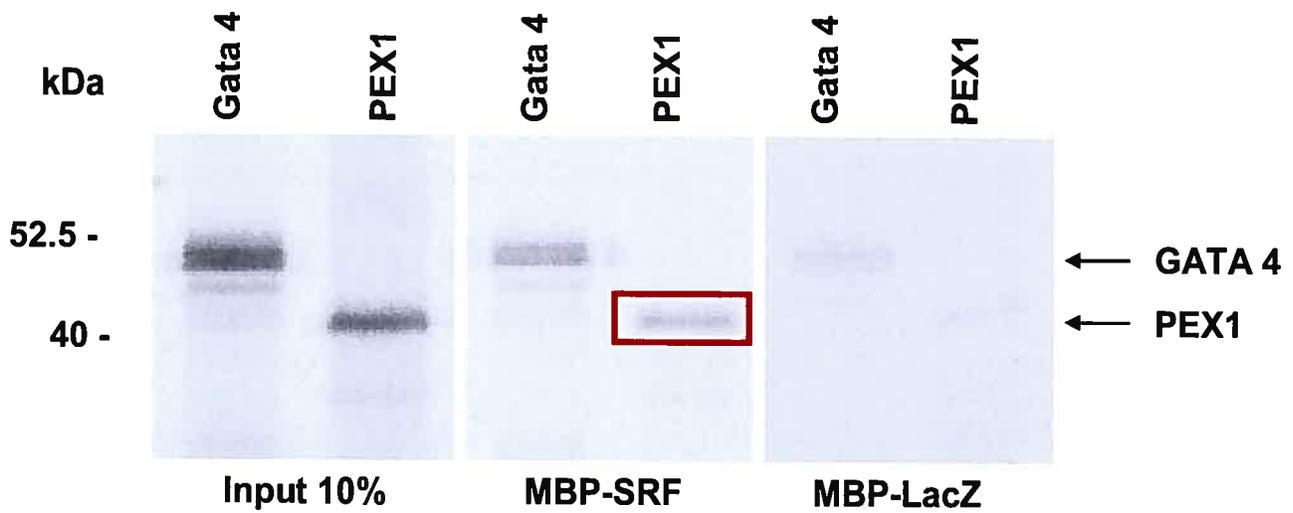
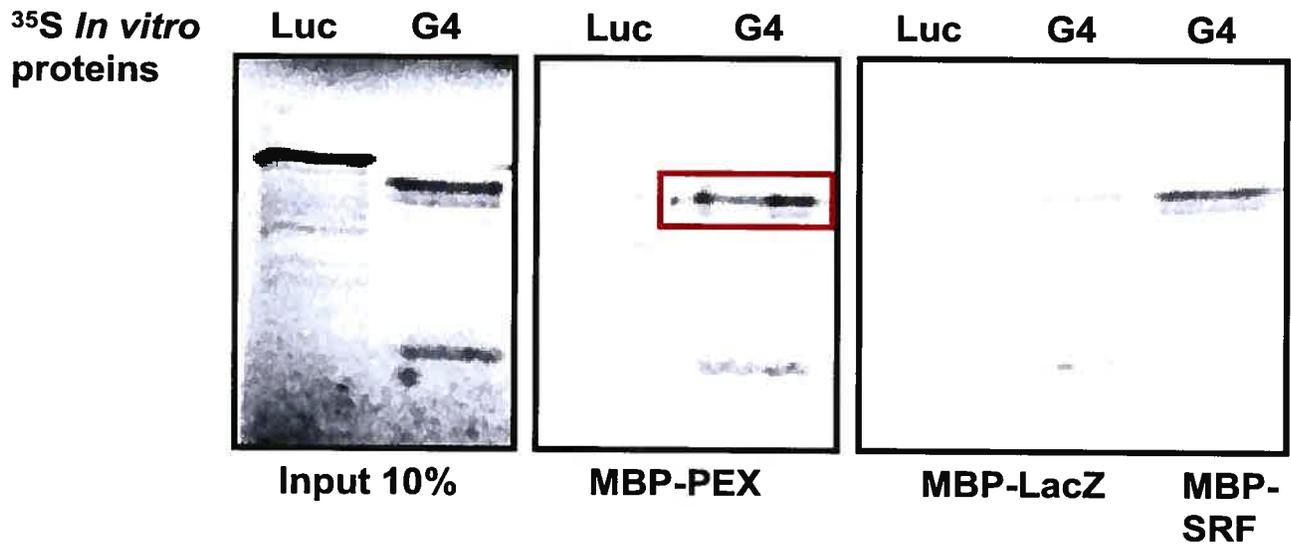


Figure4. PEX physically interacts with both GATA-4 and SRF. Pull down assays were carried out using bacterially produced MBP fusions and in vitro translated ³⁵S-labeled proteins. The protein complexes were resolved on 10% SDS-PAGE. Interaction was shown (A) using radioactively labeled GATA-4 and MBP-fused PEX1 and (B) using radioactively marked PEX1 and MBP-fused SRF (with MBP-LacZ as a negative control).

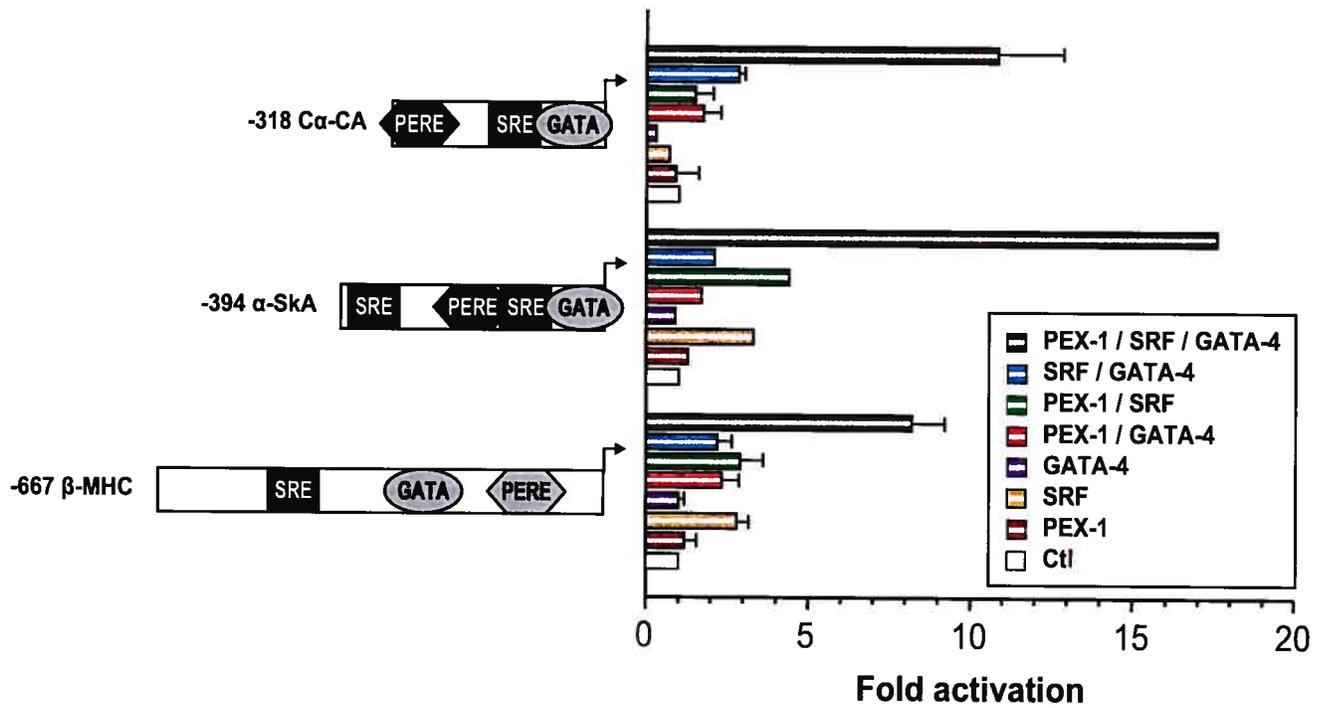


Figure 5. Cooperative interaction by GATA-4/SRF/PEX on α 1-inducible promoters. This synergy is not restricted to the ANF promoter. HeLa cells were co-transfected with the luciferase reporter under the control of distinct cardiac promoters: the chicken α -skeletal actin (-394 α -SkA), the chicken cardiac α -actin (-318 α -CA), and the rat β -myosin heavy chain (-667 β MHC), all of which are induced by α 1-agonists.

DISCUSSION

The importance of adrenergic signaling in cardiac hypertrophy has been well established ³⁶. Furthermore, it has recently become apparent that the increase in cell size *per se* does not determine progression to heart failure, but rather that changes in gene expression patterns are maladaptive ³⁷. Two crucial cardiac regulators, GATA-4 and SRF, have been shown to mediate hypertrophic responses, a hallmark of which is the re-induction of the fetal gene program and ANF. However, the molecular basis of their actions remains elusive. In this study, we propose both physical and functional interactions between a novel α 1-adrenergic inducible protein PEX1, and both hypertrophy-associated factors, GATA-4 and SRF.

GATA-4 has been previously implicated in genetic response to cardiac hypertrophy and agonist-induced hypertrophy in particular. The mechanisms may involve direct GATA modifications such as phosphorylation ¹⁸ or acetylation ¹⁹, as well as enhancement of several cofactors such as NFATc ²⁰, MEF2 ¹³ and c-fos ¹⁴. On the other hand, the mechanism underlying the implication of SRF in hypertrophy is uncertain. However, many studies have reported the importance of the DNA-binding ability of SRF on various promoters, where it would serve as a docking surface to recruit accessory factors and regulate specific gene programs ²⁴; ³⁸. We have previously reported its interaction with GATA-4 to form a ternary complex, and suggested that this complex may in turn serve as a docking site for other cofactors ²². In this context, we propose that PEX1, which acts with both GATA-4 and SRF, may be one such inducible cofactor. Indeed, our results show that PEX1 enhances ANF promoter activation when co-transfected with either SRF or GATA-4, and that maximal activation is reached in the presence of all three proteins. Moreover, the coactivation of the cardiac ANF promoter by the multiproteic complex GATA4-SRF-PEX1 requires both the SRE-like and the GATA binding elements, and specific point mutations in either one of these sites abolished the synergistic activation of the promoter. This is consistent with previous work reporting the contribution of the SRE-like site in mediating α 1-

induced ANF promoter activation³¹, as well as with our findings, where the combined action of SRF and GATA-4 in response to Endothelin-1, required both the SRE-like and GATA elements²². On the other hand, PERE site does not seem mandatory to the activation, further supporting PEX1's role as a cofactor to the GATA-SRF complex. In the future, it would be interesting to determine through Chromatin-IP whether PEX1 is actually recruited to the GATA-SRE elements in response to α 1-adrenergic and other hypertrophic stimuli.

Combinatorial interactions between GATA-4 and SRF have been shown to regulate many growth-responsive cardiac genes, some of which include the cardiac and skeletal α -actin genes^{24, 22}, suggesting a more general role for these factors in the regulation of hypertrophic gene expression. In this context, our results show that at least three α 1-induced cardiac genes, cardiac and skeletal α -actin as well as β -MHC, were cooperatively activated by the physical association of PEX1 with GATA-4 and SRF, all of which contain both GATA and SRE binding sites. This study further adds to the list of the many SRF-dependent responses to hypertrophic agents established to date^{39 38}. In addition to the involvement of GATA-4 and SRF in cardiac hypertrophy, these transcription factors are similarly important for basal level expression of several cardiac genes^{40; 41}. Indeed, GATA-4 is essential in the transcriptional control of various stages of heart development⁴² and its binding elements were found present within the promoters of most cardiac genes^{43; 15}, supporting its broad role in the regulation of cardiac gene expression. Given the coexpression of PEX1 with GATA-4 early in development (Debrus and al, unpublished), it is tempting to speculate the possible involvement of PEX1 in cardiogenesis. The role of PEX1 is currently under investigation in our laboratory; gain and loss of function studies are being carried out using adenoviral-mediated gene transfer.

Taken together, the identification of cardiac transcription factors, along with their respective regulatory elements, has helped assist our understanding of the various mechanisms behind normal and pathological heart development. Furthermore, our present data points to a novel and attractive interacting partner of two major cardiac regulators, involved in the transcriptional control of heart

development and hypertrophy. Indeed, the cooperative interaction between PEX1, GATA-4 and SRF regulates the activity of various inducible cardiac genes; it is therefore tempting to speculate on the role of PEX1 as an α 1-inducible cofactor of the GATA-SRF complex, mediating signaling through GPCRs. Additionally, given the importance of α 1-adrenergic signaling in various tissues and organs, including the liver ⁴⁴, the brain ⁴⁵ and the vascular system ^{46,47}, the combinatorial interactions we have presented could represent a more general mechanism.

MATERIAL AND METHODS

Plasmids

Wild-type ANF promoter constructs (ANF-700 and ANF-135) were previously detailed ⁴⁸. The β -MHC-Luc and cardiac α -actin-luc reporters were described in ⁴⁹. The various point mutations of the ANF promoter were obtained as described in our previous work ^{13,40,50,51}. PERE mutations were previously generated (Debrus et al, in progress). Various pCG-GATA-4 constructs were generated from the original rat GATA-4 previously mentioned ⁴⁸. PEX deletion mutants were generated as described in (Debrus et al). The MBP-PEX1 plasmid was prepared by subcloning a XbaI-BamHI rat PEX1 cDNA fragment, enclosing the entire open reading frame, into MBP-expressing pMalc-2 vector (New England Biolabs, Beverly MA, USA) cut with NheI-BamHI.

Cell culture and transactivation assays

HeLa cells were plated in 12-plate Petri dishes at 30,000 cells / plate Petri. Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). Transfections were carried out 24 hours after plating using calcium phosphate. Media was changed 12 hours later, and cells were harvested 36 hours after transfection. Luciferase activity was then assayed. The amount of reporter and expression vectors were constant in all experiments, 1.5 μ g of reporter, 10 ng of GATA-4, 100 ng of SRF and 100 ng of PEX1. The results shown are the mean \pm standard deviation of at least 3 independent experiments, each carried out in duplicate unless mentioned otherwise.

Recombinant protein production

Recombinant MBP-PEX was previously generated, and details are described in Debrus et al (in progress). Mainly, individual colonies are grown in 500 ml LB up to an O.D ranging between 0.5 and 0.6 at 600 nm. The recombinant protein is induced by Isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 hours at 37°C. Recuperated bacteria are resuspended and sonicated to ensure proper lysing.

Purification on amylose columns (New England Biolabs, Beverly MA) is carried out according to the manufacturer's instructions.

In vitro translated 35S-labeled GATA-4 and PEX1 proteins were obtained in rabbit reticulocyte lysates using T7 RNA polymerase. Details of TNT-coupled transcription / translation system are described by manufacturer (Promega Corp., Madison, WI).

Pull down assays

MBP-PEX1 and MBP-SRF were checked on gel for an estimation of protein concentration. In the first pull-down, 500 ng of MBP-PEX1 fusion proteins were incubated with 15 μ l of in vitro translated 35S-labeled-GATA-4 in 500 μ l of binding buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris [pH = 8], 0.3 % Nonident P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 0.25 % BSA), and left to rotate overnight at 4°C. The proteins were centrifuged at 15,000 rpm for 2 minutes at 4°C. Beads are previously washed 3 times in 500 μ l of binding buffer + BSA followed by another 3 time-wash with binding buffer lacking BSA. Following a 5 minute boil, proteins are released in SDS loading buffer and resolved on a 15 % SDS-PAGE. Labeled proteins are then visualized using a phosphorImager screen and a STORM scanner. In the second pulldown, certain changes were made: 1 μ g of immobilized fusion protein SRF (MPB-SRF) was incubated with 5 μ l of *in vitro* translated GATA-4 and PEX proteins in a final volume of 400 μ l of binding buffer containing 1 mM ZnCl₂. The binding buffer used later for washing contained no zinc.

Reference List

1. Simpson,P.C., Kariya,K., Karns,L.R., Long,C.S. & Karliner,J.S. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol. Cell Biochem.* **104**, 35-43 (1991).
2. Puceat,M. & Vassort,G. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol. Cell Biochem.* **157**, 65-72 (1996).
3. Li,K., He,H., Li,C., Sirois,P. & Rouleau,J.L. Myocardial alpha1-adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sci.* **60**, 1305-1318 (1997).
4. Yamazaki,T. & Yazaki,Y. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z. Kardiol.* **89**, 1-6 (2000).
5. McMullen,J.R. *et al.* Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell Biol.* **24**, 6231-6240 (2004).
6. Oudit,G.Y. *et al.* The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 449-471 (2004).
7. Zechner,D., Thuerauf,D.J., Hanford,D.S., McDonough,P.M. & Glembotski,C.C. 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 (1997).
8. Wilkins,B.J. & Molkenin,J.D. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1178-1191 (2004).
9. Zhang,T. & Brown,J.H. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **63**, 476-486 (2004).
10. Simpson,P.C., Long,C.S., Waspe,L.E., Henrich,C.J. & Ordahl,C.P. Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **21 Suppl 5**, 79-89 (1989).
11. McKinsey,T.A. & Olson,E.N. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 267-274 (1999).

12. Molkenkin, J.D. & Dorn II, G.W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 391-426 (2001).
13. Morin, S., Charron, F., Robitaille, L. & Nemer, M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J.* **19**, 2046-2055 (2000).
14. McBride, K., Charron, F., Lefebvre, C. & Nemer, M. Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene* **22**, 8403-8412 (2003).
15. McBride, K. & Nemer, M. Regulation of the ANF and BNP promoters by GATA factors: Lessons learned for cardiac transcription. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**, 673-681 (2001).
16. Liang, Q. & Molkenkin, J.D. Divergent signaling pathways converge on GATA4 to regulate cardiac hypertrophic gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 611-616 (2002).
17. Akazawa, H. & Komuro, I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **92**, 1079-1088 (2003).
18. Morimoto, T. *et al.* 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 (2000).
19. Yanazume, T. *et al.* Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol. Cell Biol.* **23**, 3593-3606 (2003).
20. Molkenkin, J.D. *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228 (1998).
21. Liang, Q. *et al.* The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 30245-30253 (2001).
22. Morin, S., Paradis, P., Aries, A. & Nemer, M. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1036-1044 (2001).
23. Charron, F. *et al.* Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev.* **15**, 2702-2719 (2001).
24. Belaguli, N.S. *et al.* Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Mol. Biol. Cell* **20**, 7550-7558 (2000).
25. Paradis, P., MacLellan, W.R., Belaguli, N.S., Schwartz, R.J. & Schneider, M.D. Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal

- alpha-actin promoter in ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 10827-10833 (1996).
26. Thuerauf, D.J. *et al.* 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 (1998).
 27. Zhang, X. *et al.* Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 40033-40040 (2001).
 28. Zhang, X. *et al.* Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **280**, H1782-H1792 (2001).
 29. Sprenkle, A.B., Murray, S.F. & Glembotski, C.C. 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: (1995).
 30. Ardati, A. & Nemer, M. A nuclear pathway for α_1 -adrenergic receptor signaling in cardiac cells. *EMBO J.* **12**, 5131-5139 (1993).
 31. Hines, W.A., Thorburn, J. & Thorburn, A. A low-affinity serum response element allows other transcription factors to activate inducible gene expression in cardiac myocytes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1841-1852 (1999).
 32. Charron, F., Paradis, P. & Nemer, M. The GATA-4 transcription factor is a mediator of cardiomyocyte hypertrophy. *Canadian Journal of Cardiology* **15 Supplement D**, 116D, no 59 (1999).
 33. Martin, X.J., Wynne, D.G., Glennon, P.E., Moorman, A.F. & Boheler, K.R. Regulation of expression of contractile proteins with cardiac hypertrophy and failure. *Mol. Cell Biochem.* **157**, 181-189 (1996).
 34. Hasegawa, K., Lee, S.J., Jobe, S.M., Markham, B.E. & Kitsis, R.N. cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* **96**, 3943-3953 (1997).
 35. McLean, B.G., Lee, K.S., Simpson, P.C. & Farrance, I.K. Basal and alpha1-adrenergic-induced activity of minimal rat betaMHC promoters in cardiac myocytes requires multiple TEF-1 but not NFAT binding sites. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**, 461-471 (2003).
 36. Keys, J.R. & Koch, W.J. The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**, 13-30 (2004).

37. Selvetella,G., Hirsch,E., Notte,A., Tarone,G. & Lembo,G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc. Res.* **63**, 373-380 (2004).
38. Sepulveda,J.L., Vlahopoulos,S., Iyer,D., Belaguli,N. & Schwartz,R.J. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 25775-25782 (2002).
39. Marais,R., Wynne,J. & Treisman,R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor- regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**, 381-393 (1993).
40. Charron,F. & Nemer,M. GATA transcription factors and cardiac development. *Sem. Cell Dev. Biol.* **10**, 85-91 (1999).
41. Parlakian,A. *et al.* Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5281-5289 (2004).
42. Nemer,G. & Nemer,M. Regulation of heart development and function through combinatorial interactions of transcription factors. *Ann. Med.* **33**, 604-610 (2001).
43. Molkentin,J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6 - Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 38949-38952 (2000).
44. Refsnes,M., Thoresen,G.H., Dajani,O.F. & Christoffersen,T. Stimulation of hepatocyte DNA synthesis by prostaglandin E2 and prostaglandin F2 alpha: additivity with the effect of norepinephrine, and synergism with epidermal growth factor. *J. Cell Physiol* **159**, 35-40 (1994).
45. Zuscik,M.J. *et al.* Overexpression of the alpha1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. *Nat. Med.* **6**, 1388-1394 (2000).
46. Ross,R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126 (1999).
47. Koch,W.J., Lefkowitz,R.J. & Rockman,H.A. Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu. Rev. Physiol* **62**, 237-260 (2000).
48. Grepin,C. *et al.* A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3115-3129 (1994).

49. Abdellatif,M., MacLellan,W.R. & Schneider,M.D. p21 Ras as a governor of global gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 15423-15426 (1994).
50. Durocher,D., Chen,C.Y., Ardati,A., Schwartz,R.J. & Nemer,M. The ANF promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4648-4655 (1996).
51. Durocher,D., Charron,F., Warren,R., Schwartz,R.J. & Nemer,M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**, 5687-5696 (1997).

CHAPITRE III. DISCUSSION

L'identification des divers facteurs de transcription cardiaque et de leurs sites de liaison aux promoteurs de gènes cibles, a permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes transcriptionnels régulant le développement et l'hypertrophie cardiaque. L'étude de ces facteurs trans-régulateurs a mis en évidence que l'orchestration spatio-temporelle de l'expression de leurs gènes cibles implique des interactions combinatoires entre ces divers facteurs de transcription. Parmi ces facteurs, GATA-4 et SRF jouent des rôles fonctionnels cruciaux tant au niveau physiologique que pathologique. En effet, des études indépendantes ont évoqué un lien direct entre chacun de ces deux facteurs et l'hypertrophie cardiaque. De plus, les travaux du laboratoire ont montré que GATA-4 et SRF forment un complexe ternaire sur le promoteur de l'ANF, et que ce complexe médie la réponse transcriptionnelle à l'ET-1, l'impliquant ainsi dans la signalisation nucléaire des GPCRs¹⁹⁹. Cependant, les éléments cis-régulateurs GATA/SRE ne semblent pas suffisants pour médier la réponse à une stimulation via des agonistes α 1-adrénergiques. En effet, un autre élément régulateur, PERE (Phenylephrine Response Element), a été identifié comme l'élément cis-régulateur nécessaire et suffisant à la réponse α 1-adrénergique²²⁴. Cet élément PERE correspond au site de liaison d'une nouvelle protéine, nommée PEX1, de la famille Krüppel des facteurs à doigts de zinc (Debus et al, en progrès). Nous proposons que cette protéine à 13 doigts de zinc, agit comme un cofacteur inductible par les voies α 1-adrénergiques du complexe transcriptionnel SRF/GATA.

3.1. Transcription durant l'hypertrophie cardiaque

La croissance hypertrophique du myocarde est déclenchée par divers facteurs de croissance tels que l'angiotensine II (AngII), l'endothéline 1 (ET-1) et les agonistes α 1-adrénergiques, impliquant tous l'activation des GPCRs; ce mécanisme, compensatoire à l'origine, se transforme éventuellement en une hypertrophie pathologique caractérisée, non seulement par une augmentation de la taille des cardiomyocytes, mais également par une reprogrammation génétique qui inclut la ré-expression des gènes précoces immédiats ainsi que de certains gènes embryonnaires, dont l'ANF. Afin d'élucider les mécanismes moléculaires à l'origine de l'hypertrophie cardiaque, notre laboratoire s'intéresse à l'identification des différents facteurs impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'ANF, car ce gène correspond à un marqueur universel de l'hypertrophie. En effet, la régulation de l'ANF est étudiée depuis plusieurs années afin de décrypter les différentes cascades nucléaires qui médient les réponses transcriptionnelles histo-spécifiques. Ainsi, de nombreux facteurs de transcription et leurs divers cofacteurs, régulant l'ANF, ont été identifiés. Ils incluent entre autre GATA-4 et SRF (voir introduction section 1.5.3.1. et 1.5.3.4.). Tel que mentionné précédemment, ces facteurs sont impliqués tant dans le processus de la cardiogenèse ²⁸⁵ que dans la réponse adaptative du myocarde postnatal à certains stress ⁵².

3.1.1. Rôle de PEX1 dans l'activation transcriptionnelle de l'ANF

Durant les études menées sur le promoteur de l'ANF, divers éléments cis-régulateurs ont été analysés au laboratoire afin de déterminer leur importance dans la régulation transcriptionnelle de l'ANF, et leur implication potentielle dans la réponse aux stimuli hypertrophiques. Parmi les divers éléments cis-régulateurs identifiés sur le promoteur de l'ANF, l'élément de réponse PERE (-70 bp) a été reconnu comme la principale séquence cis-régulatrice responsable de la médiation des voies α 1-adrénergiques sur le promoteur de l'ANF ²²⁴. Quelques années plus tard, des travaux par Sprenkle et al., ont également impliqué

l'élément PERE (appelé Sp1-like), en collaboration avec les sites SRE (-406 pb) et SRE-like (-114 pb), dans l'activité basale et α 1-inductible de l'ANF ²¹⁵. Les études subséquentes menées afin d'identifier le ou les facteurs pouvant interagir avec cet élément de réponse ont conduit au clonage moléculaire d'un transcrite encodant une protéine appartenant à la famille Krüppel, qui a été nommée PEX1 (Debrus et al, en progrès). Des études d'immunohistochimie ont permis d'établir le patron d'expression de PEX1, ce dernier coïncidant parfaitement avec celui de l'ANF dans le coeur. Ainsi, l'ontogénèse de PEX1 durant l'embryogenèse (jour E8 chez la souris), et sa diminution dramatique dans le coeur postnatal, supportent l'hypothèse d'un rôle important de PEX1 durant la cardiogenèse. Par ailleurs, la ré-induction de son expression dans les coeurs subissant une hypertrophie causée par une stimulation à la PE, suggère un rôle potentiel de PEX1 dans la croissance des cardiomyocytes, incluant la croissance trophique ou hypertrophique cardiaque. Par conséquent, il serait raisonnable de considérer PEX1 comme un médiateur clé de la réponse à divers stimuli de croissance, et particulièrement aux agents α 1-adrénergiques.

Même si le site PERE semble essentiel pour l'activation de l'ANF, d'autres éléments régulateurs semblent contribuer à la réponse α 1-adrénergique, suggérant ainsi une coopération de PEX1 avec d'autres facteurs cardiaques. Des partenaires potentiels de PEX1 dans l'activation du promoteur de l'ANF ont donc été recherchés. Etant donné que la transcription basale ainsi que celle induite par les agonistes α 1-adrénergiques de l'ANF, nécessite la collaboration de PERE et des sites SRE ²¹⁵, SRF a été considéré comme un partenaire potentiel dans la médiation des voies α 1-adrénergiques. D'autre part, l'implication critique de GATA-4 dans la régulation d'une grande variété de gènes cardiaques induits par des agents hypertrophiques, soulevait la possibilité que GATA-4 puisse aussi représenter un autre collaborateur potentiel de PEX1, particulièrement en vue. Des études impliquent le complexe SRF/GATA-4 dans l'activation de l'ANF suite à une stimulation hormonale ¹⁹⁹.

3.1.2. Implication des interactions combinatoires entre GATA-4, SRF et PEX1 dans l'hypertrophie

Nous rapportons dans cette étude une interaction coopérative entre PEX1 et GATA-4 sur le promoteur de l'ANF, appuyée par une liaison physique entre ces deux facteurs. La synergie obtenue nécessite d'une part les sites GATA du promoteur de l'ANF, et d'autre part la région C-terminale renfermant le deuxième doigt de zinc de GATA-4, responsable de la liaison à l'ADN. En revanche, des mutations ponctuelles au niveau de l'élément PERE n'affectent que faiblement la synergie, suggérant que PEX1 agisse comme un co-facteur de GATA-4. Par ailleurs, nos résultats démontrent aussi une interaction directe entre PEX1 et SRF, ayant également la capacité d'activer le promoteur de l'ANF par l'intermédiaire de l'élément de réponse reconnu par SRF, suggérant PEX1 comme le partenaire d'un autre régulateur cardiaque. La présence de l'élément intacte PERE, permet cependant une synergie optimale entre ces trois protéines, laissant présager la participation de ce site dans des conditions hypertrophiques.

Dans cette étude, nous proposons qu'un complexe multiprotéique, formé d'au moins 3 protéines GATA-4, SRF et PEX1, assure l'activation synergique du promoteur de l'ANF. L'interaction combinatoire entre ces trois facteurs trans-régulateurs dans la régulation de l'ANF est d'autant plus pertinente que deux de ces facteurs ont déjà été impliqués dans la réponse à des stimuli hypertrophiques. De plus, il est généralement accepté que les réponses hypertrophiques sont ultimement régulées au niveau transcriptionnel, et que différentes interactions combinatoires sont à l'origine des réponses variées qui existent. Dans ce complexe multi-protéique, GATA-4 est considéré comme un régulateur crucial de la cardiogenèse et de la transactivation des gènes spécifiques au coeur, tels que l'ANF et le BNP ^{205,228}. Par ailleurs, plusieurs travaux ont rapporté l'implication de GATA-4 dans l'hypertrophie cardiaque et particulièrement celle induite par les facteurs de croissance ²²⁵. En effet, divers mécanismes moléculaires convergent sur GATA-4, tels que les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ²²⁹ ou l'acétylation ²³², ou encore

le recrutement de divers cofacteurs comme NFATc⁴⁷, GATA-6²⁷², et SRF¹⁹⁹. Ces mécanismes sont à la base de la régulation transcriptionnelle de plusieurs gènes cardiaques durant l'hypertrophie. Dans ce contexte, nous proposons que PEX1 agit comme un cofacteur hormono-dépendant qui est recruté par le facteur de transcription GATA-4 pour activer de façon synergique le promoteur de l'ANF et d'autres promoteurs cardiaques.

En outre, étant donné que l'expression de plusieurs gènes cibles de SRF est altérée durant le développement et l'hypertrophie cardiaque, SRF a été suggéré comme un facteur important de la réponse hypertrophique. Des études par Sprenkle et al., ont impliqué en partie les sites SRE et SRE-like dans la médiation des voies α 1-adrénergiques²¹⁵; cependant les mécanismes moléculaires demeurent incertains. Dans notre étude, nous rapportons l'existence d'une interaction physique entre SRF et PEX1 qui régule positivement le promoteur de l'ANF. Cette activation nécessite le site SRE-like d'une part, et la boîte MADS de SRF qui représente le domaine de liaison à l'ADN d'autre part; ceci est consistant avec les études de Sprenkle et al, et suggère que SRF recrute des co-facteurs, et médie la réponse adrénérique en liant le site consensus CC(A/T)₆ GG et la séquence CTTTAAAAGG, présents sur le promoteur de l'ANF. En effet, malgré l'implication connue de SRF dans la régulation transcriptionnelle des gènes précoces immédiats et particulièrement de c-fos, son implication dans les réponses aux facteurs de croissance fait l'objet d'études intensives. Dans ce contexte, nous proposons un mécanisme nucléaire impliquant SRF et ses co-facteurs, potentiellement responsable de médier les voies α 1-adrénergiques sur l'ANF.

Ainsi, l'ensemble des résultats suggère que PEX1 agit comme un co-facteur des deux régulateurs cardiaques majeurs, GATA-4 et SRF, impliqués dans l'hypertrophie. De plus, l'activation synergique de l'ANF suite à la co-expression des trois protéines suggère que ce complexe multi-protéique est un activateur puissant de l'ANF. Comme d'autres travaux au laboratoire ont aussi impliqué le complexe ternaire GATA-4/SRF dans la réponse à l'ET-1, il serait intéressant de

vérifier, par des expériences de précipitation de la chromatine (ChIPs), la présence de PEX1 dans le complexe GATA/SRF sur le promoteur de l'ANF, et ce sous différentes conditions de stimulations (PE, ET-1 et AngII). En effet, ces expériences sont facilitées par la disponibilité d'anticorps anti-PEX1, anti-GATA4 et anti-SRF spécifiques. Ces anticorps fonctionnent bien en co-immunoprécipitation (co-IP) et en ChIP, ce qui nous permettra de vérifier que ces 3 protéines peuvent former un complexe sur différents promoteurs. De plus, des doubles et des triples ChIPs confirmeront la présence simultanée de ces 3 protéines sur l'ANF et sur d'autres promoteurs cibles. Ces expériences sont envisageables, d'autant plus que des résultats très encourageant ont été obtenus lors d'études préliminaires en ChIP, avec le promoteur de l'ANF.

3.1.3. Rôle de PEX1 dans la régulation de divers gènes α 1-inductibles

L'importance des voies de signalisation adrénérgiques dans l'hypertrophie et l'insuffisance cardiaque est bien établie ¹⁸⁵. Au niveau transcriptionnel, plusieurs gènes sont activés en réponse aux α 1-adrénérgiques. Nos travaux montrent que la collaboration SRF/GATA-4/PEX1 n'est pas restreinte au promoteur de l'ANF, mais est aussi mise en évidence pour la transcription d'autres gènes cardiaques embryonnaires α 1-inductibles, tels que la chaîne lourde de la myosine (β -MHC), l'actine cardiaque (α -CA) et l'actine squelettique (α -SkA), et pourrait donc contribuer à la régulation de l'expression de plusieurs gènes cardiaques *in vivo*.

Nous rapportons que la coexpression des 3 protéines GATA-4, SRF et PEX1, active fortement le promoteur β -MHC, sans influence particulière sur le promoteur α -MHC. En effet, les différents isoformes des MHC cardiaques sont très étudiés, car les changements dans les proportions de ces protéines semblent être directement reliés à la performance mécanique du cœur. Malgré l'expression simultanée de α - et β -MHC tôt durant le développement (E7.5- E8), β -MHC devient rapidement restreint aux ventricules et diminue drastiquement au

profit de α -MHC 7 jours après la naissance ²⁸⁶. Ce profil d'expression coïncide bien avec celui de PEX1, suggérant une régulation potentielle du promoteur β -MHC par PEX1. De plus, suite à une stimulation à la norépinéphrine (NE), une augmentation sélective de la production de protéines β -MHC, à travers les récepteurs α 1-adrénergiques, est observée dans les cultures primaires de cardiomyocytes fœtaux ²⁸⁷. Ces études sont consistantes avec nos résultats de transactivation, où le complexe multiprotéique active spécifiquement le promoteur β -MHC, suggérant l'implication potentielle de ce complexe dans la médiation des voies α 1-adrénergiques.

D'autre part, l'importance des sites cis-régulateurs GATA ^{229,272,288} et CArG ^{214,215} dans la médiation des voies α 1-adrénergiques et de la réponse hypertrophique est bien connue. Des études par Hasegawa et al. soulignent l'importance d'un site GATA proximal dans l'activation du promoteur β -MHC, suite à une stimulation α 1-adrénergique, mais les interactions transcriptionnelles qui y participent demeurent inconnues ²⁰⁴. Il serait donc raisonnable de suggérer PEX1 comme un des coactivateurs de GATA-4 sur le promoteur β -MHC. De plus, les promoteurs β -MHC et α -SkA sont impliqués dans la réponse hypertrophique, et régulés par l'interaction de GATA-4 et NFAT⁴⁷.

En outre, les éléments CArG présents dans la région proximale de divers gènes du muscle, sont impliqués dans la régulation spécifique des gènes du muscle cardiaque et squelettique ²⁸⁹⁻²⁹¹, mais semblent médier partiellement l'expression stimulée par les voies α 1-adrénergiques ²¹⁵, suggérant ainsi la présence d'autres cofacteurs. L'interaction de SRF avec d'autres facteurs nucléaires semble être à la base de l'activité transcriptionnelle tissu-spécifique. En effet, SRF est induit par Elk-1 et SAP-1 pour réguler l'activité de c-fos ²⁹², et forme des complexes transcriptionnels, notamment avec Nkx2.5 et GATA-4 pour activer certains gènes comme l'actine cardiaque (α -CA) ²⁹³. Dans ce contexte, nous proposons un complexe transcriptionnel formé de SRF, GATA-4 et PEX1, responsable d'activer divers promoteurs α 1-inductibles impliqués dans l'hypertrophie cardiaque.

3.2. Signalisation nucléaire par les récepteurs α 1adrénergiques : un mécanisme général

Les résultats présentés démontrent qu'une interaction combinatoire entre 3 protéines, active divers gènes cardiaques impliqués dans la réponse hypertrophique, incluant celle médiée par les voies α 1-adrénergiques. Etant donné que l'expression de PEX1 n'est pas restreinte au cœur, et que PEX1, SRF et la famille GATA sont simultanément présents dans plusieurs tissus et organes, ce complexe multiprotéique pourrait représenter un paradigme de la régulation α 1-adrénergique dans divers organes, tels que les muscles lisses et squelettiques, les cellules hépatiques et même dans les cellules neuronales.

3.2.1. Au niveau du muscle lisse

Contrairement aux cellules cardiaques terminalement différenciées, les cellules du muscle lisse (VSMC) présentes à l'état différencié dans les vaisseaux sanguins adultes, altèrent leur statut de différenciation dans des conditions pathologiques et adoptent un phénotype synthétique de prolifération ⁽²⁹⁴⁾. Cependant, les mécanismes moléculaires qui contrôlent cette modulation phénotypique demeurent méconnus. D'autre part, l'implication des voies α 1-adrénergiques dans la prolifération et la migration des VSMCs est bien établie, et joue un rôle critique dans les pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose ²⁸². Remarquablement, les voies de signalisation activées par les récepteurs α 1-adrénergiques ainsi que les familles de protéines impliquées dans la régulation des gènes cibles dans les systèmes vasculaires et cardiaques sont similaires, ce qui laisse présager que les mécanismes moléculaires induits au niveau cardiaque pourraient être pertinents à la régulation de la prolifération des VSMCs.

Une variété de médiateurs de la voie α 1-adrénergique joue des rôles importants dans les deux systèmes cardiaques et vasculaires. En effet, l'activation des récepteurs α 1-adrénergiques par la norépinéphrine (NE) stimule l'activité de la phospholipase D (PLD) au niveau des cardiomyocytes ²⁹⁵, mais également au niveau des VSMCs ²⁹⁶. De plus, des travaux plus récents ont rapporté l'implication des voies Ras/MAPKs dans l'activation de la PLD, induite par la NE dans les VSMCs ²⁹⁷; ces seconds messagers jouent un rôle essentiel dans la réponse hypertrophique, ce qui laisse supposer un mécanisme similaire au niveau du coeur. D'autre part, la protéine kinase p38, connue pour médier la réponse hypertrophique au niveau du coeur ¹⁹⁴, est également activée par la NE au niveau vasculaire, et médie la contraction, l'hypertrophie, la prolifération et la migration des VSMCs ⁷⁸; encore une fois, une voie qui permet de faire le parallèle entre les deux systèmes. De plus, les différents sous-types des récepteurs α 1-adrénergiques sont responsables de la régulation de la synthèse protéique au niveau des VSMCs ²⁹⁸, une caractéristique récapitulée durant la réponse hypertrophique dans le coeur. Ces quelques exemples démontrent que suite à une stimulation adrénérergique, plusieurs des effecteurs impliqués dans la réponse au stress sont communs dans les deux systèmes cardiaques et vasculaires. Également, il est important de noter que la conséquence ultime de l'activation de ces voies de signalisation est la régulation transcriptionnelle de gènes cibles qui sont très apparentés dans ces deux systèmes. En effet, la réponse aux voies pathologiques dans ces deux systèmes, engendre l'activation de certains gènes dotés de fonctions semblables, tels que SM-actin, SM 22- α dans les VSMCs et l'actin-alpha cardiaque, α et β -MHC dans le coeur. De surcroît, les régions de régulations de ces différents gènes possèdent des éléments de réponse cis-régulateurs très similaires.

En effet, il est maintenant accepté que la régulation des gènes spécifiques aux cellules du muscle lisse (SMC) sont contrôlés par des interactions combinatoires complexes de protéines trans-régulatrices ubiquitaires et histos-spécifiques ²⁹⁹. Cependant, malgré l'identification de plusieurs facteurs de transcription, les mécanismes responsables de la différenciation et la

prolifération du muscle lisse demeurent incertains. Des sites CArG ont été identifiés sur la plupart des gènes spécifiques au muscle lisse. De plus, l'activation de SRF par des agonistes hypertrophiques stimule l'expression des protéines cytosquelettiques dans les VSMCs ³⁰⁰. Par ailleurs, en plus des facteurs SRF, le facteur GATA-6 a été impliqué dans la différenciation des VSMCs ^{294,301}, mais présentement aucune étude ne suggère l'implication de GATA-6 dans la réponse hormonale par les GPCRs. Il semble donc exister une similitude entre les familles de facteurs de transcription impliqués dans la régulation des gènes cibles dans les deux systèmes cardiaques et vasculaires : la famille des protéines à boîte MADS ("MADS Box") tel que SRF et les facteurs à doigts de zinc tels que la famille de facteurs GATA, pertinents à notre étude, mais également les protéines à homéodomains dont les facteurs Nkx, les protéines à doigts de zinc "Krüppel-like", les protéines à Hélice-boucle-Hélice (HLH) et les protéines d'autres familles telles que NFAT et les protéines AP-1 ²⁹⁹. Par conséquent, il est envisageable de spéculer un rôle fonctionnel des interactions combinatoires entre SRF, GATA et PEX1 au niveau du muscle lisse. De plus, étant donné l'importance des voies des MAPKs au niveau du VSMCs ^{78,302}, il serait intéressant de voir si ce complexe représente une cible des voies α 1-adrénergiques médiées par les MAPKs, engendrant la régulation de l'expression des gènes au niveau du muscle lisse.

3.2.2. Au niveau neuronal

Parmi les divers récepteurs adrénergiques qui résident dans le cerveau, les récepteurs α 1-adrénergiques sont les plus abondants. Toutefois, le manque de sélectivité des agonistes et antagonistes aux différents sous-types, constitue un handicap dans la détermination de leur rôle fonctionnel dans le système nerveux central ⁸³. Des études ont souligné qu'une stimulation de ces récepteurs augmente la vigilance et diminue les besoins de sommeil, ^{87,88} et que la surexpression des α 1-ARs entraîne une neuro-dégénérescence apoptotique ⁸⁵. Mais les mécanismes moléculaires qui régulent ces effets excitateurs sont loin d'être compris.

Les patrons d'expression de GATA-2 et GATA-3 se chevauchent dans plusieurs domaines du système nerveux central, mais leurs modes de régulation et fonctions spécifiques sont incertaines³⁰³. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans la neurogenèse, la migration neuronale, et la projection axonale³⁰³⁻³⁰⁶. Étant donné l'expression de GATA-2 et 3 dans les stades précoces de la différenciation neuronale³⁰³, et leur implication aux stimuli hormonaux dans d'autres systèmes, notamment le système cardiaque, il serait intéressant d'investiguer si les membres de GATA ont la capacité de médier, directement ou indirectement, la réponse aux voies α 1-adrénergiques dans le système nerveux central, d'autant plus que PEX1 est exprimé dans le cerveau (Debrus et al, en progrès).

3.2.3. Au niveau hépatique

Les voies α 1-adrénergiques jouent des rôles essentiels au niveau de la fonction hépatique, notamment au niveau de la prolifération et de la croissance cellulaire²⁸¹. Elles sont également impliquées dans le processus de régénération du foie, caractérisé principalement par une ré-induction de la prolifération des hépatocytes en réponse à des situations de stress (stimulation hormonale, hépatectomie partielle (HP)). Cette fonction de régénération est contrôlée par des voies de signalisation impliquant divers seconds messagers. En effet, en plus des voies classiques impliquant l'élévation de l'inositol triphosphate et du calcium⁹⁵, des travaux par Spector et al., ont associé la voie de signalisation des MAPKs à la prolifération des hépatocytes⁷⁶. D'ailleurs, des travaux ont mis en évidence que l'administration *in vivo* d'agonistes α 1-adrénergiques stimule rapidement les voies PKB/Akt, suggérant que la voie α 1-adrénergique contrôle certaines fonctions anti-apoptotiques durant la régénération du foie⁹⁶. Cependant, malgré l'implication confirmée des récepteurs α 1-adrénergiques dans la régulation de la prolifération, les mécanismes moléculaires demeurent peu connus. Plusieurs études rapportent qu'une élévation de l'expression des gènes précoces immédiats, notamment c-fos et c-jun, intervient suite à une

stimulation adrénergique ; ces résultats suggèrent que le complexe AP-1 pourrait en partie moduler l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes hépatiques ^{97,98}.

Par ailleurs, l'expression hépatique durant l'embryogenèse des différents membres de la famille GATA ^{303,307}, et particulièrement de GATA-4 et -6, a été rapportée dans le modèle murin ³⁰⁸. Le facteur GATA-4 joue un rôle critique dans la régulation de divers gènes spécifiques au foie ³⁰⁹⁻³¹¹ ainsi que dans la restructuration de la chromatine, suggérant un mécanisme potentiel dans l'ouverture de la chromatine afin d'assurer une accessibilité aux régions régulatrices et donc un contrôle transcriptionnel ³¹². D'autre part, l'expression élevée de GATA-4 dans le foie fœtal par rapport au foie adulte ³¹¹, laisse présager un rôle dans la prolifération des précurseurs hépatocytaires au cours du développement. De plus, certains stimuli (hormonaux ou mécaniques) peuvent induire une dé-différenciation des hépatocytes matures et restaurer la prolifération de ces cellules ^{313,314}. Il serait dès lors intéressant d'évaluer la participation de GATA-4 dans ce phénomène. D'autre part, il serait intéressant d'investiguer l'interaction entre GATA-4 et PEX1 dans la réponse α 1-adrénergique au niveau du foie, d'autant plus que PEX1 est exprimé dans le foie adulte (Debrus et al, en préparation). En effet, l'importance des interactions des différents membres de la famille GATA avec d'autres co-régulateurs transcriptionnels, a été rapportée dans divers systèmes, notamment dans le cœur ^{228,280} et dans le foie ³¹⁵.

3.3. Perspectives futures

Malgré les travaux intensifs sur l'implication des interactions combinatoires dans la régulation génique, ces études n'en sont qu'à leur début. L'identification des divers éléments de réponse présents sur les gènes cardiaques cibles, ainsi que de leurs facteurs de transcription respectifs permet d'élucider les mécanismes moléculaires qui sont à la base du développement cardiaque

physiologique et pathologique. La caractérisation d'un nouveau cofacteur α 1-inductible au complexe GATA/SRF représente la première étape dans l'identification d'une nouvelle voie transcriptionnelle médiant la réponse nucléaire par les récepteurs α 1-adrénergiques sur le promoteur de l'ANF. Ce complexe GATA/SRF/PEX1 pourrait jouer un rôle essentiel aussi bien dans la croissance physiologique durant le développement, que dans la croissance pathologique durant l'hypertrophie. En effet, le profil d'expression de PEX1 est particulier. Il est activement présent durant l'embryogenèse, disparaît presque totalement chez l'adulte, et se trouve ré-induit dans le coeur durant le processus d'hypertrophie cardiaque (Debrus et al, en préparation) ; ce profil d'expression coïncidant temporellement avec celui de l'ANF.

L'étape suivante de cette étude est tout d'abord de comprendre le rôle de PEX1 par des études de gain et de perte de fonction. *In vitro*, nous chercherons à établir en premier lieu, si l'expression de PEX1 est nécessaire à la signalisation nucléaire de la voie α 1-adrénergique grâce à l'emploi de cardiomyocytes infectés avec des adénovirus exprimant l'ADNc complet ou l'antisens PEX1, traités ou non à la phényléphrine (PE). A cette fin, j'ai déjà généré des adénovirus contenant la séquence codante sens de HA-PEX1, et des adénovirus antisens PEX1 dirigés contre une partie de la région 5'UTR (région peu similaire aux autres membres à doigts de zinc), qui sont prêts à être testés. De plus, nous chercherons à vérifier si la surexpression de PEX1 potentialise la réponse à la PE, ou si elle est suffisante pour induire l'hypertrophie cardiaque. *In vivo*, il faudra aussi déterminer le rôle de PEX1 dans le développement normal et pathologique. Dans ce contexte, j'ai généré des souris transgéniques (α -MHC-PEX1), surexprimant PEX1 spécifiquement dans le coeur. Les embryons ont été récoltés aux jours E14 puis E12.5, mais aucun embryon n'était transgénique, suggérant une possibilité de létalité embryonnaire. Les analyses à un stade plus précoce (E9.5) ont donné deux positifs (qui seront analysés par immunohistochimie), suggérant une importance dose-dépendante de PEX1 durant le développement embryonnaire. Pour des études de gain de fonction à l'avenir, il faudra utiliser un système inductible.

Dans le contexte d'études de perte de fonction, des analyses bioinformatiques indiquent que toute la région codante de PEX1 se trouve dans l'exon 2 sur le chromosome 7 de la souris. L'inactivation génique de PEX1 devra aussi être faite par un système CRE-lox compte tenu de l'expression de PEX1 tôt dans les vaisseaux et le cœur. Cette excision tissu-spécifique pourrait aider dans la détermination du rôle dans d'autres tissus incluant les neurones.

L'ensemble de ces expériences devrait établir le rôle de PEX1 durant le développement embryonnaire et déterminer si PEX1 est un effecteur de la signalisation alpha1-adrénergique.

References

1. Hermans,E. Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol. Ther.* **99**, 25-44 (2003).
2. Vassilatis,D.K. *et al.* The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 4903-4908 (2003).
3. Gether,U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr. Rev.* **21**, 90-113 (2000).
4. Hirasawa,A. *et al.* Subtype-specific differences in subcellular localization of alpha1-adrenoceptors: chlorethylclonidine preferentially alkylates the accessible cell surface alpha1-adrenoceptors irrespective of the subtype. *Mol. Pharmacol.* **52**, 764-770 (1997).
5. Chalothorn,D. *et al.* Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Mol. Pharmacol.* **61**, 1008-1016 (2002).
6. Hague,C., Chen,Z., Uberti,M. & Minneman,K.P. Alpha(1)-adrenergic receptor subtypes: non-identical triplets with different dancing partners? *Life Sci.* **74**, 411-418 (2003).
7. Strader,C.D. *et al.* Allele-specific activation of genetically engineered receptors. *J. Biol. Chem.* **266**, 5-8 (1991).
8. Zhao,M.M., Hwa,J. & Perez,D.M. Identification of critical extracellular loop residues involved in alpha 1-adrenergic receptor subtype-selective antagonist binding. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1118-1126 (1996).
9. Strader,C.D., Fong,T.M., Tota,M.R., Underwood,D. & Dixon,R.A. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 101-132 (1994).
10. Wess,J. Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol. Ther.* **80**, 231-264 (1998).
11. Neer,E.J. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**, 249-257 (1995).
12. Jones,M.B., Siderovski,D.P. & Hooks,S.B. The G{beta}{gamma} DIMER as a NOVEL SOURCE of SELECTIVITY in G-Protein Signaling: GGL-ing AT CONVENTION. *Mol. Interv.* **4**, 200-214 (2004).

13. Ross,E.M. & Wilkie,T.M. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 795-827 (2000).
14. Wettschureck,N., Moers,A. & Offermanns,S. Mouse models to study G-protein-mediated signaling. *Pharmacol. Ther.* **101**, 75-89 (2004).
15. Yu,S. *et al.* Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (G α) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the g α gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 8715-8720 (1998).
16. Yu,S. *et al.* Increased insulin sensitivity in G α knockout mice. *J. Biol. Chem.* **276**, 19994-19998 (2001).
17. Yu,S. *et al.* Paternal versus maternal transmission of a stimulatory G-protein alpha subunit knockout produces opposite effects on energy metabolism. *J. Clin. Invest* **105**, 615-623 (2000).
18. Neves,S.R., Ram,P.T. & Iyengar,R. G protein pathways. *Science* **296**, 1636-1639 (2002).
19. Wu,D., Huang,C.K. & Jiang,H. Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 17)**, 2935-2940 (2000).
20. Wymann,M.P., Sozzani,S., Altruda,F., Mantovani,A. & Hirsch,E. Lipids on the move: phosphoinositide 3-kinases in leukocyte function. *Immunol. Today* **21**, 260-264 (2000).
21. Hirsch,E. *et al.* Resistance to thromboembolism in PI3K γ -deficient mice. *FASEB J.* **15**, 2019-2021 (2001).
22. Valenzuela,D. *et al.* G α (o) is necessary for muscarinic regulation of Ca²⁺ channels in mouse heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 1727-1732 (1997).
23. Minneman,K.P. Alpha1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol. Rev.* **40**, 87-119 (1988).
24. Offermanns,S. *et al.* Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking G α q. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 14089-14094 (1997).
25. Kotecha,S.A. *et al.* Co-stimulation of mGluR5 and N-methyl-D-aspartate receptors is required for potentiation of excitatory synaptic transmission in hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **278**, 27742-27749 (2003).

26. Dorn,G.W. & Brown,J.H. Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 26-34 (1999).
27. D'Angelo,D.D. *et al.* Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 8121-8126 (1997).
28. Akhter,S.A. *et al.* Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science* **280**, 574-577 (1998).
29. Esposito,G. *et al.* Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* **105**, 85-92 (2002).
30. Kurose,H. Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci.* **74**, 155-161 (2003).
31. Diviani,D., Soderling,J. & Scott,J.D. AKAP-Lbc anchors protein kinase A and nucleates Galpha 12-selective Rho-mediated stress fiber formation. *J. Biol. Chem.* **276**, 44247-44257 (2001).
32. Nagata,K. *et al.* Galpha(i2) but not Galpha(i3) is required for muscarinic inhibition of contractility and calcium currents in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **87**, 903-909 (2000).
33. Maruyama,Y. *et al.* Galpha(12/13) mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **91**, 961-969 (2002).
34. Arai,K. *et al.* Differential requirement of G alpha12, G alpha13, G alphaq, and G beta gamma for endothelin-1-induced c-Jun NH2-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol. Pharmacol.* **63**, 478-488 (2003).
35. Gonzalez,G.A. & Montminy,M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59**, 675-680 (1989).
36. Chrivia,J.C. *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855-859 (1993).
37. Arias,J. *et al.* Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *Nature* **370**, 226-229 (1994).
38. Karin,M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **270**, 16483-16486 (1995).
39. Yano,M., Kim,S., Izumi,Y., Yamanaka,S. & Iwao,H. Differential activation of cardiac c-jun amino-terminal kinase and extracellular signal-regulated

- kinase in angiotensin II-mediated hypertension. *Circ. Res.* **83**, 752-760 (1998).
40. Kim,S. & Iwao,H. Activation of mitogen-activated protein kinases in cardiovascular hypertrophy and remodeling. *Jpn. J. Pharmacol.* **80**, 97-102 (1999).
 41. Goswami,S.K., Shafiq,S. & Siddiqui,M.A. Modulation of MLC-2v gene expression by AP-1: complex regulatory role of Jun in cardiac myocytes. *Mol. Cell Biochem.* **217**, 13-20 (2001).
 42. Herdegen,T. & Waetzig,V. AP-1 proteins in the adult brain: facts and fiction about effectors of neuroprotection and neurodegeneration. *Oncogene* **20**, 2424-2437 (2001).
 43. Rao,A., Luo,C. & Hogan,P.G. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747 (1997).
 44. Macian,F., Lopez-Rodriguez,C. & Rao,A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489 (2001).
 45. Kegley,K.M., Gephart,J., Warren,G.L. & Pavlath,G.K. Altered primary myogenesis in NFATC3(-/-) mice leads to decreased muscle size in the adult. *Dev. Biol.* **232**, 115-126 (2001).
 46. Ranger,A.M. *et al.* The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**, 186-190 (1998).
 47. Molkentin,J.D. *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228 (1998).
 48. Hadcock,J.R. & Malbon,C.C. Agonist regulation of gene expression of adrenergic receptors and G proteins. *J. Neurochem.* **60**, 1-9 (1993).
 49. Stewart,A.F. *et al.* Cloning of the rat alpha 1C-adrenergic receptor from cardiac myocytes. alpha 1C, alpha 1B, and alpha 1D mRNAs are present in cardiac myocytes but not in cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* **75**, 796-802 (1994).
 50. Brodde,O.E. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure [published erratum appears in *Pharmacol Rev* 1991 Sep;43(3):350]. *Pharmacol. Rev.* **43**, 203-242 (1991).
 51. Meszaros,J.G. *et al.* Identification of G protein-coupled signaling pathways in cardiac fibroblasts: cross talk between G(q) and G(s). *Am. J. Physiol Cell Physiol* **278**, C154-C162 (2000).

52. Frey,N. & Olson,E.N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu. Rev. Physiol* **65**, 45-79 (2003).
53. Antos,C.L. *et al.* Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ. Res.* **89**, 997-1004 (2001).
54. Rockman,H.A., Koch,W.J. & Lefkowitz,R.J. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* **415**, 206-212 (2002).
55. Xiao,R.P., Ji,X. & Lakatta,E.G. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol. Pharmacol.* **47**, 322-329 (1995).
56. Xiao,R.P. *et al.* Coupling of beta2-adrenoceptor to Gi proteins and its physiological relevance in murine cardiac myocytes. *Circulation* **84**, 43-52 (1999).
57. Singh,K., Xiao,L., Remondino,A., Sawyer,D.B. & Colucci,W.S. Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis. *J. Cell Physiol* **189**, 257-265 (2001).
58. Fedida,D., Braun,A.P. & Giles,W.R. Alpha1-adrenoceptors in myocardium: functional aspects and transmembrane signaling mechanisms. *Physiol. Rev.* **73**, 469-487 (1993).
59. Puceat,M. & Vassort,G. Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol. Cell Biochem.* **157**, 65-72 (1996).
60. Exton,J.H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 26-42 (1994).
61. Divecha,N. & Irvine,R.F. Phospholipid signaling. *Cell* **80**, 269-278 (1995).
62. Zhong,H., Lee,D., Robeva,A. & Minneman,K.P. Signaling pathways activated by alpha1-adrenergic receptor subtypes in PC12 cells. *Life Sci.* **68**, 2269-2276 (2001).
63. Hieble,J.P. *et al.* International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol. Rev.* **47**, 267-270 (1995).
64. Piascik,M.T. & Perez,D.M. Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **298**, 403-410 (2001).
65. Price,D.T., Chari,R.S., Berkowitz,D.E., Meyers,W.C. & Schwinn,D.A. Expression of alpha 1-adrenergic receptor subtype mRNA in rat tissues and human SK-N-MC neuronal cells: implications for alpha 1-adrenergic receptor subtype classification. *Mol. Pharmacol.* **46**, 221-226 (1994).

66. Price,D.T., Lefkowitz,R.J., Caron,M.G., Berkowitz,D. & Schwinn,D.A. Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol. Pharmacol.* **45**, 171-175 (1994).
67. Piascik,M.T. *et al.* Immunocytochemical localization of the alpha-1B adrenergic receptor and the contribution of this and the other subtypes to vascular smooth muscle contraction: analysis with selective ligands and antisense oligonucleotides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **283**, 854-868 (1997).
68. Rokosh,D.G. *et al.* Distribution of alpha 1C-adrenergic receptor mRNA in adult rat tissues by RNase protection assay and comparison with alpha 1B and alpha 1D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1177-1184 (1994).
69. Wise,A., Lee,T.W., MacEwan,D.J. & Milligan,G. Degradation of G11 alpha/Gq alpha is accelerated by agonist occupancy of alpha 1A/D, alpha 1B, and alpha 1C adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **270**, 17196-17203 (1995).
70. Williams,N.G., Zhong,H. & Minneman,K.P. Differential coupling of alpha1-, alpha2-, and beta-adrenergic receptors to mitogen-activated protein kinase pathways and differentiation in transfected PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 24624-24632 (1998).
71. Xing,M. & Insel,P.A. Protein kinase C-dependent activation of cytosolic phospholipase A2 and mitogen-activated protein kinase by alpha 1-adrenergic receptors in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Clin. Invest* **97**, 1302-1310 (1996).
72. Ruan,Y. *et al.* Alpha-1A adrenergic receptor stimulation with phenylephrine promotes arachidonic acid release by activation of phospholipase D in rat-1 fibroblasts: inhibition by protein kinase A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 576-585 (1998).
73. Zhong,H., Murphy,T.J. & Minneman,K.P. Activation of signal transducers and activators of transcription by alpha(1A)-adrenergic receptor stimulation in PC12 cells. *Mol. Pharmacol.* **57**, 961-967 (2000).
74. Lee,D., Robeva,A., Chen,Z. & Minneman,K.P. Mutational uncoupling of alpha1A-adrenergic receptors from G proteins also uncouples mitogenic and transcriptional responses in PC12 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306**, 471-477 (2003).
75. Yamauchi,J., Nagao,M., Kaziro,Y. & Itoh,H. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G protein-coupled receptors. Involvement of Gbetagamma and Galphaq/11 subunits. *J. Biol. Chem.* **272**, 27771-27777 (1997).

76. Spector, M.S. *et al.* Differential regulation of the mitogen-activated protein and stress-activated protein kinase cascades by adrenergic agonists in quiescent and regenerating adult rat hepatocytes. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3556-3565 (1997).
77. Bogoyevitch, M.A. *et al.* Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem. J.* **314**, 115-121 (1996).
78. Xin, X., Yang, N., Eckhart, A.D. & Faber, J.E. Alpha1D-adrenergic receptors and mitogen-activated protein kinase mediate increased protein synthesis by arterial smooth muscle. *Mol. Pharmacol.* **51**, 764-775 (1997).
79. Zhong, H. & Minneman, K.P. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways in PC12 cells by closely related alpha1-adrenergic receptor subtypes. *J. Neurochem.* **72**, 2388-2396 (1999).
80. Burch, R.M. *et al.* Alpha 1-adrenergic stimulation of arachidonic acid release and metabolism in a rat thyroid cell line. Mediation of cell replication by prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* **261**, 11236-11241 (1986).
81. Kanterman, R.Y. *et al.* Alpha 1-adrenergic receptor mediates arachidonic acid release in spinal cord neurons independent of inositol phospholipid turnover. *J. Neurochem.* **54**, 1225-1232 (1990).
82. Minneman, K.P. *et al.* Transcriptional responses to growth factor and G protein-coupled receptors in PC12 cells: comparison of alpha(1)-adrenergic receptor subtypes. *J. Neurochem.* **74**, 2392-2400 (2000).
83. Pupo, A.S. & Minneman, K.P. Adrenergic pharmacology: focus on the central nervous system. *CNS. Spectr.* **6**, 656-662 (2001).
84. Docherty, J.R. Subtypes of functional alpha1- and alpha2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* **361**, 1-15 (1998).
85. Zuscik, M.J. *et al.* Overexpression of the alpha1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. *Nat. Med.* **6**, 1388-1394 (2000).
86. Kunieda, T. *et al.* Systemic overexpression of the alpha 1B-adrenergic receptor in mice: an animal model of epilepsy. *Epilepsia* **43**, 1324-1329 (2002).
87. Knauber, J. & Muller, W.E. Decreased exploratory activity and impaired passive avoidance behaviour in mice deficient for the alpha(1b)-adrenoceptor. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **10**, 423-427 (2000).

88. Stone, E.A., Lin, Y., Itteera, A. & Quartermain, D. Pharmacological evidence for the role of central alpha 1B-adrenoceptors in the motor activity and spontaneous movement of mice. *Neuropharmacology* **40**, 254-261 (2001).
89. Wilson, K.M. & Minneman, K.P. Regional variations in alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain. *J. Neurochem.* **53**, 1782-1786 (1989).
90. Stevenson, R.W. *et al.* Dose-related effects of epinephrine on glucose production in conscious dogs. *Am. J. Physiol* **260**, E363-E370 (1991).
91. Podolin, D.A., Gleeson, T.T. & Mazzeo, R.S. Role of norepinephrine in hepatic gluconeogenesis: evidence of aging and training effects. *Am. J. Physiol* **267**, E680-E686 (1994).
92. Cruise, J.L., Houck, K.A. & Michalopoulos, G.K. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha1 adrenoceptor by norepinephrine. *Science* **227**, 749-751 (1985).
93. Refsnes, M. *et al.* Stimulatory and inhibitory effects of catecholamines on DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: role of alpha 1- and beta-adrenergic mechanisms. *J. Cell Physiol* **151**, 164-171 (1992).
94. de Juan, C., Benito, M. & Fabregat, I. Regulation of albumin expression in fetal rat hepatocytes cultured under proliferative conditions: role of epidermal growth factor and hormones. *J. Cell Physiol* **152**, 95-101 (1992).
95. Chatton, J.Y., Liu, H. & Stucki, J.W. Simultaneous measurements of Ca²⁺ in the intracellular stores and the cytosol of hepatocytes during hormone-induced Ca²⁺ oscillations. *FEBS Lett.* **368**, 165-168 (1995).
96. Hong, F., Nguyen, V.A., Shen, X., Kunos, G. & Gao, B. Rapid activation of protein kinase B/Akt has a key role in antiapoptotic signaling during liver regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **279**, 974-979 (2000).
97. Slotkin, T.A., Lappi, S.E. & Seidler, F.J. Beta-adrenergic control of c-fos expression in fetal and neonatal rat tissues: relationship to cell differentiation and teratogenesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**, 188-195 (1995).
98. Im, Y.B. *et al.* Differential effects of adrenaline and noradrenaline on the hepatic expression of immediate early genes in mice. *J. Auton. Pharmacol.* **18**, 149-155 (1998).
99. Koch, W.J., Lefkowitz, R.J. & Rockman, H.A. Functional consequences of altering myocardial adrenergic receptor signaling. *Annu. Rev. Physiol* **62**, 237-260 (2000).

100. Cavalli,A. *et al.* Decreased blood pressure response in mice deficient of the alpha1b-adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 11589-11594 (1997).
101. Vecchione,C. *et al.* Cardiovascular influences of alpha1b-adrenergic receptor defect in mice. *Circulation* **105**, 1700-1707 (2002).
102. Rokosh,D.G. & Simpson,P.C. Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 9474-9479 (2002).
103. Daly,C.J. *et al.* A knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular alpha1B-adrenoceptors in mouse. *Physiol Genomics* **9**, 85-91 (2002).
104. Tanoue,A. *et al.* The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. *J. Clin. Invest* **109**, 765-775 (2002).
105. Turnbull,L., McCloskey,D.T., O'Connell,T.D., Simpson,P.C. & Baker,A.J. Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1AB-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **284**, H1104-H1109 (2003).
106. Luther,H.P. *et al.* Expression of alpha1-adrenergic receptor subtypes in heart cell culture. *Mol. Cell Biochem.* **224**, 69-79 (2001).
107. Morwinski,R., Karsten,U. & Wallukat,G. Mast cells detected in cultures of neonatal rat heart cells. *Agents Actions* **41 Spec No**, C39-C40 (1994).
108. Noguchi,H., Muraoka,R., Kigoshi,S. & Muramatsu,I. Pharmacological characterization of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat heart: a binding study. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 1026-1030 (1995).
109. Graham,R.M., Perez,D.M., Hwa,J. & Piascik,M.T. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ. Res.* **78**, 737-749 (1996).
110. Wolff,D.W., Dang,H.K., Liu,M.F., Jeffries,W.B. & Scofield,M.A. Distribution of alpha1-adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **32**, 117-122 (1998).
111. Wenham,D., Rahmatullah,R.J., Rahmatullah,M., Hansen,C.A. & Robishaw,J.D. Differential coupling of alpha1-adrenoreceptor subtypes to phospholipase C and mitogen activated protein kinase in neonatal rat cardiac myocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **339**, 77-86 (1997).

112. Fujinaga,M., Hoffman,B.B. & Baden,J.M. Receptor subtype and intracellular signal transduction pathway associated with situs inversus induced by alpha 1 adrenergic stimulation in rat embryos. *Dev. Biol.* **162**, 558-567 (1994).
113. Barki-Harrington,L., Perrino,C. & Rockman,H.A. Network integration of the adrenergic system in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **63**, 391-402 (2004).
114. Sadoshima,J. & Izumo,S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 551-571 (1997).
115. Shioi,T. *et al.* Akt/protein kinase B promotes organ growth in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* **22**, 2799-2809 (2002).
116. Vanhaesebroeck,B. *et al.* Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 535-602 (2001).
117. Toker,A. & Cantley,L.C. Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* **387**, 673-676 (1997).
118. Shioi,T. *et al.* The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice. *EMBO J.* **19**, 2537-2548 (2000).
119. Crackower,M.A. *et al.* Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737-749 (2002).
120. Naga Prasad,S.V., Esposito,G., Mao,L., Koch,W.J. & Rockman,H.A. Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **275**, 4693-4698 (2000).
121. Franke,T.F., Kaplan,D.R., Cantley,L.C. & Toker,A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668 (1997).
122. Alessi,D.R., Kozłowski,M.T., Weng,Q.P., Morrice,N. & Avruch,J. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Curr. Biol.* **8**, 69-81 (1998).
123. Downward,J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 262-267 (1998).
124. Latronico,M.V., Costinean,S., Lavitrano,M.L., Peschle,C. & Condorelli,G. Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1015**, 250-260 (2004).

125. Condorelli, G. *et al.* Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 12333-12338 (2002).
126. Shiojima, I. *et al.* Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J. Biol. Chem.* **277**, 37670-37677 (2002).
127. Tu, V.C., Bahl, J.J. & Chen, Q.M. Signals of oxidant-induced cardiomyocyte hypertrophy: key activation of p70 S6 kinase-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**, 1101-1110 (2002).
128. Simm, A., Schluter, K., Diez, C., Piper, H.M. & Hoppe, J. Activation of p70(S6) kinase by beta-adrenoceptor agonists on adult cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **30**, 2059-2067 (1998).
129. Boluyt, M.O. *et al.* Rapamycin inhibits alpha 1-adrenergic receptor-stimulated cardiac myocyte hypertrophy but not activation of hypertrophy-associated genes. Evidence for involvement of p70 S6 kinase. *Circ. Res.* **81**, 176-186 (1997).
130. McMullen, J.R. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 12355-12360 (2003).
131. Clerk, A. & Sugden, P.H. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ. Res.* **86**, 1019-1023 (2000).
132. Sah, V.P., Hoshijima, M., Chien, K.R. & Brown, J.H. Rho is required for G α q and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J. Biol. Chem.* **271**, 31185-31190 (1996).
133. Tapon, N. & Hall, A. Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 86-92 (1997).
134. Hines, W.A. & Thorburn, A. Ras and rho are required for galphaq-induced hypertrophic gene expression in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 485-494 (1998).
135. Satoh, S. *et al.* Chronic inhibition of Rho kinase blunts the process of left ventricular hypertrophy leading to cardiac contractile dysfunction in hypertension-induced heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**, 59-70 (2003).
136. Hilal-Dandan, R. *et al.* Lysophosphatidic acid induces hypertrophy of neonatal cardiac myocytes via activation of G α i and Rho. *J. Mol. Cell Cardiol.* **36**, 481-493 (2004).

137. Thorburn,J., Xu,S. & Thorburn,A. MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *EMBO J.* **16**, 1888-1900 (1997).
138. Chiloeches,A. *et al.* Regulation of Ras.GTP loading and Ras-Raf association in neonatal rat ventricular myocytes by G protein-coupled receptor agonists and phorbol ester. Activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade by phorbol ester is mediated by Ras. *J. Biol. Chem.* **274**, 19762-19770 (1999).
139. Vojtek,A.B. & Der,C.J. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **273**, 19925-19928 (1998).
140. Thorburn,A. *et al.* HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy [published erratum appears in *J Biol Chem* 1993 Jul 25;268(21):16082]. *J. Biol. Chem.* **268**, 2244-2249 (1993).
141. Garrington,T.P. & Johnson,G.L. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 211-218 (1999).
142. Hunter,J.J., Tanaka,N., Rockman,H.A., Ross,J., Jr. & Chien,K.R. Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 23173-23178 (1995).
143. Sugden,P.H. & Clerk,A. Activation of the small GTP-binding protein Ras in the heart by hypertrophic agonists. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 1-8 (2000).
144. Wang,L. & Proud,C.G. Ras/Erk signaling is essential for activation of protein synthesis by Gq protein-coupled receptor agonists in adult cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**, 821-829 (2002).
145. Ramirez,M.T. *et al.* The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **272**, 14057-14061 (1997).
146. Lazou,A., Sugden,P.H. & Clerk,A. Activation of mitogen-activated protein kinases (p38-MAPKs, SAPKs/JNKs and ERKs) by the G-protein-coupled receptor agonist phenylephrine in the perfused rat heart. *Biochem. J.* **332** (Pt 2), 459-465 (1998).
147. Cobb,M.H., Boulton,T.G. & Robbins,D.J. Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regul.* **2**, 965-978 (1991).

148. Kolch,W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem. J.* **351 Pt 2**, 289-305 (2000).
149. Wang,L., Gout,I. & Proud,C.G. Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **276**, 32670-32677 (2001).
150. Xiao,L. *et al.* MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* **33**, 779-787 (2001).
151. Zechner,D., Thuerauf,D.J., Hanford,D.S., McDonough,P.M. & Glembotski,C.C. 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 (1997).
152. Silberbach,M. *et al.* Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 24858-24864 (1999).
153. Post,G.R., Goldstein,D., Thuerauf,D.J., Glembotski,C.C. & Brown,J.H. Dissociation of p44 and p42 mitogen-activated protein kinase activation from receptor-induced hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 8452-8457 (1996).
154. Yue,T.L. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **275**, 37895-37901 (2000).
155. Liang,Q. *et al.* The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Mol. Cell Biol.* **21**, 7460-7469 (2001).
156. Thorburn,J., McMahon,M. & Thorburn,A. Raf-1 kinase activity is necessary and sufficient for gene expression changes but not sufficient for cellular morphology changes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **269**, 30580-30586 (1994).
157. Bueno,O.F. *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J.* **19**, 6341-6350 (2000).
158. Davis,R.J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252 (2000).

159. Bogoyevitch, M.A., Ketterman, A.J. & Sugden, P.H. Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 29710-29717 (1995).
160. Lange-Carter, C.A., Pleiman, C.M., Gardner, A.M., Blumer, K.J. & Johnson, G.L. A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* **260**, 315-319 (1993).
161. Bogoyevitch, M.A. *et al.* Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-Jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* **79**, 162-173 (1996).
162. Bokemeyer, D. *et al.* Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 by the stress-activated protein kinase signaling pathway but not by extracellular signal-regulated kinase in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **271**, 639-642 (1996).
163. Minamino, T. *et al.* MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by Gq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 3866-3871 (2002).
164. Cai, C.L. *et al.* Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* **5**, 877-889 (2003).
165. Yin, T. *et al.* Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J. Biol. Chem.* **272**, 19943-19950 (1997).
166. Clerk, A., Fuller, S.J., Michael, A. & Sugden, P.H. Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses. *J. Biol. Chem.* **273**, 7228-7234 (1998).
167. Derijard, B. *et al.* Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* **267**, 682-685 (1995).
168. Raingeaud, J. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J. Biol. Chem.* **270**, 7420-7426 (1995).

169. Wang, Y. *et al.* Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* **273**, 2161-2168 (1998).
170. Clerk, A., Michael, A. & Sugden, P.H. 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 (1998).
171. Markou, T., Hadzopoulou-Cladaras, M. & Lazou, A. Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathways. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 1001-1011 (2004).
172. Braun, A.P. & Schulman, H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol* **57**, 417-445 (1995).
173. Hudmon, A. & Schulman, H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* **364**, 593-611 (2002).
174. Dolmetsch, R.E., Lewis, R.S., Goodnow, C.C. & Healy, J.I. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* **386**, 855-858 (1997).
175. Passier, R. *et al.* CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo [comment]. *J. Clin. Invest.* **105**, 1395-1406 (2000).
176. Edman, C.F. & Schulman, H. Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* **1221**, 89-101 (1994).
177. Ramirez, M.T., Zhao, X.L., Schulman, H. & Brown, J.H. The nuclear deltaB isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 31203-31208 (1997).
178. Misra, R.P. *et al.* L-type voltage-sensitive calcium channel activation stimulates gene expression by a serum response factor-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **269**, 25483-25493 (1994).
179. Ho, N., Gullberg, M. & Chatila, T. Activation protein 1-dependent transcriptional activation of interleukin 2 gene by Ca²⁺/calmodulin kinase type IV/Gr. *J. Exp. Med.* **184**, 101-112 (1996).

180. Sei,C.A. *et al.* The alpha-adrenergic stimulation of atrial natriuretic factor expression in cardiac myocytes requires calcium influx, protein kinase C, and calmodulin-regulated pathways. *J. Biol. Chem.* **266**, 15910-15916 (1991).
181. Zhu,W. *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **275**, 15239-15245 (2000).
182. Zhang,T. *et al.* The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 1261-1267 (2002).
183. De Windt,L.J. *et al.* Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ. Res.* **86**, 255-263 (2000).
184. Chien,K.R., Knowlton,K.U., Zhu,H. & Chien,S. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* **5**, 3037-3046 (1991).
185. Keys,J.R. & Koch,W.J. The adrenergic pathway and heart failure. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**, 13-30 (2004).
186. Rivera,V.M. & Greenberg,M.E. Growth factor-induced gene expression: the ups and downs of c-fos regulation. *New Biol.* **2**, 751-758 (1990).
187. Lange,C.M. & Bading,H. The role of putative intragenic control elements in c-fos regulation by calcium and growth factor signalling pathways. *J. Neurochem.* **77**, 1293-1300 (2001).
188. Jochum,W., Passegue,E. & Wagner,E.F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* **20**, 2401-2412 (2001).
189. Shaulian,E. & Karin,M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-E136 (2002).
190. Takemoto,Y. *et al.* Increased JNK, AP-1 and NF-kappa B DNA binding activities in isoproterenol-induced cardiac remodeling. *J. Mol. Cell Cardiol.* **31**, 2017-2030 (1999).
191. Izumi,Y. *et al.* Important role of angiotensin II-mediated c-Jun NH(2)-terminal kinase activation in cardiac hypertrophy in hypertensive rats. *Hypertension* **36**, 511-516 (2000).

192. Omura, T. *et al.* Dominant negative mutant of c-Jun inhibits cardiomyocyte hypertrophy induced by endothelin 1 and phenylephrine. *Hypertension* **39**, 81-86 (2002).
193. Taimor, G., Schluter, K.D., Best, P., Helmig, S. & Piper, H.M. Transcription activator protein 1 mediates alpha- but not beta-adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **286**, H2369-H2375 (2004).
194. Charron, F. *et al.* Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev.* **15**, 2702-2719 (2001).
195. McBride, K., Charron, F., Lefebvre, C. & Nemer, M. Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos. *Oncogene* **22**, 8403-8412 (2003).
196. Simpson, P.C., Kariya, K., Karns, L.R., Long, C.S. & Karliner, J.S. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol. Cell. Biochem.* **104**, 35-43 (1991).
197. Knowlton, K.U. *et al.* 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 (1991).
198. Argentin, S. *et al.* Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 777-790 (1994).
199. Morin, S., Paradis, P., Aries, A. & Nemer, M. Serum response factor-GATA ternary complex required for nuclear signaling by a G-protein-coupled receptor. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1036-1044 (2001).
200. Grepin, C. *et al.* A hormone-encoding gene identifies a pathway for cardiac but not skeletal muscle gene transcription. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3115-3129 (1994).
201. Marttila, M. *et al.* GATA4 mediates transcriptional activation of the B-type natriuretic peptide gene expression in response to hemodynamic stress. *Endocrinology* **142**, 4693-4700 (2001).
202. He, Q., Mendez, M. & LaPointe, M.C. Regulation of the human brain natriuretic peptide gene by GATA-4. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* **283**, E50-E57 (2002).

203. Molkenstin,J.D., Kalvakolanu,D.V. & Markham,B.E. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the α -myosin heavy-chain gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 4947-4957 (1994).
204. Hasegawa,K., Lee,S.J., Jobe,S.M., Markham,B.E. & Kitsis,R.N. cis-Acting sequences that mediate induction of beta-myosin heavy chain gene expression during left ventricular hypertrophy due to aortic constriction. *Circulation* **96**, 3943-3953 (1997).
205. Charron,F. & Nemer,M. GATA transcription factors and cardiac development. *Sem. Cell Dev. Biol.* **10**, 85-91 (1999).
206. Simon,M.C. Gotta have GATA. *Nat. Genet.* **11**, 9-11 (1995).
207. Laverriere,A.C. *et al.* GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* **269**, 23177-23184 (1994).
208. Grépin,C., Robitaille,L., Antakly,T. & Nemer,M. Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks *in vitro* cardiac muscle differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4095-4102 (1995).
209. Grépin,C., Nemer,G. & Nemer,M. Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. *Development* **124**, 2387-2395 (1997).
210. Chen,C.Y. & Schwartz,R.J. Recruitment of the tinman homolog Nkx-2.5 by serum response factor activates cardiac α -actin gene transcription. *Mol. Biol. Cell* **16**, 6372-6384 (1996).
211. Latinkic,B.V. *et al.* Distinct enhancers regulate skeletal and cardiac muscle-specific expression programs of the cardiac alpha-actin gene in *Xenopus* embryos. *Dev. Biol.* **245**, 57-70 (2002).
212. Liu,T., Wu,J. & He,F. Evolution of cis-acting elements in 5' flanking regions of vertebrate actin genes. *J. Mol. Evol.* **50**, 22-30 (2000).
213. Fisher,S.A., Walsh,K. & Forehand,C.J. Characterization of cardiac gene cis-regulatory elements in the early stages of chicken heart morphogenesis. *J. Mol. Cell Cardiol.* **28**, 113-122 (1996).
214. Karns,L.R., Kariya,K. & Simpson,P.C. 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 (1995).

215. Sprenkle,A.B., Murray,S.F. & Glembotski,C.C. 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: (1995).
216. Small,E.M. & Krieg,P.A. Transgenic analysis of the atrialnatriuretic factor (ANF) promoter: Nkx2-5 and GATA-4 binding sites are required for atrial specific expression of ANF. *Dev. Biol.* **261**, 116-131 (2003).
217. Treisman,R. Journey to the surface of the cell: Fos regulation and the SRE. *EMBO J.* **14**, 4905-4913 (1995).
218. Chai,J. & Tarnawski,A.S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J. Physiol Pharmacol.* **53**, 147-157 (2002).
219. Miano,J.M. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**, 577-593 (2003).
220. Hines,W.A., Thorburn,J. & Thorburn,A. A low-affinity serum response element allows other transcription factors to activate inducible gene expression in cardiac myocytes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1841-1852 (1999).
221. Morin,S., Charron,F., Robitaille,L. & Nemer,M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J.* **19**, 2046-2055 (2000).
222. Lin,Q., Schwarz,J., Bucana,C. & Olson,E.N. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *mef2c*. *Science* **276**, 1404-1407:2 (1997).
223. Liu,Z.P. *et al.* CHAMP, a novel cardiac-specific helicase regulated by MEF2C. *Dev. Biol.* **234**, 497-509 (2001).
224. Ardati,A. & Nemer,M. A nuclear pathway for α_1 -adrenergic receptor signaling in cardiac cells. *EMBO J.* **12**, 5131-5139 (1993).
225. Akazawa,H. & Komuro,I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **92**, 1079-1088 (2003).
226. Patient,R.K. & McGhee,J.D. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 416-422 (2002).
227. Ohneda,K. *et al.* A minigene containing four discrete cis elements recapitulates GATA-1 gene expression in vivo. *Genes Cells* **7**, 1243-1254 (2002).

228. Molkenkin, J.D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6 - Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J. Biol. Chem.* **275**, 38949-38952 (2000).
229. Morimoto, T. *et al.* 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 (2000).
230. Yanazume, T. *et al.* Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **277**, 8618-8625 (2002).
231. Hardt, S.E. & Sadoshima, J. Negative regulators of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **63**, 500-509 (2004).
232. Yanazume, T. *et al.* Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Mol. Cell Biol.* **23**, 3593-3606 (2003).
233. Svensson, E.C., Tufts, R.L., Polk, C.E. & Leiden, J.M. Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 956-961 (1999).
234. Charron, F., Paradis, P., Bronchain, O., Nemer, G. & Nemer, M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4355-4365 (1999).
235. Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J. & Nemer, M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J.* **16**, 5687-5696 (1997).
236. Lee, Y. *et al.* 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 (1998).
237. Belaguli, N.S. *et al.* Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Mol. Biol. Cell* **20**, 7550-7558 (2000).
238. Sepulveda, J.L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N. & Schwartz, R.J. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 25775-25782 (2002).
239. Kolodziejczyk, S.M. *et al.* MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. *Curr. Biol.* **9**, 1203-1206 (1999).

240. Zhu,H., Garcia,A.V., Ross,R.S., Evans,S.M. & Chien,K.R. 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 (1991).
241. Han,J. & Molkentin,J.D. Regulation of MEF2 by p38 MAPK and its implication in cardiomyocyte biology. *Trends Cardiovasc. Med.* **10**, 19-22 (2000).
242. Marinissen,M.J., Chiariello,M., Pallante,M. & Gutkind,J.S. A network of mitogen-activated protein kinases links G protein-coupled receptors to the c-jun promoter: a role for c-Jun NH2-terminal kinase, p38s, and extracellular signal-regulated kinase 5. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4289-4301 (1999).
243. Nicol,R.L. *et al.* Activated MEK5 induces serial assembly of sarcomeres and eccentric cardiac hypertrophy. *EMBO J.* **20**, 2757-2767 (2001).
244. Tamir,Y. & Bengal,E. Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 34424-34432 (2000).
245. Xu,Q. & Wu,Z. The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 36750-36757 (2000).
246. Crabtree,G.R. & Olson,E.N. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* **109 Suppl**, S67-S79 (2002).
247. Hogan,P.G., Chen,L., Nardone,J. & Rao,A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205-2232 (2003).
248. Wilkins,B.J. & Molkentin,J.D. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**, 1178-1191 (2004).
249. Taigen,T., De Windt,L.J., Lim,H.W. & Molkentin,J.D. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 1196-1201 (2000).
250. Treisman,R. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr. Genetics Dev.* **4**, 96-101 (1994).
251. Arsenian,S., Weinhold,B., Oelgeschlager,M., Ruther,U. & Nordheim,A. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *EMBO J.* **17**, 6289-6299 (1998).

252. Zhang,X. *et al.* Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **280**, H1782-H1792 (2001).
253. Gupta,M. *et al.* Physical interaction between the MADS box of serum response factor and the TEA/ATTS DNA-binding domain of transcription enhancer factor-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 10413-10422 (2001).
254. Wang,D. *et al.* Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* **105**, 851-862 (2001).
255. Paradis,P., MacLellan,W.R., Belaguli,N.S., Schwartz,R.J. & Schneider,M.D. Serum response factor mediates AP-1-dependent induction of the skeletal alpha-actin promoter in ventricular myocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 10827-10833 (1996).
256. Thuerauf,D.J. *et al.* 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 (1998).
257. Rockman,H.A. *et al.* Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 8277-8281 (1991).
258. Sadoshima,J., Jahn,L., Takahashi,T., Kulik,T.J. & Izumo,S. Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **267**, 10551-10560 (1992).
259. Durocher,D., Grépin,C. & Nemer,M. Recent progress in hormone research. Conn,P.M. (ed.), pp. 7-23 (The Endocrine Society Press, Bethesda USA,1998).
260. Wang,M.M. & Reed,R.R. Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* **364**, 121-126 (1993).
261. Simpson,P.C., Kariya,K., Karns,L.R., Long,C.S. & Karliner,J.S. Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth. *Mol. Cell Biochem.* **104**, 35-43 (1991).
262. Li,K., He,H., Li,C., Sirois,P. & Rouleau,J.L. Myocardial alpha1-adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sci.* **60**, 1305-1318 (1997).

263. Yamazaki,T. & Yazaki,Y. Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z. Kardiol.* **89**, 1-6 (2000).
264. McMullen,J.R. *et al.* Deletion of ribosomal S6 kinases does not attenuate pathological, physiological, or insulin-like growth factor 1 receptor-phosphoinositide 3-kinase-induced cardiac hypertrophy. *Mol. Cell Biol.* **24**, 6231-6240 (2004).
265. Oudit,G.Y. *et al.* The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J. Mol. Cell Cardiol.* **37**, 449-471 (2004).
266. Zhang,T. & Brown,J.H. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc. Res.* **63**, 476-486 (2004).
267. Simpson,P.C., Long,C.S., Waspe,L.E., Henrich,C.J. & Ordahl,C.P. Transcription of early developmental isogenes in cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **21 Suppl 5**, 79-89 (1989).
268. McKinsey,T.A. & Olson,E.N. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 267-274 (1999).
269. Molkenin,J.D. & Dorn II,G.W. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 391-426 (2001).
270. McBride,K. & Nemer,M. Regulation of the ANF and BNP promoters by GATA factors: Lessons learned for cardiac transcription. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**, 673-681 (2001).
271. Liang,Q. & Molkenin,J.D. Divergent signaling pathways converge on GATA4 to regulate cardiac hypertrophic gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**, 611-616 (2002).
272. Liang,Q. *et al.* The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **276**, 30245-30253 (2001).
273. Zhang,X. *et al.* Early postnatal cardiac changes and premature death in transgenic mice overexpressing a mutant form of serum response factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 40033-40040 (2001).
274. Charron,F., Paradis,P. & Nemer,M. The GATA-4 transcription factor is a mediator of cardiomyocyte hypertrophy. *Canadian Journal of Cardiology* **15 Supplement D**, 116D, no 59 (1999).

275. Martin,X.J., Wynne,D.G., Glennon,P.E., Moorman,A.F. & Boheler,K.R. Regulation of expression of contractile proteins with cardiac hypertrophy and failure. *Mol. Cell Biochem.* **157**, 181-189 (1996).
276. McLean,B.G., Lee,K.S., Simpson,P.C. & Farrance,I.K. Basal and alpha1-adrenergic-induced activity of minimal rat betaMHC promoters in cardiac myocytes requires multiple TEF-1 but not NFAT binding sites. *J. Mol. Cell Cardiol.* **35**, 461-471 (2003).
277. Selvetella,G., Hirsch,E., Notte,A., Tarone,G. & Lembo,G. Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc. Res.* **63**, 373-380 (2004).
278. Marais,R., Wynne,J. & Treisman,R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor- regulated transcriptional activation domain. *Cell* **73**, 381-393 (1993).
279. Parlakian,A. *et al.* Targeted inactivation of serum response factor in the developing heart results in myocardial defects and embryonic lethality. *Mol. Cell Biol.* **24**, 5281-5289 (2004).
280. Nemer,G. & Nemer,M. Regulation of heart development and function through combinatorial interactions of transcription factors. *Ann. Med.* **33**, 604-610 (2001).
281. Refsnes,M., Thoresen,G.H., Dajani,O.F. & Christoffersen,T. Stimulation of hepatocyte DNA synthesis by prostaglandin E2 and prostaglandin F2 alpha: additivity with the effect of norepinephrine, and synergism with epidermal growth factor. *J. Cell Physiol* **159**, 35-40 (1994).
282. Ross,R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126 (1999).
283. Abdellatif,M., MacLellan,W.R. & Schneider,M.D. p21 Ras as a governor of global gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 15423-15426 (1994).
284. Durocher,D., Chen,C.Y., Ardati,A., Schwartz,R.J. & Nemer,M. The ANF promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4648-4655 (1996).
285. Bruneau,B.G. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ. Res.* **90**, 509-519 (2002).
286. Morkin,E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 522-531 (2000).
287. Waspe,L.E., Ordahl,C.P. & Simpson,P.C. The cardiac beta-myosin heavy chain isogene is induced selectively in alpha 1-adrenergic receptor-

- stimulated hypertrophy of cultured rat heart myocytes. *J. Clin. Invest.* **85**, 1206-1214 (1990).
288. Maeda,T., Sepulveda,J., Chen,H.H. & Stewart,A.F. Alpha(1)-adrenergic activation of the cardiac ankyrin repeat protein gene in cardiac myocytes. *Gene* **297**, 1-9 (2002).
 289. Miwa,T., Boxer,L.M. & Kedes,L. CArG boxes in the human cardiac alpha-actin gene are core binding sites for positive trans-acting regulatory factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 6702-6706 (1987).
 290. Amacher,S.L., Buskin,J.N. & Hauschka,S.D. Multiple regulatory elements contribute differentially to muscle creatine kinase enhancer activity in skeletal and cardiac muscle. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2753-2764 (1993).
 291. Catala,F. *et al.* A skeletal muscle-specific enhancer regulated by factors binding to E and CArG boxes is present in the promoter of the mouse myosin light-chain 1A gene. *Mol. Cell Biol.* **15**, 4585-4596 (1995).
 292. Grueneberg,D.A., Simon,K.J., Brennan,K. & Gilman,M. Sequence-specific targeting of nuclear signal transduction pathways by homeodomain proteins. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3318-3326 (1995).
 293. Sepulveda,J.L. *et al.* 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 (1998).
 294. Walsh,K. & Takahashi,A. Transcriptional regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *Z. Kardiol.* **90 Suppl 3**, 12-16 (2001).
 295. Ye,H., Wolf,R.A., Kurz,T. & Corr,P.B. Phosphatidic acid increases in response to noradrenaline and endothelin-1 in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res.* **28**, 1828-1834 (1994).
 296. LaBelle,E.F., Fulbright,R.M., Barsotti,R.J., Gu,H. & Polyak,E. Phospholipase D is activated by G protein and not by calcium ions in vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol* **270**, H1031-H1037 (1996).
 297. Muthalif,M.M. *et al.* Ras/mitogen-activated protein kinase mediates norepinephrine-induced phospholipase D activation in rabbit aortic smooth muscle cells by a phosphorylation-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 268-274 (2000).
 298. Siwik,D.A. & Brown,R.D. Regulation of protein synthesis by alpha 1-adrenergic receptor subtypes in cultured rabbit aortic vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**, 508-518 (1996).

299. Kumar,M.S. & Owens,G.K. Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 737-747 (2003).
300. Davis,A. *et al.* Functional significance of protein kinase A activation by endothelin-1 and ATP: negative regulation of SRF-dependent gene expression by PKA. *Cell Signal.* **15**, 597-604 (2003).
301. Suzuki,E. *et al.* The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics* **38**, 283-290 (1996).
302. Yu,S.M. *et al.* Mechanism of catecholamine-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* **94**, 547-554 (1996).
303. Nardelli,J., Thiesson,D., Fujiwara,Y., Tsai,F.Y. & Orkin,S.H. 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 (1999).
304. Pandolfi,P.P. *et al.* Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* **11**, 40-44 (1995).
305. Pata,I. *et al.* The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development* **126**, 5523-5531 (1999).
306. Karis,A. *et al.* Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *J. Comp Neurol.* **429**, 615-630 (2001).
307. Ma,G.T. *et al.* GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* **124**, 907-914 (1997).
308. Nemer,G. & Nemer,M. Transcriptional activation of BMP-4 and regulation of mammalian organogenesis by GATA-4 and -6. *Dev. Biol.* **254**, 131-148 (2003).
309. Bossard,P. & Zaret,K.S. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development* **125**, 4909-4917 (1998).
310. Denson,L.A., McClure,M.H., Bogue,C.W., Karpen,S.J. & Jacobs,H.C. HNF3beta and GATA-4 transactivate the liver-enriched homeobox gene, Hex. *Gene* **246**, 311-320 (2000).
311. Dame,C. *et al.* Hepatic erythropoietin gene regulation by GATA-4. *J. Biol. Chem.* **279**, 2955-2961 (2004).

312. Cirillo,L.A. *et al.* Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol. Cell* **9**, 279-289 (2002).
313. Richman,R.A., Claus,T.H., Pilgis,S.J. & Friedman,D.L. Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**, 3589-3593 (1976).
314. McGowan,J.A., Strain,A.J. & Bucher,N.L. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *J. Cell Physiol* **108**, 353-363 (1981).
315. Boudreau,F. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 31909-31917 (2002).