

ELS FACTORS GATA4 I GATA5 EN LA REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL DEL GEN QUE CODIFICA PEL CANAL DE SODI CARDÍAC (SCN5A)

Anna Tarradas Pou

Per citar o enllaçar aquest document:
Para citar o enlazar este documento:
Use this url to cite or link to this publication:
<http://hdl.handle.net/10803/405732>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-NoComercial

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial licence



TESI DOCTORAL

**Els factors GATA4 i GATA5 en la regulació
transcripcional del gen que codifica pel canal
de sodi cardíac (*SCN5A*)**

Anna Tarradas Pou

2016



TESI DOCTORAL

**Els factors GATA4 i GATA5 en la regulació
transcripcional del gen que codifica pel canal
de sodi cardíac (SCN5A)**

Anna Tarradas Pou

2016

Programa de Doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Dirigida per:

Dra. Sara Pagans Lista i Dr. Ramon Brugada Terradellas

Tutor:

Dr. Ramon Brugada Terradellas

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la

Universitat de Girona

1 Annex



Girona, 20 desembre 2016

La Dra. Sara Pagans Lista, investigadora Ramón y Cajal del Departament de Ciències Mèdiques i professora de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona.

El Dr. Ramon Brugada Terradellas, professor titular de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona, director del Centre de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona i cardióleg de l'Hospital Josep Trueta.

DECLAREM: Que el treball titulat **"Els factors GATA4 i GATA5 en la regulació transcripcional del gen que codifica pel canal de sodi cardíac (SCN5A)"** que presenta l'Anna Tarradas Pou per a l'obtenció del títol de doctora ha estat realitzat sota la nostra direcció, i, perquè així consti i tingui els efectes oportuns, signem aquest document.

Dra. Sara Pagans Lista

A handwritten signature in blue ink, reading "Sara Pagans", with a stylized flourish at the end.

Dr. Ramon Brugada Terradellas

A handwritten signature in blue ink, reading "Ramon Brugada", with a stylized flourish at the end.

Anna Tarradas Pou

A handwritten signature in blue ink, reading "Anna Tarradas", with a stylized flourish at the end.

Llistat de publicacions derivades de la tesi

Anna Tarradas, Mel·lina Pinsach-Abuin, Carlos Mackintosh, Oriol Llorà-Batlle, Alexandra Pérez-Serra, Montserrat Batlle, Félix Pérez-Villa, Thomas Zimmer, Ivan Garcia-Bassets, Ramon Brugada, Pedro Beltran-Alvarez, Sara Pagans. *Transcriptional regulation of the sodium channel gene (SCN5A) by GATA4 in human heart*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2016.

Agraïments

I ara sí, ha arribat el moment d'agrair a tots els que m'heu ajudat a aconseguir aquest repte. Aquest treball és una sinèrgia de moltes persones, i junts m'heu fet créixer professionalment i personalment. Tanco una etapa de cinc anys inoblidable i molt intensa, de la qual me'n porto molts i bons records.

En primer lloc vull agrair a la Sara i a en Ramon, els meus directors. A tu Sara, gràcies per tot el temps que has dedicat a ensenyar-me, ha sigut un autèntic plaer treballar a teu costat. Has fet que els dies a la feina siguin agradables i sobretot m'has fet gaudir de la ciència. Ramon, gràcies per confiar amb mi i deixar-me formar part del teu grup. Donant-me aquest oportunitat has fet que hagi viscut una de les millor etapes de la meva vida.

Quan portava dos anys de tesi, vaig tenir una germana científica, la Mel·lina. Des del principi vas ser una persona molt propera, per mi ha estat un privilegi tenir-te de companya de feina. Oriol, durant un temps tu també vas ser un germà científic, la teva ajuda va ser molt important pel projecte. A tots dos us envio molta força per tirar endavant les vostres tesis.

Moltes gràcies a tota la resta de persones del grup de Gencardio: Mireia, Helena, Monica, Cristina, Txus, Bernat, Javi, Olallo, Pedro (gràcies Pedro pels coneixements amb proteòmica que m'has transmès), Alexandra, Caterina, Eli, Anna F., Irene, Ferran, Oscar, Anna I., Rino, Marcel, Fabi i Guillermo (*gracias Fabi y Guillermo por enseñarme tanto los seis meses que estuve trabajando con vosotros*). Ivan, gràcies a tu també per l'ajuda que m'has donat des de l'altre punta de món. Dóna gust treballar amb gent com vosaltres, us puc assegurar que de companys de feina passeu a ser bons amics.

Hi ha persones que no han intervingut directament en el treball de recerca, però sí que han participat en la meva vida personal donant-me els ànims i l'ajuda que necessitava.

Els meus pares, que sempre m'han apoïat en els estudis. Ells m'han ensenyat que per aconseguir objectius es necessita constància i esforç. Gràcies per transmetre'm aquests valors que m'han ajudat a tirar endavant aquest projecte i a aconseguir-lo. A tu Guillem i Anna, gràcies per fer-me costat i suportar els meus moments d'estrès. I a tu Cesc, que encara que has arribat a la recta final, m'has donat una empenta per seguir endavant. Guillem, la teva mítica pregunta de: i tu quan deixaràs "d'estudiar"? Mai t'he pogut donar una resposta, no sé si ara posaré punt i final a la meua vida acadèmica, però t'asseguro que si estudiar vol dir estar envoltada de gent com la que he conegut aquests cinc anys, jo segueixo. Gràcies als avis, tius, ties, cosins i cosines, les trobades familiars per mi eren claus per agafar forces. A l'altra part de la meua família, gràcies Conxita, Genís, Bernat i Gemma, per totes les estones que hem passat junts, m'han ajudat a desconnectar en aquests moments de tant d'estrès. Gràcies família per preocupar-vos per mi i per tot el suport que m'heu donat cada un de vosaltres durant aquests anys.

Gràcies als amics i amigues per entendre'm i recolzar-me. A vosaltres Mireia, Montse i a les farmacèutiques, sé que durant aquest temps no m'he deixat veure gaire, tal com jo us deia era una mica "antisocial". Però a partir d'ara espero poder-ho compensar. Les Camallerenques: Marta, Simó, Pilar, Xavi i Lluç, les vostres quedades amb atacs de riure inclosos eren una injecció d'energia enorme. Les padelistes, espero que a partir d'ara ens puguem veure més sovint, ja sigui a dins o a fora de les pistes. Les dues superveïnes, Sofi i Raquel gràcies per preocupar-vos per mi i ajudar-me a l'adaptació en el meu nou poble mentre tenia la tesi entremans. Gràcies també a vosaltres Pepa i Miquel, sé que heu passat per una aventura similar a aquesta i això ha fet que sempre m'hagi sentit molt compresa, i els tres petits (Elisenda, Ximena i Jordi) gràcies pels vostres somriures i alegries.

Als companys del grup I+D Farma d'Hipra, per mi no ha sigut fàcil compaginar la feina i la tesi. Si he aconseguit tirar-ho tot endavant en part és també gràcies a vosaltres.

I l'última part dels agraïments, la reservo per vosaltres dos: Andreu i Arnau. Andreu té molt de mèrit el que has fet, perquè sense entendre res del que "estudiava" m'has ajudat moltíssim. En els moments de màxim estrès la teva filosofia va ser clau: "no pensis amb tot el que et queda per fer, tu tira, tira endavant, i no deixis que cap pedra t'aturi". Gràcies per fer-me costat i aguantar tot el que has aguantat. Últimament el meu temps lliure ha sigut mínim, però en aquest sentit t'he de dir que estava tranquil·la, perquè mentre em passava hores i hores davant de l'ordinador jo sabia que tu estaves gaudint com un nen petit amb la teva estimada bici. I el petit Arnau, no oblidaré mai les tardes escrivint la tesi mentre sentia les teves petadetes... una sensació indescriptible, alegraves les meves estones feixugues davant de l'ordinador. Quan et vam tenir als nostres braços em vas donar l'energia i la força que necessitava per acabar d'aconseguir aquest repte. Moltes gràcies petit per fer-me fàcils les coses difícils, has fet que el 2016 sigui un any molt i molt feliç.

A tots vosaltres, gràcies, gràcies i gràcies!

Per als meus pares

Llista d'abreviatures

α-MHC	Cadena pesada de la α -miosina (<i>α-Myosin Heavy Chain</i>)
β-MHC	Cadena pesada de la β -miosina (<i>β-Myosin Heavy Chain</i>)
ACCN	Acetonitril
ANP	Pèptid natriurètic auricular (<i>Atrial Natriuretic Peptide</i>)
BNP	Pèptid natriurètic tipus B (<i>B-type Natriuretic Peptide</i>)
Ca⁺²	Ió calci
cDNA	DNA complementari
ChIP	Immunoprecipitació de cromatina (<i>Chromatin Immunoprecipitation</i>)
ChIP-seq	Immunoprecipitació de cromatina i seqüenciació massiva
CMV	Citomegalovirus
CPI	Complex de preiniciació
Ct	Cicle llindar (<i>Cycle threshold</i>)
Da	Daltons
DAI	Desfibril·lador automàtic implantable
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorur
DHSs	Llocs d'hipersensibilitat a DNasa I (<i>DNase I hypersensitive site</i>)

ECG	Electrocardiograma
FAF	Fibril·lació auricular familiar
FT	Factor de transcripció
FTG	Factors de transcripció general
GWAS	Estudi d'associació de genoma (<i>Genome-Wide Association Studies</i>)
HA	Hemaglutinina
HDAC	Desacetilases d'histones (<i>Histone acetyltransferase</i>)
HEK	Cèl·lules de ronyó d'embrió humà (<i>Human Embryonic Kidney</i>)
K⁺	Ió potassi
KAT	Acetiltransferases de lisines (<i>Lysine acetyltransferase</i>)
KMT	Metiltransferases de lisines (<i>Lysine methyltransferase</i>)
LC-MS/MS	Espectrometria de masses acoblada a un sistema de cromatografia en fase líquida
MALDI-TOF	Desorció/ionització làser assistida per matriu – Temps de vol (<i>Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of flight</i>)
MAPK	Proteïnes quinases activades per mitògens (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MBD	Domini d'unió a DNA metilat (<i>Methylation Binding Domain</i>)

MSC	Mort sobtada cardíaca
Na⁺	Ió sodi
NA	Nicotinamida
Na_v	Canal de sodi dependent de voltatge
Na_v1.5	Canal de sodi cardíac dependent de voltatge
NSA	Nòdul sinoauricular
NAV	Nòdul auriculoventricular
PAC	Potencial d'acció cardíac
Pb	Parells de bases
PBS	Tampó salí fosfat
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PDX1	Gen Homeobox 1 pancreàtic i duodenal
PRMT	Metiltransferasa d'arginina (<i>Protein Arginine methyltransferase</i>)
PVDF	Fluorur de polivinilidè
qPCR	PCR quantitativa
ReChIP	Immunoprecipitació seqüencial de cromatina (<i>Sequential Chromatin Immunoprecipitation</i>)
RNA Pol II	RNA Polimerasa II
RS	Reticle sarcoplasmàtic

SAM	S-adenosilmetionina
SBr	Síndrome de Brugada
SDS	Dodecilsulfat sòdic
SDS-PAGE	Electroforesi en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic
SPCC	Síndrome progressiva del sistema de conducció cardíac
SQTL	Síndrome de QT llarg
SV40	Virus del simi 40
TAD	Dominis topològics (<i>Topological Associating Domains</i>)
TAF	Factors associats a TBP (<i>TBP-associated factor</i>)
TBP	Proteïna d'unió a TATA (<i>TATA binding protein</i>)
TSA	Tricostatin A
TSS	Lloc d'inici de la transcripció (<i>Transcription Start Site</i>)
WT	Salvatge (<i>Wild-type</i>)
z/m	Càrrega/massa

Nota: al llarg de la tesi els gens es mostren amb majúscula i cursiva (independentment de l'espècie) i les proteïnes amb majúscula sense cursiva.

Índex de figures

Figura 1. Anatomia del cor.....	10
Figura 2. Sistema de conducció elèctric del cor.....	11
Figura 3. PAC i corrents iònics del cor.....	14
Figura 4. Representació de l'ECG.....	15
Figura 5. Subunitat α del canal de sodi cardíac $\text{Na}_v1.5$	17
Figura 6. Estats conformacionals del canal $\text{Na}_v1.5$	19
Figura 7. ECG característic de la SBr.....	26
Figura 8. Hipòtesis per explicar els mecanismes de l'elevació del segment ST en un ECG de SBr.....	28
Figura 9. ECG característic de la SQT.....	31
Figura 10. Transcripció basal en eucariotes.....	35
Figura 11. Estructura i funció del Mediator.....	36
Figura 12. Estructura i funció de l'Elongator.....	37
Figura 13. Organització i estructura de la cromatina en el nucli de cèl·lules eucariotes.....	44
Figura 14. Unió dels <i>readers</i> en modificacions d'histones específiques.....	50
Figura 15. Modificacions d'histones associades a determinades regions del genoma.	51
Figura 16. Remodelació de nucleosomes.....	52

Figura 17. Estructura dels FT GATA.....	61
Figura 18. Conservació dels factors GATA.....	62
Figura 19. Vies de senyalització activades en el procés de la hipertròfia cardíaca.....	69
Figura 20. Modificacions posttraduccional de GATA4.....	75
Figura 21. Esquema del gen <i>SCN5A</i> humà.....	81
Figura 22. Seqüències del PromotorA i PromotorB d' <i>SCN5A</i>	94
Figura 23. Anàlisi de la puresa dels pèptids per HPLC.....	102
Figura 24. Reaccions de bioluminescència.....	115
Figura 25. Protocol dels experiments de ChIP i Re-ChIP.....	131
Figura 26. Esquema de l'espectròmetre MALDI-TOF.....	143
Figura 27. Possibles motius GATA en el gen <i>SCN5A</i> humà.....	149
Figura 28. Efecte dels siRNA per <i>GATA4</i> sobre els nivells d'mRNA d' <i>SCN5A</i>	151
Figura 29. Efecte de la fenilefrina sobre els nivells d'mRNA d' <i>SCN5A</i>	153
Figura 30. Efecte dels factors GATA cardíacs sobre l'activitat del promotor d' <i>SCN5A</i>	155
Figura 31. Efectes sinèrgics entre factors GATA cardíacs en l'activitat del promotor d' <i>SCN5A</i>	156
Figura 32. Efecte de <i>GATA4</i> i <i>GATA6</i> sobre l'activitat del promotor <i>PDX1</i>	157
Figura 33. Immunoprecipitació de <i>GATA4</i> i <i>GATA5</i> en extractes cel·lulars d'HEK293T.....	158

Figura 34. Activitat dels promotors A i B d' <i>SCN5A</i>	160
Figura 35. Efecte de dos motius GATA mutats situats a l'intró 1 en l'activació del promotor d' <i>SCN5A</i> per GATA4 i GATA5.....	162
Figura 36. Anàlisi de la unió dels factors GATA cardíacs en el promotor i l'intró 1 del gen <i>SCN5A</i> en el cor humà adult mitjançant ChIP.....	165
Figura 37. Anàlisi de la unió dels factors GATA cardíacs en el promotor i l'intró 1 del gen <i>SCN5A</i> en el cor humà adult mitjançant Re-ChIP.....	166
Figura 38. Anàlisi dels nivells de <i>GATA4</i> , <i>GATA5</i> i <i>GATA6</i> en ventricle esquerre humà adult per qPCR.....	167
Figura 39. Anàlisi dels nivells d'mRNA de <i>GATA4</i> , <i>GATA5</i> i <i>GATA6</i> en mostres de ventricle esquerre humà per ddPCR.....	169
Figura 40. Anàlisi de les proteïnes GATA4, GATA5 i GATA6 en el cor humà adult per <i>western blot</i>	170
Figura 41. Anàlisi de l'expressió de GATA5 en el cor adult de ratolí.....	171
Figura 42. Estudi de la correlació entre els nivells de cRNA d' <i>SCN5A</i> i el corrent de Na ⁺ en oòcits de <i>Xenopus</i>	172
Figura 43. Estudi de la correlació entre els nivells d'mRNA de l' <i>SCN5A</i> i dels factors <i>GATA</i> i entre els diferents factors <i>GATA</i>	173
Figura 44. Efecte de GATA4 i p300 sobre l'activació del promotor d' <i>SCN5A</i>	176
Figura 45. Anàlisi de la unió de p300 i GATA4 en el promotor i l'intró 1 del gen <i>SCN5A</i> en el cor humà adult mitjançant ChIP.....	177
Figura 46. Pèptids sintètics de GATA4.....	179

Figura 47. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació <i>in vitro</i> del pèptid 1.....	180
Figura 48. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació <i>in vitro</i> del pèptid 2.....	181
Figura 49. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació <i>in vitro</i> del pèptid 3.....	183
Figura 50. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació <i>in vitro</i> del pèptid 4.....	184
Figura 51. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació <i>in vitro</i> del pèptid 5.....	186
Figura 52. Anàlisi de la reacció d'acetilació <i>in vitro</i> del pèptid 3 per LC-MS/MS.....	187
Figura 53. Efecte de la mutació K326A en els nivells d'acetilació de GATA4.....	189
Figura 54. Efecte d'HDAC2 i HOPX sobre GATA4 en la regulació del promotor d'SCN5A.....	190
Figura 55. Efecte de les HDAC sobre l'activitat del promotor d'SCN5A.....	191
Figura 56. Efecte d'HDAC4 i HDAC5 sobre GATA4 en la regulació d'SCN5A.....	193
Figura 57. Efecte d'HDAC2, HDAC4 i HDAC5 en l'acetilació de GATA4.....	194
Figura 58. Anàlisi de la reacció de desacetilació <i>in vitro</i> del pèptid 3 per MALDI-TOF.....	195
Figura 59. Anàlisi de la reacció de desacetilació <i>in vitro</i> del pèptid 4 per MALDI-TOF.....	196
Figura 60. Anàlisi de la reacció de desacetilació <i>in vitro</i> del pèptid 5 per MALDI-TOF.....	197

Figura 61. ChIP-seq d'H3K27ac en mostres de ventricle esquerre humà adult segons dades publicades en el RoadMap Epigenomics Project.....	218
Figura 62. Model molecular de regulació de l'expressió d'SCN5A...	225

Índex de taules

Taula 1. Dominis <i>readers</i> de modificacions d'histones.....	50
Taula 2. Evolució del cor i dels FT cardíacs centrals.....	56
Taula 3. Encebadors per a mutagènesi dirigida.....	96
Taula 4. Encebadors per a determinar els nivells d'mRNA.....	97
Taula 5. Encebadors per als assajos de ChIP i Re-ChIP.....	98
Taula 6. Anticossos primaris.....	99
Taula 7. Anticossos secundaris.....	100
Taula 8. Pèptids sintètics corresponents a la proteïna GATA4 humana.....	101
Taula 9. Reactius per a les reaccions d'acetilació i desacetilació <i>in vitro</i>	103
Taula 10. Solucions per a l'obtenció d'oòcits de <i>Xenopus</i>	105
Taula 11. Medis de cultiu de bacteris i antibiòtics per a l'obtenció del DNA plasmídic.....	111
Taula 12. Tampons per a electroforesi SDS-PAGE i <i>western blot</i> ...	121
Taula 13. Gels d'acrilamida.....	122
Taula 14. Tampons per a ChIP i Re-ChIP.....	136
Taula 15. Solucions per a la immunofluorescència.....	140
Taula 16. Solucions per a les reaccions d'acetilació i desacetilació i per a les anàlisis de MALDI-TOF.....	144

Índex general

Agraïments.....	i
Llista d'abreviatures.....	vii
Índex de figures.....	xi
Índex de taules.....	xvi
Resum.....	1
Resumen.....	3
Summary.....	5
I. Introducció.....	7
A. Canalopaties associades amb mort sobtada cardíaca.....	9
1. El cor.....	9
1.1. Anatomia i funció del cor.....	9
1.2. Activitat elèctrica cardíaca.....	11
1.3 Potencial d'acció cardíac.....	12
1.4. Electrocardiograma.....	14
2. El canal de sodi cardíac dependent de voltatge (Na _v 1.5).....	16
3. Mort sobtada cardíaca.....	20
3.1. Definició i epidemiologia.....	20
3.2. Malalties cardíques associades a la MSC.....	21
3.3. La genètica de la MSC.....	22
4. Malalties elèctriques o canalopaties cardíques.....	23
4.1. Canalopaties associades amb variants genètiques en les regions exòniques del gen <i>SCN5A</i>	24

4.2. Síndrome de Brugada.....	26
4.3. Síndrome de QT Llarg.....	29
B. Mecanismes de regulació transcripcional en el cor.....	32
5. Regulació de l'expressió gènica a nivell transcripcional.....	32
5.1. Factors de transcripció.....	34
5.2. Regions del DNA reguladores de la transcripció.....	39
5.3. Cromatina.....	42
5.3.1. Estructura de la cromatina.....	42
5.3.2. Dinàmica de la cromatina.....	45
6. Regulació de l'expressió gènica en el cor per factors de transcripció.....	55
7. Factors de transcripció GATA cardíacs.....	60
7.1. Estructura.....	60
7.2. Expressió.....	63
7.3. Funció.....	64
7.3.1. Funció dels factors GATA cardíacs en el desenvolupament cardíac.....	64
7.3.2. Funció dels factors GATA cardíacs en el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca.....	67
7.4. Interaccions dels factors GATA cardíacs.....	69
7.5. Regulació dels factors GATA per modificacions posttraduccionals.....	72
8. Mecanismes de regulació de l'expressió del gen <i>SCN5A</i>	76
8.1. Alteracions en l'expressió d' <i>SCN5A</i> com a causant d'arítmies cardíques.....	76
8.2. Regulació transcripcional del gen <i>SCN5A</i>	79
II. Plantejament de la recerca, hipòtesi i objectius.....	84

III. Materials i mètodes.....	89
1. Materials.....	91
1.1. Vectors d'expressió.....	91
1.1.1. Vectors reporters luciferasa	91
1.1.2. Vectors d'expressió de proteïnes.....	92
1.2. Encebadors.....	96
1.2.1. Encebadors per a mutagènesi dirigida	96
1.2.2. Encebadors per a determinar els nivells d'mRNA.....	97
1.2.3. Encebadors per a assajos de ChIP i Re-ChIP..	98
1.3. Anticossos.....	98
1.4. Pèptids	100
1.5. Reactius per a les reaccions d'acetilació i desacetilació <i>in vitro</i>	103
1.6. Models experimentals.....	103
1.6.1. Línies cel·lulars.....	103
1.6.2. Oòcits de <i>Xenopus laevis</i>	104
1.6.3. Mostres de teixit cardíac humà.....	105
1.6.4. Seccions de ventricle de ratolí.....	106
2. Mètodes	107
2.1. Manteniment de les cèl·lules.....	107
2.1.1. Congelació de cèl·lules en nitrogen líquid.....	107
2.1.2. Descongelació de cèl·lules del nitrogen líquid..	108
2.1.3. Subcultius de cèl·lules.....	108

2.2. Obtenció de DNA plasmídic.....	109
2.2.1. Preparació del cultiu de bactèries <i>E. Coli</i> transformades.....	109
2.2.2. Preparació d'estocs de bactèries transformades en glicerol.....	109
2.2.3. Minipreparacions de DNA plasmídic.....	109
2.2.4. Maxipreparacions de DNA plasmídic.....	110
2.3. Mutagènesi dirigida i subclonatge.....	111
2.4. Experiments de transfecció.....	113
2.4.1 Transfecció de vectors d'expressió.....	113
2.4.2. Transfecció de siRNA.....	114
2.5. Determinació de l'activitat del promotor <i>SCN5A</i> i <i>PDX1</i> per assajos luciferasa.....	114
2.5.1. Transfecció de les cèl·lules.....	116
2.5.2. Preparació dels lisats cel·lulars.....	117
2.5.3. Lectura de l'activitat luciferasa i renilla i anàlisi dels resultats.....	117
2.6. Expressió dels vectors d'expressió de GATA4, GATA5 i GATA6 en cèl·lules H9c2.....	118
2.6.1. Transfecció de les cèl·lules H9c2.....	118
2.6.2.Preparació de l'extracte cel·lular.....	118
2.6.3. Electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	119
2.6.4. <i>Western blot</i>	119
2.7. Experiments de <i>knockdown</i> de GATA4.....	122
2.7.1. Transfecció de cèl·lules H9c2 amb siRNA.....	122
2.7.2. Anàlisi dels nivells d'mRNA de <i>SCN5A</i> per qPCR.....	123

2.7.2.1. Extracció de l'RNA	123
2.7.2.2. Transcriptasa inversa i qPCR.....	123
2.7.3. Anàlisi de l'activitat del promotor d' <i>SCN5A</i> per assaig luciferasa.....	124
2.8. Tractament amb fenilefrina.....	125
2.9. Eines bioinformàtiques.....	125
2.10. Registre del corrent de Na ⁺ en oòcits de <i>Xenopus</i>	125
2.11. Experiments d'immunoprecipitació: estudi de la interacció entre GATA4 i GATA5 i dels nivells d'acetilació de GATA4.....	126
2.11.1. Transfecció de cèl·lules HEK293T.....	127
2.11.2. Preparació de l'extracte cel·lular.....	128
2.11.3. Immunoprecipitació.....	128
2.11.4. Electroforesi SDS-PAGE i <i>western blot</i>	129
2.12. Assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i d'immunoprecipitació de cromatina seqüencial (Re-ChIP)...	129
2.12.1. ChIP.....	131
2.12.1.1. Fixació de les proteïnes al DNA.....	131
2.12.1.2. Sonicació de la cromatina.....	132
2.12.1.3. Immunoprecipitació de la cromatina..	133
2.12.1.4. Purificació del DNA i qPCR	134
2.12.2. Re-ChIP.....	135
2.13. Estudi de l'expressió dels factors GATA cardíacs en el cor humà	136
2.13.1. Anàlisi dels nivells d'mRNA.....	136
2.13.2. Anàlisi de proteïnes.....	138

2.14. Immunofluorescència de mostres de cor de ratolí.....	138
2.14.1. Preparació de la mostres de cor de ratolí.....	138
2.14.2. Immunodetecció de GATA5.....	139
2.15. Assajos d'acetilació i desacetilació <i>in vitro</i> i anàlisi per espectrometria de masses.....	140
2.15.1. Assaig d'acetilació.....	141
2.15.2. Assaig de desacetilació.....	141
2.15.3. Espectrometria de masses MALDI-TOF.....	142
2.15.4. LC-MS/MS.....	143
IV. Resultats.....	146
1. Regulació del gen <i>SCN5A</i> pels factors GATA cardíacs.....	148
1.1. En el gen <i>SCN5A</i> humà s'han predit diversos motius GATA.....	148
1.2. GATA4 regula la transcripció del gen <i>SCN5A</i>	150
1.2.1. GATA4 controla els nivells d'mRNA d' <i>SCN5A</i>	150
1.2.2. La fenilefrina indueix l'expressió de <i>SCN5A</i>	152
1.3. GATA4 i GATA5 cooperen en la regulació del promotor d' <i>SCN5A</i>	153
1.3.1. GATA4 i GATA5 sinergitzen per a activar el promotor d' <i>SCN5A</i>	153
1.3.2. GATA4 interacciona amb GATA5	157
1.4. L'activació transcripcional d' <i>SCN5A</i> per GATA4 i GATA5 és dependent de motius GATA.....	159
1.4.1. L'intró 1 d' <i>SCN5A</i> conté importants regions reguladores.....	159
1.4.2. Dos motius GATA de l'intró 1 estan implicats en el sinergisme entre GATA4 i GATA5	161

1.5. GATA4 i GATA5 s'uneixen al promotor i intró 1 d' <i>SCN5A</i> en cor humà adult	164
1.6. GATA4, GATA5 i GATA6 s'expressen en el cor humà adult.....	166
1.7. Els nivells d'mRNA de <i>GATA4</i> i <i>SCN5A</i> correlacionen en el cor humà.....	171
2. Modulació de l'activitat del promotor <i>SCN5A</i> per acetilació/desacetilació de <i>GATA4</i>	175
2.1. L'activitat del promotor d' <i>SCN5A</i> està regulada per p300.....	175
2.2. La regió bàsica del motiu C-Zn de <i>GATA4</i> conté tres llocs d'acetilació.....	178
2.2.1. Tres lisines de <i>GATA4</i> són dianes de p300.....	178
2.2.2. La lisina K326 és un nou lloc d'acetilació de <i>GATA4</i>	188
2.3. Regulació del promotor d' <i>SCN5A</i> per HDAC.....	189
2.3.1. HDAC2 regula el promotor d' <i>SCN5A</i> per un efecte depenent de <i>GATA4</i>	189
2.3.2. HDAC4 i HDAC5 regulen l'activitat del promotor d' <i>SCN5A</i>	191
2.3.3. HDAC2 desacetila pèptids de <i>GATA4</i> en assajos <i>in vitro</i>	194
V. Discussió.....	200
1. Efecte dels FT GATA cardíacs sobre la regulació del promotor d' <i>SCN5A</i>	203
1.1. Mecanisme molecular de regulació del promotor d' <i>SCN5A</i> pels FT GATA cardíacs	204
1.2. Llocs d'unió GATA com a importants regions reguladores d' <i>SCN5A</i>	207

1.3. Defectes en la regulació transcripcional d' <i>SCN5A</i> pels FT GATA cardíacs com a possibles causes de patologies cardíques.....	210
2. Expressió dels factors GATA cardíacs en el cor humà adult.....	214
3. Modulació de l'activitat del promotor d' <i>SCN5A</i> per acetilació/desacetilació de GATA4.....	217
3.1. Regulació transcripcional del gen <i>SCN5A</i> per acetilació.....	217
3.1.1. Mecanisme de cooperació entre GATA4 i p300.	217
3.1.2. Llocs dianes d'acetilació de GATA4 per p300....	219
3.2. Modulació del gen <i>SCN5A</i> per desacetilació.....	220
4. Possible model molecular de regulació de l'expressió d' <i>SCN5A</i>	223
VI. Conclusions.....	227
VII. Bibliografia.....	232
Annex 1.....	251

Resum

El gen *SCN5A* codifica per la subunitat alfa del canal de sodi cardíac dependent de voltatge ($\text{Na}_v1.5$), el qual permet l'entrada de ions sodi a través de la membrana dels cardiomiòcits. Les variants genètiques en el gen *SCN5A* s'han relacionat amb malalties aritmogèniques associades a mort sobtada cardíaca. Diverses evidències suggereixen que una expressió anòmala del gen *SCN5A* també pot donar lloc a una major susceptibilitat a patir aquestes malalties cardíques. Malauradament, els mecanismes que regulen l'expressió d'*SCN5A* són molt poc coneguts. Per tal d'entendre millor aquests mecanismes, l'objectiu d'aquesta tesi va ser estudiar la regulació transcripcional del gen *SCN5A* pels factors de transcripció GATA cardíacs (GATA4, GATA5 i GATA6).

Les eines bioinformàtiques TFSearch i MEME van predir múltiples llocs d'unió dels factors GATA des de la regió 5'UTR fins a l'intró 1 del gen *SCN5A*. Experiments reporters en cèl·lules cardíques de rata H9c2 van demostrar que GATA4 i GATA5 activen sinèrgicament el promotor d'*SCN5A*, mentre que GATA6 té un efecte lleu sobre l'activitat del promotor. En aquests experiments també es va demostrar que dos llocs d'unió GATA situats a l'intró 1 d'*SCN5A* participen en l'efecte sinèrgic de GATA4 i GATA5. Experiments d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i d'immunoprecipitació seqüencial de cromatina van indicar que GATA4 i GATA5 coocupen el promotor i l'intró 1 d'*SCN5A* en mostres de ventricle esquerre humà adult. Aquest resultat suggereix que l'efecte regulador de GATA4 i GATA5 té lloc en el cor humà adult. Els estudis d'expressió, mitjançant Droplet Digital PCR, van determinar que GATA5 s'expressa al ventricle esquerre humà adult; tot i això, els nivells d'mRNA detectats són substancialment inferiors als de GATA4 i GATA6. Aquests estudis també van evidenciar que els nivells d'mRNA de GATA4 i

d'*SCN5A* correlacionen positivament en les mostres de ventricle, fet que recolza un paper de GATA4 en el control dels nivells d'mRNA d'*SCN5A*.

En aquesta tesi també es va estudiar l'efecte de l'acetilació de GATA4 en la regulació d'*SCN5A*. Experiments en cèl·lules cardíques H9c2 van mostrar que GATA4 i l'acetiltransferasa p300 activen sinèrgicament el promotor d'*SCN5A* i, per tant, indica que l'efecte de GATA4 sobre *SCN5A* està modulats per acetilació. En experiments de ChIP es va observar que GATA4 i p300 s'uneixen a la mateixa regió del promotor d'*SCN5A* en les mostres de ventricle humà adult. D'acord amb l'activitat desacetilasa d'HDAC2 sobre GATA4, es va demostrar que la sobreexpressió d'HDAC2 redueix l'activitat transcripcional de GATA4 sobre el promotor d'*SCN5A*.

Assajos d'acetilació i desacetilació *in vitro* de pèptids sintètics de GATA4, i la posterior anàlisi per espectrometria de masses, van indicar que tres de les lisines de GATA4 presents en el domini d'unió al DNA són dianes de p300 i HDAC2. Tot i que prèviament s'havien descrit les lisines K311, K318, K320 i K322 com els residus diana de p300, els resultats obtinguts en aquesta tesi van revelar que només dues d'aquestes lisines s'acetilen. En canvi, es va identificar la lisina K326 com un nou lloc d'acetilació.

A partir dels resultats obtinguts es proposa un nou mecanisme de regulació de la transcripció d'*SCN5A* en el cor humà adult basat en l'acció sinèrgica de GATA4 i GATA5 a través de la unió al promotor i l'intró 1 d'*SCN5A*. En resum, aquest estudi permet avançar en el coneixement de les bases moleculars de les arítmies cardíques associades amb alteracions del corrent de sodi.

Resumen

El gen *SCN5A* codifica la subunidad alfa del canal de sodio cardíaco dependiente de voltaje ($\text{Na}_v1.5$) el cual permite la entrada de iones sodio a través de la membrana de los cardiomiocitos. Variantes genéticas en el *SCN5A* se han relacionado con enfermedades arritmogénicas que se asocian a un mayor riesgo de muerte súbita cardíaca. Evidencias sugieren que una expresión anómala del gen *SCN5A* puede dar lugar a susceptibilidad a sufrir arritmias cardíacas. Sin embargo, los mecanismos que regulan la expresión de *SCN5A* son muy poco conocidos. Para entender mejor dichos mecanismos, el objetivo de la presente tesis fue estudiar la regulación transcripcional del gen *SCN5A* por los factores de transcripción GATA cardíacos (GATA4, GATA5 y GATA6).

Las herramientas bioinformáticas TFSearch y MEME permitieron predecir múltiples sitios de unión de los factores GATA desde la región 5'UTR hasta el intrón 1 del gen *SCN5A*. Experimentos reporteros en células cardíacas de rata H9c2 demostraron que GATA4 y GATA5 activan de manera sinérgica el promotor de *SCN5A*, mientras que GATA6 tiene un efecto leve sobre la actividad del promotor. En estos experimentos también se demostró que dos sitios de unión GATA situados en el intrón 1 de *SCN5A* participan en el efecto sinérgico de GATA4 y GATA5. Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) y de inmunoprecipitación secuencial de cromatina demostraron que GATA4 y GATA5 coocupan el promotor y el intrón 1 de *SCN5A* en muestras de ventrículo izquierdo humano adulto. Este resultado sugiere que el efecto regulador de GATA4 y GATA5 tiene lugar en el corazón humano adulto. Los estudios de expresión, mediante Droplet Digital PCR indicaron que el gen *GATA5* se expresa en el ventrículo izquierdo humano adulto; aún así, los niveles de mRNA detectados son sustancialmente inferiores a los de *GATA4* y *GATA6*. Estos estudios demostraron también que los niveles de mRNA de

GATA4 y de *SCN5A* correlacionan positivamente en las muestras de ventrículos, hecho que apoya un papel de *GATA4* en el control de los niveles de mRNA de *SCN5A*.

En esta tesis también se ha estudiado el efecto de la acetilación de *GATA4* en la regulación del gen *SCN5A*. Experimentos en células cardíacas H9c2 demostraron que *GATA4* y la acetiltransferasa p300 activan sinérgicamente el promotor de *SCN5A*, lo que indica que el efecto de *GATA4* sobre *SCN5A* está modulado por acetilación. En experimentos de ChIP se observó que *GATA4* y p300 se unen a la misma región del promotor de *SCN5A* en las muestras de ventrículo humano adulto. De acuerdo con la actividad desacetilasa de HDAC2 sobre *GATA4*, la sobreexpresión de HDAC2 reduce la actividad transcripcional de *GATA4* sobre el promotor de *SCN5A*.

Ensayos de acetilación y desacetilación *in vitro* de péptidos sintéticos de *GATA4*, y su posterior análisis por espectrometría de masas, indicaron que tres de las lisinas de *GATA4* presentes en el dominio de unión al DNA son dianas de p300 y de HDAC2. Aunque previamente se habían descrito las lisinas K311, K318, K320 y K322 como los residuos dianas de p300, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que sólo dos de estas lisinas se acetilan. En cambio, se identificó la lisina K326 como un nuevo sitio de acetilación.

Los resultados obtenidos proponen un nuevo mecanismo de regulación de la transcripción del *SCN5A* en el corazón humano, basado en la acción sinérgica de *GATA4* y *GATA5* a través de la unión al promotor y al intrón 1 de *SCN5A*. En resumen, este estudio permite avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de las arritmias cardíacas asociadas con alteraciones de la corriente de sodio.

Summary

The *SCN5A* gene encodes the alpha subunit of the cardiac sodium channel (Na_v1.5), which is responsible for the influx of sodium ions through membrane of cardiomyocytes. Genetic alterations in *SCN5A* have been linked to arrhythmogenic diseases associated with sudden cardiac death. Different evidences suggest that an aberrant expression of the *SCN5A* gene may increase susceptibility to cardiac arrhythmias. However, the mechanisms that control *SCN5A* expression regulation are largely unknown. To gain insight into these mechanisms, the aim of the present thesis was to study *SCN5A* transcriptional regulation by cardiac GATA transcription factors (GATA4, GATA5 and GATA6).

Using the bioinformatic programs TFSearch and MEME, multiples GATA binding sites were predicted from the 5'UTR region to the intron of *SCN5A*. Reporter experiments in H9c2 cardiac cells showed that GATA4 and GATA5 synergize in the activation of the *SCN5A* promoter. In contrast, GATA6 showed a lower effect on the promoter. These experiments also demonstrated that two GATA4 binding sites located in the intron 1 of the *SCN5A* contribute to the synergistic effect of GATA4 and GATA5. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) and sequential ChIP assays showed co-occupancy of GATA4 and GATA5 on promoter and intron 1 *SCN5A* regions in human left ventricle samples. These results suggest a regulatory role of GATA4 and GATA5 in the human heart. Expression studies by Droplet Digital PCR showed that GATA5 is expressed in the adult human left ventricle; however, mRNA levels detected were substantially lower than the GATA4 and GATA6. These studies also demonstrated that *GATA4* and *SCN5A* mRNA levels positive correlate in ventricle, supporting the role of GATA4 in the regulation of *SCN5A* mRNA levels.

The effect of GATA4 acetylation on the regulation of *SCN5A* gene has also been studied in this thesis. Experiments in H9c2 cells showed that GATA4 and the acetyltransferase p300 synergistically activate the *SCN5A* promoter, thus revealing that the effect of GATA4 on the *SCN5A* is modulated by acetylation. ChIP experiments demonstrated that GATA4 and p300 bind to the same region on the *SCN5A* promoter in the adult human heart. In addition, in agreement with the deacetylase activity of HDAC2 on GATA4, the overexpression of HDAC2 reduces the transcriptional activity of GATA4 on the *SCN5A* promoter.

In vitro acetylation and deacetylation assays of GATA4 synthetic peptides, and subsequent analysis by mass spectrometry, demonstrated that three lysines of the GATA4 DNA binding domain are targets of p300 and HDAC2. Although lysines K311, K318, K320 and K322 were described previously as p300 targets, the results obtained in this thesis showed that only two of them are acetylated. In contrast, the lysine K326 was identified as a new acetylation site.

Based on the results obtained, the study proposes a new mechanism of *SCN5A* transcriptional regulation in the human heart based on the synergistic activity of GATA4 and GATA5 through their binding to the *SCN5A* promoter and intron 1. In summary, this study contributes to further understand the molecular basis of the cardiac arrhythmias associated with alteration of sodium currents.

I. Introducció

A. Canalopaties associades amb mort sobtada cardíaca

1. El Cor

1.1. Anatomia i funció del cor

El cor és un òrgan muscular especialitzat en bombejar la sang per tot el cos, per tal de proporcionar oxigen i nutrients al resta d'òrgans. El cor humà està dividit en quatre cavitats, dues aurícules a la part superior i dos ventricles a la part inferior (**Figura 1A**). Una paret muscular anomenada septe divideix el cor en dues meitats (esquerra i dreta), i així evita el pas de la sang entre les dues aurícules i entre els dos ventricles. La meitat esquerra del cor rep la sang oxigenada, que prové dels pulmons, i l'expulsa mitjançant el sistema arterial a tot el cos. En canvi, a la meitat dreta del cor hi arriba la sang desoxigenada, a través del sistema venós, que prové dels diferents òrgans cos, i l'envia als pulmons.

El cor presenta tres capes principals, de la part externa a la interna: una membrana serosa anomenada epicardi que cobreix la superfície externa del cor; el miocardi, que és el teixit muscular del cor que conté els cardiomiòcits; i una capa fina anomenada endocardi que recobreix l'interior del cor i les vàlvules cardíques (**Figura 1B**).

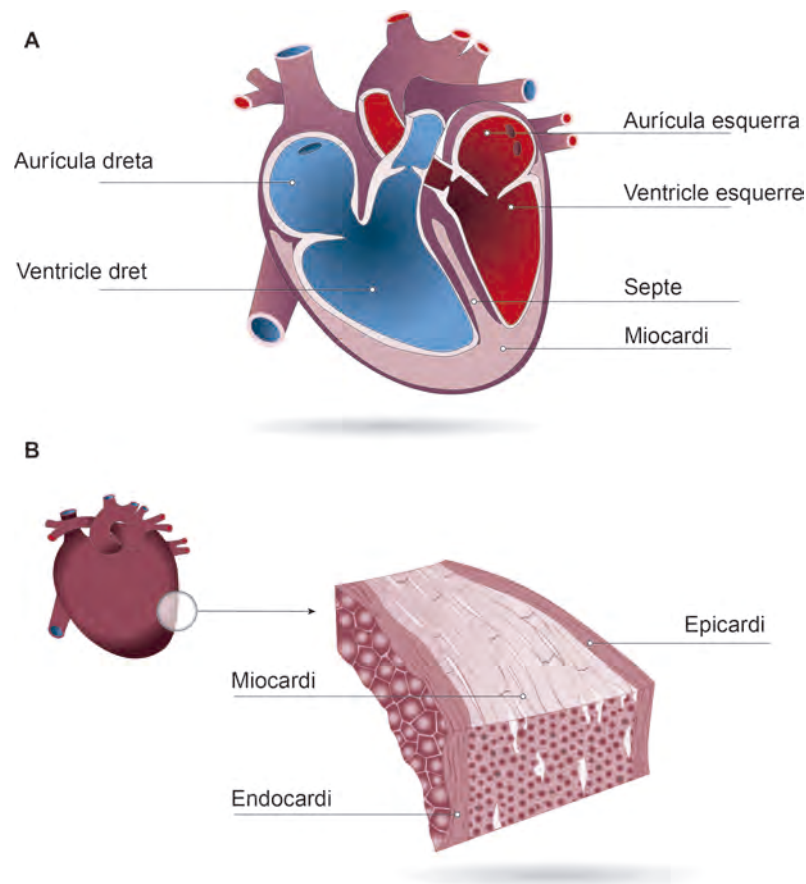


Figura 1. Anatomia del cor. **A.** Representació de les quatre cambres del cor i el septum. En blau s'indica la sang desoxigenada i en vermell la sang oxigenada. **B.** Representació de les tres capes que recobreixen el cor. Figures extretes i adaptades de www.studyblue.com.

Per a permetre el bombeig de la sang són necessaris dos moviments del cor, anomenats sístole (contracció del cor) i diàstole (relaxació del cor). Un cicle de sístole-diàstole és el que succeeix en cada batec cardíac. Aquest cicle s'inicia amb la diàstole auricular, en la qual les aurícules s'omplen de sang. Seguidament es produeix la sístole auricular, per enviar la sang de les aurícules als ventricles, ja que els ventricles estan relaxats per a omplir-se de sang (diàstole ventricular). Després té lloc la sístole ventricular per a expulsar la sang del cor i enviar-la a la resta del cos. Al final de la sístole ventricular les aurícules ja es comencen a omplir de sang per a tornar a començar el cicle cardíac¹.

1.2. Activitat elèctrica cardíaca

Cada batec cardíac s'origina gràcies a un impuls elèctric generat per les cèl·lules autonòmiques marcapassos del nòdul sinoauricular (NSA), localitzat a la part superior de l'aurícula dreta. L'impuls elèctric produït en el NSA es propaga a través del sistema de conducció elèctric per tot el cor (**Figura 2**). Primer l'impuls arriba als cardiomiòcits de les aurícules, i provoca que aquests es contreguin. A continuació, l'impuls elèctric es propaga al nòdul auriculoventricular (NAV), situat al límit entre les aurícules i els ventricles. Del NAV neixen el feix de His i les fibres de Purkinje, els quals condueixen l'impuls elèctric fins als cardiomiòcits dels ventricles, i originen la contracció ventricular. El feix de His i les fibres de Purkinje sorgeixen del NAV en forma de feix únic que es divideix en dues branques, dreta i esquerra, cadascuna de les quals s'allarga fins als respectius ventricles. Les cèl·lules del NSA són les úniques que poden generar de manera espontània aquest impuls elèctric, propietat anomenada automatisme. Per tant, el NSA és el que determina el ritme cardíac.

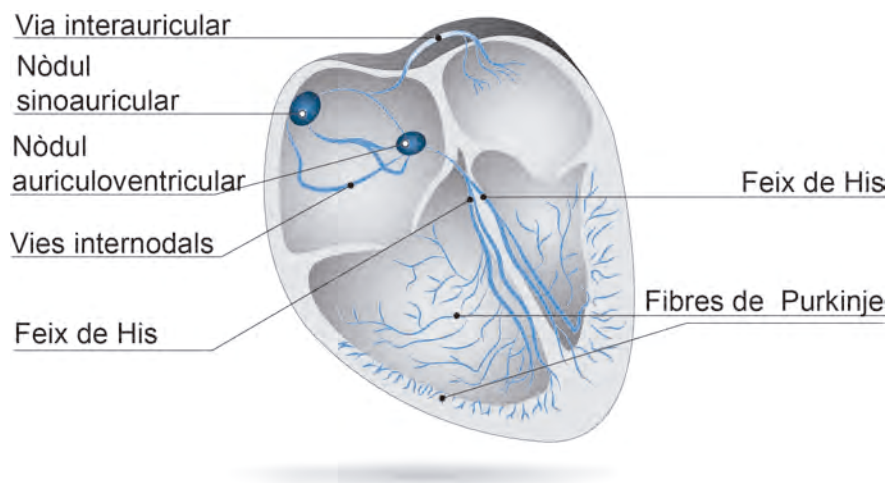


Figura 2. Sistema de conducció elèctric del cor. Representació dels diferents components que formen part del sistema de conducció elèctric del cor, per on es propaga l'impuls elèctric. Adaptada de Munshi 2012².

1.3. Potencial d'acció cardíac

A mesura que es va propagant l'impuls elèctric, es va produint la contracció de les diferents parts del cor gràcies a la generació d'un potencial d'acció cardíac (PAC). El PAC és un balanç de corrents de ions que circulen a favor del seu gradient electroquímic, a través dels canals iònics presents a la membrana dels cardiomiòcits. La difusió de ions provoca canvis reversibles en el potencial de membrana, que es defineix com la diferència de potencial que existeix entre els dos costats de la membrana plasmàtica. En les cèl·lules excitable (neurons, cardiomiòcits...) la membrana plasmàtica presenta una distribució asimètrica de càrregues entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula que és el que produeix la diferència de potencial. Els cardiomiòcits en estat de repòs presenten una diferència de potencial de -90 mil·livolts (mV), que significa que l'interior de les cèl·lules és 90 mV més negatiu que l'exterior. En el cor els tres corrents de ions més importants són el corrent de sodi (Na^+), el de potassi (K^+) i el de calci (Ca^{+2}). Els canals iònics són selectius pels diferents ions (canal de Na^+ , de K^+ i de Ca^{+2}) i són dependents de voltatge, és a dir, la seva activació depèn dels canvis que es produeixin en el potencial de membrana^{3, 4}.

El PAC consta de 5 fases (**Figura 3**):

- **Fase 0 o de despolarització:** l'arribada de l'impuls elèctric indueix l'obertura dels canals de Na^+ cardíacs dependents de voltatge (canals $\text{Na}_v1.5$). A través d'aquests canals es produeix una entrada ràpida i massiva de ions Na^+ dins la cèl·lula que genera el corrent de Na^+ (I_{Na}). L'entrada de Na^+ fa que la membrana passi d'un potencial de -90 mV (en estat de repòs) a valors positius (aproximadament de +40 mV).

- **Fase 1 o de repolarització parcial:** aquesta fase es deu a l'obertura de canals de K^+ , que genera un corrent de sortida de K^+ (I_{t0}), i a la inactivació dels canals $Na_v1.5$.
- **Fase 2 o de *plateau*:** es produeix un corrent entrant de Ca^{+2} a través dels canals de calci tipus L (I_{CaL}). L'entrada de Ca^{+2} activa els receptors de rianodina, que són presents a la membrana del reticle sarcoplasmàtic (RS). El receptor de rianodina allibera el calci de l'interior del RS al citoplasma. L'augment de calci citosòlic activa l'intercanviador Na^+/Ca^{+2} , el qual provoca l'alliberació del Ca^{+2} fora de la cèl·lula, i fa entrar tres ions Na^+ per cada ió de Ca^{+2} que surt. En aquesta fase es produeix també l'activació de diferents canals de K^+ , que generen un corrent sortint de K^+ (I_K).
- **Fase 3 o de repolarització:** es caracteritza per una sortida prolongada de ions K^+ . Al llarg d'aquesta fase el potencial de membrana assoleix cada vegada valors més negatius.
- **Fase 4 o de repòs:** correspon al retorn al potencial de repòs de membrana dels cardiomiòcits (-90 mV). La membrana es manté estable a aquest potencial gràcies al corrent rectificador de K^+ (I_{K1}). Els cardiomiòcits resten en aquesta fase fins a l'arribada d'un nou impuls elèctric.

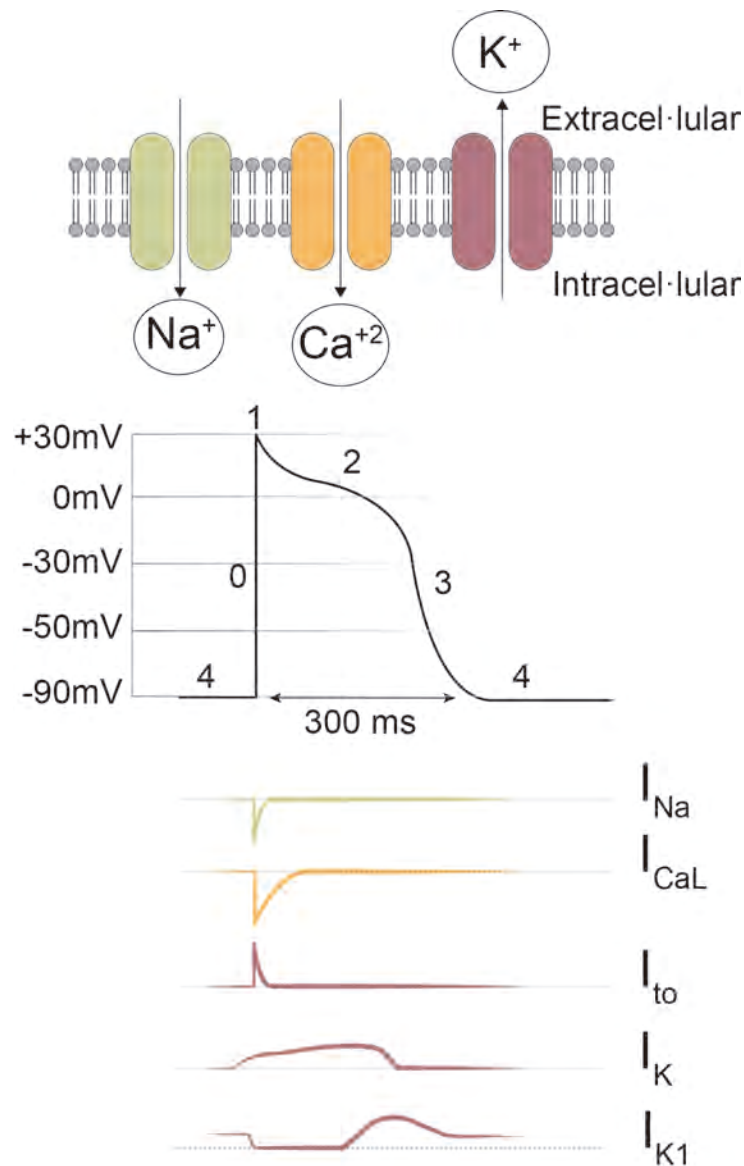


Figura 3. PAC i corrents iònics del cor. En la part superior, es representen els tres canals iònics principals presents a la membrana dels cardiomiòcits que participen en el PAC. Al mig, es mostra un PAC ventricular, i a sota, els corrents de sodi (I_{Na}), de calci (I_{CaL}) i de potassi (I_{to} , I_{K} , I_{K1}) responsables de generar el PAC. Adaptada de Marban 2002¹.

1.4. Electrocardiograma

La forma del PAC no és igual entre les cèl·lules del NSA, de les aurícules i dels ventricles, ja que existeixen certes diferències en les propietats elèctriques d'aquestes cèl·lules. Tals divergències es deuen a l'expressió diferencial d'alguns canals iònics.

La suma dels PAC dels cardiomiòcits en les diferents regions del cor és el que podem registrar a la superfície en forma d'electrocardiograma (ECG) (**Figura 4**). Per tant, l'ECG és una representació de l'activitat elèctrica del cor i, en conseqüència, una eina molt valuosa per al diagnòstic d'alteracions del ritme cardíac^{5, 6}.

La representació electrocardiogràfica d'un batec cardíac normal consisteix en: una **ona P** corresponent a la despolarització o contracció auricular (fase 0 del PAC auricular), un **segment QRS** que representa la despolarització o contracció dels ventricles (fase 0 del PAC ventricular), i una **ona T** deguda al corrent elèctric que es produeix en la repolarització o relaxació ventricular (fases 1, 2 i 3 del PAC ventricular). La repolarització o relaxació auricular no es pot observar en un ECG, ja que es dona al mateix temps que el complex QRS i el senyal elèctric que produeix és menor que el d'aquest complex. El primer soroll del batec cardíac coincideix amb el complex QRS, mentre que el segon soroll es produeix en l'ona T⁴.

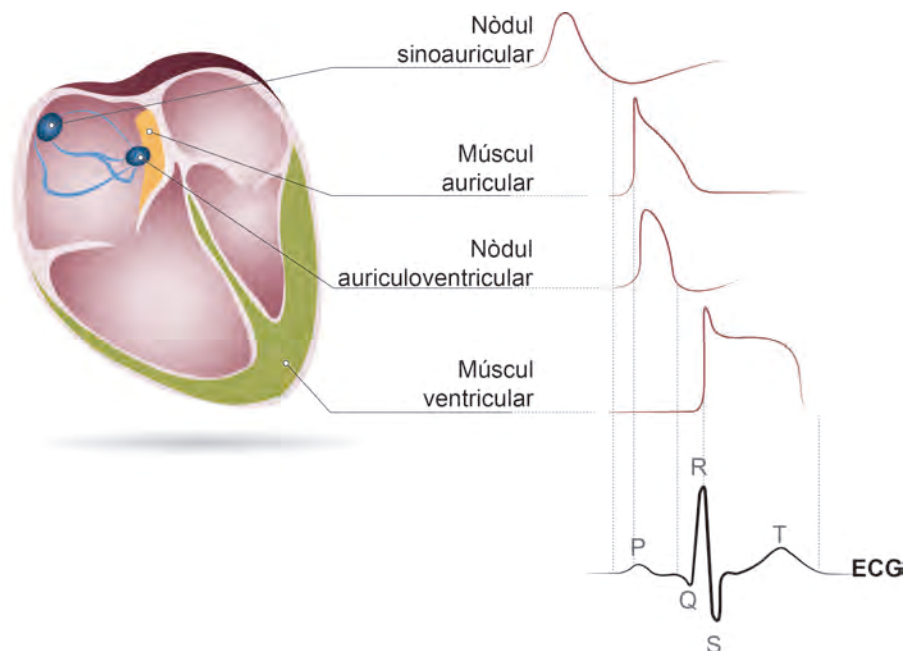


Figura 4. Representació de l'ECG. Correlació entre els PAC de les diferents regions del cor i l'ECG. Adaptada de Giudicessi *et al* 2012⁵.

2. El canal de sodi cardíac dependent de voltatge (Na_v1.5)

Els canals de sodi dependents de voltatge (canals Na_v) són proteïnes integrals de la membrana plasmàtica responsables de permetre el flux de ions Na⁺ a través de la cèl·lula. En els mamífers es coneixen nou canals de sodi dependents de voltatge (Na_v1.1-Na_v1.9), codificats per gens diferents, els quals comparteixen més d'un 50% d'homologia en seqüència aminoacídica. Els canals Na_v es coneixen com la subunitat alfa (α) o formadora del porus del canal, per on es produeix la circulació de ions Na⁺. La subunitat α sovint s'associa amb una o més subunitats beta (β) auxiliars, que són unes proteïnes transmembrana que modulen la funció del canal. Actualment, es coneixen cinc subunitats β (β 1, β 1b, β 2, β 3, β 4) dels canals Na_v; les subunitats β 1, β 1b i β 3 s'associen a la subunitat α per enllaços no covalents, i les subunitats β 2 i β 4 per ponts disulfurs⁷.

En els cardiomiòcits, la forma que s'expressa és el canal Na_v1.5, que està codificat pel gen *SCN5A*. Es creu que les subunitats β associades al canal Na_v1.5 incrementen el corrent de Na⁺ dels cardiomiòcits ja que provoquen un augment de l'expressió de la subunitat α a la membrana⁷. De forma similar, s'ha observat que el canal Na_v1.5 també interacciona amb altres proteïnes que modulen l'activitat elèctrica, el trànsit o les modificacions posttraduccionals del canal. Algunes d'aquestes proteïnes inclouen: anquirina-G, desmogleïna-2, GPD1L (*Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like*), calmodulina, entre d'altres^{8, 9}.

Estructuralment, el canal Na_v1.5 és un tetràmer amb quatre dominis homòlegs (DI-DIV), cadascun format per sis segments transmembrana (S1-S6) (**Figura 5**). Els llaços d'unió o *loops* entre els dominis i els extrems N- i C- terminal són intracel·lulars. El segment S4 correspon al sensor de voltatge, caracteritzat

per tenir aminoàcids amb càrrega positiva cada tres posicions. La unió entre S5 i S6 constitueix el porus del canal i dóna la selectivitat pel ió Na^+ . L'estructura quaternària consisteix en un plegament dels quatre dominis formant el porus, de tal manera que els segments S5 i S6 de cada domini queden a la part interior i fan de filtre per permetre el pas exclusiu de ions $\text{Na}^{+10, 11}$.

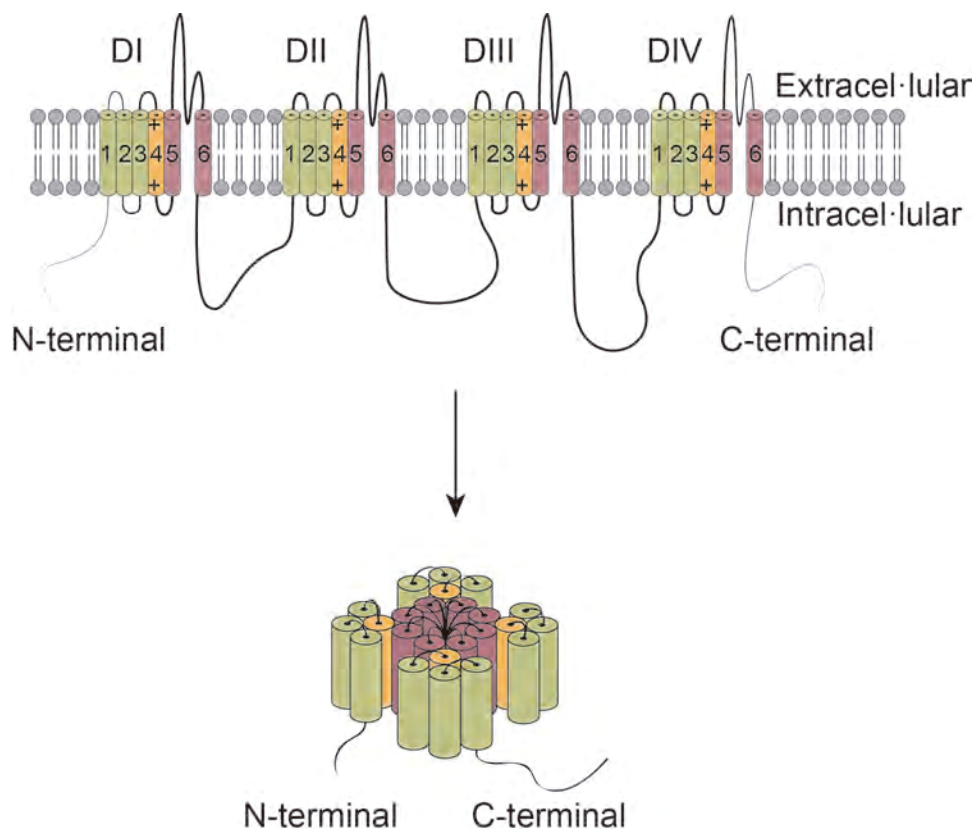


Figura 5. Subunitat α del canal de sodi cardíac $\text{Na}_V1.5$. A la part superior, estructura de la subunitat α del canal $\text{Na}_V1.5$ que mostra els 4 dominis (DI-DIV), cadascun amb els seus sis segments transmembrana corresponents. A la part inferior, model de l'estructura quaternària del canal que mostra el porus resultant de la unió dels segments S5 i S6 (en vermell) dels quatre dominis. Adaptada d'Amin i Asghari-Roodsari 2010⁶.

Durant el PAC el canal $\text{Na}_V1.5$ adopta tres estats conformacionals: obert, tancat i inactivat (**Figura 6**)¹². El primer és un estat conductor de ions Na^+ , mentre que els dos últims són no conductors. Aquests diferents estats es

poden explicar per la presència de dues comportes, la d'activació (o porus) i la d'inactivació. A potencials de repòs, el canal es troba en estat **tancat**, és a dir, la comporta d'activació es manté tancada mentre que la d'inactivació està oberta. En aquest moment el canal no permet el pas del Na^+ , però sí que es troba disponible per a activar-se. Quan s'inicia la despolarització (fase 0 del PAC) els canals $\text{Na}_v1.5$ passen de l'estat tancat a l'**obert**. En aquest moment es produeix una ràpida obertura de la comporta d'activació i un tancament lent de la comporta d'inactivació. D'aquesta manera, mentre ambdues comportes es troben obertes es dona l'entrada de ions Na^+ a la cèl·lula. Quan la comporta d'inactivació s'ha acabat de tancar no es permet l'entrada de Na^+ , encara que la comporta d'activació continuï obert; per això, aquest estat es coneix com a **inactivat (obert)**. Quan la cèl·lula està retornant a potencials de repòs durant la fase de repolarització, el procés és invers al de la despolarització: la comporta d'activació es tanca ràpidament, però, en canvi, la comporta d'inactivació s'obre més lentament. En aquest estat, el canal roman **inactivat (tancat)**, ja que es troba doblement tancat per les dues comportes. El canal requereix un cert temps fins que la comporta d'inactivació estigui totalment oberta per a tornar a l'estat de tancat i, així, tornar a ser activable per a iniciar un nou PAC. Aquest temps, durant el qual no es pot iniciar un nou PAC, és conegut com a període refractari absolut.

El sensor de voltatge té un paper important en els canvis d'estat del canal. Durant el PAC, els canvis en el potencial de membrana dels cardiomiòcits donen lloc a un moviment de les càrregues positives presents en el sensor de voltatge. Aquest moviment de càrregues modifica l'estructura del canal $\text{Na}_v1.5$ i, així, permet que aquest adopti els diferents estats conformacionals.

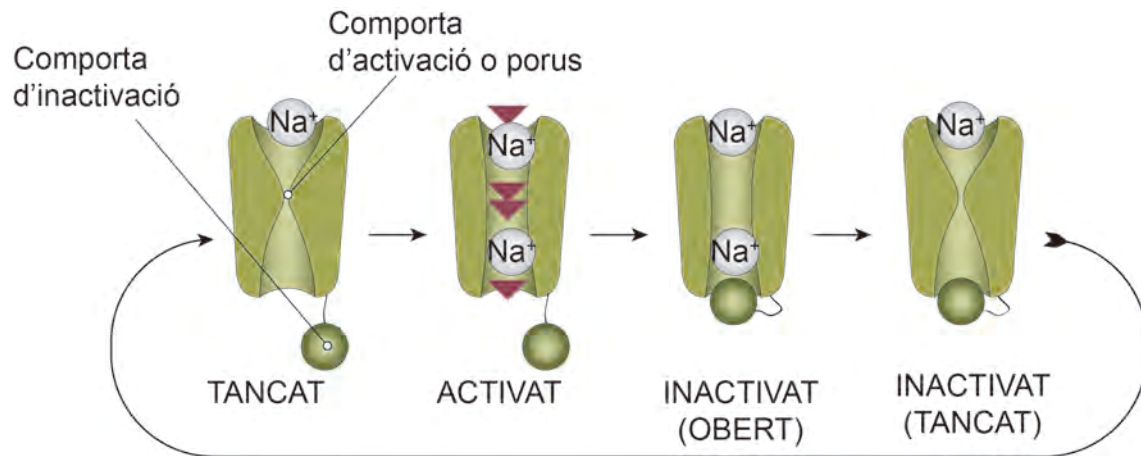


Figura 6. Estats conformacionals del canal $\text{Na}_v1.5$. Representació dels quatre estats que adopta el canal $\text{Na}_v1.5$ en funció del voltatge. Adaptada de Theile i Cummins 2011¹³.

3. Mort Soltada Cardíaca

3.1. Definició i epidemiologia

La mort soltada cardíaca (MSC) és una mort natural per causes cardíques que té lloc de manera ràpida i inesperada en persones amb o sense diagnòstic previ de malaltia cardiovascular. La definició més acceptada de MSC especifica que la mort succeeix com a màxim una hora després des de l'inici dels símptomes (dolor de pit, palpitations, dispnea, síncope...) ^{14, 15}. Tot i això, un 50% de les MSC en joves es produeixen sense previ avís, per la qual cosa la pròpia mort n'és la primera manifestació clínica ¹⁶.

La incidència de la MSC augmenta amb l'edat i és més elevada en homes que en dones. Tot i que el risc és més gran amb l'edat, la proporció de morts que són per causa de MSC és més elevada en persones joves, fet que té un important impacte social. Es calcula que als Estats Units i a Europa la incidència anual de la MSC és d'entre 50 i 100 casos per cada 100.000 habitants ^{17, 18}. Tot i això, la incidència pot variar entre els diferents estudis epidemiològics. Per exemple, el tipus d'estudi utilitzat per a determinar els casos (estudi prospectiu o bé estudi retrospectiu basat en la informació dels certificats mèdics) pot influir en l'estimació de la incidència de la MSC ¹⁹. El temps des de l'aparició dels primers símptomes és també determinant per a valorar la incidència de la MSC. En aquest sentit, alguns estudis apunten que sinó hi ha cap testimoni que pugui corroborar que l'esdeveniment ha tingut lloc durant la primera hora des de l'inici dels símptomes (per definició), es considera MSC si es dona dins les 24 hores des de l'última vegada que es va veure la persona amb vida i sense cap símptoma ²⁰.

L'etiologia de la MSC engloba principalment dos factors: en primer lloc, la presència d'una malaltia cardíaca en el pacient, que en molts casos es manté oculta fins que es produeix la MSC; i, en segon lloc, un desencadenant extern,

com l'exercici físic o l'estrès emocional, que augmenta l'activitat del sistema nerviós simpàtic. La suma d'aquests dos factors provoca una inestabilitat en l'activitat elèctrica del cor que acaba donant lloc a la MSC. Aquesta inestabilitat elèctrica, en un 75-80% dels casos és una fibril·lació ventricular i, en un 20-25% dels casos, una bradicàrdia ^{14, 15, 20}.

3.2. Malalties cardíques associades a la MSC

La causa més important de MSC és la malaltia coronària, que representa el 75-80% de les MSC^{21, 22}. Així mateix, un 10-15% de les MSC són degudes a malalties que presenten anomalies estructurals del cor; aquestes malalties s'anomenen cardiomiopaties. Les cardiomiopaties inclouen: la cardiomiopatia hipertròfica, la cardiomiopatia dilatada, la cardiomiopatia aritmogènica del ventricle dret i les anomalies congènites. D'altra banda, un 5-10% de les MSC són conseqüència d'unes malalties cardíques anomenades canalopaties, que es caracteritzen per alteracions en l'activitat elèctrica cardíaca sense presentar defectes estructurals del cor. Les canalopaties inclouen: la síndrome de QT llarg (SQTL), la síndrome de Brugada (SBr), la síndrome de QT curt (SQTC), la fibril·lació auricular familiar (FAF), la síndrome de Lev-Lenègre o síndrome progressiva del sistema de conducció cardíac (SPCC) i la taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (TVPC). Les canalopaties es consideren arítmies primàries ja que la inestabilitat elèctrica del cor està causada per un defecte en la mateixa activitat elèctrica cardíaca²³. En canvi, les cardiomiopaties es consideren arítmies secundàries, perquè la inestabilitat elèctrica és deguda a una alteració en l'estructura del cor. Entre els grups d'edat més joves, les cardiomiopaties i les canalopaties són la causa més comuna de MSC i, en canvi, disminueix la incidència de la malaltia coronària, que és més freqüent en persones majors de 40 anys^{24, 25}.

3.3. La genètica de la MSC

En els darrers anys, els avenços en el camp de la genètica han tingut un gran impacte en la MSC, ja que han permès identificar gens responsables d'aquestes malalties. La genètica té un paper important principalment en les cardiomiopaties i les canalopaties, les quals es consideren arítmies hereditàries. La malaltia coronària també pot tenir un component genètic, tot i que es considera una malaltia multifactorial i poligènica, és a dir, amb diversos gens implicats. Malgrat que els factors genètics predisposen un individu a patir una arítmia cardíaca, és necessària la presència d'un factor extern per a desencadenar la MSC²⁶.

Les variants genètiques, enteses com qualsevol canvi d'un o més nucleòtids en el DNA, responsables d'arítmies cardíques afecten gens que codifiquen per quatre grans famílies de proteïnes: les proteïnes sarcomèriques, les proteïnes del citoesquelet, les proteïnes desmosomals i els canals iònics cardíacs²³. Les tres primeres famílies inclouen proteïnes implicades en l'estructura dels cardiomiòcits (cèl·lules cardíques amb funció contràctil) i en la generació i transmissió de la força contràctil del cor; els defectes genètics en els gens que codifiquen per a aquestes proteïnes estan associats amb cardiomiopaties. Els canals iònics cardíacs són proteïnes de membrana encarregades de regular el pas de ions a través de la membrana dels cardiomiòcits; les variants genètiques en els gens que codifiquen per a aquestes proteïnes s'han associat amb canalopaties.

Les anàlisis genètiques poden confirmar un diagnòstic clínic d'arítmies associades a MSC. Així mateix, poden ajudar en el diagnòstic d'aquells casos de morts sobtades que presenten una autòpsia negativa, és a dir, sense causa identificada. Davant d'un pacient que ha patit una MSC, la genètica també permet identificar portadors genètics en membres de la mateixa família, els quals podran rebre un teràpia preventiva.

4. Malalties elèctriques o canalopaties cardíques

Les canalopaties cardíques són un grup de malalties associades a la MSC i causades per variants genètiques en els gens que codifiquen pels canals iònics implicats en el PAC (canals de Na^+ , de K^+ i de Ca^{+2}), així com també per les proteïnes reguladores d'aquests¹⁶. Les variants genètiques poden donar lloc a defectes en la funció, localització o expressió del canal i, com a conseqüència, a una alteració del PAC que es manifesta en l'ECG. De fet, les diferents canalopaties presenten un patró electrocardiogràfic característic, que és de gran utilitat pel diagnòstic.

Les variants associades amb canalopaties poden ser de diferents tipus. Les més freqüents són les variacions de nucleòtid únic (SNV), les quals poden ser: sinònimes, quan no produeixen canvi d'aminoàcid; no sinònimes, quan tenen com a conseqüència un canvi d'aminoàcid; stop, quan introdueixen un codó stop i donen lloc a una proteïna truncada²². Les variants associades a canalopaties poden ser també insercions o delecions, les quals poden modificar el marc de lectura (*frameshift*). És important destacar que no totes les variants genètiques en els gens que codifiquen pels canals iònics són patogèniques. En aquest sentit, existeixen diferents criteris per avaluar si les variants poden ser potencialment patogèniques. Alguns d'aquests criteris inclouen: (1) estudiar si la variant genètica cosegrega amb la malaltia a partir d'un pedigrí familiar; (2) verificar l'absència de la variant en una cohort d'individus control; (3) comprovar si la variant dona lloc a una proteïna truncada; (4) realitzar anàlisis de predicció *in silico* amb programes bioinformàtics; i (5) examinar l'efecte de les variants sobre les propietats biofísiques dels canals iònics mitjançant tècniques d'electrofisiologia²⁷.

Les canalopaties són malalties amb una expressivitat variable, és a dir, pacients amb una mateixa variant genètica poden presentar una gran variabilitat de manifestacions fenotípiques, des de casos asimptomàtics fins a pacients que manifestin arítmies ja des de la infantesa. Els mecanismes que expliquen aquesta expressivitat variable encara no es coneixen molt bé. No obstant això, es creu que, en part, es deuen a factors individuals o exògens, com és el sexe, el tractament amb fàrmacs bloquejadors del canal $\text{Na}_v1.5$, i la febre, entre d'altres. Diversos estudis també han suggerit que existeixen altres factors genètics responsables d'aquesta variabilitat de fenotips (aquest punt s'explica de manera més detallada a l'apartat 4.1.). D'altra banda, el fet que una mateixa variant pugui causar diferents canalopaties (SBr, SQT3 o SPCC), fa que hi pugui haver superposició de fenotips de diferents malalties cardíques en un mateix individu, complicant encara més la interpretació de l'expressivitat variable^{28, 29}.

4.1. Canalopaties associades amb variants genètiques en les regions exòniques del gen *SCN5A*

Les variants genètiques en les regions codificants (exons) del gen ***SCN5A***, que codifica pel canal $\text{Na}_v1.5$, s'han associat amb diverses canalopaties, entre les quals les més destacades són la SBr, la SQT3 de tipus 3 (SQT3), la SPCC i la FAF. Les variants genètiques en *SCN5A* associades amb la SBr i la SPCC causen una pèrdua de funció del canal $\text{Na}_v1.5$, és a dir, una disminució del corrent de Na^+ que circula a través del canal. En canvi, les variants que donen lloc a la SQT3 són de tipus guany de funció, i produeixen un augment del corrent de Na^+ . En el cas de la FAF es poden donar ambdues situacions^{6, 30}.

Tot i que s'ha observat una àmplia distribució de les variants associades a canalopaties al llarg dels 28 exons que conté el gen *SCN5A*, s'han descrit regions de la proteïna on es concentren més variants per una determinada

patologia. Per exemple, en el cas de la SBr, s'ha identificat un elevat percentatge de variants en la regió que forma el porus del canal $\text{Na}_v1.5$ (entre els segments S5-S6), mentre que les variants en segments transmembrana o en les regions intracel·lulars representen un menor percentatge de casos. En el cas de la SQTL3, la majoria de les variants identificades es concentren als *loops* intracel·lulars del canal, mentre que no s'ha detectat cap variant en el porus del canal associada amb la SQTL3. Això suggereix que les variants genètiques en el porus sovint donen lloc a una pèrdua de funció del canal $\text{Na}_v1.5$. En resum, l'efecte que produeix la variant en l'estructura i la funció de la proteïna, depèn en part de la regió de la proteïna a on es trobi.

Tal com s'ha comentat anteriorment, les canalopaties presenten una gran variabilitat en el fenotip; diverses evidències han suggerit que, en part, podria ser deguda a altres factors genètics que influeixin en l'efecte d'una variant patogènica. De fet, s'han identificat variants a *SCN5A* associades amb canalopaties que coexisteixen amb polimorfismes (una variant genètica que és present en més d'un 1% de la població). S'ha observat que aquests polimorfismes poden actuar com a modificadors genètics de la variant i modular la susceptibilitat a patir arítmies cardíques²⁸. En aquest sentit, en un estudi d'associació de genoma (GWAS), realitzat amb 312 pacients de SBr, es van identificar tres polimorfismes, un al gen *SCN5A* (rs11708996), un al gen *SCN10A* (rs10428132) i un al gen *HEY2* (rs9388451), associats amb la malaltia³¹. El polimorfisme del gen *SCN5A* trobat en aquest estudi correspon a la variant no sinònima H558R, que s'ha demostrat que pot revertir l'efecte de determinades variants patogèniques. Per exemple, estudis electrofisiològics van mostrar que la variant R282H, associada amb la SBr, causa una inhibició total del corrent de Na^+ ; en canvi, la coexpressió d'aquesta variant amb el polimorfisme H558R provoca un augment significatiu del corrent de Na^+ ³². Això es deu al fet que aquest polimorfisme reverteix l'expressió del canal

$Na_v1.5$ en la membrana de les cèl·lules i, per tant, té un efecte protector contra arítmies.

4.2. Síndrome de Brugada

La síndrome de Brugada (SBr) es va descriure per primera vegada el 1992³³. És una malaltia cardíaca hereditària que presenta un patró electrocardiogràfic caracteritzat per una elevació del segment ST en les derivacions precordials dretes (V1-V3) (**Figura 7**)^{34, 35}. Els pacients amb SBr tenen un alt risc de patir taquicàrdies ventriculars polimòrfiques o fibril·lació ventricular, que donen lloc a la MSC. Aquesta síndrome es considera responsable d'entre el 4 i el 12% de les MSC. La prevalença de la malaltia varia segons la regió geogràfica; així, és d'1 a 5 per 10.000 habitants a Europa i de 12 per 10.000 habitants al sud-est Asiàtic³⁶. La majoria dels símptomes aritmogènics es manifesten entre els 40 i els 45 anys, que és quan la malaltia sol ser diagnosticada, i afecta principalment els homes (un 80% d'afectats són homes mentre que un 20% són dones). Es calcula que entre un 25-50% dels pacients tenen una història familiar de MSC^{23, 37, 38}.

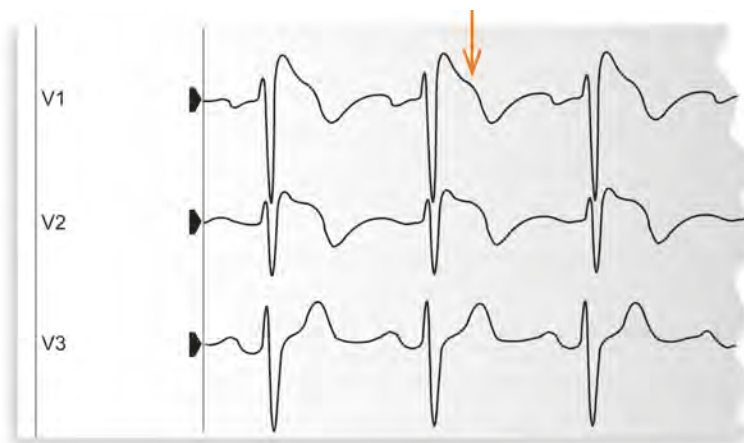


Figura 7. ECG característic de la SBr. La fletxa vermella indica l'elevació del segment ST en les derivacions V1-V3. Adaptada de Duthoit *et al* 2012³⁵.

La causa més coneguda de la SBr són les variants en el gen *SCN5A*, les quals representen un 25% dels casos de SBr i presenten un patró de transmissió autosòmic dominant³⁹. Fins al moment s'han identificat més de 350 variants a *SCN5A*, un gran nombre de les quals corresponen a variants no sinònimes (canvi d'aminoàcid), tot i que també s'han identificat algunes variants que donen lloc a proteïnes $\text{Na}_v1.5$ truncades. D'altra banda, també s'han descrit variants associades amb la SBr a altres gens però amb una incidència molt més baixa. Aquests gens inclouen aquells que codifiquen per proteïnes moduladores de la funció del canal $\text{Na}_v1.5$, en són un exemple les subunitats $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ ^{40 41, 42}. També inclouen gens que codifiquen per canals de Ca^{+2} i de K^+ , o proteïnes reguladores d'aquests. És important destacar, però, que en un 60-75% de pacients amb la SBr no s'ha detectat cap alteració genètica causant de la malaltia. Això significa que la causa de la malaltia és desconeguda en la majoria de casos⁴³.

Tal com s'ha explicat anteriorment, la SBr es caracteritza per una disminució del corrent de Na^+ , que és la causa de l'elevació del segment ST en l'ECG típic d'aquests pacients. Però existeix certa controvèrsia respecte als mecanismes que expliquen aquesta elevació del segment ST. S'han proposat dues hipòtesis per explicar aquest mecanisme^{44, 45}:

- **Hipòtesi de desequilibri en la repolarització (Figura 8A):** es basa en la diferència que existeix en el PAC entre l'epicardi i l'endocardi. En condicions normals, en la fase 1 del PAC el corrent sortint de K^+ s'oposa al corrent entrant de Na^+ , i fa que el potencial de membrana assoleixi valors menys positius. Això es pot observar a la fase 1 del PAC com una deflexió, anomenada gradient transmural. Com que el corrent de K^+ és major a les cèl·lules de l'epicardi que no a les de l'endocardi, el corrent de Na^+ a l'epicardi es veu més contrarestat i el gradient transmural és més important. En pacients amb SBr, on hi ha una disminució del corrent de Na^+ , la diferència entre el corrent

entrant de Na^+ i el sortint de K^+ és molt més gran, sobretot a la regió de l'epicardi. En conseqüència, el gradient transmural és més accentuat en aquesta regió, i això es reflecteix en l'ECG de pacients amb SBr en una elevació dels segment ST. D'altra banda, aquesta descompensació en l'epicardi causa una fase 2 del PAC més llarga que en l'endocardi i dóna lloc a una ona T negativa.

- **Hipòtesi de desequilibri en la despolarització (Figura 8B):** segons aquesta hipòtesi, la reducció del corrent de Na^+ en els pacients amb SBr causa un retard en la conducció en el tracte de sortida del ventricle dret (TSVD) respecte al ventricle dret. Com a conseqüència, en fer el registre de l'ECG, s'observa una elevació del segment ST i una ona T negativa.

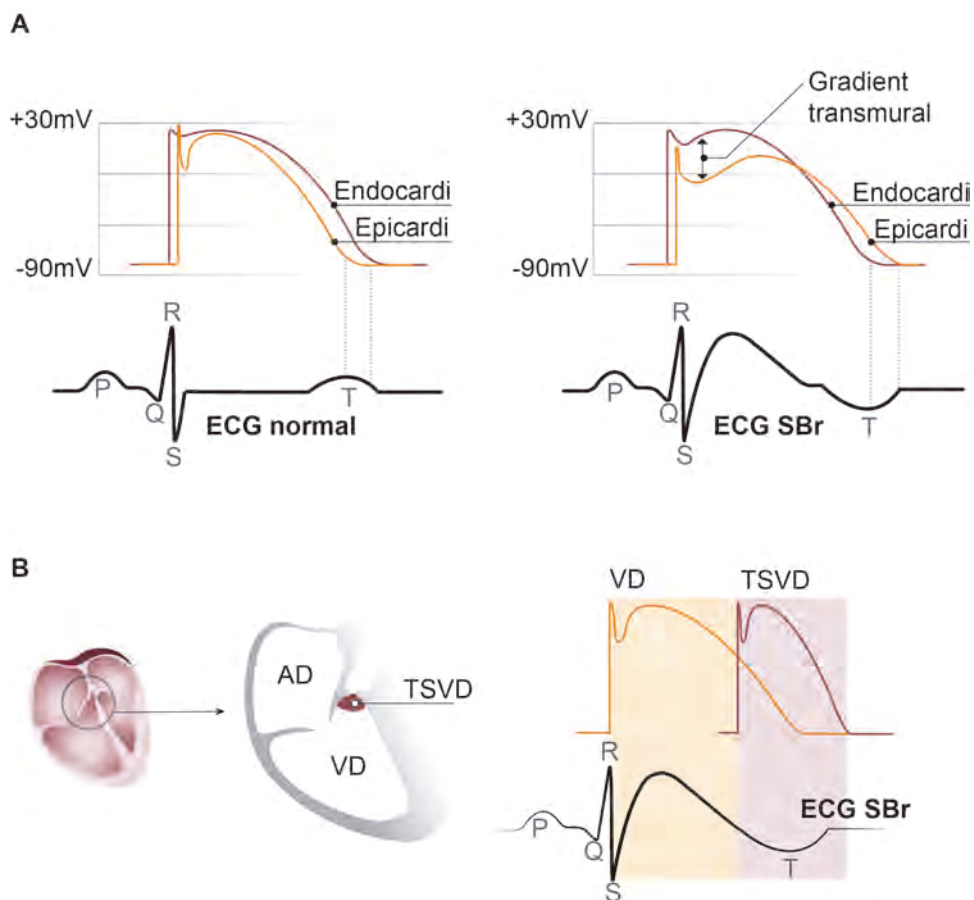


Figura 8. Hipòtesis per explicar els mecanismes de l'elevació del segment ST en un ECG de SBr. **A.** Hipòtesi de desequilibri en la repolarització. **B.** Hipòtesi de desequilibri en la despolarització. Adaptades de Meregalli *et al* 2005 ⁴⁵.

Els criteris de diagnòstic de la SBr es basen principalment en detectar l'elevació del segment ST en l'ECG. A més, el pacient també ha de presentar algun altre factor que recolzi el diagnòstic, com pot ser història familiar de MSC, símptomes relacionats amb arítmies (síncopes, respiració nocturna agònica,...), arítmies ventriculars o variants genètiques associades a SBr³⁶. En molts pacients, l'elevació del segment ST es manté oculta fins que es desemmascara la síndrome per algun factor extern. Aquests factors inclouen la febre, consum de cocaïna, antidepressius tricíclics, antihistamínics de primera generació o fàrmacs antiarítmics bloquejadors del canal de sodi (com són l'ajmalina i la flecainida). Aquests últims fàrmacs s'utilitzen en la pràctica clínica de manera controlada per a desemmascarar la malaltia en aquells casos que hi hagi indicis de que el pacient podria patir una SBr⁴⁶.

Actualment, l'única estratègia terapèutica efectiva per prevenir la MSC dels pacients que pateixen la SBr és la implantació d'un desfibril·lador automàtic (DAI). El DAI és un dispositiu que controla contínuament el ritme cardíac, i en el cas que detecti algun problema allibera un xoc elèctric per a restaurar l'activitat elèctrica normal. Tot i que els tractaments farmacològics estan encara en estudi, actualment s'estan utilitzat dos grups de fàrmacs per reduir el desequilibri iònic de la fase 1 del PAC: (1) fàrmacs inhibidors del corrent de K^+ I_{to} ; i (2) fàrmacs activadors dels canals de Na^+ i de Ca^{2+} tipus L^{47, 48}.

4.3. Síndrome de QT llarg

La SQTLL és una malaltia cardíaca associada a la MSC que afecta 1 de cada 2.000 individus⁴⁹. Es caracteritza per una prolongació de l'interval QT en l'ECG, deguda a un allargament del temps de repolarització ventricular. L'interval QT és la distància entre el pic QRS, corresponent a la

despolarització ventricular, i el final de l'ona T, corresponent al final de la repolarització ventricular.

La SQTl pot ser causada per un defecte genètic (SQTl hereditària). No obstant això, també s'han descrits casos en què pot ser adquirida, per exemple un tractament amb fàrmacs bloquejadors dels canals de K^+ pot induir un patró electrocardiogràfic típic de la SQTl. Pel que fa a la SQTl hereditària, s'han descrit variants en 16 gens diferents com a causants de la malaltia. La majoria de les variants presenten una herència autosòmica dominant. En funció del gen afectat s'han classificat 16 tipus de SQTl, entre les quals les majoritàries són la SQTl1 (que representa un 30-35% del total de casos de SQTl), la SQTl2 (25-30%) i la SQTl3 (5-10%). Les SQTl1 i SQTl2 estan causades per variants als gens que codifiquen pels canals de K^+ *KCNQ1* i *KCNH2*, respectivament, mentre que la SQTl3 s'ha relacionat amb la presència de variants al gen *SCN5A*. En la SQTl1 i SQTl2 es produeix una pèrdua de funció dels canals de K^+ , donant lloc a un alentiment de l'entrada de ions K^+ durant la fase 2 del PAC. En canvi, els pacients amb SQTl3 presenten una inactivació incompleta del canal $Na_v1.5$, de tal manera que es produeix una entrada continua de corrent de Na^+ a la cèl·lula. Com a conseqüència, en la SQTl1, SQTl2 i SQTl3 la fase de repolarització del PAC és més lenta, i això es reflecteix en l'ECG com un allargament de l'interval QT (**Figura 9**). Encara que en menor proporció que la SBr, també hi ha un percentatge de pacients amb SQTl (20-35%) sense causa genètica identificada, per tant, en aquests casos no es coneix l'etiologia de la malaltia⁵⁰.

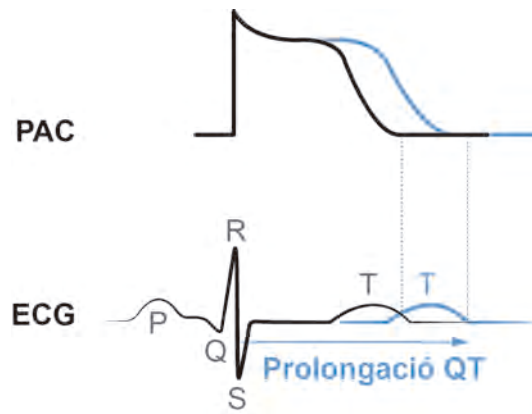


Figura 9. ECG característic de la SQTl. A la part superior, es representa l'allargament de la fase de repolarització del PAC típic de SQTl (blau) en comparació amb un PAC normal (negre). A la part inferior, es mostra l'allargament QT en l'ECG. Adaptada de Brugada *et al* 2007³⁰.

El criteri de diagnòstic de la SQTl inclou un ECG, juntament amb la història clínica del pacient (presència de síncope o arítmies) i antecedents familiars. Pel que fa el tractament, els fàrmacs bloquejadors del canal de Na^+ s'han mostrat eficaços per normalitzar l'interval QT en pacients amb SQTl3³⁰. En els casos de SQTl1 i SQTl2 el tractament preferible són els fàrmacs β -bloquejadors (antagonistes dels receptors adrenèrgics).

B. Mecanismes de regulació transcripcional en el cor

5. Regulació de l'expressió gènica a nivell transcripcional

L'expressió gènica és el procés a partir del qual la informació continguda en els gens és utilitzada per a la síntesi d'un producte funcional, sigui RNA o proteïna. Totes les cèl·lules d'un organisme són genèticament idèntiques, és a dir, tenen exactament la mateixa seqüència de DNA. L'heterogeneïtat dels diferents tipus cel·lulars en morfologia i funció és deguda a una expressió diferencial dels gens. Així doncs, els mecanismes que regulen els gens que s'han d'expressar en cada tipus cel·lular, així com en diferents moments del desenvolupament i en resposta a estímuls, asseguren que cada cèl·lula de l'organisme disposa de totes les proteïnes necessàries en la quantitat correcta i en el moment adequat. Una alteració dels mecanismes que regulen l'expressió gènica pot tenir conseqüències greus, ja que pot donar lloc al desenvolupament de malalties⁵¹. Bàsicament hi ha tres punts crítics de regulació de l'expressió en eucariotes, que són els següents:

- A nivell transcripcional: inclou tots els mecanismes que controlen la unió de l'RNA polimerasa II (RNA Pol II) al DNA per tal que iniciï el procés de transcripció. És el pas més important de regulació de l'expressió gènica (explicat amb més detall en els apartats 5.1., 5.2. i 5.3.). Aquesta tesi es basa principalment a estudiar els mecanismes de regulació transcripcional del gen *SCN5A*.

- A nivell posttranscripcional: fa referència a les modificacions que rep l'mRNA just després de ser transcrit, anomenat pre-mRNA, per tal que es converteixi en un mRNA madur preparat per la traducció a proteïna. Aquestes modificacions són: la poliadenilació de l'extrem 3', addició de 7-metil-guanosina a l'extrem 5' i l'*splicing* (eliminació dels introns i unió dels exons). En la regulació posttranscripcional també hi participen els microRNA, els quals controlen els nivells i l'estabilitat dels mRNA. Els microRNA són petites molècules d'RNA que s'uneixen de forma específica a l'mRNA i n'indueixen la seva degradació o bé la inhibició de la traducció a proteïna.
- a nivell posttraduccional: fa referència, principalment, a l'addició de grups químics a la proteïna un cop ha estat sintetitzada. Les modificacions posttraduccional inclouen la fosforilació, la glicosilació, l'acetilació i la metilació, entre d'altres. Aquestes modificacions regulen diversos aspectes de les proteïnes com són l'activació o la inhibició de l'activitat catalítica, la localització en els diferents compartiments cel·lulars i la degradació.

Tot i que qualsevol fase de l'expressió gènica pot ser regulada, es creu que es produeix, en gran part, a **nivell transcripcional**⁵². El control de la transcripció depèn principalment de la comunicació entre dos components: els **factors de transcripció (FT)**, que són proteïnes que s'uneixen al DNA, i la **cromatina**, formada pel DNA i les histones. La interacció entre aquests dos components és el que determina si s'activa o no l'RNA Pol II i, per tant, promourà l'activació o la repressió de la transcripció dels gens. En eucariotes, la transcripció basal és restrictiva, és a dir, els gens estan inactivats transcripcionalment i necessiten una regulació positiva per a iniciar la transcripció⁵³.

5.1. Factors de transcripció

Els FT són proteïnes d'unió al DNA que participen en la regulació transcripcional. Poden activar o reprimir la transcripció gènica mitjançant la unió directa al DNA, a través de la unió a altres FT, o interaccionant amb l'RNA Pol II. Bàsicament es distingeixen dos tipus de FT: els FT generals i els FT específics⁵⁴.

A) Factors de transcripció generals (FTG) o basals

Els FTG o basals (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE i TFIIH) s'uneixen al promotor dels gens i són necessaris per a l'inici de la transcripció de qualsevol gen. Aquestes proteïnes recluten l'RNA Pol II i la situen al lloc d'inici de la transcripció (TSS). Els FTG i l'RNA Pol II formen un complex anomenat complex de preiniciació (CPI). La unió del CPI al promotor per si sola és suficient per induir una transcripció basal⁵⁵.

La fase d'**iniciació** de la transcripció comença amb la unió del TFIID al promotor (**Figura 10**). TFIID és un complex multiproteic que inclou: la proteïna *d'unió a TATA* (TBP) que reconeix específicament la caixa TATA (seqüència situada a 25 nucleòtids del TSS); i onze proteïnes associades a TBP (TAF1-TAF11). En promotors amb la caixa TATA, TBP és suficient perquè tingui lloc la transcripció. En canvi, els promotors sense la caixa TATA requereixen les proteïnes TAF. A continuació, el TFIIB reconeix el complex TFIID-DNA, s'hi uneix i formen un complex ternari molt estable. El TFIIB recluta tant el TFIIF com l'RNA Pol II, ja que té llocs d'unió per ambdues proteïnes. El TFIIA també s'uneix a TFIID-DNA i estabilitza la unió de la TBP amb el promotor. Finalment, TFIIE s'uneix al complex, el qual recluta TFIIH. Gràcies a l'activitat helicasa de TFIIH, es separen les dues cadenes de DNA i l'RNA Pol II transcriu el primer nucleòtid de l'mRNA. En la següent fase, anomenada **elongació**, l'RNA Pol II s'allibera del promotor i avança al llarg del gen per sintetitzar l'mRNA^{55, 56}. El domini C-terminal de l'RNA Pol II conté una

seqüència repetitiva de set aminoàcids, dos dels quals són serines que estan subjectes a fosforilació. La subunitat quinasa de TFIIF, formada per Cdk7/cycH, fosforila la serina 5 de l'RNA Pol II durant la iniciació⁵⁷. A continuació, Cdk9/CycT, que és una subunitat del factor P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*), fosforila la serina 2 de l'RNA Pol II per a facilitar el procés d'elongació⁵⁸. Estudis recents també han demostrat que la cua C-terminal de l'RNA Pol II és acetilada per p300 en les primeres etapes d'elongació⁵⁹.

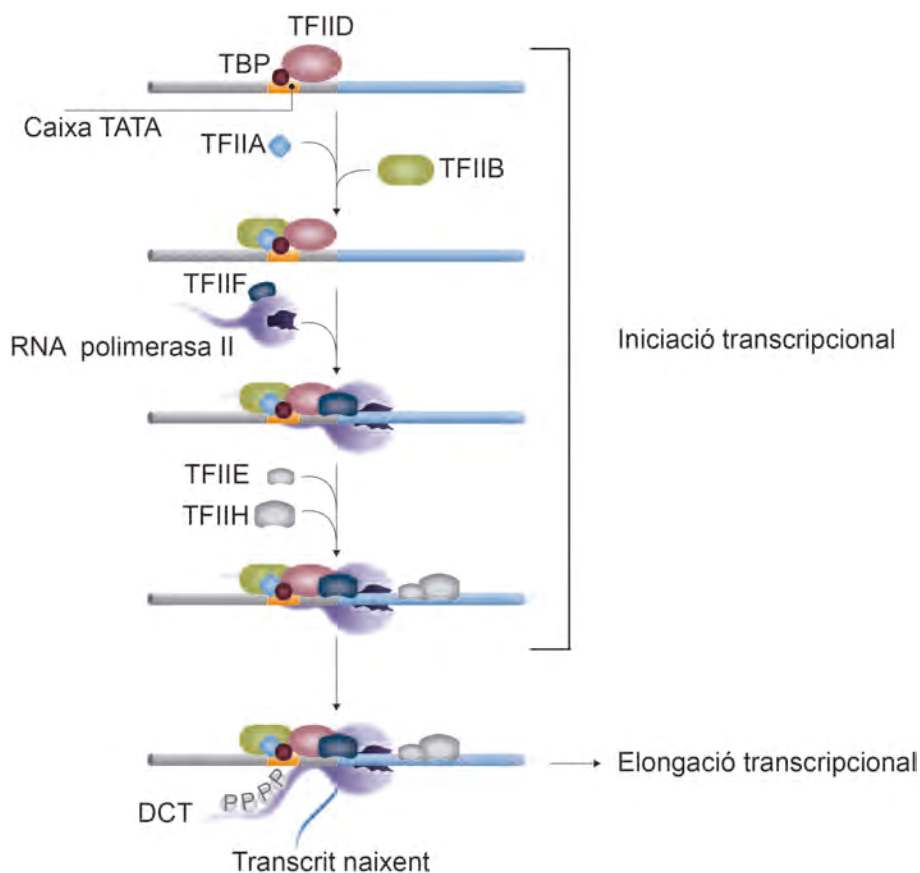


Figura 10. Transcripció basal en eucariotes. Regulació de la transcripció basal en eucariotes pels FTG (TFIIA, TFIIB, TFIID, TBP, TFIIE, TFIIH) i l'RNA Pol II. DCT: Domini C-terminal. Adaptada de Levine 2011⁶⁰.

Tot i que els FTG i l'RNA Pol II poden donar lloc a una transcripció basal, la unió amb un tercer element anomenat **Mediator**, constitueixen la maquinària de transcripció que s'uneix al promotor i provoca una activació més important i específica de la transcripció. El Mediator és un enorme complex proteic format per 31 subunitats (MED1-MED31) que actua de pont entre el CPI i els FT específics (**Figura 11 A i B**). Quan l'RNA Pol II comença l'elongació, el Mediator s'allibera del CPI, i interacciona amb el complex CDK8/CycC, que té activitat quinasa. Aquesta subunitat bloqueja la unió del Mediator amb una altra RNA Pol II, i d'aquesta manera impedeix que es comenci un nou procés d'iniciació de la transcripció⁶¹. Alguns estudis recents han descrit noves funcions del complex Mediator; per exemple s'ha constatat la participació d'aquest complex en processos com la regulació epigenètica o l'elongació i la maduració de l'mRNA, entre altres. S'ha observat també que el Mediator té una gran importància en la regulació de l'expressió gènica durant el desenvolupament embrionari⁶².

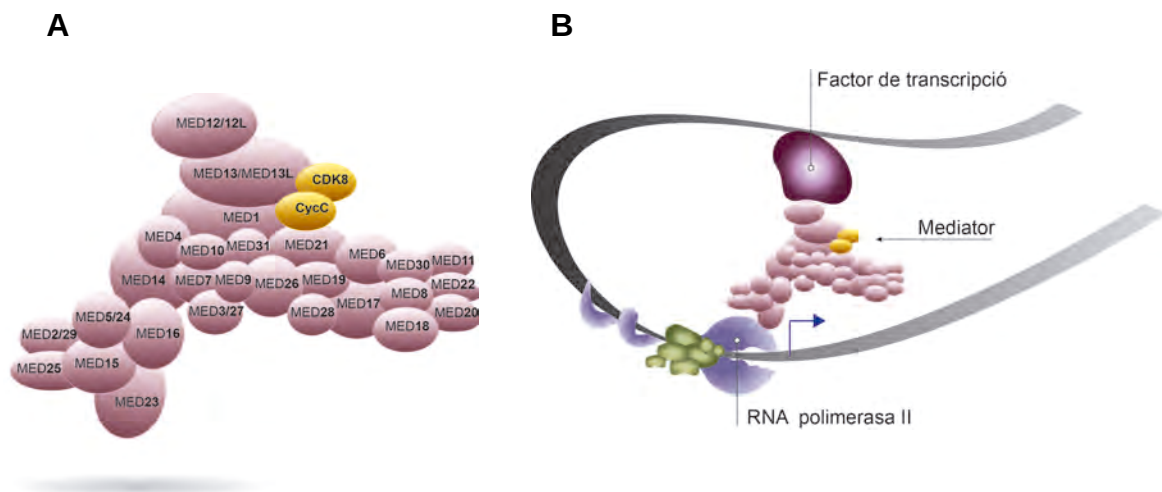


Figura 11. Estructura i funció del Mediator. **A.** Esquema de les subunitats que formen el Mediator. El complex Cdk8/CycC (en groc) interacciona amb el Mediator. **B.** Interacció del Mediator amb l'RNA polimerasa II i un factor de transcripció. La fletxa blava indica el TSS. Adaptades de Yin i Wang 2014⁶².

L'**Elongator** és un complex proteic format per sis subunitats (Elp1 - Elp6) amb activitat acetiltransferasa de lisina (**Figura 12A**). Es pot trobar tant al citosol com al nucli, i quan es troba al nucli regula la transcripció. Aquest efecte en la transcripció es deu al fet que l'Elongator s'uneix al DNA una vegada l'RNA Pol II ha estat fosforilada⁶³. L'Elongator actua acetilant les lisines de les cues de la histona 3 (H3) i la histona 4 (H4) presents en el gen, que és un pas necessari perquè es doni el procés d'elongació (**Figura 12B**)^{64, 65}. L'acetilació de les histones donarà lloc a una estat menys compactat de la cromatina que permetrà que l'RNA Pol II pugui avançar al llarg del gen.

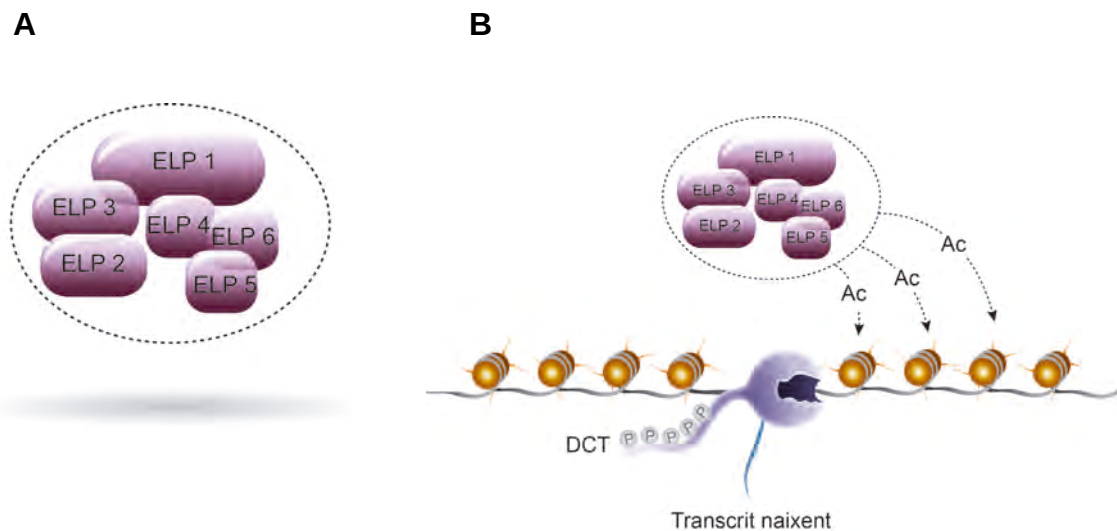


Figura 12. Estructura i funció de l'Elongator. **A.** Esquema de les sis subunitats que formen l'Elongator. **B.** L'Elongator acetila les histones durant l'elongació transcripcional. Adaptades de Creppe i Buschbeck 2011⁶³.

B) Factors de transcripció específics

Els FT específics reconeixen i s'uneixen a regions reguladores del DNA. Poden ser activadors o repressors depenent de si activen o reprimeixen l'activitat de l'RNA Pol II, respectivament. No obstant això, un mateix FT pot realitzar ambdues funcions en contextos diferents. Mentre que els FTG

contribueixen a la transcripció basal dels gens, els FT específics activadors són els responsables de l'expressió gènica diferencial⁵⁴.

Els FT **activadors** donen un senyal de regulació positiva al CPI, i d'aquesta manera estimulen la transcripció. S'uneixen al promotor així com també a regions anomenades *enhancers*, que poden estar situades a prop o lluny del gen que controlen. Estructuralment, els activadors tenen un domini d'unió al DNA i un domini d'activació necessari per a estimular la transcripció. Els llocs del DNA a on s'uneixen són regions molt curtes, de 6 a 12 parells de bases (pb), tot i que l'especificitat d'aquesta unió només depèn de 4-6 pb. Els activadors poden interaccionar i funcionar cooperativament entre ells per a produir una activació sinèrgica de la transcripció. Poden formar homodímers (unió de dos activadors iguals) o heterodímers (unió de dos activadors diferents), ja que al DNA es poden trobar de manera contigua llocs d'unió de dos activadors, o potser que només un dels dos interaccioni directament al DNA. També poden formar complexos proteics unint-se varis activadors a la vegada⁵².

Quan els activadors s'uneixen a regions *enhancers* llunyanes al promotor estimulen la transcripció mitjançant diversos mecanismes: (a) a través de la interacció directa amb un o més elements del CPI o amb el Mediator, gràcies a la formació d'un *loop* de DNA entre l'*enhancer* i el promotor; (b) a través del reclutament de proteïnes anomenades coactivadors, que no contenen dominis d'unió al DNA i actuen com a pont entre els activadors i la maquinària de transcripció present en el promotor⁶⁶.

Els FT **repressors** s'uneixen a regions anomenades silenciadors, que es poden trobar en zones proximals o distals del promotor del gen que regulen. S'han proposat diversos mecanismes dels repressors per a inhibir la transcripció. Per una banda, els repressors poden bloquejar la unió al DNA d'un activador proper o inclús poden competir amb l'activador pel mateix lloc

d'unió. Això es deu al fet que silenciadors i *enhancers* poden estar molt pròxims entre ells, o fins i tot poden ser la mateixa regió que conté llocs d'unió tant per l'activador com pel repressor. S'ha proposat també que els silenciadors poden formar un *loop* amb el promotor per acostar el repressor a la maquinària de transcripció. Un altre possible mecanisme de repressió és mitjançant el reclutament de cofactors, anomenats corepressors, per inhibir la transcripció. Els corepressors, que no es poden unir directament al DNA, poden bloquejar la transcripció mitjançant la unió a activadors, -i d'aquesta manera competeixen amb els coactivadors-, o mitjançant el reclutament de proteïnes que provoquen un canvi en l'estructura de la cromatina i fan que aquesta estigui transcripcionalment inactiva. Alguns estudis han demostrat que per activar la transcripció d'alguns gens, és suficient obrir el *loop* entre el repressor i maquinària de transcripció^{67,68}.

5.2. Regions del DNA reguladores de la transcripció

Les seqüències de DNA a on s'uneixen els FT s'anomenen regions reguladores o elements reguladors en *cis*, els quals inclouen:

A) Promotor. De cada promotor es poden diferenciar dues parts:

- Promotor mínim (*core promoter*): és una regió de llargada variable situada al començament del gen que marca la direcció de la transcripció. Inclou el TSS, a on s'inicia la transcripció. El promotor conté una sèrie d'elements a on s'uneixen els components del CPI⁶⁹. Un d'aquests elements és la **caixa TATA**, present en un 24% dels promotors humans. Tot i que la seqüència consens és 5'-TATAAA-3', només un 10% dels promotors amb caixa TATA tenen la seqüència exacta. El 76% dels promotors restants sense la caixa TATA són rics en CG i tenen un alt contingut de llocs d'unió del FT Sp1. El FT Sp1 és una proteïna de tipus dit de zinc que s'uneix en regions amb un elevat contingut de CG, i regula molts processos cel·lulars, com són la

diferenciació i el creixement cel·lular, l'apoptosi, la reparació del DNA i la remodelació de la cromatina. Un altre element important és l'**iniciador**, que es troba en un 46% dels promotors humans. S'ha observat que la majoria de promotors que tenen iniciador no contenen la caixa TATA i, per tant, en part podrien ser excloents. El promotor basal també pot incloure altres elements com el **DPE** (*downstream promoter element*), on s'uneixen TAF6 i TAF9, i el **BRE** (*B recognition element*), que és un lloc d'unió de TFIIB^{52, 70}.

No obstant això, en molts promotors no s'ha identificat cap d'aquests elements d'unió de les proteïnes que formen el CPI, suggerint que existeixen altres elements, encara per descobrir, que permeten el reclutament del CPI. Aquestes dades evidencien que hi ha una gran diversitat de promotors i que la unió del CPI no depèn d'un element en concret.

- Regió proximal del promotor: és una regió que es localitza immediatament o a poca distància de l'extrem 5' del promotor mínim. Conté una elevada densitat de llocs d'unió d'activadors i, per tant, inclou seqüències importants per al control de la transcripció. El 60% dels gens humans es caracteritzen perquè els seus elements proximals del promotor contenen illes CpG, que són unes regions relativament curtes (de 500 pb a 2 quilobases) amb un alt contingut dels nucleòtids CG. Molts dinucleòtids CG presents en el genoma es troben metilats, però concretament els situats a prop dels promotors no ho estan. Les illes CpG desmetilades són un bon indicador per a predir la presència d'un gen. Curiosament, s'ha observat una correlació entre la presència de les illes CpG en la regió proximal del promotor i elements del promotor mínim. Per exemple, els promotors sense caixa TATA no tenen illes CpG properes, mentre que els promotors amb elements BRE estan associats amb illes CpG^{52, 71}.

B) Enhancers: són regions del genoma normalment formades per diverses seqüències d'unió a FT. El fet que varis FT es puguin unir a un *enhancer* al mateix temps, permet que aquests activin cooperativament la transcripció d'un gen diana. Sovint els mateixos activadors que s'uneixen a les regions proximals del promotor també s'uneixen als *enhancers*. Un mateix gen pot ser activat per més d'un *enhancer*. En aquest sentit, el genoma humà conté uns 23.000 gens, mentre que es calcula que hi ha un milió d'*enhancers*⁶⁶. Els *enhancers* poden estar fins a milers de parells de bases del promotor, tant en regions 3' com a 5' del gen o fins i tot dins d'un gen. Tot i que puguin trobar-se a molts nucleòtids de distància del promotor, cal tenir present que el DNA es troba plegat en el nucli i, per tant, podrien estar propers en l'espai. També s'ha demostrat amb experiments de captura de conformació dels cromosomes (3C), tal com ja s'ha comentat anteriorment, que els *enhancers* interaccionen amb el promotor a través de la formació d'un *loop* de DNA. Els *enhancers* es poden trobar en orientació sentit o antisentit respecte al gen que regulen, i en ambdós casos poden activar la transcripció⁵². Recentment, s'ha definit el terme *super-enhancer*, com un grup d'*enhancers* que es troben molt propers en el genoma i presenten un alt grau d'ocupació de FT i del Mediator. La unió del Mediator als *super-enhancers* facilita la formació del *loop* de DNA que permet acostar els FT que es troben units en aquesta regió a l'RNA Pol II situada al promotor⁷². Els *super-enhancers* regulen gens que defineixen la identitat cel·lular i es diferencien dels *enhancers* típics per la mida, l'elevada densitat de FT que s'hi troben units i la major habilitat per activar la transcripció⁷³.

C) Silenciadors: són regions a les quals s'uneixen els FT repressors i, per tant, inhibeixen la transcripció. De manera similar als *enhancers*, funcionen independentment de l'orientació en què es trobin, i es poden localitzar tant en regions proximals o distals del promotor com a dins del gen que regulen. Poden reprimir la transcripció mitjançant dos mecanismes diferents: formant

un *loop* entre el silenciador i el promotor per a acostar el repressor al CPI, o bé poden interferir en la unió d'un FT a l'*enhancer*⁵².

D) *Insulators* o *boundaries*: estableixen els límits d'acció dels dominis topològics (TAD). Els TAD són les regions en què el genoma s'organitza a nivell tridimensional dins el nucli cel·lular, i són dominis estructuralment i funcionalment independents. Comprenen regions del genoma que interaccionen físicament entre si molt freqüentment, com per exemple en un TAD es troben *enhancers* i promotors que interaccionen. La unió de FT als *boundaries* pot bloquejar la modulació que confereixen els *enhancers* o els silenciadors als gens que regulen. En els vertebrats, l'única proteïna coneguda que s'uneix als *boundaries* és el factor CTCF (*CCCTC-binding factor*)⁷⁴.

5.3. Cromatina

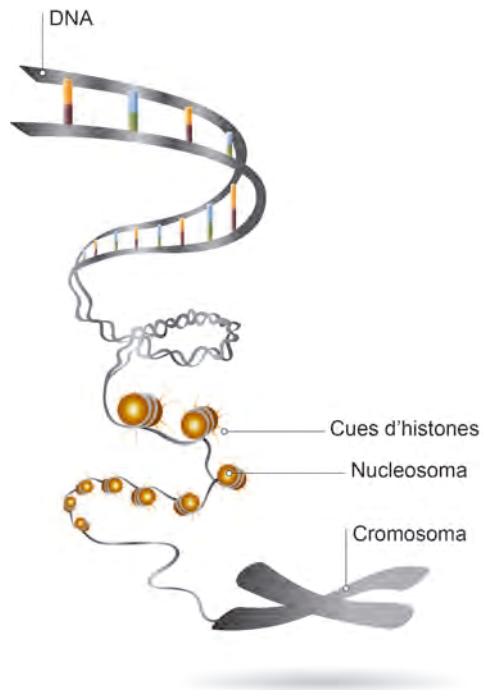
5.3.1. Estructura de la cromatina

En cèl·lules eucariotes, el DNA es troba compactat en el nucli en forma de cromatina, un complex format per la interacció del DNA i unes proteïnes associades anomenades histones (**Figura 13A**). La unitat fonamental de la cromatina és el nucleosoma, que consisteix en 146-147 pb de DNA enrotllats a un octàmer d'histones. Aquest octàmer normalment està format per dues unitats de cadascuna de les histones H2A, H2B, H3 i H4 (**Figura 13B**). La histona H1, situada entre l'octàmer i el DNA, ajuda a estabilitzar l'estructura del nucleosoma. Els nucleosomes estan separats per regions de DNA de longitud variable, anomenat DNA internucleosòmic. Les histones tenen un domini C-terminal d'estructura globular molt similar entre elles, que és important per a la formació del nucleosoma ja que està involucrat en la interacció histona-histona i histona-DNA⁷⁵. Les cues N-terminal de les histones estan menys estructurades i sobresurten dels nucleosomes. Les cues N-terminal estan subjectes a múltiples modificacions posttraduccional

reversibles (metilació, acetilació, fosforilació,...), que modulen l'estat de la cromatina (**Figura 13C**)⁷⁶.

Clàssicament, en funció del grau de compactació del DNA en els nucleosomes, s'han definit dos tipus de cromatina. L'eucromatina correspon a la cromatina menys compactada, i en tenir una estructura més laxa, permet que el DNA sigui més accessible als FT i a la maquinària de la transcripció. Per tant, és una zona activa transcripcionalment, on es localitzen la majoria dels gens actius. D'altra banda, l'heterocromatina correspon a un estat més condensat de la cromatina, que es localitza sobretot a la perifèria del nucli. Hi ha dos tipus d'heterocromatina: la constitutiva i la facultativa. L'heterocromatina constitutiva correspon a regions silenciades, és a dir, que no es transcriuen a causa de l'alt grau de compactació; són regions iguals a totes les cèl·lules, com per exemple els telòmers i els centròmers. L'heterocromatina facultativa correspon a regions que es troben condensades o no depenent del tipus cel·lular o de l'estat de la cèl·lula.

Les regions de DNA que estan lliures de nucleosomes, són més sensibles a ser tallades per DNases. Per aquesta raó, tals regions s'anomenen també llocs d'hipersensibilitat a DNases (DHSs). Les regions DHSs s'han utilitzat per a definir regions reguladores, ja que pel fet de ser regions poc compactades, s'hi uneixen els FT (**Figura 13D**)⁷⁷.

A**B**

Introducció

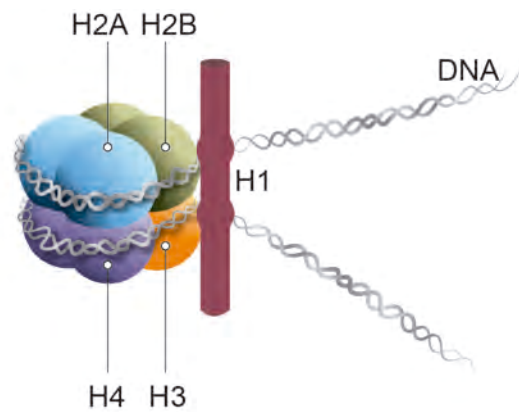
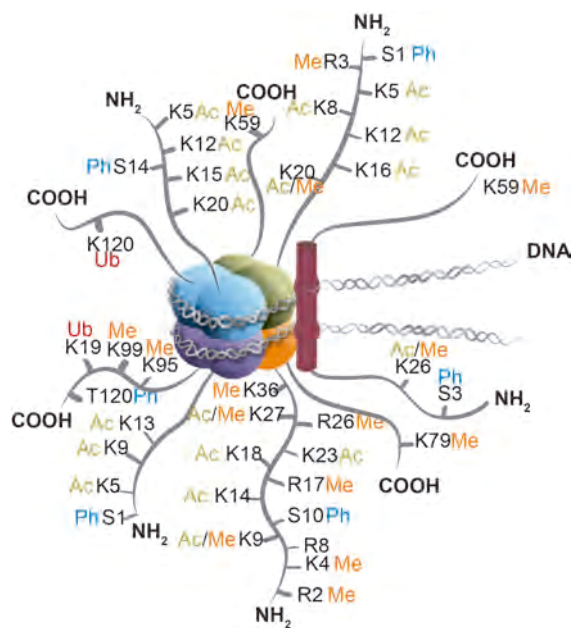
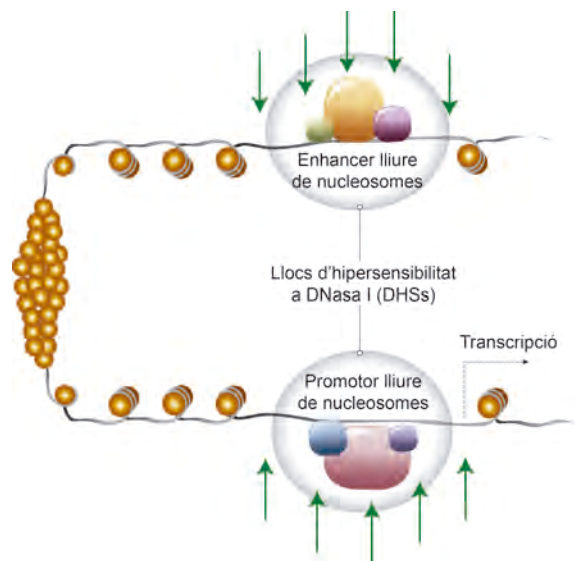
**C****D**

Figura 13. Organització i estructura de la cromatina en el nucli de cèl·lules eucariotes.

A. Representació esquemàtica dels diferents nivells de compactació del DNA en el nucli: des de la formació dels nucleosomes fins a la formació dels cromosomes, que és el nivell de màxima compactació. Adaptada de Maleszewska i Kaminska 2013⁷⁸. **B.** Estructura de l'octàmer d'histones que forma el nucleosoma i representació de la histona H1. Adaptada de

Georgopoulos 2002⁷⁹. **C.** Modificacions posttraduccional dels residus de les cues d'histones. Adaptada de Zhao 2013⁸⁰. **D.** Representació dels llocs d'hipersensibilitat a DNasa I (DHSs), on s'observa absència de nucleosomes i unió dels factors de transcripció. Les fletxes indiquen les regions que són susceptibles a ser tallades per la DNasa degut a l'absència de nucleosomes. Adaptada de Wang *et al* 2012⁸¹.

5.3.2. Dinàmica de la cromatina

La cromatina és una estructura dinàmica, perquè està subjecta a múltiples modificacions que modulen el seu estat de compactació, organització i funció. Aquestes modificacions de la cromatina inclouen: modificacions d'histones, remodelació de la cromatina i metilació del DNA. Es tracta de modificacions que afecten la cromatina sense alterar la seqüència de nucleòtids del DNA, i són determinants en la regulació de processos com són la transcripció i la replicació del DNA. En relació a la regulació de la transcripció, aquestes modificacions poden induir a que la cromatina estigui en un estat més favorable o desfavorable a la unió dels FT. Per tant, les modificacions de la cromatina dicten, en gran part, els patrons d'expressió gènica⁸².

A) Modificacions de les histones

Tal com s'ha explicat anteriorment, les cues N-terminal de les histones són llocs susceptibles a ser modificats covalentment. Entre les modificacions d'histones més conegudes que modulen la transcripció s'inclouen l'acetilació de lisines, la metilació de lisines i arginines, i la fosforilació de serines, treonines i tirosines, tot i que també cal anomenar-ne d'altres, com són la ubiquitinació de lisines, la sumoilació de lisines, l'ADP-ribosilació d'àcid glutàmic, la deiminació d'arginines i la isomerització de prolines. No totes les modificacions són presents a la mateixa histona al mateix temps, sinó que són incorporades o eliminades de forma molt dinàmica, en funció dels processos biològics que s'activen en la cèl·lula en cada moment. Les modificacions d'histones poden alterar les interaccions entre el DNA i les histones; així mateix, també poden modular les interaccions entre histones d'un mateix

nucleosoma (intranucleosomals) o de nucleosomes adjacents (internucleosomals)⁸³.

A continuació es descriuen les tres modificacions d'histones més estudiades en relació a la regulació transcripcional⁷⁶:

- Acetilació de lisines: consisteix en l'addició d'un grup acetil en el grup ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina. L'acetilació neutralitza la càrrega positiva de les lisines, cosa que provoca una disminució de la interacció entre la cua N-terminal de la histona i la càrrega negativa dels grups fosfats del DNA. Aquesta desestabilització del complex DNA-histona fa que la cromatina es trobi en un estat menys compactat i, així afavoreix l'accés dels FT al DNA. És per això que l'acetilació de lisines s'associa amb l'activació de la transcripció i predomina principalment en regions eucromàtiques.

Clàssicament, els enzims encarregats d'introduir grups acetil a les histones s'anomenaven acetiltransferases d'histona (HAT). Actualment però, amb la nova nomenclatura establerta l'any 2007, reben el nom de acetiltransferases de lisines (KAT), ja que sabem que també acetilen proteïnes no histones⁸⁴.

Les KAT es poden dividir en dues grans famílies: KAT tipus A i KAT tipus B. Les KAT tipus B són principalment citoplasmàtiques i, acetilen histones acabades de sintetitzar abans d'unir-se a la cromatina⁸⁵. Les KAT tipus A són una família d'enzims més nombrosa, els més importants dels quals són CBP (KAT3A) i p300 (KAT3B), dos coactivadors transcripcionals estructuralment molt semblants i funcionalment relacionats^{86, 87}. Aquests enzims, que acostumen a formar complexos multiproteics amb altres proteïnes, acetilen múltiples lisines a les cues N-terminals de les histones presents a la cromatina. Tot i que les KAT tipus A majoritàriament acetilen lisines de les cues N-

terminal, també poden acetilar lisines presents en el domini globular, com la lisina 56 de la histona 3 (H3K56).

L'acetilació és un procés reversible, ja que el grup acetil de les lisines pot ser eliminat pels enzims histones desacetilases (HDAC), de manera que es restaura la càrrega positiva del residu. Les HDAC d'eucariotes poden desacetilar histones, així com també altres proteïnes no histones⁸⁸. Al contrari de l'acetilació, la desacetilació estabilitza la unió DNA-histona i dóna lloc a un estat més compacte de la cromatina. És per això que les HDAC es consideren corepressors de la transcripció i participen en la formació de la heterocromatina. Les HDAC de mamífers es classifiquen en cinc famílies: classe I (HDAC1, 2, 3 i 8), classe IIa (HDAC4, 5, 7, 9), classe IIb (HDAC6, 10), classe III (sirtuïnes) i classe IV (HDAC11). Les de classe I, II i IV són inhibides per Tricostatin A (TSA). En canvi, les de classe III no són sensibles a TSA però sí a nicotinamida (NA). Les HDAC no tenen domini d'unió al DNA, sinó que actuen en els seus gens dianes mitjançant la seva incorporació en complexos multiproteics⁸⁹.

- Fosforilació: de manera similar a l'acetilació, la fosforilació d'histones és una modificació molt dinàmica. La fosforilació està controlada pels enzims quinases i fosfatases, que afegeixen o eliminen el grup fosfat, respectivament. Els residus fosforilats són principalment serina, treonina i tirosina. Les quinases transfereixen el grup fosfat de l'ATP al grup hidroxil dels aminoàcids diana. La càrrega negativa dels grups fosfats desestabilitza la interacció entre els residus d'histones fosforilats i la càrrega negativa del DNA. Conseqüentment, la cromatina passa a un estat més descondensat i més accessible als FT encarregats de promoure la transcripció. També s'ha observat que, tot i que la fosforilació és més freqüent en les cues N-terminals de les histones, també es pot donar en el domini globular de les histones, com per

exemple la fosforilació de la tirosina 41 de la histona 3 (H3Y41) mitjançant la quinasa JAK2⁹⁰.

- Metilació: té lloc als residus lisina i arginina de les histones. A diferència de l'acetilació i la fosforilació, la metilació no produeix canvis en la càrrega dels aminoàcids i es creu que és químicament més estable. Funcionalment, la metilació també és més complexa que altres modificacions d'histones, ja que tant pot promoure activació com repressió transcripcional, depenent del residu modificat i el nombre de grups metil afegits. Les lisines poden ser mono-, di- o trimetilades, mentre que les arginines poden ser mono- o dimetilades. Els enzims responsables de la metilació de les histones es classifiquen en dues famílies depenent de l'aminoàcid diana: lisina metiltransferasa (KMT) i arginina metiltransferasa (PRMT).

Les KMT transfereixen un grup metil procedent de S-adenosilmetionina (SAM) al grup amino de la lisina⁹¹. S'han identificat un gran nombre de KMT, la majoria de les quals comparteixen el domini SET, que té la funció enzimàtica metiltransferasa. Com a excepció, la KMT Dot1, que metila la lisina 79 de la histona 3 (H3K79) situada en el domini globular, no conté el domini SET.

Les PRMT transfereixen un grup metil procedent de SAM en el grup guanidino de l'arginina⁹². Les PRMT es classifiquen en dos grups: de tipus I (PRMT1, 2, 3, 4, 6 i 8) i tipus II (PRMT5, 7). Els dos tipus donen lloc a arginines mono- i dimetilades, però en el cas de les de tipus I la dimetilació és asimètrica, mentre que les de tipus II produeixen una dimetilació simètrica.

Tot i que durant molt de temps es pensava que la metilació era una modificació estàtica, a partir del 2002 diversos estudis van demostrar que existien uns mecanismes de desmetilació d'arginines i lisines, on hi

participen les histones desmetilases. El 2004 es va descobrir la primera desmetilasa, anomenada desmetilasa específica de lisina 1 (LSD1), que desmetila les H3K4 i H3K9 mono- i dimetilades i, en canvi és incapaç d'actuar sobre lisines trimetilades. El 2006 es va descobrir una altra classe de desmetilases que contenen el domini catalític Jumonji C (JmjC). Aquestes són específiques de residus trimetilats, per exemple, desmetilen H3K9me3 i H3K36me3⁹³. En humans es coneixen 27 tipus de desmetilases amb el domini JmjC, de les quals 15 han estat publicades com a desmetilases específiques de lisines i arginines de la H3⁹⁴.

Les modificacions d'histones són “llegides” per unes proteïnes efectores que contenen dominis proteics anomenats *readers*. Els *readers* es classifiquen en funció de la seva estructura, que els permet reconèixer modificacions d'histones específiques ^{95, 96} (**Taula 1 i Figura 14**). Moltes proteïnes que s'associen a la cromatina contenen diverses còpies d'un o varis dominis *readers*; d'aquesta manera, poden reconèixer i unir-se a més d'una modificació d'histona a la vegada, en un mecanisme multivalent. Moltes d'aquestes proteïnes tenen activitat enzimàtica, amb la qual afegeixen o eliminen modificacions d'histones, o bé provoquen canvis en la posició dels nucleosomes. Alguns exemples d'aquestes proteïnes són: subunitats dels complexos remodeladors de la cromatina (s'expliquen de manera més detallada en l'apartat B); l'acetiltransferasa p300, la qual té un bromodomini que s'uneix a residus acetilats com la H4K20ac i la H3K36ac; la proteïna HP1, que conté un cromodomini que li permet unir-se a H3K9me2/3; i la histona metiltransferasa L3MBTL1 que té tres dominis MBT a través dels quals s'uneix a H4K20me1/2 i H1bK26me1/2. Així doncs, les modificacions d'histones no només afecten l'estructura de la cromatina per si soles, sinó que també serveixen per reclutar i estabilitzar proteïnes efectores que modularan la regulació transcripcional.

Readers	Llocs de reconeixement dels readers
Bromodominis	Lisines acetilades
Cromodominis	Lisines metilades
PHD	Lisines metilades i l'H3 sense modificar
Tudor	Lisines i arginines metilades
MBT	Lisines metilades
WD40	Lisines metilades i l'H4 sense modificar
Anquirina	Lisines metilades
PWWP	Lisines metilades
14/3/03	Serines fosforilades
BRCT	Serines fosforilades

Taula 1. Dominis readers de modificacions d'histones. Classificació dels dominis proteics (*readers*) que reconeixen modificacions d'histones específiques.

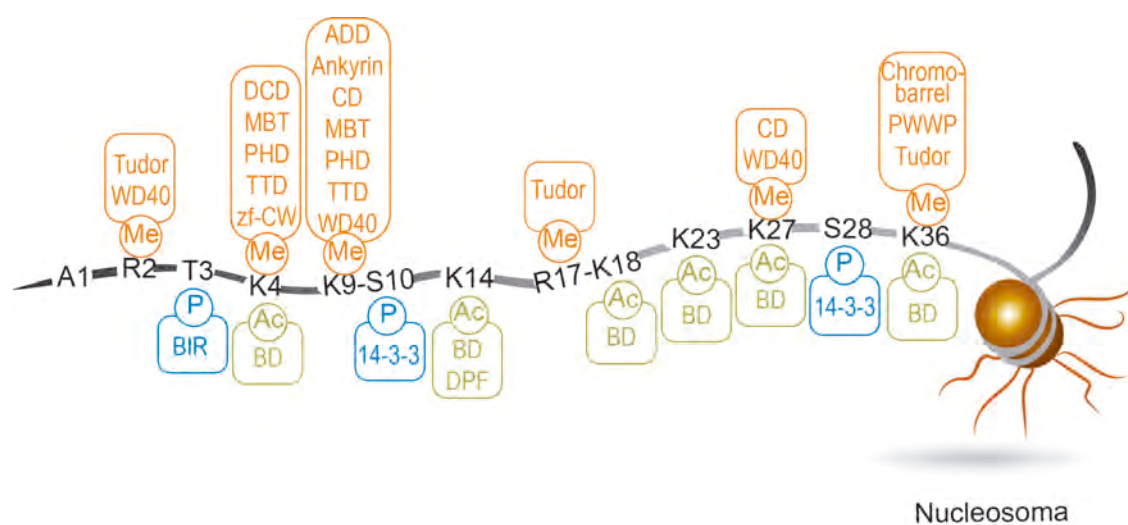


Figura 14. Unió dels readers en modificacions d'histones específiques. Representació de la cua N-terminal de la histona 3 amb els residus modificats per acetilació (Ac), metilació (Me) i fosforilació (P), i els dominis *readers* de reconeixement específics. Adaptada de Musselman 2012⁹⁶.

Els diferents patrons de les modificacions de les histones emmagatzemen una gran informació que és traduïda a diferents efectes en la transcripció. En aquest sentit, la hipòtesi del “codi d'histones”, proposa que combinacions específiques d'aquestes modificacions dicten l'activitat transcripcional d'un promotor determinat^{97, 98}. Davant la gran diversitat de modificacions d'histones s'assumeix que cada residu modificat té una funció biològica, però malauradament moltes d'aquestes funcions són encara desconegudes. Tanmateix, a partir d'estudis d'immunoprecipitació de cromatina i seqüenciació massiva (ChIP-seq) s'ha observat que els patrons de modificacions d'histones defineixen regions determinades al llarg del genoma; per exemple: la trimetilació de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me3) correlaciona amb el TSS; la trimetilació de la lisina 36 de la histona 3 (H3K36me3) es troba dins el cos dels gens⁹⁹; la monometilació de la lisina 4 de la histona 3 (H3K4me1) és una marca d'*enhancers* inactius o que estan en repòs^{99, 100}; i l'acetilació de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac) s'ha associat tant a promotors com a *enhancers* actius^{100, 101} (**Figura 15**).

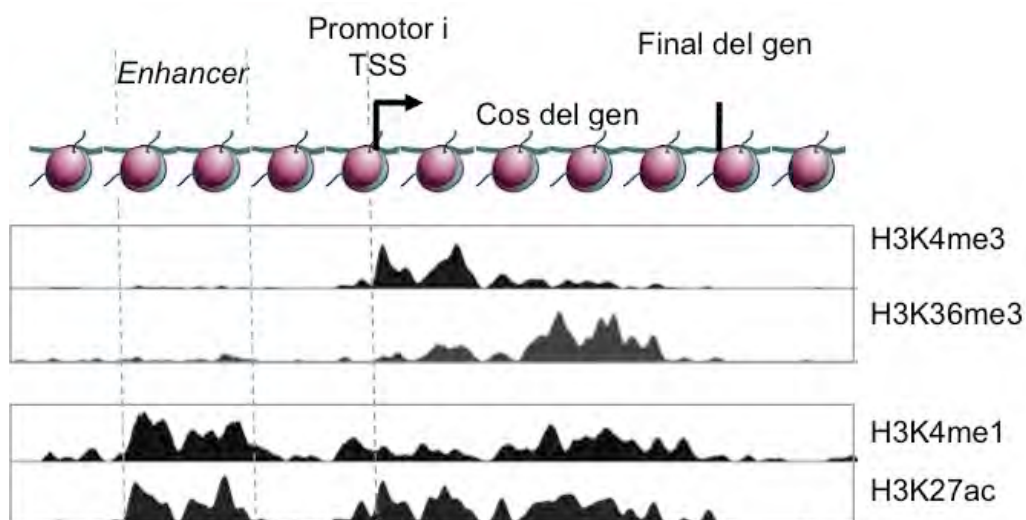


Figura 15. Modificacions d'histones associades a determinades regions del genoma. Enriquiment de modificacions d'histones en diferents regions del genoma (*enhancer*, promotor, TSS i cos del gen) mitjançant experiments de ChIP-seq. Imatge cedida pel Dr. Ivan Garcia Bassets, Universitat de Califòrnia San Diego.

B) Canvis en la posició dels nucleosomes pels complexos remodeladors de cromatina

Els complexos remodeladors de la cromatina estan formats per entre 10 i 15 subunitats. Determinades subunitats dels complexos remodeladors de la cromatina tenen, a la seva estructura, dominis *readers* de modificacions d'histones que els permeten unir-se a regions específiques de la cromatina. Una vegada reclutats a la cromatina, indueixen canvis en la posició dels nucleosomes. Aquests canvis poden ser de cinc tipus: desplaçament de nucleosomes, eliminació de nucleosomes, ensamblatge de nucleosomes, espaïament de nucleosomes i recanvi d'histones (**Figura 16**). La remodelació de nucleosomes incrementa l'accessibilitat al DNA dels FT, tant activadors com repressors, i faciliten d'aquesta manera processos d'activació o repressió transcripcional¹⁰².

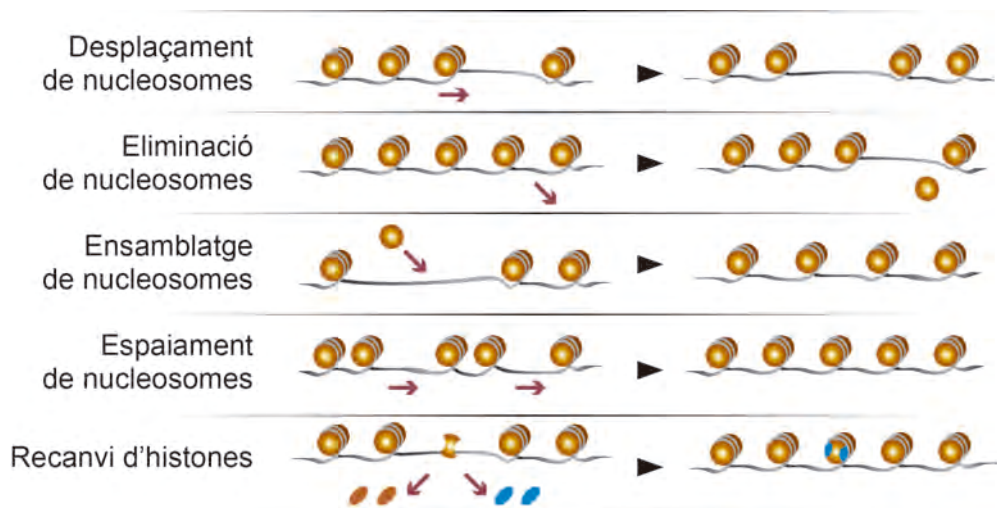


Figura 16. Remodelació de nucleosomes. Representació dels tipus de remodelació dels nucleosomes catalitzats pels complexos remodeladors de la cromatina. Adaptada de Petty i Pillus 2013¹⁰².

La subunitat catalítica dels complexos remodeladors de cromatina és una subunitat ATPasa, que utilitza l'energia de la hidròlisi de l'ATP per a alterar l'estructura de la cromatina. Els principals complexos remodeladors de cromatina en eucariotes són: SWI/SNF, ISWI, CHD i INO80. Els components de la família **SWI/SNF** s'uneixen a lisines acetilades d'histones a través d'un bromodomini i promouen desplaçament i eliminació de nucleosomes. Els remodeladors **ISWI** indueixen ensamblatge i espaïament de nucleosomes. Es caracteritzen per unir-se a les histones H4 no modificades (a través d'un domini SANT), i al DNA internucleosomal (a través d'un domini SLIDE). Els complexos **CHD** catalitzen desplaçament, eliminació, ensamblatge i espaïament de nucleosomes. S'uneixen a lisines metilades d'histones gràcies a dos cromodominis en tàndem presents en la seva estructura. La família **INO80** està especialitzada en el recanvi d'histones dels nucleosomes; reemplacen el dímer H2A-H2B per dímers que contenen la variant H2A.Z-H2B¹⁰².

C) Metilació del DNA

La metilació del DNA consisteix en l'addició covalent de grups metil a citosines del DNA. Els enzims responsables d'aquestes modificacions són DNA metiltransferases, les quals catalitzen la transferència d'un grup metil del SAM a les citosines. Tot i que la metilació del DNA és una modificació poc dinàmica, els grups metils també poden ser eliminats per enzims amb activitat desmetilasa. Un tipus d'enzim desmetilasa són les proteïnes Tet, que tenen activitat DNA hidroxilasa i actuen sobre citosines metilades en la posició 5 (5mC). Per tal de desmetilar el DNA, les proteïnes Tet catalitzen tres reaccions d'oxidació consecutives en les quals converteixen les 5mC a 5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina i, finalment, a 5-carboxilcitosina¹⁰³.

La metilació del DNA té lloc principalment en illes CpG. El 60% dels promotors humans contenen illes CpG, i quan estan desmetilats s'associen amb estats

transcripcionals actius, mentre que quan estan metilats s'associen amb repressió transcripcional. Això és degut al fet que la metilació interfereix en l'accessibilitat dels FT als seus llocs d'unió dels promotors. La metilació del DNA està estretament relacionada amb la formació de l'heterocromatina i és per això que es troba en regions com els centròmers i els telòmers dels cromosomes^{104, 105}.

La metilació del DNA és un lloc de reconeixement per a proteïnes que contenen un domini d'unió a DNA metilat (MBD). Les proteïnes amb un domini MBD recluten corepressors que indueixen canvis en les modificacions d'histones per afavorir una cromatina transcripcionalment inactiva¹⁰⁶. Per tant, existeix una estreta relació entre la metilació del DNA i les modificacions d'histones. Un exemple, és la proteïna MeCP2 que s'uneixen al DNA metilat, a través d'un domini MBD, i recluta HDAC, les quals desacetilen les histones¹⁰⁷. Un altre exemple són les histones metiltransferases que tenen també un domini MBD, i una vegada unides en les regions de DNA metilat donen lloc a la metilació de les histones¹⁰⁸. D'acord amb aquestes evidències, en un estudi amb cèl·lules mares embrionàries de ratolí mutades, les quals presenten una reducció de la metilació de les illes CpG, es va observar que tenen baixos nivells de la marca repressora transcripcional H3K9me2, en canvi alts nivells de la marca activadora H3K9ac¹⁰⁹.

En resum, el caràcter dinàmic de les modificacions d'histones, la remodelació de nucleosomes i la metilació del DNA permet respondre de manera ràpida a les necessitats de la cèl·lula, modificant l'accessibilitat als FT i induint canvis en el balanç entre activació-repressió transcripcional.

6. Regulació de l'expressió gènica en el cor per factors de transcripció

El primer òrgan que es forma en l'embrió és el cor, en un procés anomenat cardiogènesi. En una primera etapa té lloc la formació d'un tub cardíac, anomenat miocardi embrionari, que condueix l'impuls elèctric a una velocitat molt baixa. Aquest tub es va elongant i comencen a diferenciar-se regions específiques que acabaran formant les dues aurícules i els dos ventricles¹¹⁰. A partir de progenitors cardíacs es generen els diferents tipus de cèl·lules del cor (cardiomiòcits de les aurícules, dels ventricles, del sistema de conducció...). En etapes molt primerenques de la cardiogènesi ja s'observa un ràpid increment de l'expressió de FT cardíacs. Aquests FT regulen l'expressió dels gens responsables de la formació del cor i la morfogènesi de les estructures cardíques i, per tant, són claus per definir el destí de les cèl·lules cardíques^{111, 112}.

S'ha identificat un grup de FT cardíacs centrals que són claus en la regulació transcripcional cardíaca tant en l'embrió com en l'adult. Aquests FT cardíacs centrals inclouen: NKX2.5, GATA4, TBX5, MEF2A, HAND1/2 i SRF. Al llarg de l'evolució, la xarxa transcripcional cardíaca ha esdevingut cada vegada més complexa, amb un augment del nombre de gens que codifiquen per diferents tipus dels FT cardíacs centrals (**Taula 2**)¹¹³. L'increment de FT cardíacs ha donat lloc a nous patrons d'expressió gènica, fet que s'ha traduït en un cor cada vegada més complex evolutivament, que ha passat de ser un simple tub cardíac a ser una potent bomba contràctil formada per quatre càmeres. Tot i els canvis al llarg de l'evolució, la conservació dels FT cardíacs centrals en la xarxa de transcripció cardíaca recolza el seu paper clau per al correcte desenvolupament i funcionament del cor. En aquest sentit, el projecte

ENCODE de ratolí publicat recentment ha demostrat que els mecanismes de regulació de l'expressió gènica pels FT estan molt conservats entre ratolí i humà, tot i que no ho estiguin els elements reguladors en *cis*¹¹⁴

		Factors de transcripció cardíacs				
Grup filogenètic	Estructura cardíaca	NKX2	MEF2	GATA	TBX	HAND
Cnidaris	Cèl·lules musculars estriades associades amb la gastrodermis	1	1	?	1	0
Nemàtodes (<i>C. elegans</i>)	Faringe contràctil	1	1	2	1	0
Artròpodes (<i>Drosophila</i>)	Tub cardíac	1	1	2	3	1
Urocordats o tunicats (Ascidiacis)	Tub cardíac	1	1	2	≥3	1
Cefalocordat (amfiox)	Tub cardíac	1	1	2	?	1
Peixos	Una aurícula i un ventricle	≥3	4	3	≥4	1
Amfibis	Dues aurícules i un ventricle	≥3	4	3	≥5	1
Amniotes (rèptils, ocells i mamífers)	Dues aurícules i dos ventricles	≥2	4	3	≥7	2

Taula 2. Evolució del cor i dels FT cardíacs centrals. S'indiquen, per cada grup filogenètic, l'estructura cardíaca i el nombre de gens que s'expressen en el cor de cada tipus dels FT cardíacs centrals. Adaptada d'Olsen 2006¹¹³.

Els FT cardíacs centrals tenen la propietat de regular la seva pròpia expressió; d'aquesta manera retroalimenten i mantenen el programa de transcripció

cardíaca. Cal destacar també que els FT cardíacs centrals sovint tenen funcions redundants, i en cas d'absència d'un d'ells poden parcialment compensar la seva funció per a activar els gens dianes¹¹⁵. Una altra propietat d'aquests FT és el fet que sovint interaccionen entre ells formant complexos multiproteics, per a activar cooperativament l'expressió dels seus gens diana. Evidències per aquesta acció cooperativa provenen d'estudis on s'han identificat múltiples gens cardíacs amb llocs d'unió dels diversos FT cardíacs centrals¹¹⁵. En aquest sentit, estudis recents de ChIP-seq suggereixen que els *enhancers* cardíacs actius vénen sovint definits per aquelles regions del genoma coocupades simultàniament per diversos FT cardíacs centrals¹¹⁶. En els estudis esmentats, aquests *enhancers* coincideixen amb regions ocupades per p300, que també s'ha utilitzat sovint com a marcador d'*enhancers*. Concretament, un 89,7% de les regions enriquides per p300 estan també coocupades com a mínim per un FT cardíac central, principalment GATA4. Però es va observar que la majoria d'*enhancers* coocupats per múltiples FT cardíacs centrals no s'uneixen a p300; per tant, la identificació d'aquestes regions va permetre detectar *enhancers* que amb el ChIP de p300 no s'haurien identificat.

Alteracions en els FT cardíacs centrals s'han associat amb diverses malalties, perquè provoquen un funcionament anòmal de la xarxa de transcripció cardíaca, i donen lloc a canvis en els patrons d'expressió de gens del cor. En funció del moment en què tenen lloc aquestes alteracions, les patologies cardíques poden ser congènites o en l'adult. A continuació es mostren alguns exemples d'alteracions de cadascun dels FT centrals:

- Ratolins *knockout* homozigots per **NKX2.5** mostren una formació anormal del tub cardíac i alteracions en el desenvolupament del ventricle dret, i moren durant el desenvolupament. D'altra banda, variants genètiques a *NKX2.5* en humans i ratolins tenen defectes en la

conducció auriculoventricular, suggerint un paper clau d'aquest FT en el sistema de conducció¹¹⁷.

- Ratolins *knockout* homozigots per **GATA4** moren en estadis embrionaris a causa de defectes en la formació del tub cardíac¹¹⁸. En humans, variants genètiques al gen **GATA4** causen malalties cardíques congènites com ara defectes del septe, tetralogia de Fallot i estenosi pulmonar. Un exemple és la variant genètica G296S identificada en una família amb defectes de septació, degut a una alteració en la interacció entre GATA4 i TBX5¹¹⁹.

- Els ratolins *knockout* heterozigots de **TBX5** presenten defectes en el septe i bloqueig de la conducció entre aurícules i ventricles. També presenten problemes en la separació del cor en les quatre cambres¹²⁰. En humans, les variants genètiques al gen **TBX5** s'han associat amb la síndrome de Holt-Oram, que es caracteritza per malformacions congènites del cor. També s'han identificat variants en *enhancers* del gen **TBX5** que redueixen la seva expressió, les quals s'han associat a defectes del septe ventricular o altres malalties congènites cardíques.

- Els ratolins *knockout* de **MEF2A** moren a la primera setmana de naixement a causa de defectes en l'estructura del cor. Això es deu al fet que MEF2A regula l'expressió dels gens estructurals que participen en la formació del sarcòmer. D'altra banda, en pacients amb malaltia coronària i infart de miocardi s'ha identificat una deleció de set aminoàcids en el gen **MEF2A**, suggerint que MEF2A també podria estar implicat en la patogènesis d'aquestes malalties cardíques¹²¹.

- Els ratolins *knockout* de **HAND2** tenen anormalitats en la formació del ventricle dret, mentre que les cèl·lules mare embrionàries deficientes de **HAND1** presenten una formació ineficient del ventricle esquerre^{122, 123}. En humans, les variants genètiques a **HAND1** estan associades a

defectes de septació, mentre que les variants a HAND2 s'han identificat en pacients amb tetrologia de Fallot, ventricle dret de doble sortida i estenosi pulmonar¹²⁴.

- Els ratolins amb el gen **SRF** inactivat presenten una desorganització de les estructures del sarcòmer, cosa que dóna lloc a un fenotip d'insuficiència cardíaca¹²⁵. En humans, s'ha descrit una variant genètica no sinònima (K259R) en el gen de la miocardina (un coactivador del múscul cardíac) que altera el lloc d'unió d'SRF. Aquesta variant està associada amb malalties cardíques congènites¹²⁶.

7. Factors de transcripció GATA cardíacs

Els FT GATA són una família de proteïnes de tipus dit de zinc que s'uneixen a regions concretes del DNA per a regular l'expressió de gens específics. Tenen un paper important en la regulació transcripcional durant la diferenciació, el creixement i la supervivència de diferents tipus cel·lulars¹²⁷. El genoma de mamífers codifica per sis FT GATA (GATA1-GATA6). Es divideixen en dos subgrups en funció del seu patró d'expressió i la seva homologia en la seqüència: GATA1, GATA2 i GATA3 s'expressen predominantment en les cèl·lules mare hematopoètiques; en canvi GATA4, GATA5 i GATA6 s'expressen en teixits derivats de mesoderm i endoderm, com són cor, fetge, pulmó, gònades i intestí¹²⁸.

Tenint en compte que la present tesi està emmarcada dins d'un context cardíac, aquest apartat està dedicat principalment als factors GATA4, GATA5 i GATA6. D'ara endavant, aquests tres FT s'anomenen **factors GATA cardíacs**.

7.1. Estructura

Els factors GATA es caracteritzen per tenir un domini d'unió al DNA i d'interacció proteïna-proteïna format per dos motius dit de zinc (N-Zn i C-Zn, segons si correspon al motiu més proper a l'extrem N-terminal o C-terminal, respectivament). La seqüència dels dos motius és Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys, essent X qualsevol aminoàcid. A més, cadascun dels motius dits de zinc conté una regió bàsica adjacent rica en aminoàcids lisina (**Figura 17**)¹²⁹. La regió bàsica adjacent del C-Zn conté més lisines que la de l'N-Zn i comprèn també una seqüència de localització nuclear¹³⁰. En la regió N-terminal, els factors GATA contenen un o dos dominis d'activació transcripcional, que són necessaris per a la funció activadora de la transcripció dels seus gens

diana¹³¹. Basant-se en un estudi realitzat en una proteïna GATA truncada, es va observar que sense la regió N-terminal es dona igualment una lleugera activació transcripcional, fet que suggereix que la regió C-terminal podria també contenir algun domini amb una dèbil activitat transcripcional¹³².

El domini d'unió al DNA i d'interacció proteïna-proteïna està molt conservat entre els diferents factors GATA, els quals comparteixen un 75% de la seqüència d'aminoàcids (**Figura 18A**). Entre els factors GATA cardíacs (GATA4, GATA5 i GATA6) la similitud d'aquest domini és del 85%¹¹¹. Pel que fa a la resta de regions, l'homologia entre els factors GATA cardíacs és substancialment inferior, d'un 45% en el domini N-terminal i un 35% en el domini C-terminal. En general, cadascuna dels factors GATA cardíacs està altament conservat entre espècies, i el domini d'unió al DNA i d'interacció proteïna-proteïna és el més conservat (**Figura 18B**)^{133, 134}.

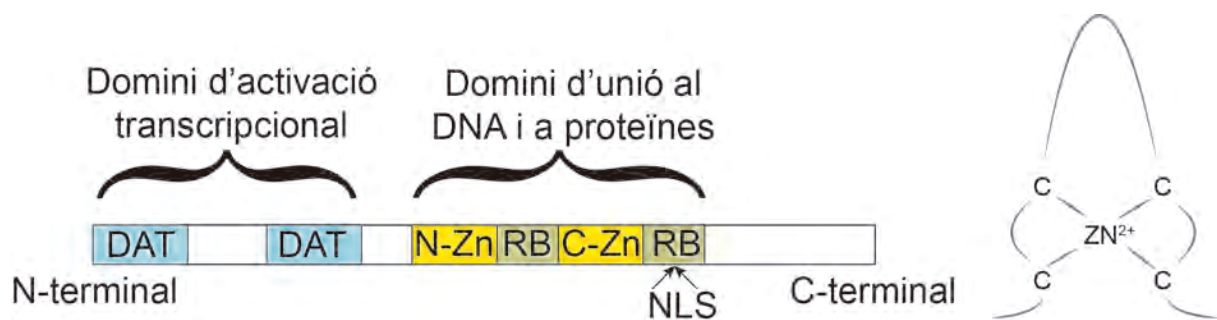


Figura 17. Estructura dels FT GATA. A l'esquerra, estructura general dels FT GATA. DAT: domini d'activació transcripcional; N-Zn: dit de zinc N-terminal; C-Zn: dit de zinc C-terminal; RB: regió bàsica; NLS: lloc de localització nuclear. A la dreta, estructura d'un motiu dit de zinc, on el zinc s'uneix a quatre residus de cisteïnes. Adaptades de Aronson *et al* 2014¹²⁹.

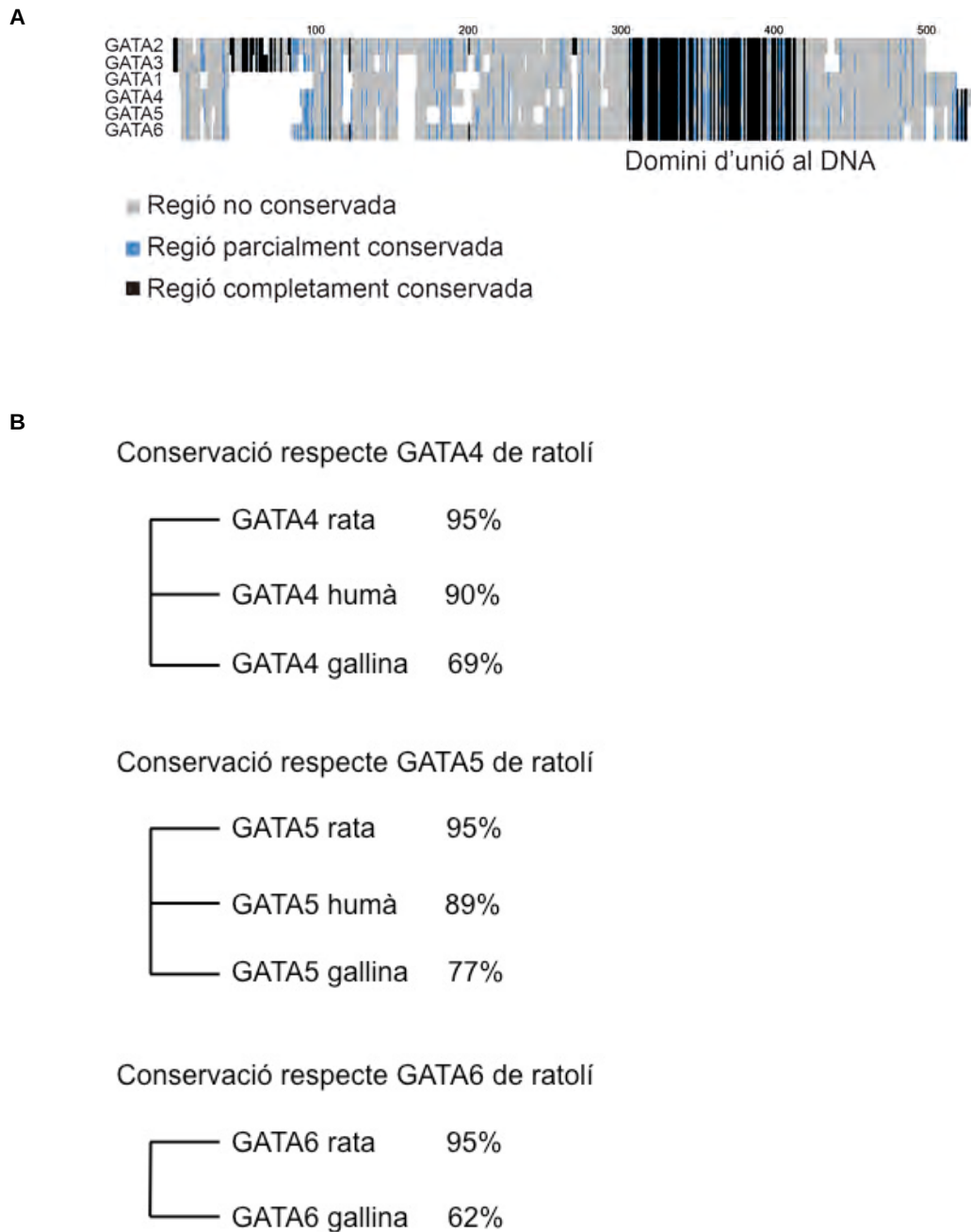


Figura 18. Conservació dels factors GATA. **A.** Conservació de l'estructura primària entre els factors GATA1-6. S'indica la regió del domini d'unió al DNA, la qual és la regió més conservada entre els factors GATA. Adaptada de Zhou *et al* 2012¹¹¹. **B.** Conservació dels factors GATA cardíacs entre diferents espècies. Es mostra el percentatge de conservació de la seqüència d'aminoàcids respecte a ratolí. Adaptada de Charron i Nemer 1999¹³⁴.

Els factors GATA s'uneixen al DNA amb elevada afinitat als llocs d'unió GATA (o motius GATA), els quals tenen la seqüència consens WGATAR (W=A/T, R=A/G)¹³⁵. El motiu C-Zn i la seva regió bàsica adjacent són necessaris i suficients perquè els factors GATA puguin unir-se al DNA. Variants genètiques en el motiu C-Zn impedeixen la unió del factor GATA al DNA, mentre que en absència del motiu N-Zn es dona igualment la unió¹³⁶. El motiu N-Zn estabilitza les interaccions DNA-proteïna i també participa en interaccions proteïna-proteïna. En alguns casos el motiu N-Zn es pot unir al DNA de manera independent, tot i que té preferència per seqüències lleugerament diferents (GATC, GATG i GATT), i normalment l'afinitat al DNA sol ser menor que amb el C-Zn^{111, 137}.

La cristal·lització del complex GATA3-DNA ha permès conèixer millor els mecanismes d'unió dels factors GATA al DNA. S'ha pogut observar que en zones del DNA amb dos motius GATA molt propers, com per exemple el motiu GATA palindròmic que es troba en alguns promotors ATC(A/T)GATAAG, ambdós motius N-Zn i C-Zn es poden unir al DNA, i donar lloc a un complex proteïna-DNA units d'alta afinitat. En el cas que les dues seqüències GATA es trobin més separades entre elles i sigui impossible que una mateixa proteïna GATA s'uneixi simultàniament als dos llocs d'unió, es formen homodímers entre dues molècules GATA. En aquests estudis també es va observar que cadascun dels motius dits de zinc d'una proteïna GATA es pot unir a motius GATA que es troben en molècules de DNA diferents, i així formar un *loop* entre dos fragments de DNA separat^{134, 135, 137}. Aquest últim mecanisme estaria d'acord amb la presència de motius GATA en regions allunyades dels gens que regulen.

7.2. Expressió

Els factors GATA cardíacs s'expressen molt aviat en l'embriogènesi. En els progenitors cardíacs ja s'observa expressió dels tres factors GATA cardíacs, i

és GATA4 el més abundant i el que s'expressa de manera més primerenca¹³⁴. En general, però, tots tres comparteixen perfils d'expressió bastant similars durant tot el desenvolupament cardíac. En l'embrió, GATA4 i GATA6 es troben tant a l'endocardi com al miocardi, i la seva expressió continua essent abundant en les cèl·lules cardíques adultes. GATA5 es troba tant a miocardi com a endocardi, depenent de l'etapa embrionària, tot i que la seva expressió és més abundant a les cèl·lules de l'endocardi¹³⁸. Existeix però certa controvèrsia respecte a l'expressió de GATA5 durant l'etapa postnatal¹³⁹. Alguns autors han reportat que els nivells de GATA5 són ja indetectables després del naixement, mentre que altres han descrit expressió de GATA5 en el cor adult^{127, 140}. Entre els estudis que apunten expressió de GATA5 en l'adult tampoc està clar si la seva localització està restringida a endocardi o es troba també a miocardi.

Una gran nombre de gens cardíacs que s'expressen durant el desenvolupament cardíac o en l'adult contenen elements reguladors amb motius GATA. Això evidencia la importància dels factors GATA cardíacs en la regulació de l'expressió gènica en el cor. La similitud en patrons d'expressió ha dificultat molt la caracterització de les funcions individuals de cadascun dels factors GATA cardíacs. A més, el fet que entre ells puguin tenir funcions redundants encara ha complicat més aquesta caracterització. No obstant això, alguns estudis han suggerit que existeixen certes diferències en el seu patró d'expressió espacial i temporal, i que per tant cadascun d'aquests factors és necessari en diferents etapes de la cardiogènesi^{141, 142}.

7.3. Funció

7.3.1. Funció dels factors GATA cardíacs en el desenvolupament cardíac

La majoria d'evidències publicades sobre la funció dels factors GATA cardíacs, es basen en estudis a nivell del desenvolupament cardíac en l'embrió, en canvi, les seves funcions en etapes postnatales són menys

estudiades. Tot i això diversos estudis s'han centrat en examinar la implicació dels factors GATA cardíacs, en especial GATA4, en la hipertròfia cardíaca en l'adult.

Durant la cardiogènesi, **GATA4** té una gran importància en el procés de diferenciació dels cardiomiòcits. Aquesta funció de GATA4 es va descriure utilitzant la línia cel·lular embrionària P19 (cèl·lules derivades d'un teratocarcinoma d'embrions de rata). En concret, es va observar que la diferenciació de les cèl·lules P19 a cardiomiòcits estava inhibida en condicions de silenciament de GATA4, a més de produir-se un augment d'apoptosis. En canvi, la sobreexpressió de GATA4 donava lloc a una inducció de la diferenciació a cèl·lules cardíques¹⁴³. De forma similar, la sobreexpressió de GATA4 en embrions de *Xenopus* causava un augment dels marcadors de diferenciació cardíaca i, inclús, una inducció ectòpica de cardiomiòcits^{144, 145}. Curiosament, tot i que els embrions de ratolí *knockdown* homozigots de **GATA4** (**GATA4**^{-/-}) moren entre la setmana E8.5 i E10.5, la majoria d'animals tenen una diferenciació del miocardi aparentment normal, una dada que sembla contradictòria amb el fet que GATA4 sigui clau per a la diferenciació de les cèl·lules cardíques^{139, 146}. En aquests ratolins *knockdown*, l'absència de GATA4 era compensada per un increment dels nivells endògens de la proteïna GATA6, i això dóna suport a la idea que GATA4 i GATA6 tindrien funcions redundants en la diferenciació cel·lular.

GATA5 és una proteïna fonamental en la regulació de l'expressió gènica durant la cardiogènesi. Actua sobretot en la formació de l'endocardi, on és necessària per a la diferenciació dels progenitors cardíacs a cèl·lules endotelials. D'acord amb aquesta funció, la inhibició de GATA5 en cèl·lules progenitores cardíques, utilitzant un cDNA antisentit de GATA5, resulta en una reducció dels marcadors de diferenciació endocardials¹⁴⁷. La diferenciació de l'endocardi dóna lloc a la formació de les vàlvules del cor; és per això que els defectes en la proteïna GATA5 estan associats amb malalties cardíques

congenites caracteritzades per unes malformacions de les vàlvules durant el desenvolupament. Tot i el paper clau de *GATA5* en el desenvolupament del cor, en un estudi es va observar que ratolins *knockout* per *GATA5* (*GATA5*^{-/-}) eren viables i no mostraven problemes en el desenvolupament cardíac¹⁴⁸. Posteriorment, es va poder demostrar que aquests ratolins presentaven un augment dels nivells d'mRNA de *GATA4* i, en menor proporció, de *GATA6*, evidenciant l'efecte redundat entre els factors GATA cardíacs¹³⁹. En aquest mateix estudi es va observar que els ratolins deficientes de *GATA5* i heterozigots per *GATA4* (*GATA5*^{-/-} *GATA4*^{+/-}) morien a causa d'un desenvolupament incomplet del teixit cardíac. Tenint en compte que els ratolins *GATA4*^{+/-} són viables, aquests resultats mostren la importància de *GATA5* en el desenvolupament cardíac. D'acord amb aquests estudis descrits, variants genètiques de *GATA5* en *zebrafish* mostraven una disminució de marcadors cardíacs, mentre que la sobreexpressió de *GATA5* induïa expressió ectòpica de gens del cor en teixits no cardíacs.

Els ratolins *knockout* per ***GATA6*** moren abans de la formació del cor a causa de defectes en la funció de l'endoderm visceral i en el desenvolupament extraembrionari, fet que ha dificultat el seu estudi durant el desenvolupament cardíac¹⁴⁹. Tot i això, hi ha estudis que demostren la importància de *GATA6* en la cardiogènesi. Un exemple són els experiments de *knockdown* de *GATA6*, mitjançant oligonucleòtids antisentit, en embrions de *Xenopus* i *zebrafish*, en què s'observa una inhibició de la cardiogènesi. Aquest defecte és degut al fet que una deficiència de *GATA6* impedeix l'expressió de gens com ara *BMP-4* i *NKX2.5*, els quals són necessaris per a la maduració de les capes embrionàries endoderm i mesoderm -que són les que formaran el teixit cardíac durant la gàstrula¹⁵⁰. Un altre estudi en embrions de *Xenopus* van mostrar una disminució de l'expressió de *GATA6* (però no de *GATA4* i *GATA5*) quan els progenitors cardíacs comencen a diferenciar-se i a donar lloc als cardiomiòcits madurs. En aquesta mateixa línia, un augment de

l'expressió de GATA6 retarda l'inici de la diferenciació dels precursors cardíacs¹⁵¹. Aquests resultats suggereixen que GATA6 seria necessari per a mantenir els precursors cardíacs en un estat progenitor i proliferatiu, mentre que per a la seva diferenciació hi participarien GATA4 i GATA5. D'altra banda, els embrions derivats de cèl·lules mares deficientes de GATA6 presenten nivells baixos de GATA4, la qual cosa suggereix que GATA6 podria estar regulant l'expressió de GATA4 durant la diferenciació embrionària¹⁵².

7.3.2. Funció dels factors GATA cardíacs en el desenvolupament de la hipertròfia cardíaca

La hipertròfia cardíaca es defineix macroscòpicament com un increment del gruix de la paret i/o del septe interventricular. A nivell cel·lular es caracteritza per un augment de la mida dels cardiomiòcits (però no en nombre), un augment de la síntesi proteica i un canvi en l'organització dels sarcòmers. La hipertròfia cardíaca té lloc a causa d'un estrès cardíac, és a dir, un augment de la demanda de treball del cor. Aquest estrès pot ser causat per una patologia com per exemple la hipertensió, la malaltia valvular, l'infart de miocardi o la cardiomiopatia, o bé per altres factors com l'entrenament físic intens o l'edat avançada. En aquestes circumstàncies s'activen uns estímuls hipertròfics (mecànics i/o neurohormonals) que indueixen a un increment de la massa ventricular que permeti optimitzar la funció de la bomba cardíaca i, per tant, tolerar millor l'estrès cardíac. Encara que en etapes inicials es considera un mecanisme compensatori, la hipertròfia cardíaca prolongada és un factor de risc important de la insuficiència cardíaca¹⁵³.

Els estímuls hipertròfics mecànics estan produïts per un estirament físic dels cardiomiòcits, el qual és suficient per induir un fenotip d'hipertròfia, inclús en absència d'estimulació neurohormonal. Els estímuls neurohormonals poden ser factors de creixement (factor de creixement transformant tipus β , TGF β ; factor de creixement fibroblàstic, FGF; factor de creixement anàleg a la

insulina, IGF; entre d'altres), els quals activen els receptors de membrana tipus tirosina quinasa. Un altre grup d'estímuls neurohormonals són els que provoquen una activació de receptors acoblats a proteïnes G (receptors α_1 -adrenèrgics, receptors AT-1 d'angiotensina i el receptor ET per endotelina-1). Els estímuls hipertròfics donen lloc a una activació simultània de diverses vies de senyalització intracel·lulars (activació de la *mitogen-activated protein kinase* o MAPK, la fosfolipasa C, el fosfoinositol 3-quinasa i l'adenilat ciclase), que convergeixen en una gran activació de FT cardíacs en el nucli. Entre aquests FT, GATA4 és un dels més importants, tot i que també s'ha observat que hi participen GATA5, GATA6, NKX2.5, MEF2, HAND, entre d'altres. Aquests FT indueixen una reactivació de l'expressió de gens implicats en el desenvolupament embrionari. Per tant, la hipertròfia cardíaca es considera un desordre de la transcripció cardíaca caracteritzat per una re-activació del programa fetal cardíac en etapes adultes (**Figura 19**)¹⁵³.

Els canvis d'expressió gènica que tenen lloc en la hipertròfia, a part de produir un augment de mida dels cardiomiòcits, també eviten que aquestes cèl·lules entrin en un procés d'apoptosi^{54, 154}. Diversos estudis donen suport a aquesta observació i a la importància de GATA4 en el procés d'hipertròfia. Per exemple, s'ha observat que quan s'estimula l'apoptosi de cardiomiòcits, amb un fàrmac cardiotòxic, disminueix l'expressió de GATA4. En un altre estudi es va demostrar que cardiomiòcits de ratolí *knockout* per *GATA4* no poden hipertrofiar-se en condicions d'estrès cardíac i conseqüentment tenen un augment d'apoptosis¹⁵⁵. De forma contrària, la sobreexpressió de GATA4 en cardiomiòcits indueix hipertròfia cardíaca¹⁵⁶.

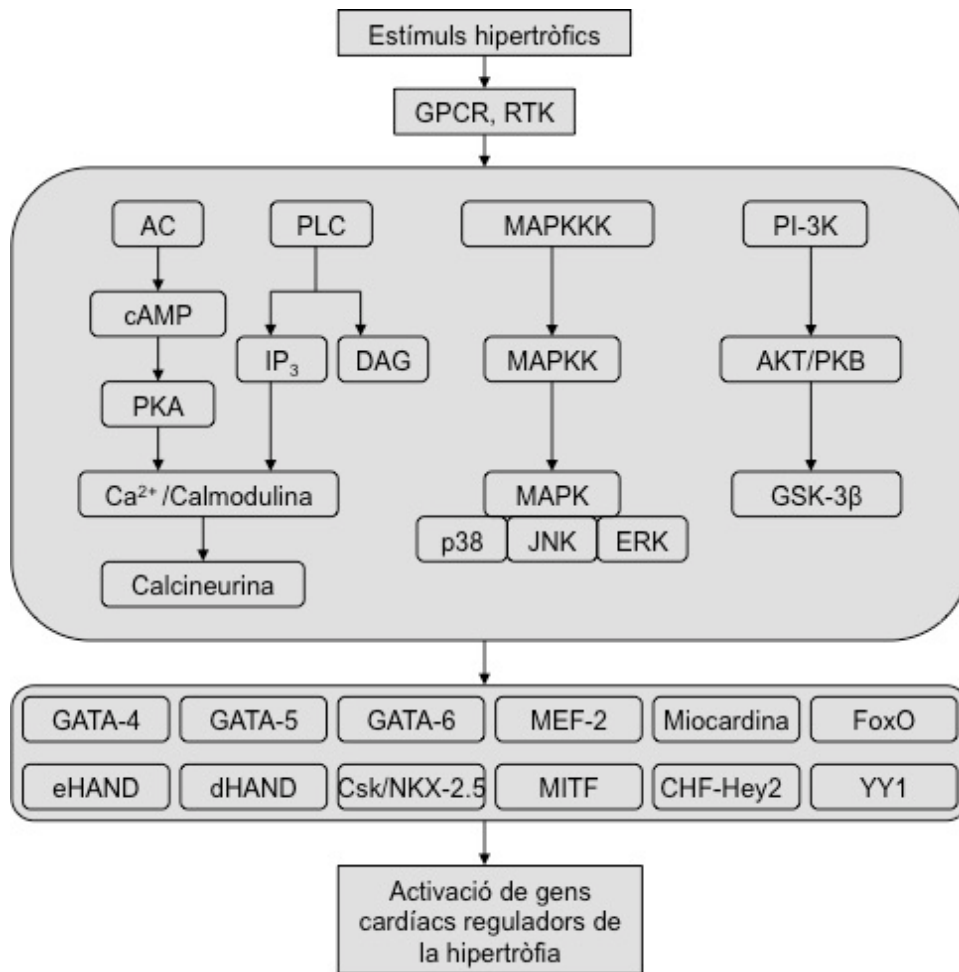


Figura 19. Vies de senyalització activades en el procés de la hipertròfia cardíaca. Els estímuls hipertròfics estimulen una cascada de vies de senyalització intracel·lulars mitjançant l'activació dels receptors de membrana tipus tirosina quinasa (RTK) i receptors acoblats a proteïnes G (GPCR). Finalment, s'activen múltiples FT que donen lloc a una expressió de gens implicats en el desenvolupament de la hipertròfia. Adaptada de Kohli 2011⁵⁴.

7.4. Interaccions dels factors GATA cardíacs

Els factors GATA cardíacs s'associen sovint amb altres proteïnes per tal de regular de manera sinèrgica la transcripció de gens cardíacs. Els dos motius dits de zinc participen en aquests tipus d'interaccions entre proteïnes¹³⁷. Així, variants genètiques en aquests dominis podrien afectar les interaccions dels

factors GATA cardíacs, donant lloc a alteracions en l'expressió de gens específics i a malalties cardíques.

- Interaccions entre factors GATA cardíacs:

La formació d'homodímers i heterodímers entre factors GATA cardíacs és un mecanisme conegut. GATA4 i GATA6 interactuen per a activar importants promotors de gens cardíacs durant les etapes postnatales, com són: la troponina C cardíaca, el pèptid natriurètic auricular (*ANP*), el pèptid natriurètic tipus B (*BNP*) i la cadena pesada de la α i la β -miosina (α -MHC i β -MHC)¹⁵⁷. De manera similar s'ha observat també que GATA4 i GATA5 cooperen en la formació del septe auriculoventricular durant la cardiogènesi¹³⁸.

- Interacció amb NKX2.5:

La interacció d'NKX2.5 amb el motiu C-Zn de GATA4 dóna lloc a una activació sinèrgica de determinats promotors durant la cardiogènesi, com és el cas del promotor d'*ANP*¹⁴². Aquesta interacció, descrita originalment en experiments de sobreexpressió, ha estat demostrada per experiments de ChIP-seq en cèl·lules cardíques HL-1 (cardiomiòcits d'aurícula de ratolí), on s'observa unió d'NKX2.5 en les regions ocupades per GATA4¹¹⁶. GATA5, però no GATA6, pot substituir GATA4 en aquesta interacció, suggerint que existeix certa especificitat de NKX2.5 pels factors GATA durant el desenvolupament¹¹¹. Sembla que el sinergisme produït per la interacció GATA-NKX2.5 és un mecanisme conservat evolutivament.

- Interacció amb SRF i MEF2:

Els FT MEF2 i SRF contenen un domini d'unió al DNA anomenat MADS el qual pot interaccionar també amb el motiu C-Zn de GATA4. En experiments *in vitro* s'ha demostrat que GATA4 i SRF així com també GATA4 i MEF2 activen de manera sinèrgica la transcripció de gens cardíacs^{158, 159}. L'activació de GATA4 i SRF és més eficient quan s'associen amb NKX2.5. GATA6, però no

GATA5, pot substituir GATA4 en la interacció amb MEF2. Aquest efecte sinèrgic sobre la transcripció de gens cardíacs no s'ha demostrat *in vivo*.

- Interacció amb TBX5

TBX5 forma part de la família de proteïnes anomenada T-Box. Els membres de la família TBX (TBX1, TBX2, TBX3, TBX5, TBX18 i TBX20) es caracteritzen per tenir una regió conservada de 180 aminoàcids anomenada T-box. Els ratolins doble heterozigots per *GATA4*^{+/-} i *TBX5*^{+/-} presenten defectes cardíacs més severos que els ratolins heterozigots simples, suggerint una interacció genètica entre GATA4 i TBX5¹⁶⁰. La interacció entre aquests dos FT és important en les cèl·lules endocardials per a produir la septació auricular¹⁶¹. GATA4 i TBX5 també interaccionen en un *enhancer* de la connexina 30.2 per a donar lloc a una correcta expressió del sistema de conducció cardíac¹⁶².

La formació de complexos multiproteics entre GATA4, NKX2.5 i TBX5 és un mecanisme bastant comú en la regulació de diversos gens cardíacs durant el desenvolupament cardíac. TBX20 interacciona també amb GATA4 o GATA5 i NKX2.5. TBX20 té més preferència per GATA5 que per GATA4, la qual cosa demostra que hi ha diferències funcionals entre membres de la família GATA. En l'endocardi, on l'expressió de GATA5 és abundant, el complex format per TBX20, NKX2.5 i GATA5 és important per a regular el desenvolupament endocardial¹⁴⁷.

- Interacció amb FOG-2

La proteïna FOG-2 (*Friend of GATA-2*) s'expressa majoritàriament en teixits derivats de mesoderm i endoderm, igual que els factors GATA cardíacs. FOG-2 no té domini d'unió al DNA, sinó que normalment s'associa amb altres FT, principalment amb els factors GATA¹⁶³. De fet, experiments de ChIP-seq en cèl·lules HL-1 han demostrat que la majoria de llocs d'unió de FOG-2

coincideixen amb els llocs d'unió de GATA4¹¹¹. La interacció GATA4-FOG-2 pot donar lloc a una activació o repressió dels promotors regulats per GATA4, depenent del gen i del tipus cel·lular. La repressió és deguda al fet que FOG-2 pot competir amb GATA4 per la interacció amb el coactivador p300.

7.5. Regulació dels factors GATA per modificacions posttraduccionals

Els factors GATA cardíacs també interaccionen amb coactivadors i corepressors, que sovint són enzims que modulen la funció dels factors GATA introduint modificacions posttraduccionals. Les modificacions posttraduccionals més estudiades són les de GATA4, que s'exposen a continuació (**Figura 20**):

- Acetilació/desacetilació de GATA4:

L'activitat transcripcional de GATA4 està regulada per un balanç d'acetilació i desacetilació. La forma acetilada de GATA4 presenta una major afinitat d'unió al DNA i un augment de l'activitat transcripcional. L'acetiltransferasa p300 és l'encarregada d'acetilar GATA4, i actua com a coactivador de GATA4. En l'únic estudi en què s'han examinat les dianes d'acetilació de GATA4 es van descriure quatre lisines (K311, K318, K320 i K322), situades a la regió bàsica del motiu C-Zn de GATA4, com els residus acetilats per p300¹⁶⁴.

La sobreexpressió de p300 en ratolins indueix l'acetilació de GATA4. Conseqüentment, s'observa un augment de l'activitat transcripcional de GATA4 que dóna lloc a hipertròfia cardíaca en els ratolins⁸⁸. En canvi, els ratolins deficientes en p300 tenen defectes en el desenvolupament cardíac, similars als observats en condicions de dèficit de GATA4.

p300 pot interaccionar amb qualsevol dels dos motius de Zn de la proteïna GATA4. La regió de p300 que participa en aquesta interacció és una zona rica

en aminoàcids cisteïna i histidina, concretament de l'aminoàcid 1.587 al 1.817¹⁶⁵. La quinasa Cdk9 també interacciona amb el complex p300-GATA4, provocant la fosforilació de p300, necessària per tal que aquest pugui acetilar GATA4¹⁶⁶. S'ha observat que GATA5 també pot interaccionar amb p300⁸⁷.

GATA4 i p300 interaccionen i coregulen múltiples gens cardíacs en ratolins. De fet, un 80% de les regions del DNA enriquides en p300 estan també ocupades per GATA4¹¹⁶. Estudis recents de ChIP-seq han proposat un mecanisme pel qual GATA4 i p300 activen la transcripció. Aquest mecanisme es basa en el fet que GATA4 recluta p300 a les regions reguladores dels seus gens diana, i p300 promou l'acetilació de la histona H3K27, afavorint així l'activació transcripcional d'aquests gens¹⁶⁷.

A part d'acetilar GATA4, p300 també participa en la regulació de l'expressió de GATA4. Així s'ha observat que durant la diferenciació de cèl·lules mares embrionàries a cardiomiòcits, p300 s'uneix al promotor de GATA4 i n'estimula la seva expressió¹⁶⁸. També s'ha observat que durant la diferenciació dels cardiomiòcits augmenten els nivells de p300 i conseqüentment també els de GATA4 acetilat¹⁶⁹.

Els nivells d'acetilació de GATA estan regulats per un equilibri entre l'activitat de p300 i l'activitat desacetilasa d'HDAC2. Experiments realitzats en cors de ratolí han demostrat la interacció entre HDAC2 i GATA4, una interacció que està estabilitzada per la proteïna HOPX, la qual s'expressa únicament en cardiomiòcits. Una inhibició d'HOPX i HDAC2 causa importants malformacions cardíques i una excessiva proliferació dels cardiomiòcits, a causa d'una hiperacetilació de GATA4⁸⁸.

- Fosforilació de GATA4:

GATA4 és fosforilada a les serines 105 i 261 (S105 i S261) per Erk1/2 i PKA, respectivament. La fosforilació de GATA4 augmenta la seva afinitat d'unió al

DNA i la seva activitat transcripcional¹⁷⁰. La fosforilació de la S105 és necessària per al desenvolupament de la hipertròfia cardíaca. Els ratolins amb la S105 de GATA4 mutada no desenvolupen hipertròfia cardíaca en resposta a un estrès cardíac provocat per una constricció de l'aorta transversa; com a conseqüència, són més susceptibles a patir una insuficiència cardíaca¹⁷¹. La fenilefrina, que és un inductor de la hipertròfia cardíaca, indueix la fosforilació de la S105. La funció de la S261 fosforilada és encara desconeguda a nivell cardíac, tot i que s'ha descrit que en cèl·lules gonadals indueix un augment de la interacció entre GATA4 i p300. Fins al moment, no s'han identificat les fosfatases encarregades de la desfosforilació de GATA4.

- Metilació de lisines i arginines de GATA4:

El complex histona metiltransferasa PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*) metila la lisina K299 de GATA4¹⁷². D'altra banda, la metiltransferasa PRMT5 interacciona amb GATA4 i metila les arginines R229, R265 i R317¹⁷³. La metilació de GATA4 en els residus K299 o R317 bloqueja l'acetilació per part de p300 i per tant redueix la seva activitat transcripcional. D'acord amb aquesta funció inhibidora de GATA4, la sobreexpressió de PRMT5 en condicions d'inducció d'hipertròfia cardíaca (tractament amb fenilefrina) inhibeix l'acetilació de GATA4 i la hipertròfia. De forma contrària, en condicions de *knockdown* de PRMT5 l'activitat transcripcional de GATA4 augmenta i s'indueix la hipertròfia cardíaca.

- Sumoilació:

GATA4 es pot sumoilar a la lisina K366 unint-se de manera covalent a la proteïna SUMO-1. Aquest procés té lloc en diverses etapes en què intervenen diferents enzims. En un primer pas, una proteasa talla els 4 últims aminoàcids de la proteïna SUMO-1, per tal de generar un extrem C-terminal acabat amb dos residus de glicina. A continuació té lloc la fase d'activació de SUMO-1 catalitzada per l'enzim E1, que és un heterodímer format per SAE1/SAE2. Per

a l'activació, es forma un enllaç tioèster entre la cisteïna de SAE2 i la glicina de l'extrem C-terminal de SUMO-1. Seguidament, té lloc la fase de conjugació, en què la proteïna SUMO-1 és transferida de l'enzim E1 a l'E2, anomenat Ubc9, formant també un enllaç tioèster. La lligació és l'última fase, en què intervé l'enzim lligasa E3, anomenat PIAS1. Aquest enzim transfereix la proteïna SUMO-1 de l'E2 a la lisina K366 de GATA4.

La sumoilació de GATA4 s'ha associat amb un augmenta de la seva activitat transcripcional. També s'ha suggerit que la sumoilació de GATA4 modula la seva localització nuclear, ja que quan la lisina K366 està mutada augmenten els nivells de GATA4 en el citoplasma¹⁷⁴.

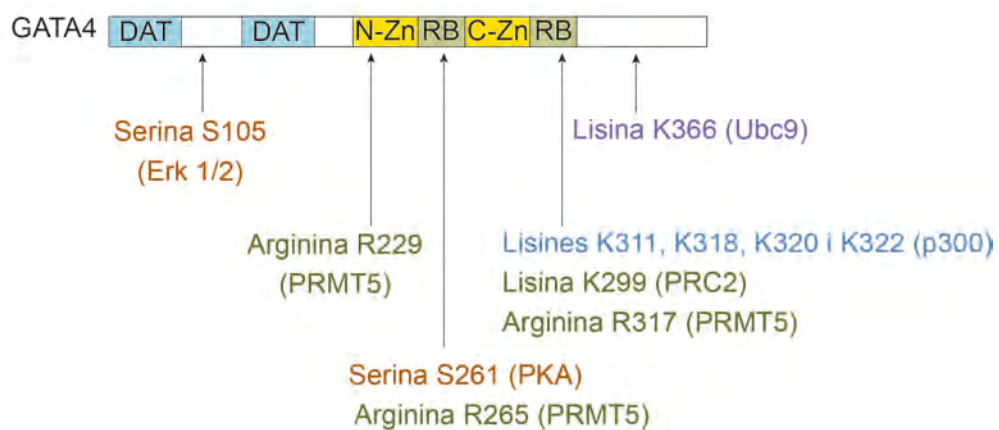


Figura 20. Modificacions posttraduccionalles de GATA4. Esquema de la proteïna GATA4 on es mostren els residus que són modificats posttraduccionalment, i entre parèntesi, l'enzim responsable de catalitzar la modificació. Adaptada de Pikkarainen *et al* 2004¹²⁷.

8. Mecanismes de regulació de l'expressió del gen *SCN5A*

8.1. Alteracions en l'expressió d'*SCN5A* com a causants d'arítmies cardíques

Tradicionalment, la majoria d'anàlisis genètiques en pacients amb malalties aritmogèniques s'han realitzat en exons, ja que durant molt de temps es va assumir que només les alteracions genètiques en les **regions codificants** podien tenir un efecte clínic. No obstant això, estudis recents han emfatitzat la importància de les variants genètiques en **regions reguladores no codificants** com a causants de fenotips patològics. D'entre aquests estudis, caldria destacar el de Maurano i col·laboradors, els quals van analitzar les dades de 920 estudis de GWAS associats a múltiples malalties humanes (càncer, diabetis, malalties autoimmunes, malalties cardiovasculars,...)¹⁷⁵. Van observar que només un 4,9% de les variants genètiques associades a malalties es localitzen en regions codificants, mentre la resta es troben en regions reguladores no codificants (majoritàriament en introns, seguits de promotors i regions entre una quilobase i una megabase a 5' de l'inici del gen).

En el camp de les malalties cardíques, cada vegada hi ha també més evidències del paper que tenen les variants en regions no exòniques com a possible causa d'aquestes malalties. Per exemple, en un estudi realitzat a partir de 503 pacients amb SBr, es van identificar 5 variants al promotor d'*SCN5A* associades amb una disminució de l'activitat del promotor, suggerint que podrien causar una reducció de l'expressió del gen *SCN5A*¹⁷⁶. En un altre estudi genètic realitzat en pacients amb SBr van identificar dotze noves variants genètiques localitzades en introns del gen *SCN5A* que no eren

presentes en la població general¹⁷⁷. En aquesta mateixa línia, en individus amb la SQT3 es va identificar una nova variant genètica en una regió intrònica del gen *SCN5A* localitzada en una posició d'*splicing*¹⁷⁸. Aquesta variant genètica podria donar lloc a un procés d'*splicing* defectuós i, per tant, a una proteïna alterada. No obstant això, fan falta estudis per avaluar l'impacte que tenen les variants en regions reguladores (no codificants) sobre la regulació de l'expressió de gens que codifiquen per canals iònics cardíacs, com a possible causa de canalopaties cardíques.

Hi ha diverses evidències que proposen que alteracions en els mecanismes que regulen l'expressió del gen *SCN5A* poden donar lloc a canalopaties associades amb alteracions del corrent de Na⁺. A continuació es descriuen alguns estudis en què recolzen aquestes evidències:

(1) Estudi de Leoni i col·laboradors¹⁷⁹. Pacients amb variants al gen *SCN5A* de tipus pèrdua de funció (associades amb SBr i SPCC) presenten un ampli espectre de manifestacions fenotípiques pel que fa als defectes en el sistema de conducció cardíaca. Per tal d'analitzar aquesta heterogeneïtat en els fenotips, Leoni *et al* van estudiar ratolins heterozigots *SCN5A*^{+/-}. Aquests ratolins *SCN5A*^{+/-} presentaven una disminució en la conducció elèctrica cardíaca similar a la dels pacients amb mutacions a *SCN5A* del tipus pèrdua de funció. Els ECG realitzats als ratolins van mostrar que hi havia diferents graus de severitat dels defectes en la conducció elèctrica, és a dir, existia una variabilitat important en el fenotip dels animals. L'anàlisi dels nivells d'expressió del canal Na_v1.5 va demostrar que hi havia una correlació entre la severitat fenotípica dels ratolins i els nivells d'expressió del canal Na_v1.5. Els ratolins amb un fenotip més sever corresponien als que tenien una reducció de l'expressió del canal Na_v1.5 d'un 50% respecte al salvatge o *wild type* (WT). En canvi, els ratolins amb un fenotip més lleu tenien una reducció del 25%. Estudis electrofisiològics van demostrar també

que la reducció del corrent de Na^+ era més important en els ratolins amb un fenotip més sever. En resum, els resultats d'aquest estudi suggereixen que el patró d'expressió del gen *SCN5A* determina la severitat dels pacients amb SBr o SPCC.

(2) Estudi de Bezzina i col·laboradors¹⁸⁰. En un estudi realitzat en individus de la població asiàtica, es va analitzar la regió del promotor d'*SCN5A* per tal d'identificar possibles polimorfismes moduladors de la funció del sistema cardíac de conducció. Aquest estudi va identificar dos haplotips al promotor d'*SCN5A*: l'haplotip A, que contenia els al·lels comuns i es trobava amb una freqüència del 75%; i l'haplotip B, que contenia els al·lels minoritaris i la seva freqüència era del 25%. L'haplotip B contenia 6 polimorfismes en homozigosi i en complet desequilibri de lligament. Assajos luciferasa realitzats en cardiomiòcits de rata van demostrar que l'activitat del promotor d'*SCN5A* amb l'haplotip B era un 62% menor que l'activitat amb l'haplotip A. D'altra banda, es va observar que individus portadors de l'haplotip B, però no de l'haplotip A, presentaven un allargament dels intervals PR i QRS en l'ECG, no observats en individus amb l'haplotip A. Aquestes dades suggereixen que variacions genètiques en el promotor d'*SCN5A* poden afectar l'expressió del gen, i com a conseqüència, donar lloc a canvis en l'activitat elèctrica i conferir susceptibilitat a patir arítmies cardíques.

(3) Estudi de van den Boogaard i col·laboradors^{181, 182}. En els darrers anys s'han realitzat nombrosos estudis de GWAS per identificar polimorfismes associats a alteracions en l'ECG. En un d'aquests estudis es va identificar un polimorfisme (rs6801957) al gen *SCN10A* associat a alteracions en el sistema de conducció cardíac (allargament de l'interval QRS) i que predisposa a patir arítmies cardíques¹⁸³. Aquest polimorfisme es localitza en una regió *enhancer* que modula l'expressió del gen *SCN5A*, i és un lloc d'unió dels FT TBX3 i TBX5. Van den

Boogaard et al van observar que com a conseqüència del polimorfisme, la seqüència del DNA a on s'uneixen TBX3 i TBX5 queda alterada i no és possible la unió. El resultat final és una desregulació del promotor d'*SCN5A* que provoca una disminució de l'expressió del canal $\text{Na}_v1.5$. Aquestes dades suggereixen que una pertorbació en els mecanismes que regulen l'expressió del gen *SCN5A* pot ser una causa de les alteracions elèctriques en el cor.

Els resultats dels tres estudis mencionats suggereixen que alteracions en l'expressió del gen *SCN5A* podrien explicar l'etiologia d'una part dels casos de SBr i SQTl que després de les anàlisis genètiques de les regions codificants no se'ls ha identificat cap variant genètica causal de la malaltia. Per tant, entendre els mecanismes de regulació del gen *SCN5A* és clau per poder revelar noves causes d'aquestes malalties cardíques.

8.2. Regulació transcripcional del gen *SCN5A*

Tot i el paper clau del canal $\text{Na}_v1.5$ en l'activitat elèctrica del cor, els mecanismes que regulen l'expressió del gen *SCN5A* han estat molt poc estudiats. En l'apartat anterior s'han descrit tres evidències que donen suport a la necessitat de conèixer aquests mecanismes, ja que una alteració dels nivells d'expressió d'*SCN5A* pot donar lloc a arítmies cardíques.

El gen *SCN5A* humà presenta un 99% d'homologia amb el de ratolí i rata. En les tres espècies aquest gen conté 28 exons, dels quals l'exó 1 no és una regió codificant. La regió promotora de l'*SCN5A* humà es va caracteritzar l'any 2004. En aquest estudi es va identificar el TSS del gen *SCN5A*, que va permetre determinar la mida de l'exó 1. La regió promotora es va definir entre els nucleòtids -261 i +140 respecte al nou TSS descrit. El promotor del gen *SCN5A* es caracteritza per ser un promotor sense la caixa TATA i ric en regions GC. Es van identificar diversos elements reguladors en *cis* just abans del TSS, que també es troben en rata i ratolí (**Figura 21**). Entre aquests

elements cal destacar llocs d'unió del FT Sp1, el qual és un FT ubico que s'uneix a promotors rics en GC. Uns altres elements identificats van ser quatre regions riques en citocines homòlogues a les seqüències CACC, que són exclusives de gens musculars. També es va definir una caixa-E, que té com a seqüència CANNTG (on N és qualsevol nucleòtid), i s'ha proposat com un lloc d'unió del FT Snail, el qual és un repressor transcripcional. D'acord amb aquesta proposta, la deleció de la caixa-E està associada a un augment de l'expressió del canal $\text{Na}_v1.5$ i un augment del corrent de Na^+ . A diferència del promotor d'*SCN5A* de ratolí i rata, el promotor humà consta d'una seqüència extra d'11 pb rics en citosines (GACCCCGCCCC)¹⁸⁴. Aquesta seqüència podria jugar un paper en la regulació de la transcripció d'*SCN5A*, ja que una mutació d'un d'aquests nucleòtids redueix l'activitat transcripcional del promotor. Aquesta seqüència també s'ha identificat al promotor de la troponina I cardíaca humana com un lloc d'unió de FT cardíacs¹⁸⁵.

La comparació dels gens *SCN5A* d'humà i de ratolí mitjançant eines bioinformàtiques, va permetre identificar 92 regions conservades entre ambdues espècies, que s'han plantejat com a potencials regions reguladores del gen *SCN5A*¹⁸⁶. La majoria d'aquestes regions (un 25%) es localitzen a l'intró 1; un 16% a 3' d'*SCN5A*, des de l'acabament de l'exó 28 fins l'inici del següent gen (*EXOG*); i un 13% a 5' de l'exó 1 fins a l'acabament del gen adjacent (*SCN10A*). Per tant, es proposa l'intró 1 com la zona més important de regulació del gen *SCN5A*. Algunes de les regions de l'intró 1 humà que han estat estudiades funcionalment inclouen (**Figura 21**): una caixa-E que, de la mateixa manera que al promotor, té llocs d'unió pel FT Snail, amb funció repressora de la transcripció d'*SCN5A*; un motiu GATA (de +542 a +545 pb respecte al TSS), amb efecte activador de la transcripció; i una regió amb una important funció activadora de la transcripció entre els nucleòtids +540 i +613¹⁸⁶.

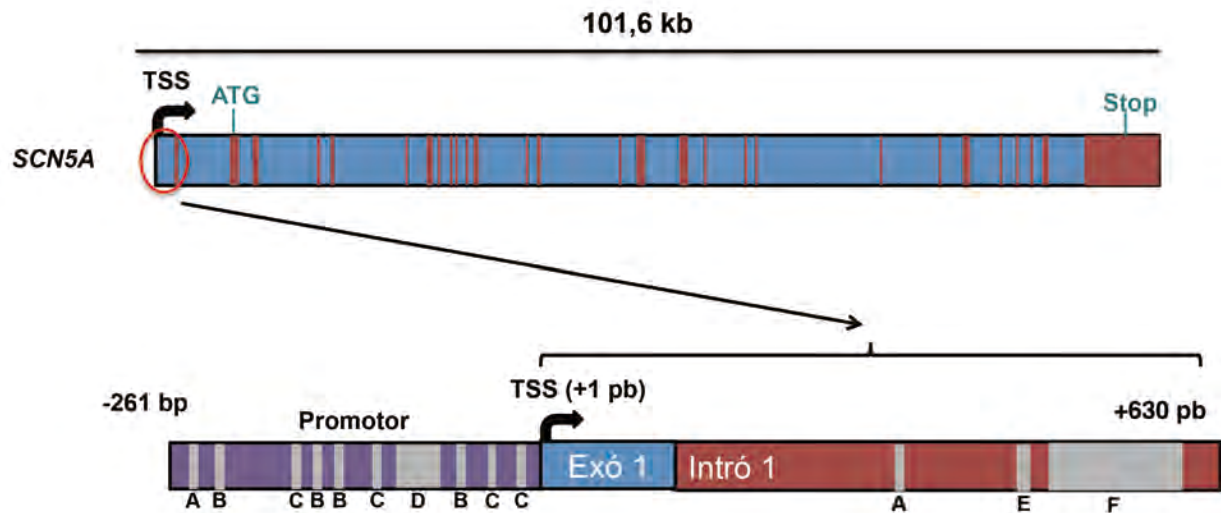


Figura 21. Esquema del gen *SCN5A* humà. A la part superior es mostren els 28 exons (en blau) i els 28 introns (en vermell) del gen *SCN5A*. S'indica el TSS, el codó d'inici de la traducció (ATG) i el codó Stop. A la part inferior, es mostra ampliada la regió de l'exó 1 i una part de l'intró 1, així com també la regió del promotor (en lila). En gris representen regions reguladores que s'han identificat al promotor i a l'intró 1: llocs d'unió del FT Snail (A), llocs d'unió del FT Sp1 (B); seqüències CACC (C); seqüència rica en citosines GACCCCGCCCC (D); lloc d'unió GATA (E); regió amb funció activadora (F).

El factor NF- κ B també s'ha proposat com un FT implicat en la regulació d'*SCN5A*. Per una banda, experiments de ChIP-seq van mostrar que NF- κ B s'uneix al promotor d'*SCN5A* en cèl·lules cardíques de rata H9c2¹⁸⁷. A més, cèl·lules H9c2 tractades amb angiotensina II van mostrar un augment de la unió del heterodímer d'NF- κ B (p50-p65) al promotor d'*SCN5A*. Aquesta unió induïa una disminució de l'expressió del gen *SCN5A* i, consegüentment, una reducció del corrent de Na⁺. Aquests resultats suggereixen que la implicació de NF- κ B en les arítmies cardíques es deu a una desregulació del gen *SCN5A*.

Estudis recents de ChIP-seq realitzats en cor de ratolí han detectat unió dels FT cardíacs NKX2.5, GATA4, TBX3, TBX5 i de l'acetiltransferasa p300 en diverses regions reguladores del gen *SCN5A*^{116, 182}. En l'apartat anterior s'ha introduït l'estudi de van den Boogaard *et al*, on van identificar dos *enhancers*

en cor de ratolí regulats pels factors TBX3 (amb acció repressora) i TBX5 (amb acció activadora), que controlen l'expressió del gen *SCN5A*¹⁶⁹. Els dos *enhancers* estan conservats en humans, on també estan regulats pels factors TBX. Un d'aquests *enhancers* es troba en una regió no codificant del gen *SCN10A*, i l'altre a 3' del gen *SCN5A*. Estudis de 4C-seq, van observar que els dos *enhancers* interaccionen físicament amb els promotors d'*SCN5A* i *SCN10A*, indicant que regulen l'expressió d'ambdós gens. Tot i això, respecte el gen *SCN10A*, que es localitza adjacent al *SCN5A* i codifica pel canal de sodi Na_v1.8, hi ha certa controvèrsia de si s'expressa al cor.

En conclusió, la majoria de les regions reguladores d'*SCN5A*, que s'han predit amb les anàlisis bioinformàtiques de conservació entre espècies, no tenen una funció coneguda. Tot i que els estudis de ChIP-seq, mitjançant la identificació dels FT que s'uneixen en regions reguladores, han ajudat a entendre millor la funció d'aquestes regions, encara falten més estudis per revelar els mecanismes moleculars que controlen l'expressió del gen *SCN5A*.

II. Plantejament de la recerca, hipòtesi i objectius

Plantejament de la recerca

Tal com s'ha comentat en la introducció, les alteracions en el corrent de Na^+ en cardiomiòcits poden donar lloc a arítmies cardíques hereditàries associades amb MSC, com són la SBr i la SQT3. Els avenços en el camp de la genètica han permès identificar causes d'aquestes malalties cardíques; fins al moment les variants genètiques a la regió codificant del gen *SCN5A* són la causa més comuna. Tot i això, encara hi ha molts casos de SBr (70-75%) i de SQT3 (20-35%) en què l'etiologia és desconeguda. En aquest context, s'ha plantejat la hipòtesi que una alteració de l'expressió del gen *SCN5A* podria explicar, en part, els casos d'arítmies en què no s'ha identificat una causa genètica. No obstant això, per a validar aquesta hipòtesi encara fan falta estudis a dos grans nivells:

- 1) Entendre els mecanismes que regulen l'expressió del gen *SCN5A* a nivell transcripcional, ja que actualment són poc coneguts. Això permetrà identificar possibles punts crítics de la transcripció d'*SCN5A* que podrien estar alterats en canalopaties.
- 2) Analitzar les regions no codificants (possibles regions reguladores) del gen *SCN5A* i d'altres gens associats a canalopaties. Actualment, el diagnòstic genètic d'aquestes malalties no inclou la seqüenciació de les regions no codificants, sinó només la dels exons d'aquests gens. No obstant això, se sap que les variants genètiques en regions reguladores (per exemple en llocs d'unió de FT) podrien afectar l'expressió gènica.

Aquesta tesi s'ha centrat sobretot en el punt 1, i s'ha proposat estudiar nous mecanismes reguladors de la transcripció d'*SCN5A* per FT. A més, aquests estudis permetran revelar regions reguladores del gen *SCN5A* on s'uneixen els FT, fet que també permetrà aportar coneixement en el punt 2.

En el moment que es va iniciar aquesta tesi s'havien descrit llocs d'unió GATA en el gen *SCN5A*, però mancava un estudi exhaustiu del possible paper dels factors GATA cardíacs (GATA4, GATA5 i GATA6) sobre la transcripció d'*SCN5A*. Atesa la importància dels factors GATA cardíacs, i en particular de GATA4, en la xarxa transcripcional cardíaca, es va plantejar que aquests factors podrien participar en el control de l'expressió d'*SCN5A*.

Hipòtesi

S'ha formulat la hipòtesi següent que emmarca aquesta tesi doctoral:

Els FT GATA cardíacs (GATA4, GATA5 i GATA6) regulen la transcripció del gen *SCN5A* en el cor humà adult.

Objectius

A partir de la hipòtesi anterior s'han plantejat els objectius següents:

1. Estudiar l'efecte dels factors GATA cardíacs sobre l'activitat del promotor d'*SCN5A* en un model de cèl·lules cardíques.
2. Caracteritzar l'expressió dels factors GATA cardíacs en el cor humà adult, tant en mRNA com en proteïna. Determinar si els factors GATA cardíacs estan implicats en la regulació del gen *SCN5A in vivo*.
3. Avaluar l'efecte de l'acetilació i desacetilació de GATA4 sobre l'activitat del promotor d'*SCN5A*. Caracteritzar els llocs d'acetilació de GATA4 per espectrometria de masses.

III. Materials i mètodes

1. Materials

1.1. Vectors d'expressió

Els diferents vectors que es van utilitzar en aquest treball es descriuen en els següents apartats.

1.1.1. Vectors reporters luciferasa

Aquests vectors es van utilitzar per a clonar un fragment de DNA amb funció promotora en posició 5' del DNA complementari (cDNA) d'un gen reporter. Com a gens reporters es van utilitzar la luciferasa *firefly* i la luciferasa de renilla.

- **pSGG-PromotorA SCN5A (PromotorA-luciferasa):** conté el gen de la luciferasa *firefly* controlat per la regió promotora del gen *SCN5A* humà corresponent als nucleòtids de -713 a +282 pb respecte al TSS (**Figura 22A**). D'ara endavant aquesta regió del gen *SCN5A* s'anomenarà PromotorA. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Es va adquirir a SwitchGear Genomics (Menlo Park, CA, EUA).
- **pGL3-PromotorB SCN5A (PromotorB-luciferasa):** conté el gen de la luciferasa *firefly* controlat per la regió promotora del gen *SCN5A* humà corresponent als nucleòtids de -260 a +612 pb respecte al TSS (**Figura 22B**). D'ara endavant aquesta regió del gen *SCN5A* s'anomenarà PromotorB. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Va ser proporcionat pel Dr. Dan Roden (Vanderbilt University, Nashville, TN, EUA).
- **pGL3-PromotorB SCN5A mutat simple:** aquesta construcció és com el PromotorB-luciferasa, però conté un lloc d'unió GATA mutat de la

posició +566 a la +569 (canvi de GATA a TTGC) respecte al TSS (**Figura 22B**). D'ara endavant aquest lloc d'unió s'anomenarà motiu GATA-A.

- **pGL3-PromotorB SCN5A mutat doble**: aquesta construcció és com el PromotorB-luciferasa, però conté dos llocs d'unió GATA mutats: el motiu GATA-A i un altre, anomenat a partir d'ara motiu GATA-B, de la posició +403 a la +406 (canvi de TATC a GCAA) (**Figura 22B**).
- **pEF-1 α -renilla** : conté el gen reporter luciferasa de renilla controlat pel promotor del factor d'elongació 1 humà. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Aquest vector va ser prèviament descrit¹⁸⁸.
- **pGL3-PDX1-luciferasa (PDX1-luciferasa)**: conté el gen de la luciferasa *firefly* controlat pel promotor del gen homeobox 1 pancreàtic i duodenal (*PDX1*) de ratolí corresponent als nucleòtids de -1.886 a +41 pb respecte al TSS. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Va ser proporcionat per la Dra. Anabel Rojas (CABIMER, Sevilla, Espanya).

1.1.2. Vectors d'expressió de proteïnes

- **pMT2-GATA4**: vector d'expressió de la proteïna GATA4 de ratolí controlada pel promotor del virus del simi 40 (SV40). El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Va ser proporcionat pel Dr. Jeffery Molkentin (Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, OH, EUA).
- **pCGN-GATA4/HA**: vector d'expressió de la proteïna GATA4 de ratolí. L'expressió de la proteïna està controlada pel promotor del citomegalovirus (CMV) i fusionada amb hemaglutinina (HA). El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Va ser proporcionat pel Dr. Jonathan A. Epstein (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, EUA).

- **pCGN-GATA4-K326A/HA:** vector d'expressió de GATA4 generat per mutagènesi dirigida a partir del vector pCGN-GATA4/HA. La lisina K326 de la proteïna GATA4 està mutada a alanina. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina.
- **pRK-GATA5:** vector d'expressió de la proteïna GATA5 de ratolí controlada pel promotor del CMV. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Va ser proporcionat per la Dra. Anabel Rojas.
- **pCMV-GATA6/Flag:** vector d'expressió de la proteïna GATA6 de ratolí. GATA6 està fusionada amb un Flag i la seva expressió està controlada pel promotor del CMV. El vector confereix resistència a la kanamicina. Va ser proporcionat per la Dra. Anabel Rojas.
- **pcDNA3.1-HDAC1-8/Flag:** es van utilitzar vuit vectors d'expressió de les proteïnes HDAC 1-8 humanes fusionades amb Flag a l'extrem C-terminal. Els vectors confereixen resistència a l'ampicil·lina. Van ser proporcionats pel Dr. Eric Verdin (Gladstone Institutes, San Francisco, CA, EUA).
- **pcDNA3.1-p300/Myc:** vector d'expressió de la proteïna p300 humana fusionada amb Myc. El vector confereix resistència a l'ampicil·lina. Va ser proporcionat pel Dr. Michael Stallcup (University of South Carolina, Columbia, SC, EUA).
- **pcDNA 3.1 (+):** vector bàsic dissenyat per a produir alts nivells d'expressió del fragment de cDNA clonat, gràcies a la presència del promotor del CMV. Confereix resistència a l'ampicil·lina. Es va utilitzar com a vector buit en experiments de transfecció per igualar la quantitat total de DNA transfectat en diferents condicions. Aquest vector es va adquirir a Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA).

A >5' UTR

```

gaacaaagcttccacagcgtggaaggggacccaagcgggttgccctgatggcctgttttg
tttaacaagaagtgtgtccccataggtcctgggcatgggcatgggagcaactgtttgtc
agcgtatgtctccgtgtgtgtgtgcctgtgacatgtctctgagtgagaaacagtgggtg
tgtaagtatgtgactccaggctctgcatgtgtcaaggtgaaggttgatgtggctcaaga
gggtggaagtatatataaaagaggtatatacatgtatatatatatgtatgtgtgtgtgt
gtttgcgcgcgcgcgtgtgtgggtgtctctgtgttggttgccctgcttctctgggtctg
gggtgtgtgtttgggttctgtcagcatgtgcgctccgtgtgttcaggtagatgtgtaccattg
tgcagatttctgtggcatcactaagtgtgtctccaggaaagtgtggttcgagtgtgtgtg
tgtgtctctgtgtcagtgtgtcagtggatgtgtgtcctaagtcatgtgggtgtcctaagttt
gtcagagtgtcttccctcagtgtcagtgtgtgtcaatgatgtgtctgtctgtgtctgtgtg
gggtgtgtgggggtgtgtatctgtctcaggggtgcatgtgtgtgtctgtgtcagtgcaggta
tgcctatggcagcgtgtgtctgtctcggcatgagtgtcagtgtatgcccggtgtccacgtg
gggtgggtgggtgtctggtagccttcccaagtcagcaaggttgccgtgtgtgtgtgtgtata
ctctggcggggtgctggtgtgtatgccagtgtttgttaatgtgagcctgtccgcgtccgcg
tgggtggccatctgtggtgaagcgtcgccgggtcgccgtgtgtgtacccccgcctatgtc
tgtctgtccgcggccgcgtgtgcggctgtctgtggctgtgagccccgggtcagtgtggg
agtgtgcgccccggcgggcgctggtgtgtccccctccgagcgggaggagcaccacgtgc
ggagccctgggcgcgtcgctctggggcgagccagcccgggggcccaagccccaggccga
acccaggcgggggcccgccccgacccccgccccgacccccgccccagccccgagccccgcgc
gcctgcccagcccgggagcccgaacagagccgcggagccg

```

>EXÓ 1

```

AGACGGCGGGCGGGCGCCCGTAGGATGCAGGGATCGCTCCCCCGGGGCCGCTGAGCCTGCGC
CCAGTGCCCCGAGCCCCGCGCCGAGCCGAGTCCGCGCCAAGCAGCAGCCGCCACCCCGG
GGCCCGGCCGGGGGACCAGCAG

```

>INTRÓ 1

```

gtgagcagagtgtccccgcgcgccggcagccctggccccggcgagccccctccgcctgcgc
ccgccccaaactttccctccccgaggggcgaagcctccagtccctgcggtgtcctccctgcc
cgggtccgcccagccgctccctccccgatcagtgtccccagagagccggaggggggagaagg
ggcgcagatccgccccggctggaggggtatccccgggggagacgtctctaaacaccgtgcgc
cccccttcccttccctttcccttccgggtttcccggtgcgctgtcgagggccgggggaggg
ggagctgcggccccagcttcccgggccatccctggcgcaggctcggggaggggtctgggatt
gggacccggataccggagggccggagaccccaagggtcagagcggcgactaggcgcgccatg
aatgtgggtccagagagcgggggtttgcgggggctgaccgagcagggttgatgtggggga
ggaagccacgcaccccccttctctggtggccagggggaaccgtccgctggggctgtcctct
ctgtgggacgagatctctgcgcgttttagaccatgtagagatctcggtgccctttgacgcc
ctaaagggggcgcacatctcctctgtctgatctctgtgcttctcgaaggggtggagatctct

```

B >5' UTR

```

gaacaaagcttccacagcgtggaaggggacccaagcgggttgccctgatggcctgttttg
tttaaacaagaagtgtgtccccataggtcctgggcatgggcatgggagcaactgtttgtc
agcgtatgtctccgtgtgtgtgtgcctgtgacatgtctctgagtgagaaacagtgggtg
tgtaagtatgtgactccaggctctgcatgtgtcaaggtgaaggttgatgtggctcaaga
gggtggaagtatatataaaagaggtatatacatgtatatatatgtatgtgtgtgtgtgt
gtttgcgcgcgcgcgtgtgtgggtgtctctgtgttggttgccctgcttctctgggtctg
gggtgtgtgtttgtttctgtcagcatgtgcgtccgtgtgttcaggtagatgtgtaccattg
tgcagatttctgtggcatcactaagtgtgtctccaggaaagtgtggttcgagtgtgtgtg
tgtgtctctgtgtcagtgtgtcagtggatgtgtgtgtctaagtcagtgtgggtgtctaagttt
gtcagagtgtcttccctcagtgtcagtgtgtgtcaatgatgtgtctgtctgtgtctgtgtg
gggtgtgtgggggtgtgtatctgtctcaggggtgcatgtgtgtgtctgtgtcagtgcaggta
tgcctatggcagcgtgtgtctgtctcggcatgagtgtcagtgtatgcccggtgtccacgtg
gggtgggtgggtgtctggtagccttcccaagtcagcaaggttgcggtgtgtgtgtgtgtata
ctctggcggggtgtgtgtgtgtatgccagtgtttgttaatgtgagcctgtccgcgtccgcg
tgggtggccatctgtggtgaagcgtcgccgggtgcgcgtgtgtgtacccccgcctatgtc
tgtctgtccgcgcgcgcgtgtgcggctgtctgtgtgtgtgagccccgggtcagtgtggg
agtgtgcgcgcgcgcgcgcgtgtgtgtgtccccctccgagcgggcggagcaccacgtgc
ggagccctgggcgcgtcgtctgtgggcggagccagcccggggccccgaagccccaggccga
acccaggcggggcccgccccgacccccgccccgacccccgccccagccccgagccccgcgc
gcctgcccagccccgggagccccgaacagagccgcggagccg

```

>EXÓ 1

```

AGACGGCGGCGGCGCCCGTAGGATGCAGGGATCGCTCCCCCGGGGCCGCTGAGCCTGCGC
CCAGTGCCCCGAGCCCCGCGCCGAGCCGAGTCCGCGCCAAGCAGCAGCCGCCACCCCGG
GGCCCCGGCCGGGGGACCAGCAG

```

>INTRÓ 1

```

gtgagcagagtgtccccgcgcgccggcagccctggccccggccggagccccctccgcctgccg
ccgcccacttttctccccgagggcggaagcctccagtccctgctgtctctccctgccg
cgggtccgcccagcgcctccctccccgatcagtgtccccagagagccggaggggggagaagg
ggcgcagatccgcccggctggaggggtatccccgggggagacgtctctaaacaccgtgcgc
cccccttcccttcccttcccttccgggtttccccgggtgcgcgtgtcaggggcgggggaggg
ggagctgcggccccagcttccggccatccctggcgcaggctcggggaggggtctgggatt
gggacccgggataccggaggccggagaccccaaggtcagagcggcgactaggcgcgccatg
aatgtggttccagagagcgggggtttgcgggggctgaccgagcagggttgatgtggggga
ggaagccacgcaccccccttctctgggcccagggggaaccgtccgctggggctgtcctct
ctgtgggacgagatctctgcgcgttttagaccatgtagagatctcggtgccctttgacgcc
ctaaaggggcccgcacatctcctctgtctgatctctgtgcttctcgaaggggtggagatctct

```

Figura 22. Seqüències del PromotorA i PromotorB d'SCN5A. **A.** En gris es mostra la regió del PromotorA (de -713 a +282 pb respecte al TSS). **B.** En gris es mostra la regió del PromotorB (de -260 a +612 pb). En blau es marca el motiu GATA-A (de +566 a +569 pb respecte al TSS) i en vermell el motiu GATA-B (de +403 a +406 pb). Les fletxes indiquen el TSS del gen SCN5A.

1.2. Encebadors

En aquesta tesi es van utilitzar encebadors per la Reacció en Cadena de la Polimerasa (PCR) en les diferents tècniques: mutagènesi dirigida, anàlisi dels niells d'mRNA, assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i assajos d'immunoprecipitació de cromatina seqüencial (Re-ChIP).

1.2.1. Encebadors per a mutagènesi dirigida

El encebadors per a realitzar mutagènesi dirigida es van dissenyar amb el programa QuikChange Primer Design (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), i es van sintetitzar a Integrated DNA Technologies (Madrid, Espanya). Per cada mutació que es volia introduir es va utilitzar una parella d'encebadors, que contenien la mutació en qüestió i s'hibridaven a la mateixa seqüència de DNA però en cadenes oposades del vector (**Taula 3**).

Regió mutada	Parella d'encebadors
Motiu GATA-A del vector PromotorB-luciferasa	(S) 5'-CTGGGATTGGGACCCG <u>TTGCCCG</u> GAGGCCGGAGACC-3' (AS) 5'-GGTCTCCGGCCTCCGGG <u>GCAACG</u> GGTCCCAATCCCAG-3'
Motiu GATA-B del vector PromotorB-luciferasa	(S) 5'-CGCCCGGCTGGAGGGG <u>GCAACCCG</u> GGGGAG ACGTC-3' (AS) 5'-GACGTCTCCCCCGGGT <u>TTGCCCT</u> CCAGCCGGGCG-3'
Lisina K326 del vector pCGN-GATA4/HA	(S) 5'-GGAAGCCCAAGAATCTGAAT <u>GCATC</u> TAAGACACCAGCAGGT-3' (AS) 5'-ACCTGCTGGTGTCTTAGAT <u>GCA</u> TT CAGATTCTTGGGCTTCC-3'

Taula 3. Encebadors per a mutagènesi dirigida. Seqüències sentit (S) i antisentit (AS) de les parelles d'encebadors emprades per a mutar els motius GATA-A i GATA-B del PromotorB. També s'indiquen els encebadors utilitzats per mutar la lisina K326 de GATA4 a una alanina. Els nucleòtids mutats es mostren subratllats.

1.2.2. Encebadors per a determinar els nivells d'mRNA

L'anàlisi dels nivells d'mRNA es va fer mitjançant PCR quantitativa a temps real (qPCR) utilitzant el reactiu SYBR Green i encebadors prèviament validats (**Taula 4**), a partir de mostres de cDNA.

Gen	Espècie	Casa comercial
<i>SCN5A</i>	Rata	Qiagen
<i>GATA4</i>	Rata	Qiagen
<i>KCNH2</i>	Rata	Sigma-Aldrich
<i>ANP</i>	Rata	Sigma-Aldrich
<i>β-ACTINA</i>	Rata	Qiagen
<i>GATA4</i>	Humà	Qiagen
<i>GATA5</i>	Humà	Qiagen
<i>GATA6</i>	Humà	Qiagen
<i>GAPDH</i>	Humà	Qiagen
<i>PDX1</i>	Humà	Sigma

Taula 4. Encebadors per a determinar els nivells d'mRNA. S'indica la regió (gen) del cDNA a on s'hibriden els encebadors, l'espècie a la qual pertany el gen i la casa comercial on es van comprar els encebadors.

1.2.3. Encebadors per a assajos de ChIP i Re-ChIP

Per a l'anàlisi de les mostres de ChIP i Re-ChIP es van dissenyar 4 parelles d'encebadors complementaris a diferents regions del gen *SCN5A* humà amb el programa Primer 3 (versió 0.4.0) (**Taula 5**). Es van seleccionar encebadors que donaven una mida d'amplicó d'entre 50 i 150 pb, i es van sintetitzar a Integrated DNA Technologies.

Posició respecte al TSS	Mida amplicó	Posició genòmica (GRCh37)	Seqüència
De -8.833 a -8.772 pb	62 pb	38,700,052 - 38,699,991	(S) 5'-GGGACTCCAGTCCTCTTTCC-3' (AS) 5'-CCCCAGCATCCAGATTTCTA-3'
De -5.976 a -5.857 pb	120 pb	38,697,193 - 38,697,074	(S) 5'-TAAAGGCAGGATTGGGTCAC-3' (AS) 5'-TTTGAAGGCATGAGCAGTTG-3'
De -237 a -160 pb	78 pb	38,691,454 - 38,691,377	(S) 5'-CCGCCTATGTCTGTCTGTCC-3' (AS) 5'-GCACACTCCCACACTGACC-3'
De +440 a +571 pb	132 pb	38,690,779 - 38,690,648	(S) 5'-CCCTTCCCTTCCCTTTCTT-3' (AS) 5'-GGTATCCGGGTCCCAATCC-3'

Taula 5. Encebadors per als assajos de ChIP i Re-ChIP. De cada parella d'encebadors es mostren les posicions d'inici i final respecte al TSS del gen *SCN5A*, la mida de l'amplicó, les posicions genòmiques humanes inicial i final segons la versió GRCh37 i les seqüències sentit (S) i antisentit (AS).

1.3. Anticossos

Els anticossos primaris i secundaris emprats en aquest treball es detallen a les taules 6 i 7, respectivament.

Anticòs	Origen	Proveïdor (número de catàleg)	Aplicació	Dilució o quantitat
α -GATA4 (policlonal)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology (sc-1237x)	<i>Western blot</i>	1:200
			ChIP i Re-ChIP	5 μ g
α -GATA5 (policlonal)	Conill	Santa Cruz Biotechnology (sc-9054x)	<i>Western blot</i>	1:200
			ChIP i Re-ChIP	5 μ g
			Immunofluorescència	1:50
α -GATA6 (policlonal)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology (sc-7244x)	<i>Western blot</i>	1:200
			ChIP i Re-ChIP	5 μ g
α -HA (monoclonal)	Ratolí	Abcam (ab1424)	<i>Western Blot</i>	1:1.000
			Immunoprecipitació	1:100
α -Flag (monoclonal)	Ratolí	Sigma-Aldrich (F1804)	<i>Western blot</i>	1:1.000
α -actina (policlonal)	Conill	Sigma-Aldrich (A2066)	<i>Western blot</i>	1:2.000
α -lisines acetilades (policlonal)	Conill	Cell Signaling Technology (9441)	Immunoprecipitació	1:100

Taula 6. Anticossos primaris. De cada anticòs s'especifica l'origen, el proveïdor i el número de catàleg, les tècniques en què s'ha utilitzat i la dilució o quantitat emprada.

Anticòs	Origen	Proveïdor (número de catàleg)	Aplicació	Dilució
α -conill- HRP	Cabra	Thermo Scientific (32460)	<i>Western blot</i>	1:2.000
α -cabra- HRP	Conill	Thermo Scientific (31402)	<i>Western blot</i>	1:10.000
α -ratolí- HRP	Cabra	Thermo Scientific (32430)	<i>Western blot</i>	1:2.000
α -conill CY3	Cabra	Amersham (PA43004)	Immunofluorescència	1:400

Taula 7. Anticossos secundaris. De cada anticòs s'especifica l'origen, el proveïdor i el número de catàleg, les tècniques en què s'ha utilitzat i la dilució emprada. HRP: *Horseradish Peroxidase*, fa referència a la peroxidasa conjugada a l'anticòs.

1.4. Pèptids

Pels experiments d'acetilació i desacetilació *in vitro* es van dissenyar 5 pèptids corresponents a la proteïna GATA4 humana. La seqüència dels pèptids corresponia a la regió de GATA4 responsable de les interaccions DNA-proteïna i proteïna-proteïna, concretament a la regió bàsica del motiu C-Zn. Els pèptids 1, 2 i 3 contenen la seqüència de la proteïna nativa, mentre que els pèptids 4 i 5 tenen dues o tres lisines mutades a arginines (**Taula 8**).

Els pèptids es van sintetitzar en el Departament de Proteòmica de la Universitat Pompeu Fabra (Barcelona, Espanya) utilitzant el sintetitzador de pèptids Prelude (Protein Technologies). La puresa dels pèptids sintètics es va verificar amb l'HPLC analític LC-2010A (Shimadzu, Kyoto, Japó), i el pes molecular es va determinar per LC-MS amb l'equip 2010EV (Shimadzu).

Atès que els pèptids sintètics no tenien una puresa gaire elevada (aproximadament del 70%), es van purificar amb un HPLC preparatiu. L'anàlisi posterior dels pèptids purificats per HPLC analític i per LC-MS van confirmar un increment de puresa de fins al 90-95% (**Figura 23**). Finalment, es van liofilitzar.

Pèptid	Posició aminoacídica	Seqüència
1	295 - 308	GLYMK ₂₉₉ LHGVPRPLA
2	303 - 317	VPRPLAMRK ₃₁₁ EGIQTR
3	313 - 334	GIQTRK ₃₁₈ RK ₃₂₀ PK ₃₂₂ NLNK ₃₂₆ SK ₃₂₈ TPAAPS
4	313 - 334	GIQTRR ₃₁₈ RR ₃₂₀ PR ₃₂₂ NLNK ₃₂₆ SK ₃₂₈ TPAAPS
5	313 - 334	GIQTRK ₃₁₈ RK ₃₂₀ PK ₃₂₂ NLNR ₃₂₆ SR ₃₂₈ TPAAPS

Taula 8. Pèptids sintètics corresponents a la proteïna GATA4 humana. De cada pèptid es mostren les posicions aminoacídiques inicial i final de la proteïna GATA4 humana i la seqüència. En blau s'assenyalen les lisines WT i en vermell les lisines mutades a arginines, i de cada una es mostra la posició del residu.

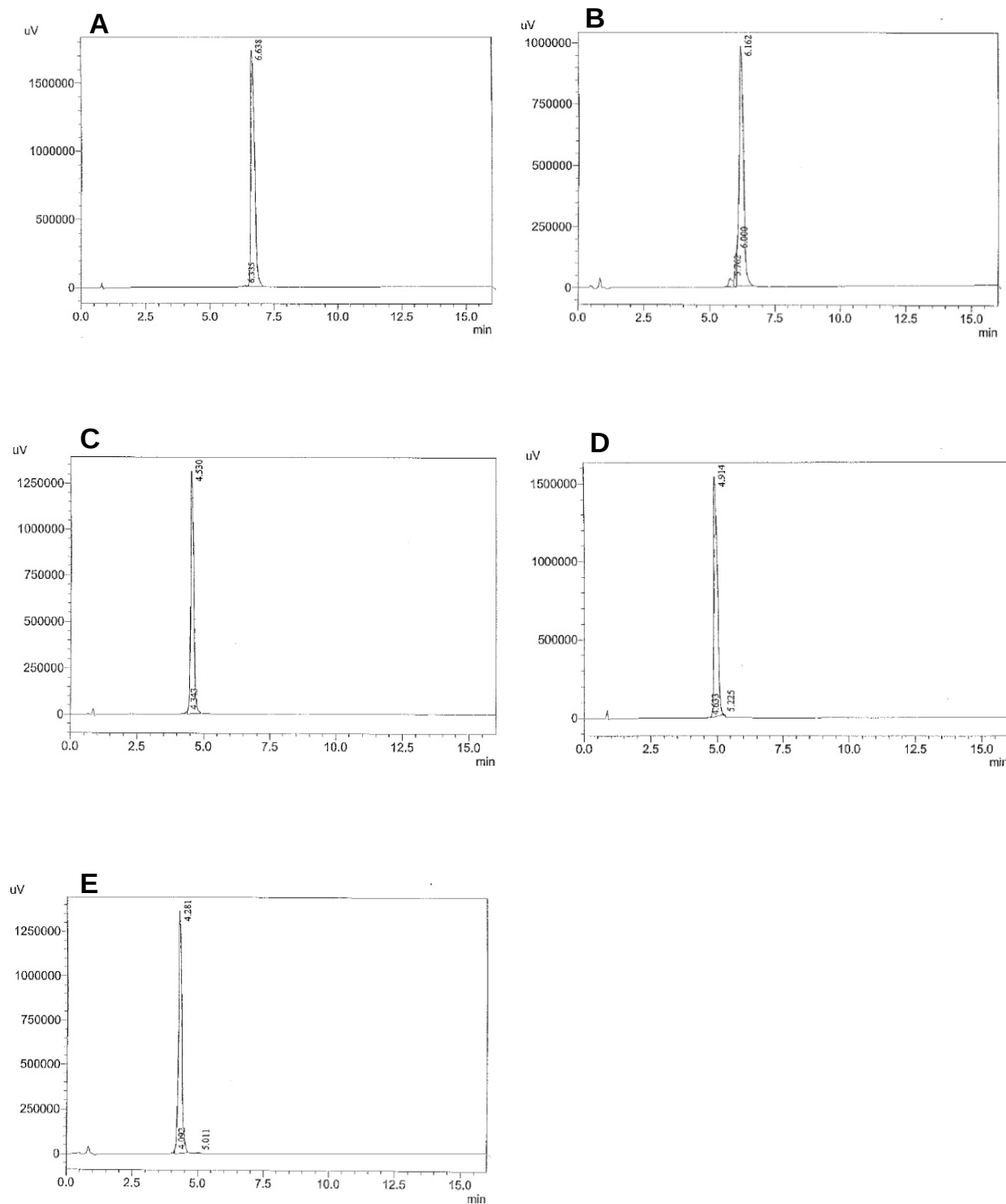


Figura 23. Anàlisi de la puresa dels pèptids per HPLC. Cromatogrames dels pèptids 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4 (D) i 5 (E) obtinguts després de la purificació dels pèptids.

1.5. Reactius per a les reaccions d'acetilació i desacetilació *in vitro*

Els assajos enzimàtics d'acetilació i desacetilació *in vitro* de GATA4 es van realitzar amb els pèptids sintètics descrits a l'apartat anterior. A la **taula 9** s'especifiquen els enzims recombinants que es van utilitzar així com el substrat per les reaccions d'acetilació (acetil-CoA).

Enzim/substrat	Espècie	Proveïdor (número de catàleg)	Quantitat
p300 (domini catalític)	Humà	Millipore (03-188)	300 ng (per 1 nmol de pèptid)
HDAC2	Humà	Active Motif (31343)	300 ng (per 1 nmol de pèptid)
HDAC4	Humà	Active Motif (31364)	150 ng (per 1 nmol de pèptid)
Acetil-CoA	-	Sigma-Aldrich (A2056)	10 vegades la concentració de pèptid

Taula 9. Reactius per a les reaccions d'acetilació i desacetilació *in vitro*. De cada un dels enzims i del substrat utilitzats es mostra l'espècie, el proveïdor i número de catàleg, i la quantitat utilitzada en les reaccions.

1.6. Models experimentals

1.6.1. Línies cel·lulars

En els experiments realitzats en aquesta tesi es van utilitzar dues línies cel·lulars diferents:

- La línia cel·lular **H9c2** és un subclon derivat del clon original de ventricle d'embrió de rata BD XI establert per Kimes i Brandt el 1976¹⁸⁹.

- La línia cel·lular **HEK293T** (*Human Embryonic Kidney*) deriva de cèl·lules de ronyó d'embrió humà. Expressen de manera estable l'antigen-T SV40, el qual es pot unir a l'origen de replicació SV40 dels vectors transfectats augmentant d'aquesta manera la seva replicació.

1.6.2. Oòcits de *Xenopus laevis*

Els oòcits utilitzats per als estudis electrofisiològics es van extreure de *Xenopus laevis* (Nasco Biologicals & Educational Kits Production Facility, Fort Atkinson, WI, USA) sota l'efecte de l'anestèsia, seguint el protocol prèviament publicat¹⁹⁰. En primer lloc, les granotes es van submergir en aigua, que contenia un 0,12 % de l'anestèsic etil 3-aminobenzoat metansulfonat (Tricaina), durant 20 minuts. Per comprovar l'èxit de l'anestèsia es va fer el test de reflexos (utilitzant el reflex de la retirada del pedal). Les granotes anestesiades es van rentar breument amb aigua i immediatament es van posar en gel per tal d'extreure'n quirúrgicament els lòbuls ovàrics. Aleshores, els ovaris es van transferir a medi Barth lliure de calci (**Taula 10**). Els oòcits en estadi V i VI també es van incubar en medi Barth lliure de calci que contenia 1,2 mg/mL de col·lagenasa (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanya) durant 60-90 minuts. A continuació, els oòcits es van rentar repetidament amb medi Barth calci (**Taula 10**) que contenia 4 µg/mL de cefuroxima (Lilly, Giessen, Alemanya), 50 unitats/mL de penicil·lina (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MA, EUA), 50 µg/mL d'estreptomicina (Sigma-Aldrich) i 100 µg/mL de neomicina (Sigma-Aldrich). Finalment, els oòcits es van aïllar i desfol·licular mecànicament.

Els experiments amb *Xenopus laevis* els va realitzar el Dr. Thomas Zimmer a la Universitat de Jena (Jena, Alemanya). Els experiments van ser aprovats pel govern local de l'Estat Lliure de Turíngia (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz) amb el número de registre 02-0.37/13 i portats a terme

d'acord amb les guies de la Directiva 2010/63/EU del Parlament Europeu de la protecció d'animals usats per a propòsits científics.

Solució	Composició
Medi Barth lliure de calci	84 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO ₃ ; 0,82 mM MgSO ₄ ; 7,5 mM Tris/HCl pH 7,4
Medi Barth amb calci	84 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO ₃ ; 0,82 mM MgSO ₄ ; 0,33 mM Ca(NO ₃) ₂ ; 0,41 mM CaCl ₂ ; 7,5 mM Tris/HCl pH 7,4

Taula 10. Solucions per a l'obtenció d'oòcits de *Xenopus laevis*.

1.6.3. Mostres de teixit cardíac humà

Les mostres de ventricle esquerre humà adult van ser utilitzades per estudiar l'expressió dels FT GATA cardíacs (mitjançant qPCR, ddPCR i *western blot*) així com per als assajos de ChIP i Re-ChIP. Aquestes mostres es van obtenir de pacients diagnosticats amb insuficiència cardíaca en etapa terminal que requerien un transplantament cardíac. Els pacients no patien cap arítmia hereditària ni cardiomiopatia estructural, sinó que la insuficiència cardíaca era causa d'una malaltia isquèmica, valvular o idiopàtica. Les mostres es van recollir del cor afectat, i immediatament es van rentar i congelar en nitrogen líquid. Per als experiments de ddPCR també es van utilitzar mostres de ventricle esquerre humà adult procedents de donants sans. Totes les mostres es van recollir de la mateixa regió (paret anterior del ventricle esquerre) i comprenien les tres capes del cor (epicardi, miocardi i endocardi).

Tots els individus van signar un consentiment escrit per a participar en l'estudi. Les mostres van ser recol·lectades pels Drs. Montserrat Batlle i Félix Pérez-Villa de l'Hospital Clínic de Barcelona (Barcelona, Espanya). Els procediments

van ser aprovats pels comitès ètics de l'Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta (Girona, Espanya) i de l'Hospital Clínic de Barcelona, i compleixen els principis establerts en la Declaració de Hèlsinki.

1.6.4. Seccions de ventricle de ratolí

Per als estudis d'immunofluorescència es van utilitzar seccions histològiques de ventricle extrems de ratolins adults de la soca B6D2F1/OlaHsd (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, EUA).

2. Mètodes

2.1. Manteniment de les cèl·lules

Les cèl·lules H9c2 i HEK293T es van fer créixer en medi Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví (Sigma-Aldrich), un 1% de penicil·lina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) i un 1% Glutamax (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), i s'incubaren a 37°C amb un nivell de CO₂ del 5%. Les cèl·lules es van sembrar en flascons de 75 cm² de superfície, on van créixer adherides en forma de monocapa.

Per a conservar les cèl·lules H9c2 i HEK293T a llarg termini se'n van mantenir estocs congelats en nitrogen líquid. Els protocols de congelació, descongelació i subcultiu de cèl·lules que es van seguir per a ambdues línies cel·lulars es detallen a continuació.

2.1.1. Congelació de cèl·lules en nitrogen líquid

A partir d'un cultiu de cèl·lules HEK293T o H9c2, mantingudes en un flascó, es va aspirar el medi i es va fer un rentat amb uns 10 mL de tampó salí fosfat (PBS, Sigma-Aldrich). Les cèl·lules es van tripsinitzar amb Tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) amb el volum mínim per a cobrir la superfície del flascó (aproximadament 1 mL) durant 2 minuts a 37°C. Passat aquest temps es va comprovar sota el microscopi que les cèl·lules s'havien desenganxat del flascó i havien quedat en suspensió. Les cèl·lules tripsinitzades es van resuspendre amb 12 mL de medi DMEM suplementat, i es va determinar la concentració de cèl·lules amb un comptador automàtic (ScepterTM 2.0 Handheld Automated Cell Counter, Merck Millipore). En diluir la tripsina amb medi, s'atura el procés de tripsinització i així s'evita la digestió de les cèl·lules. A continuació, les cèl·lules es van centrifugar 5 minuts a 1.500 rpm, i el sediment obtingut es va resuspendre amb el medi de congelació Cell Freezing Medium-Serum-free (Sigma-Aldrich) per a obtenir una concentració

d'aproximadament 4.000.000 de cèl·lules/mL. La suspensió de cèl·lules es va al·liquotar en vials d'1 mL i es van mantenir a -80°C durant 24 hores en un recipient de congelació que contenia propanol (Nalgene® Mr. Frosty, Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA). Aquest mètode permet aconseguir una congelació lenta, i evitar així la formació de cristalls intracel·lulars que podrien danyar les cèl·lules. Passades les 24 hores, els vials es van transferir a un tanc de nitrogen líquid.

2.1.2. Descongelació de cèl·lules del nitrogen líquid

Els vials de cèl·lules H9c2 i HEK293T conservats en nitrogen líquid es van descongelar ràpidament en un bany de 37°C per a prevenir l'aparició de cristalls. Una vegada descongelats, les cèl·lules es van resuspendre en un tub de 15 mL de centrífuga en medi DMEM suplementat (amb un volum mínim de 9 mL). Es va fer una centrifugació de 5 minuts a 1.500 rpm i es va descartar el sobrenedant. El sediment de cèl·lules es va resuspendre en medi DMEM suplementat, i les cèl·lules es van sembrar en un flascó de 75 cm². Al cap de 24 hores es va aspirar el medi i se'n hi va afegir de nou.

2.1.3. Subcultius de cèl·lules

El subcultiu de les cèl·lules H9c2 i HEK293T es realitzava quan aquestes assolien un 70-80% de confluència. De forma similar al procés de congelació de cèl·lules, en un primer pas es va eliminar el medi i es va rentar el cultiu cel·lular amb 10 mL de PBS. Les cèl·lules es van tripsinitzar i resuspendre amb medi DMEM suplementat. La suspensió de cèl·lules es va subcultivar en un nou flascó, a una proporció d'1:5 (suspensió cel·lular:medi) en el cas de les cèl·lules H9c2 i d'1:10 en el cas de les cèl·lules HEK293T. Les cèl·lules HEK293T es sembren a una proporció més baixa perquè tenen un creixement més ràpid.

2.2. Obtenció de DNA plasmídic

Tots els vectors descrits a l'apartat 1.1 van ser construïts amb les tècniques habituals de DNA recombinant i comprovats per seqüenciació de Sanger. Es van conservar a -20°C estocs de vectors que van ser utilitzats per als experiments de transfeccions. Per a reposar aquest estoc i per a disposar dels vectors a llarg termini, es va mantenir també un estoc de bacteris d'*Escherichia Coli* (*E. Coli*) transformades amb els vectors i conservades en glicerol a -80°C.

2.2.1. Preparació del cultiu de bacteris *E. Coli* transformades

Els vectors es van transformar en bacteris competents *E. Coli* de la soca DH5α (Thermo Fisher), seguint les instruccions del fabricant. Una vegada transformats, es van sembrar en plaques d'LB-Agar autoclavat (**Taula 11**), en les quals s'hi afegí l'antibiòtic de selecció del vector (ampicil·lina o kanamicina; **Taula 11**). Per tal d'obtenir colònies de bacteris es van incubar les plaques a 37°C unes 16 hores. Passat aquest temps, se'n va seleccionar una colònia aïllada i es va fer créixer en un tub de 15 mL que contenia 5 mL de medi LB-Broth autoclavat (**Taula 11**) i l'antibiòtic de selecció. Els tubs es van mantenir a 37°C durant 16 hores en agitació per tal d'obtenir un cultiu de bacteris transformats.

2.2.2. Preparació d'estocs de bacteris transformats en glicerol

Els estocs de glicerol es van preparar amb 750 µL del cultiu de bacteris transformats (tal com s'ha explicat en l'apartat anterior) juntament amb 250 µL de glicerol al 60% estèril, i es van conservar a -80°C.

2.2.3. Minipreparacions de DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA plasmídic permeten obtenir d'una forma fàcil i ràpida quantitats petites dels vectors d'interès (uns 50 µL a aproximadament

300 ng/ μ L). Les minipreparacions, que es van realitzar amb el kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel, Düren, Alemanya) seguint les instruccions del fabricant, es van utilitzar pels clonatges amb finalitat analítica (no preparativa). En un primer pas es van transformar els vectors d'interès en bacteris DH5 α i es van sembrar en plaques d'LB-Agar, igual com s'ha explicat en l'apartat 2.2.1. Aleshores es van seleccionar diverses colònies que havien crescut a la placa i, es van fer créixer per separat en 5 mL de medi LB-Broth i l'antibiòtic (**Taula 11**), de tal manera que cada cultiu provenia d'una colònia diferent. A partir de cada cultiu bacterià es va fer una minipreparació per a purificar el DNA plasmídic. Els clons obtinguts es van analitzar per seqüenciació mitjançant el mètode Sanger per a verificar quines colònies tenien la construcció esperada. Posteriorment, d'un dels clons correctes se'n va fer la maxipreparació (apartat següent).

2.2.4. Maxipreparacions de DNA plasmídic

Les maxipreparacions es van emprar per a obtenir quantitats més grans de DNA plasmídic (200 μ L a aproximadament 3.000 ng/ μ L). Les maxipreparacions es van fer amb el kit EndoFree Plasmid Maxi Kit® (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del fabricant. El fet que aquest mètode sigui lliure d'endotoxines permet obtenir DNA plasmídic amb major grau de puresa, fet que és important pels experiments de transfeccions en cèl·lules. Es van incubar 5 mL d'un cultiu de bacteris transformats, juntament amb l'antibiòtic de selecció, a 37°C durant 6 hores en agitació per tal de fer-hi créixer les bacteris. Passat aquest temps el contingut del tub s'abocava a un erlenmeyer que contenia 100 mL de medi LB-Broth autoclavat i l'antibiòtic de selecció, i s'incubava a 37°C durant 16 hores en agitació. A partir del cultiu bacterià obtingut es realitzava la maxipreparació.

Els vectors purificats per aquest mètode són els que es van utilitzar per als experiments de transfeccions en cèl·lules. La concentració del DNA plasmídic

obtingut es va determinar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop-1000 Thermo Fisher.

Reactiu	Concentració
LB-Agar (Sigma-Aldrich)	35 g/L en H ₂ O
Medi LB-Broth (Sigma-Aldrich)	20 g/L en H ₂ O
Ampicil·lina (Sigma-Aldrich)	100 µg/mL en LB-Agar o LB-Broth
Kanamicina (Sigma-Aldrich)	25 µg/mL en LB-Agar o LB-Broth

Taula 11. Medis de cultiu de bacteris i antibiòtics per a l'obtenció del DNA plasmídic.

2.3. Mutagènesi dirigida i subclonatge

La introducció de mutacions en els dos motius GATA del vector pGL3-PromotorB *SCN5A* i en la lisina K326 del vector pCGN-GATA4/HA es va fer per mutagènesi dirigida.

Per a generar les mutacions es va utilitzar el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis System® (Agilent Technologies), seguint les instruccions del fabricant. Aquest sistema permet introduir mutacions puntuals en vectors de doble cadena. En primer lloc es va realitzar una PCR a partir del vector WT, utilitzant una parella d'encebadors que incorporaven la mutació d'interès (**Taula 3**). Cadascun dels encebadors s'hibrida a una cadena del vector, i s'elonga el fragment incorporant la mutació, fins a replicar el vector complet i formar una molècula de DNA bicatenària. A continuació, es va fer un

tractament amb l'endonucleasa DpnI durant 1 hora a 37°C. Degut a que aquest enzim digereix específicament DNA metilat, permet eliminar el vector WT i només quedar-nos amb el que ha introduït la mutació.

El vector obtingut del procés de mutagènesi es va transformar en bacteris *E. Coli* XL10-Gold Ultracompetent Cells, que són els recomanats pel protocol de mutagènesi, seguint les instruccions del fabricant. A partir d'un cultiu de les cèl·lules transformades es va purificar el DNA plasmídic mitjançant una minipreparació (apartat 2.2.3.). Després de comprovar per seqüenciació Sanger que la mutació s'havia introduït correctament, es va fer una nova transformació en bacteris DH5α per a purificar el DNA mitjançant una maxipreparació (apartat 2.2.4.).

Per tal d'assegurar que el vector no havia introduït altres mutacions com a conseqüència d'errors de la polimerasa durant el procés de PCR, es va subclonar l'insert corresponent a la porció del DNA d'interès que contenia la mutació en el vector WT. Pel subclonatge, es van digerir ambdós vectors (el WT i el resultant de la mutagènesi dirigida) amb els mateixos enzims de restricció durant 1 hora a 37°C, els quals van permetre alliberar l'insert.

Els fragments de DNA resultants de la digestió es van separar en un gel d'agarosa. Les bandes corresponents a l'insert mutat i al vector WT lineariatzat es van purificar amb el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). La reacció de lligació dels dos fragments es va fer a una proporció 1:3 (vector:insert), amb 1 µL de l'enzim DNA lligasa (Thermo Fisher) i 1 µL del tampó DNA lligasa (Thermo Fisher), en un volum final de 10 µL que es va completar amb aigua. La reacció es va incubar en un bany de 16°C a la cambra de 4°C durant 16 hores.

Posteriorment, els bacteris *E. Coli* DH5α es van transformar amb 5 µL del producte de la lligació. Unes 5 colònies resultants de la transformació es van fer créixer per purificar els DNA plasmídics per minipreparacions. Després de

comprovar per seqüenciació Sanger que l'insert i el vector WT s'havien lligat correctament, el vector resultant es va transformar novament en bacteris *E. Coli* DH5 α per a obtenir DNA plasmídic mitjançant maxipreparació.

2.4. Experiments de transfecció

En aquest treball es van fer experiments de transfecció transitòria de DNA plasmídic o siRNA en cèl·lules H9c2 i HEK293T. El dia anterior a la transfecció, les cèl·lules es van sembrar a una concentració coneguda determinada amb el comptador Scepter™ 2.0. En cada experiment explicat en els apartats posteriors s'especifica la concentració de cèl·lules que es va sembrar en cada cas.

2.4.1 Transfecció de vectors d'expressió

Les transfeccions de vectors d'expressió en cèl·lules H9c2 i HEK293T es van dur a terme amb l'agent de transfecció Lipofectamine® 2000 (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), seguint les instruccions del fabricant. La Lipofectamine® 2000 és un lípid catiónic usat per a transfectar àcids nucleics en cèl·lules eucariotes. Aquest lípid és responsable de la formació de liposomes, gràcies a la interacció de les seves càrregues positives amb les càrregues negatives del DNA. El liposoma unit al DNA interacciona amb la membrana plasmàtica i té lloc un procés d'endocitosis, que permet l'entrada del DNA a l'interior de la cèl·lula.

Per a formar els liposomes es va utilitzar una proporció 1:2 de μ g de DNA: μ L de Lipofectamine® que es va incubar en el medi lliure de sèrum Opti-MEM (Sigma-Aldrich) durant 20 minuts. A continuació, aquesta mescla es va afegir sobre el cultiu cel·lular, que estava mantingut en medi DMEM sense antibiòtic. S'utilitza medi sense antibiòtic per evitar la possible toxicitat cel·lular ja que durant la transfecció augment la permeabilitat de les cèl·lules. Passades 6

hores de la transfecció, es va aspirar el medi de transfecció i es va renovar amb medi DMEM suplementat.

2.4.2. Transfecció de siRNA

Les transfeccions de siRNA es van dur a terme amb el reactiu de transfecció Dharmafect® (Thermo Scientific), seguint les instruccions del fabricant. El Dharmafect® és un lípid catiònic que interacciona amb els siRNA formant liposomes, els quals penetren a les cèl·lules per endocitosi.

Per a la transfecció es va utilitzar medi lliure de sèrum Opti-MEM i la concentració final dels siRNA en el cultiu de cèl·lules va ser de 25 nM. Les cèl·lules es van mantenir en medi DMEM sense antibiòtic fins passades 24 hores de la transfecció, i aleshores es va canviar per medi DMEM suplementat.

2.5. Determinació de l'activitat del promotor *SCN5A* i *PDX1* per assajos luciferasa

L'assaig luciferasa es basa en una reacció de bioluminescència catalitzada per l'enzim luciferasa. La reacció bioluminescent és un procés a partir del qual es produeix llum en organismes vius. Entre els organismes bioluminescents, les cuques de llum (en anglès conegudes com a *firefly*) són les més estudiades i més ben caracteritzades.

L'enzim luciferasa es pot sintetitzar al laboratori i s'utilitza com a gen reporter, ja que la seva expressió emet llum i, per tant, permet identificar-lo fàcilment. Una de les aplicacions més comunes de la luciferasa és en l'estudi de l'activitat d'una regió reguladora d'interès, per exemple d'un promotor o d'un *enhancer*. En aquests estudis es clona la seqüència de DNA reguladora d'interès controlant el gen de la luciferasa. D'aquesta manera, els nivells de

luciferasa dels lisats cel·lulars són indicatius de l'activitat transcripcional del promotor o *enhancer*.

En aquesta tesi, s'han dut a terme assajos luciferasa amb dos enzims reporters diferents: la luciferasa *firefly* i la luciferasa de renilla; els seus substrats sintètics són la luciferina i la coelenterazina, respectivament. Aquests enzims són proteïnes que no necessiten ser modificades posttraduccionalment per a ser actives i, per tant, poden funcionar com a gens reporters immediatament després de la seva traducció.

La reacció catalitzada per la luciferasa *firefly* es duu a terme en dues etapes: en un primer pas, la luciferina reacciona amb grups fosfats de l'ATP en presència de magnesi, i dóna lloc a adenilat de luciferina i pirofosfat (PP_i); en un segon pas l'adenilat de luciferina en presència d'oxigen molecular pateix una oxidació i descarboxilació donant lloc a l'oxiluciferina en un estat excitat (**Figura 24**). Quan l'oxiluciferina baixa a nivells d'energia inferiors dóna lloc a l'emissió d'un fotó de llum visible. En el cas de la luciferasa de renilla, la reacció té lloc en una sola etapa en què la coelenterazina reacciona amb l'oxigen molecular i dóna lloc a la coelenteramida. Quan la coelenteramida passa d'un estat excitat a un estat basal es desprèn llum.

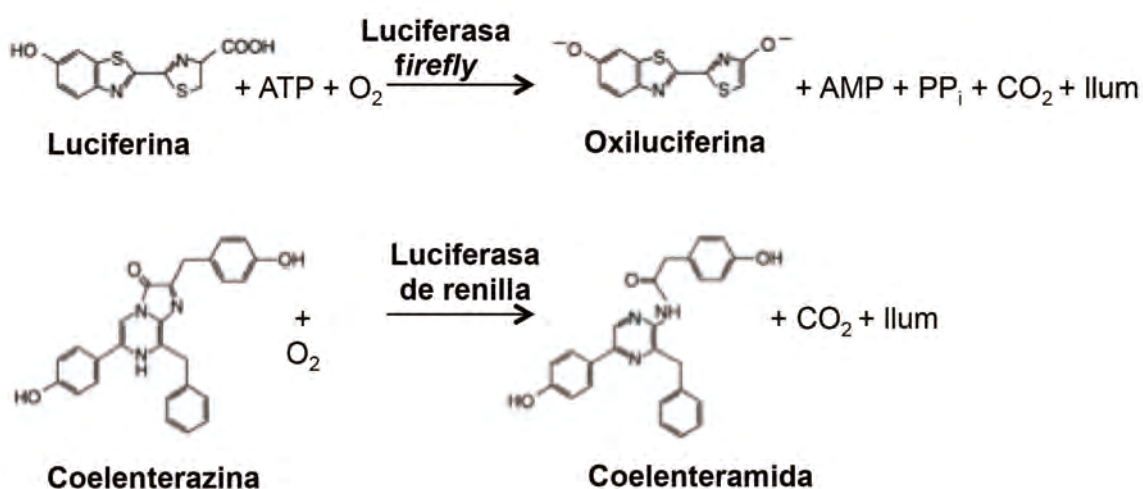


Figura 24. Reaccions de bioluminescència. Reacció bioluminescent catalitzada per la luciferasa *firefly* (panell superior) i per la luciferasa de renilla (panell inferior). Adaptada de Marques i Esteves da Silva 2009¹⁹¹.

Els assajos luciferasa d'aquest treball es van dur a terme per a avaluar l'activitat dels promotors d'*SCN5A* i *PDX1*. Cadascun dels promotors s'havia clonat en un vector reporter a 5' del gen de la luciferasa *firefly*. Així doncs, l'activitat enzimàtica de la luciferasa era proporcional a l'activitat del promotor d'estudi. A la vegada, les cèl·lules es van transfectar amb un constructe que contenia el gen de la luciferasa de renilla controlat pel promotor EF-1 α . L'activitat transcripcional del promotor EF-1 α es manté constant en el model cel·lular utilitzat (cèl·lules H9c2). És per això que els valors de renilla obtinguts es van utilitzar per a normalitzar els valors de luciferasa; d'aquesta manera s'eliminava la variabilitat entre rèpliques.

2.5.1. Transfecció de les cèl·lules

Les cèl·lules H9c2 i HEK293T es van sembrar en plaques de 6 pous a unes concentracions de 50.000 cèl·lules/mL i $1 \cdot 10^6$ cèl·lules/mL, respectivament, en un volum final de 2 mL. Per a l'estudi de l'activitat del promotor *SCN5A* es van utilitzar les H9c2, i per a l'estudi del promotor *PDX1* es van emprar les HEK293T. Després de 24 hores, les cèl·lules es van transfectar utilitzant l'agent de transfecció Lipofectamine® 2000, seguint el protocol explicat a l'apartat 2.4.1. Les quantitats que es van transfectar dels vector reporters eren: 200 ng dels vectors que contenien el gen reporter luciferasa (PromotorA-luciferasa, PromotorB-luciferasa o *PDX1*-luciferasa) i 20 ng del vector pEF-1 α -renilla. Es van transfectar també els vectors d'expressió de les proteïnes que es volien estudiar: GATA4, GATA5 o GATA6 (600, 1.200 o 1.800 ng, depenent de l'experiment); p300 (300 o 600 ng, depenent de l'experiment); HDAC (600 ng); HOPX (600 ng). En cada experiment la quantitat de DNA total es va ajustar amb el pcDNA3.1.

2.5.2. Preparació dels lisats cel·lulars

Passades 48 hores de la transfecció, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS. Seguidament, es van incubar amb 200 µL de tampó de lisi (Passive Lysis Buffer, Promega, Madison, WI, EUA) per pou durant 15 minuts a temperatura ambient en lleugera agitació. Els lisats es van recol·lectar amb un raspador de cèl·lules i es van transferir a tubs d'1,5 mL, els quals es va centrifugar durant 2 minuts a 16.000 g i a 4°C. El sobrenedant, que contenia les proteïnes solubles, es va recuperar en un nou tub, i el sediment, amb les proteïnes insolubles i les membranes cel·lulars, es va descartar. Les mostres es van mantenir en gel en tot moment.

2.5.3. Lectura de l'activitat luciferasa i renilla i anàlisi dels resultats

Per a determinar l'activitat luciferasa (produïda pel gen luciferasa *firefly*) i l'activitat renilla (produïda per la luciferasa de renilla) es va utilitzar el kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) i el luminòmetre GloMax-96 amb dos injectors. La lectura es va fer en plaques de 96 pous específiques per a aquest aparell, on es posaven 10 µL de mostra a cada pou. Una vegada situada la placa dins el luminòmetre, a cada pou s'injectava automàticament 50 µL del reactiu *Luciferase Assay Reagent* (Promega), per a detectar l'activitat luciferasa, i 50 µL del reactiu *Stop&Glo Reagent* (Promega), per a detectar l'activitat renilla.

Per a calcular l'activitat del promotor d'interès, els valors de luciferasa de cada mostra van ser normalitzats pels valors de renilla.

2.6. Expressió dels vectors d'expressió de GATA4, GATA5 i GATA6 en cèl·lules H9c2

Per tal de verificar que en els experiments de luciferasa els vectors d'expressió dels factors GATA4, GATA5 i GATA6 s'estaven expressant correctament es va realitzar un *western blot*.

2.6.1. Transfecció de les cèl·lules H9c2

Les cèl·lules H9c2 es van sembrar en plaques de 6 pous a una concentració de 50.000 cèl·lules/mL. Després de 24 hores, les cèl·lules es van transfectar amb 3 µg dels vectors d'expressió de GATA4, GATA5 o GATA6/Flag, utilitzant l'agent de transfecció Lipofectamine® 2000 (apartat 2.4.1.).

2.6.2. Preparació de l'extracte cel·lular

Al cap de 48 hores de la transfecció, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS fred. Les cèl·lules es van lissar incubant-les amb 200 µL per pou del tampó de lisi (**Taula 12**) suplementat amb inhibidor de proteases (Protease Inhibitors Cocktail, Roche, Madrid, Espanya), durant 30 minuts a 4°C en agitació. Els lisats de cèl·lules es van recollir amb un raspador de cèl·lules i es van transferir a tubs d'1,5 mL. Posteriorment, es van centrifugar 15 minuts a 16.000 g i a 4°C; el sobrenedant, que contenia les proteïnes, es va transferir a un nou tub, i el sediment es va descartar. La quantitat total de proteïna de cada lisat es va quantificar amb el mètode colorimètric PIERCE BCA Protein Assay Kit® (Thermo Fisher). La quantificació de la concentració de proteïna de cada mostra va permetre realitzar els càlculs necessaris per poder analitzar la mateixa quantitat de proteïna de cada condició en el gel d'acrilamida. Les mostres es van incubar amb el tampó de càrrega 6X (**Taula 12**) durant 5 minuts a 100°C, per tal de desnaturalitzar les proteïnes abans de carregar-les en el gel.

2.6.3. Electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

L'electroforesi en gels de poliacrilamida SDS-PAGE permet separar proteïnes carregades en funció del seu pes molecular quan es sotmeten a l'acció d'un camp elèctric. La interacció de les proteïnes amb els grups sulfats del dodecilsulfat sòdic (SDS), permet que les proteïnes quedin carregades negativament. D'aquesta manera, les proteïnes migren del càtode a l'ànode a una velocitat proporcional al seu pes molecular.

Primer es va preparar el gel d'acrilamida, que presenta dues fases (**Taula 13**):

- El gel separador (fase inferior) permet que les proteïnes migrin en funció del seu pes molecular. La mida del porus depèn de la mida de proteïnes que es vulguin analitzar, com més pes molecular tenen les proteïnes d'interès, més gran haurà de ser el porus, i viceversa. Per a analitzar els factors GATA es van fer servir gels separadors al 10% d'acrilamida.
- El gel d'apilament (fase superior) facilita que les proteïnes carregades es concentrin en bandes molt estretes i entrin al mateix temps al gel separador. Els porus d'aquest gel són de mida gran.

Els gels separador i d'apilament contenen persulfat amònic i N, N, N', N'-tetrametiletildiamina per permetre la seva polimerització. Una vegada preparat el gel, es van carregar les mostres als pous, es va submergir en un tampó d'electroforesi (**Taula 12**) i es va sotmetre a l'acció d'un camp elèctric generat per una font d'alimentació.

2.6.4. Western blot

Les proteïnes separades en l'electroforesi es van transferir a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF) amb el tampó de transferència (**Taula 12**) a 90 volts durant 2 hores a 4°C. Posteriorment, la membrana es va bloquejar

amb una solució de bloqueig (**Taula 12**) durant 1 hora a temperatura ambient en lleugera agitació. La membrana bloquejada s'incubà amb l'anticòs primari (α -GATA4, α -GATA5 o α -Flag; **Taula 6**) diluït en la solució de bloqueig, durant tota la nit a 4°C en agitació. L'endemà la membrana es va rentar tres vegades (dues amb una solució de PBS-Tween i una amb una solució de PBS, **Taula 12**). Aleshores, la membrana es va incubar amb un anticòs secundari conjugat amb peroxidasa, diluït en la solució de bloqueig, durant 1 hora a temperatura ambient i en agitació. Per a la detecció de GATA4 i GATA6 es va utilitzar l'anticòs secundari α -cabra, mentre que per a GATA5 es va emprar l'anticòs α -conill (**Taula 7**). Es van fer tres rentats de la membrana (dos amb la solució de PBS-Tween i un amb la solució de PBS) per tal d'eliminar l'anticòs secundari no unit.

Per a detectar la peroxidasa conjugada a l'anticòs secundari es va utilitzar el substrat quimioluminescent Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) o bé el SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific), en funció de la intensitat de les bandes de les proteïnes d'interès. Finalment, es procedí al revelat mitjançant l'exposició de la membrana en una pel·lícula d'autoradiografia.

Tampó	Composició
Tampó de lisi	50 mM Tris/HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40
Tampó de càrrega 6X	0,5 M Tris/HCl, pH 6.8; 30% glicerol; 10% SDS; 0,6 M DTT; 0,012% blau de bromofenol
Tampó d'electroforesi	1 g/L SDS; 28,8 g/L glicina; 6 g/L Tris/HCl pH 8,8
Tampó de transferència	1 g/L SDS; 11,13 g/L glicina; 2,42 g/L Tris/HCl pH 8,8; metanol 20%
Solució de bloqueig	5% llet desnatada en pols en una solució de PBS amb 0,1% de Tween-20
Solució de PBS	8 g/L NaCl; 0,2 g/L KCl; 1,44 g/L Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g/L KH ₂ PO ₄
Solució de PBS-Tween	Solució de PBS i 0,1% de Tween

Taula 12. Tampons per a electroforesi SDS-PAGE i *western blot*.

Gel separador	Gel d'apilament
10% Acrilamida:bisacrilamida 37,5:1	4% Acrilamida:bisacrilamida 37,5:1
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	0,5 M Tris/HCl pH 8,8
50 µl SDS 10%	25 µl SDS 10%
23 µl APS* solució al 10%	15 µl APS* solució al 10%
7,7 µl TEMED** solució (Sigma)	5 µl TEMED** solució (Sigma)
Aigua q.s.p. 5 ml	Aigua q.s.p. 2,5 ml

Taula 13. Gels d'acrilamida. *Persulfat amònic, ** N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina

2.7. Experiments de *knockdown* de GATA4

Els estudis de *knockdown* de GATA4 es van realitzar en cèl·lules H9c2 transfectades amb siRNA específics. L'efecte del *knockdown* de GATA4 sobre l'expressió del gen *SCN5A* es va estudiar a dos nivells: (1) examinant els nivells d'mRNA d'*SCN5A*, que es van determinar per qPCR; i (2) examinant l'activitat del promotor d'*SCN5A*, que es va estudiar amb assajos luciferasa.

2.7.1. Transfecció de cèl·lules H9c2 amb siRNA

Es van sembrar cèl·lules H9c2 en plaques de 6 pous a una concentració de 30.000 cèl·lules/mL. Les cèl·lules es van transfectar 24 hores més tard amb 25 nM de siRNA control (ON-TARGETplus Non-targeting Pool; Thermo

Scientific) o de siRNA GATA4 de rata (siGENOME siRNA Rat GATA4 amb número de catàleg D-090725-02 i D-090725-03; Thermo Scientific), amb l'agent de transfecció Darmaphect® (apartat 2.4.2). Es van utilitzar dos siRNA de GATA4 diferents per a confirmar els resultats.

2.7.2. Anàlisi dels nivells d'mRNA d'*SCN5A* per qPCR

2.7.2.1. Extracció de l'RNA

Al cap de 48 hores de transfectar els siRNA, es va fer una extracció de l'RNA total de les cèl·lules H9c2 amb el kit RNeasy Mini Kit® (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Es va fixar aquest temps ja que després de realitzar diferents proves a 24, 48 i 72 hores després de la transfecció, es va observar que a 48 hores era quan es produïa una reducció més eficient de GATA4. En el protocol d'extracció de l'RNA es va incloure un tractament amb DNasa I, per evitar la contaminació de DNA genòmic que pogués restar a la mostra. La concentració i la qualitat de l'RNA es van analitzar amb el NanoDrop-1000.

2.7.2.2. Transcriptasa inversa i qPCR

La transcripció inversa es va realitzar a partir d'1 µg d'RNA utilitzant el QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen). El cDNA obtingut es va analitzar per qPCR amb els encebadors de rata (*SCN5A*, *GATA4*, *KCNH2*, *ANP* i β -*ACTINA*; **Taula 4**). La química emprada en la qPCR es va basar en la detecció de la fluorescència emesa pel reactiu SYBR Green (Kapa SYBR® Fast qPCR Kit, Wilmington), el qual s'uneix inespecíficament al DNA de doble cadena dels productes de PCR. La intensitat de fluorescència emesa és proporcional a la quantitat de producte amplificat en cada cicle. La qPCR es va realitzar en un termociclador Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hauppauge, NY, EUA) i es va utilitzar el programa informàtic RealPlex per a l'anàlisi de les dades.

Els nivells d'expressió de les mostres es van quantificar pel mètode del delta-delta Ct. Aquest mètode permet fer una quantificació relativa respecte a un gen constitutiu (en aquest treball es va utilitzar el gen de la *β-actina*)¹⁹². El valor de *cycle threshold* (Ct) és el nombre de cicles necessaris per a produir una intensitat de fluorescència llindar, per tant, aquest valor és inversament proporcional a la quantitat de cDNA inicial. Els passos que es van seguir per a quantificar els nivells d'mRNA dels gens analitzats són els següents:

1) De cada mostra (siRNA control i siRNA GATA4), es va restar el Ct del gen d'interès (*SCN5A*, *GATA4*, *KCNH2* o *ANP*) amb el Ct del gen constitutiu (*β-ACTINA*).

$$\Delta Ct = Ct [\text{gen interès}] - Ct [\beta\text{-actina}]$$

2) Per cada gen d'interès, es va restar el valor ΔCt de les mostres transfectades amb siRNA control amb el valor ΔCt de les mostres transfectades amb siRNA GATA4.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct [\text{siRNA control}] - \Delta Ct [\text{siRNA GATA4}]$$

3) Els nivells d'expressió relativa es van obtenir aplicant la fórmula següent:

$$\text{Expressió relativa} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

2.7.3. Anàlisi de l'activitat del promotor d'*SCN5A* per assaig luciferasa

Primer es va fer una transfecció dels siRNA com es detalla a l'apartat 2.7.1. Al cap de 24 hores, les cèl·lules H9c2 es van transfectar amb el PromotorA-luciferasa i pEF-1 α -renilla seguint el protocol descrit a l'apartat 2.4.1. Finalment, 24 hores després de la transfecció amb els vectors reporters i 48 hores després de la transfecció amb els siRNA es van lissar les cèl·lules i es va determinar l'activitat luciferasa i renilla (apartats 2.5.2. i 2.5.3.).

2.8. Tractament amb fenilefrina

Les cèl·lules H9c2 es van sembrar en plaques de 6 pous a una concentració de 50.000 cèl·lules/mL en medi DMEM suplementat. L'endemà es va canviar el medi per medi Opti-MEM, i es va afegir una solució filtrada de fenilefrina en aigua per a obtenir una concentració de 30 μ M de fenilefrina a cada pou. Les cèl·lules es van incubar 24 hores més, i aleshores es va extreure l'RNA total de les cèl·lules (apartat 2.7.2.1.). A partir del cDNA obtingut per transcriptasa inversa es va realitzar la qPCR per a analitzar els nivells d'mRNA dels gens *SCN5A* i *GATA4* (usant β -*ACTINA* com a gen constitutiu), seguint el protocol descrit a l'apartat 2.7.2.2.

2.9. Eines bioinformàtiques

Es van utilitzar els recursos bioinformàtics TFSearch i MEME per identificar potencials llocs d'unió dels factors GATA en la regió de -1.125 a +857 pb respecte al TSS del gen *SCN5A* humà. La regió analitzada comprèn part de la regió 5'UTR, el promotor, l'exó 1 i una part de l'intró 1.

Es van realitzar estudis d'alineament de seqüències amb l'eina bioinformàtica UCSC Genome Browser. Aquesta eina es va fer servir per a determinar la conservació entre espècies dels motius GATA-A i GATA-B de l'intró 1 identificats en aquesta tesi.

2.10. Registre de corrent de Na⁺ en oòcits de *Xenopus*

Els estudis electrofisiològics, realitzats pel Dr. Thomas Zimmer a la Universitat de Jena, van consistir en mesurar el corrent de Na⁺ en oòcits de *Xenopus* que prèviament havien estat injectats amb el transcrit sintètic (cRNA) del gen *SCN5A*. El cRNA es va obtenir per transcripció *in vitro* del gen *SCN5A* utilitzant el kit mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription® (Life Technologies). La concentració del cRNA es va determinar amb

l'espectròmetre NanoDrop-1000 i es va comprovar per electroforesi en un gel d'agarosa. Dilucions creixents del cRNA d'*SCN5A* (0,00004; 0,0002; 0,001; 0,004; 0,01; 0,02 µg/µL) es van injectar en oòcits de *Xenopus*, usant micropipetes de vidre. Després d'incubar-los 3 dies a 18°C, els oòcits de quatre sèries –cada sèrie es refereix als oòcits obtinguts del mateix animal– van ser analitzats per mètodes electrofisiològics.

El corrent de Na⁺ dels oòcits es va registrar amb la tècnica de *patch clamp* en el mode *whole cell voltage clamp*. Els oòcits van ser sotmesos a polsos de voltatge de -80 a +40 mV, en increments de 5 mV, i el corrent va ser determinat a un voltatge de -20 mV. Es va utilitzar una micropipeta de vidre amb un microelectrode a l'interior que es va posicionar a la membrana de l'oòcit mitjançant un micromanipulador i observant des d'un microscopi. Quan la micropipeta estava en contacte amb la membrana cel·lular es va aplicar una succió a l'interior de la micropipeta per a produir un segell entre ambdues. Seguidament, aplicant una altra succió es va trencar la membrana cel·lular on s'havia produït el segell i aquesta ruptura va permetre que la solució intracel·lular entrés en contacte amb una solució de 3 M de KCl continguda dins la micropipeta. Mentre es realitzava la tècnica del *patch clamp*, les cèl·lules es van mantenir en una solució de bany amb la composició següent: 20 NaCl mM, 2 KCl mM, 1,8 CaCl₂ mM, 10 mM Hepes/KOH, a pH 7,2. La composició de les solucions de la micropipeta i del bany són semblants a les condicions iòniques fisiològiques intracel·lulars i extracel·lulars, respectivament, però permeten aïllar el corrent de Na⁺.

2.11. Experiments d'immunoprecipitació: estudi de la interacció entre GATA4 i GATA5 i dels nivells d'acetilació de GATA4

La immunoprecipitació és una tècnica que permet estudiar interaccions entre proteïnes. En un primer pas s'aïlla la proteïna d'interès 1 de l'extracte cel·lular

amb un anticòs específic. A continuació el material immunoprecipitat s'analitza per *western blot* amb un anticòs específic contra la proteïna 2. Si existeixi interacció, la proteïna 2 es podrà detectar. La immunoprecipitació també s'utilitza per l'estudi de modificacions posttraduccional. En aquest cas, un dels anticossos és contra la proteïna d'interès i l'altre contra la modificació posttraduccional d'estudi.

En aquest treball, els experiments d'immunoprecipitació es van realitzar per a estudiar els aspectes següents:

- La interacció entre GATA4 i GATA5
- L'acetilació de la lisina K326 de GATA4
- L'acetilació de GATA4 en presència de p300, HDAC2, HDAC4 o HDAC5

2.11.1. Transfecció de cèl·lules HEK293T

Les cèl·lules HEK293T es van sembrar en plaques de 10 cm² a una concentració de 10⁶ cèl·lules/mL i al cap de 24 hores es van transfectar amb Lipofectamine® 2000 (apartat 2.4.1.).

Per a estudiar la interacció entre GATA4 i GATA5 es van transfectar els vectors d'expressió de les proteïnes GATA4/HA (7,5 µg) i GATA5 (7,5 µg). Es van preparar dues condicions controls, una únicament transfectada amb GATA/HA, i l'altra sense cap dels dos FT GATA, però en ambdós casos es va igualar la quantitat de DNA transfectat amb el pcDNA3.1 fins a arribar a 15 µg de DNA total.

Per a examinar l'acetilació de la lisina K326 de GATA4 es van transfectar 10 µg del vector d'expressió GATA4/HA o GATA4-K326A/HA, el qual tenia la lisina K326 mutada a alanina, 24 hores després de la transfecció, les cèl·lules es van tractar amb els inhibidors de desacetilases TSA (Sigma) a 400 nM i Nicotinamida (NA; Sigma) a 5mM, i es van deixar incubant 24 hores més.

Per a determinar l'efecte de p300, HDAC2, HDAC4 o HDAC5 sobre l'acetilació de GATA4 es van transfectar els vectors d'expressió següents: 10 µg de GATA4/HA, 10 µg de p300 i 7 µg de HDAC2, HDAC4 o HDAC5; i el DNA total es va ajustar a 27 µg amb pcDNA3.1.

2.11.2. Preparació de l'extracte cel·lular

Les cèl·lules transfectades en els tres experiments es van lissar seguint el protocol descrit en l'apartat 2.6.2. Cadascun dels lisats van ser analitzats amb el kit PIERCE BSA Protein Assay per a determinar-ne la concentració de proteïna. Per cada condició d'immunoprecipitació es van utilitzar 1,5 mg de proteïna total i, d'aquests, un 1% es va fer servir com a input (mostra sense immunoprecipitar). Els inputs es van congelar fins a ser utilitzats com a control en el *western blot*.

2.11.3. Immunoprecipitació

La immunoprecipitació es va realitzar amb la proteïna A-sefarosa (GE Healthcare) prèviament hidratada. Per a hidratar-la, primer es va incubar amb PBS durant 15 minuts a temperatura ambient; seguidament es va centrifugar 1 minut a 1.300 rpm i es va eliminar el sobrenedant. El sediment de proteïna A obtingut es va resuspendre amb tres volums de PBS. D'aquesta suspensió se'n van utilitzar 50 µL per cada condició d'immunoprecipitació, que es van rentar cinc vegades amb 500 µL de tampó de lisi (**Taula 12**) durant 5 minuts. Després de cada rentat es van centrifugar 5 minuts a 300 g i 4°C, i es va eliminar el sobrenedant. A continuació, s'hi va afegir el lisat corresponent a 1,5 mg de proteïna, i es van ajustar totes les mostres al mateix volum amb el tampó de lisi. Aleshores es va afegir l'anticòs d'interès: per a detectar la interacció entre GATA4 i GATA5 es va utilitzar l'anticòs α-HA, mentre que per a detectar l'acetilació de GATA4 es va emprar l'anticòs α-lisines acetilades (**Taula 6**). Després de la incubació amb l'anticòs tota la nit a 4°C en agitació, es van fer cinc rentats de les mostres amb 500 µL de tampó de lisi durant 5

minuts a 300 g i 4°C, eliminant el sobrenedant després de cada rentat. Les proteïnes immunoprecipitades es van extreure de la proteïna A-sefarosa per desnaturalització incubant-les amb 30 µL de tampó de càrrega 6X (**Taula 12**) durant 5 minuts a 100°C i, posteriorment, es van centrifugar 5 minuts a 16.000 g i 4°C. Els inputs es van descongelar, es van resuspendre amb el tampó de càrrega 6X i es van incubar 5 minuts a 100°C.

2.11.4. Electroforesi SDS-PAGE i *western blot*

Per a l'electroforesi i el *western blot* es va seguir el protocol descrit en els apartats 2.6.3. i 2.6.4. Per al *western blot* es van utilitzar com a anticossos primaris l'anticòs α -GATA5, en el cas de l'estudi d'interacció entre GATA4 i GATA5, i l' anticòs α -GATA4, en els estudis d'acetilació de GATA4 (**Taula 6**). Per a detectar GATA5 i GATA4 es van utilitzar els anticossos secundaris α -conill i α -cabra, respectivament (**Taula 7**).

2.12. Assajos d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP) i d'immunoprecipitació seqüencial de cromatina (Re-ChIP)

El ChIP és un dels millors mètodes per a estudiar, en condicions *in vivo*, la unió de FT i la presència d'histones modificades a la cromatina. Per tant, resulta molt útil per a mapar les interaccions proteïna-DNA que es donen en el genoma. Els primers estudis de ChIP van ser realitzats per Glimour D. i Lis J. el 1984, per a observar la distribució *in vivo* de l'RNA polimerasa en determinats gens bacterians¹⁹³. Els assajos de Re-ChIP són una variant del ChIP que permeten determinar la presència simultània de dues proteïnes en una mateixa regió del genoma. Aquesta tècnica es basa en el fet que sovint les proteïnes s'associen al DNA formant complexos multiproteics.

En aquest treball es van realitzar experiments de ChIP i Re-ChIP per a estudiar la interacció *in vivo* dels FT GATA cardíacs en el gen *SCN5A*. Per a aconseguir-ho es van utilitzar mostres de teixit cardíac humà corresponent al

ventricle esquerre. Els protocols de ChIP i Re-ChIP que es van utilitzar es van adaptar de Gomes *et al*¹⁹⁴ i de Furlan-Magaril *et al*¹⁹⁵, respectivament.

El ChIP consisteix principalment en quatre etapes: fixació de les proteïnes al DNA, sonicació de la cromatina, immunoprecipitació de la cromatina i anàlisi del DNA immunoprecipitat (**Figura 25A**). L'única diferència amb el Re-ChIP és que aquest presenta dues immunoprecipitacions seqüencials de la cromatina (**Figura 25B**). Una de les tècniques més utilitzades avui en dia per a l'anàlisi del DNA immunoprecipitat és la seqüenciació massiva mitjançant tècniques de *Next Generation Sequencing*. D'aquesta manera es permet analitzar la unió de les proteïnes d'interès en tot el genoma, mètode conegut com a ChIP-Seq. No obstant això, en aquest treball no s'ha pogut realitzar ChIP-Seq, ja que no es disposava de suficient quantitat de mostra a causa de la dificultat d'obtenir mostres de cor humanes. Com a alternativa a la seqüenciació massiva, es va utilitzar la qPCR per a analitzar diferents regions del gen *SCN5A* mitjançant encebadors específics.

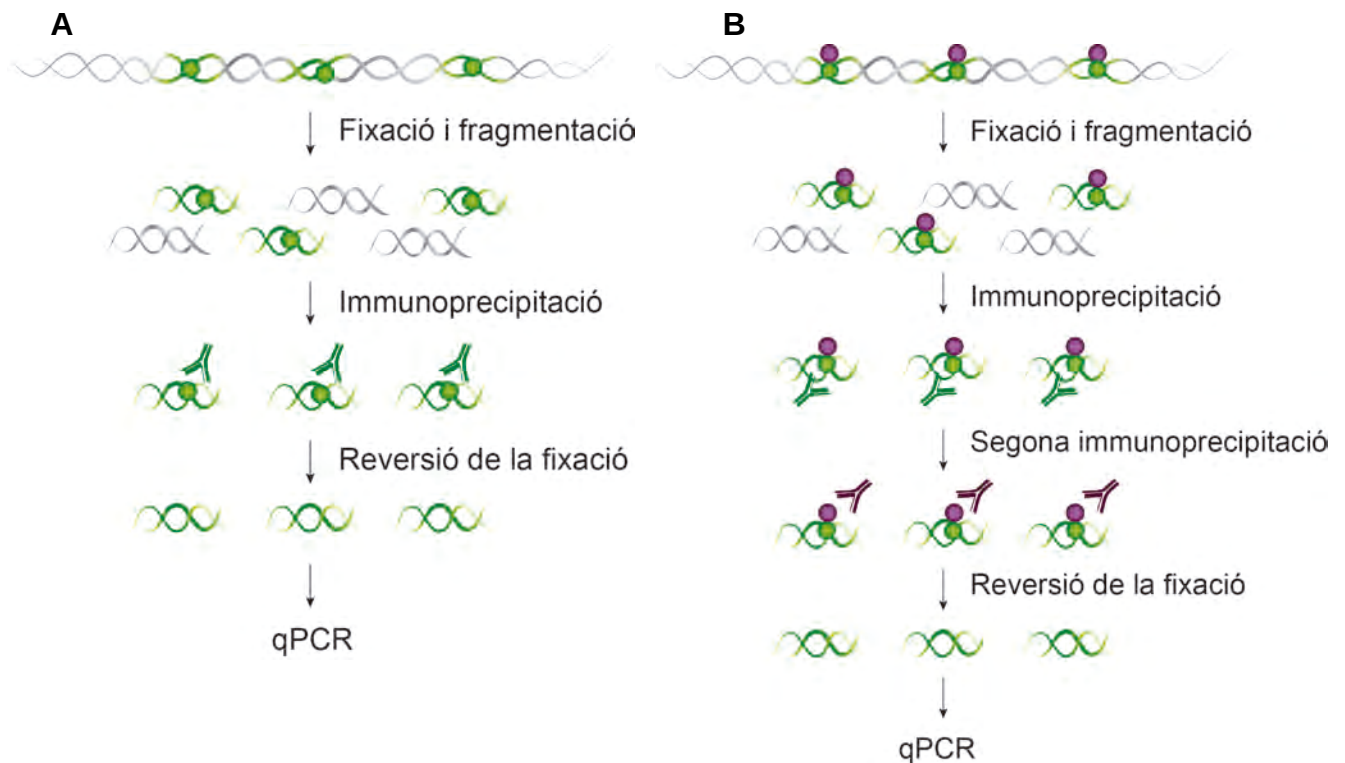


Figura 25. Protocol dels experiments de ChIP i Re-ChIP. **A.** Protocol de ChIP. En verd es marca una proteïna unida al DNA i l'anticòs específic d'aquesta. **B.** Protocol de Re-ChIP. En verd i en lila es marquen dues proteïnes unides al DNA formant un complex, i els anticossos específics d'aquestes.

2.12.1. ChIP

2.12.1.1. Fixació de les proteïnes al DNA

Les mostres de ventricle esquerre d'humà adult, conservades a -80°C , es van descongelar i es van tallar amb un bisturí en fragments de 100 mg, sempre mantingudes en gel. Els fragments es van tallar en peces més petites, per a assegurar que les solucions accedissin a tot el teixit, i es van conservar en tubs de 1,5 mL.

Les proteïnes es van fixar al DNA amb 500 μL de la solució de *cross-linking* (**Taula 14**) prèviament suplementada amb 5mM de butirat sòdic i inhibidors de proteases, durant 10 minuts a temperatura ambient i en una plataforma

rotatòria. Per aturar la reacció es van afegir 55 µL d'una solució al 1,25 M de glicina, durant 5 minuts a temperatura ambient i en agitació ocasional. Les mostres fixades es van rentar dues vegades amb 500 µL de PBS fred, i es van centrifugar 1 minut a 100 g i 4°C després de cada rentat. Seguidament, es va disgregar el teixit amb un homogeneïtzador de vidre tipus Dounce amb 1 mL de PBS fred, mantenint les mostres en gel. Una vegada disgregat el teixit, es va centrifugar 1 minut a 100 g i 4°C. El sediment cel·lular obtingut es va resuspendre en 6 volums de tampó de lisi per a ChIP (**Taula 14**) suplementat amb inhibidor de proteases, i es va incubar 15 minuts en gel. Aquest tampó permet trencar les membranes de les cèl·lules, deixant els nuclis intactes. Les mostres es van centrifugar 10 minuts a 400 g i 4°C, i, després de descartar el sobrenedant, es va resuspendre el sediment, que contenia els nuclis, amb 200 µL del tampó Szak's RIPA (**Taula 14**), suplementat amb inhibidor de proteases, 50 mM de fluorur sòdic, 5 mM de butirat sodi i 0,5 mM d'AEEDF. Posteriorment, el sediment es va incubar 5 minuts en gel. D'aquesta manera els nuclis es van lissar i es va obtenir una solució de cromatina.

2.12.1.2. Sonicació de la cromatina

La cromatina es va sonicar per a obtenir fragments entre 500 i 1.000 pb, que és la mida òptima perquè els anticossos puguin immunoprecipitar els fragments de cromatina i els encebadors es puguin hibridar correctament amb la seqüència de DNA. La sonicació es va realitzar amb el Bioruptor® NGS (Diagenode, Liège, Bèlgica) seguint un protocol de 30 cicles, en què cada cicle consta de 30 segons ON/30 segons OFF, a una freqüència alta. El Bioruptor® produeix la fragmentació de la cromatina gràcies a ultrasons generats a través d'un bany d'aigua mantingut a 4°C. Abans de seguir endavant amb el protocol es va comprovar la mida dels fragments i la qualitat del DNA amb l'equip 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Les mostres sonicades es van centrifugar 10 minuts a 1.400 g i 4°C, per tal de sedimentar les restes nuclears i només seleccionar el sobrenedant, el qual contenia la cromatina fragmentada. El sobrenedant es va transferir a un nou tub, i se'n va separar un 2% per a ser utilitzat com a input (cromatina sense immunoprecipitar). Els inputs es van resuspendre amb el tampó d'elució Tailandis 1X (**Taula 14**) fins a un volum final de 250 µL, i després es van congelar a -20°C fins a la seva utilització.

2.12.1.3. Immunoprecipitació de la cromatina

La immunoprecipitació de la cromatina es va fer utilitzant la proteïna G magnètica. L'avantatge d'aquesta proteïna G és que permet capturar-la amb una gradeta magnètica (DynaMag™-2 Magnet, Thermo Fisher Scientific). En un primer pas, per cada mostra es van rentar 20 µL de proteïna G amb tampó Szak's RIPA durant 5 minuts a 4°C en una plataforma rotatòria. A continuació, la proteïna G es va bloquejar amb 500 µL de la solució de bloqueig per ChIP (**Taula 14**) durant 1 hora a 4°C en una plataforma rotatòria, per tal d'evitar que la proteïna G s'unís inespecíficament a la cromatina. Paral·lelament, es va fer el preacleriment de les mostres de cromatina incubant-les amb 20 µL de proteïna G magnètica (prèviament rentada dues vegades amb tampó Szak's RIPA) durant 1 hora a 4°C en una plataforma rotatòria, per a eliminar les unions inespecífiques en absència de l'anticòs. Un vegada bloquejada la proteïna G, es va rentar dues vegades amb tampó Szak's RIPA. Aleshores s'hi va afegir la mostra de cromatina preaclerida i 5 µg de l'anticòs d'interès (α-GATA4, α-GATA5 o α-GATA6; **Taula 6**), i es va incubar tota la nit a 4°C en rotació. Acabada la incubació, la proteïna G es va rentar amb 500 µL dels tampons següents amb incubacions de 5 minuts a 4°C en rotació: dues vegades amb el tampó Szak's RIPA, quatre vegades amb el tampó de rentat (**Taula 14**), dues vegades amb el tampó Szak's RIPA i dues vegades amb TE 1x. Per a eluir els immunocomplexos es va incubar la proteïna G amb el tampó d'elució Tailandis 1X (**Taula 14**) durant 10 minuts a 65°C. Després de

capturar la proteïna G amb la gradeta magnètica, es va recollir el sobrenedant, que contenia la cromatina eluïda, i es va transferir a un nou tub.

En aquest punt del protocol es van descongelar els inputs de -20°C i a partir d'aquí van seguir el mateix tractament que els immunoprecipitats. Les mostres es van incubar 1 hora a 37°C amb 1 µg RNAasa (Qiagen; per a reduir el soroll de fons causat per l'RNA) i 100 µg de Proteinasa K (5 Primer; per a digerir les proteïnes i d'aquesta manera augmentar l'eficàcia de la purificació del DNA). A continuació, es va revertir la fixació de les proteïnes al DNA amb 200 mM de NaCl durant 5 hores a 65°C.

2.12.1.4. Purificació del DNA i qPCR

Del material immunoprecipitat, se'n va purificar el DNA amb el kit NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up (Macherey-Nagel), seguint el protocol de PCR Clean-up, i seguidament es va quantificar amb el NanoDrop-1000. El DNA immunoprecipitat es va analitzar per qPCR utilitzant encebadors específics per múltiples regions del gen *SCN5A* humà (**Taula 5**).

Els resultats obtinguts de la qPCR es van analitzar seguint el mètode del percentatge d'input. Aquest mètode consisteix a relativitzar els valors de Ct obtinguts en les mostres de ChIP pel seu corresponent input. Per al càlcul es van seguir els passos següents:

- 1) Es va ajustar el valor de Ct dels inputs tenint en compte el factor de dilució. La fracció d'input que es va utilitzar era el 2% de la cromatina de partida, per tant, el factor de dilució era 50. Així, l'input ajustat es va calcular amb la fórmula següent:

$$\text{Ct input ajustat} = \text{Ct input} - \text{Log}_2 50$$

2) Finalment, per a calcular el percentatge d'input es va aplicar la fórmula següent:

$$\% \text{ input} = 100 \times 2^{(\text{Ct input ajustat} - \text{Ct IP})}$$

2.12.2. Re-ChIP

Tal com s'ha explicat anteriorment, el Re-ChIP consta de dues immunoprecipitacions seqüencials de la cromatina. En aquest treball, el Re-ChIP es va utilitzar per a estudiar si GATA4 interacciona amb altres factors de transcripció GATA cardíacs al gen *SCN5A*.

Les etapes del protocol de ReChIP són les mateixes que per al protocol de ChIP fins al moment de la incubació de la cromatina amb l'anticòs –en aquest cas es va utilitzar l' α -GATA4 (**Taula 6**)–. Després de la incubació, la proteïna G es va rentar dues vegades amb el tampó Szak's RIPA i, a continuació, es van eluir els immunocomplexos incubant dues vegades les mostres amb 75 μ L de dithiothreitol (DTT) 10 mM, durant 15 minuts a temperatura ambient. Per a evitar els efectes del DTT en la funció de l'anticòs secundari, els eluïts es van diluir deu vegades amb el tampó Szak's RIPA. La segona immunoprecipitació es va dur a terme incubant els eluïts amb 20 μ L de la proteïna G prèviament pre-bloquejada i 5 μ g d'anticòs α -GATA4, α -GATA5 o α -GATA6, durant tota la nit a 4°C. Els rentats posteriors a la incubació i els passos següents (purificació del DNA i qPCR) són els mateixos que per al protocol de ChIP.

Tampó	Composició
Solució de <i>cross-linking</i>	1% de formaldehid (Sigma) en PBS
Tampó de lisi per ChIP	5 mM PIPES pH8, 85 mM KCl, 0.5% NP40
Tampó Szak's RIPA	150 mM NaCl; 1% v/v Nonidet P-40%; 0,5% w/v deoxycholate; 0,1% w/v SDS; 50 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA
Tampó de rentat	100 mM Tris/HCl pH 8.5; 500 mM NaCl; 1% v/v Nonidet P-40; 1% w/v deoxycholic acid
Tampó d'elució Tailandis	70 mM Tris HCl pH8; 1 mM EDTA; 1,5% w/v SDS
Solució de bloqueig per a ChIP	0,3 mg/mL de DNA d'esperma de salmó (Sigma) i 1 mg/mL d'albumina de sèrum boví (Sigma) en tampó Szak's RIPA

Taula 14. Tampons per a ChIP i Re-ChIP

2.13. Estudi de l'expressió dels factors GATA cardíacs en el cor humà

L'expressió dels factors GATA en el cor humà es va estudiar a nivell d'mRNA (per qPCR i ddPCR), i a nivell de proteïna (per *western blot*).

2.13.1. Anàlisi dels nivells d'mRNA

Es va aïllar l'RNA total d'una mostra de 30 mg de ventricle esquerre amb el RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit® (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Per a evitar contaminació amb DNA genòmic es va incloure un tractament amb DNasa I. La concentració i la qualitat de l'RNA es va analitzar amb el NanoDrop-1000. Seguidament, es va obtenir el cDNA per transcriptasa inversa d'1 µg d'RNA total utilitzant el QuantiTect Reverse Transcription Kit® (Qiagen).

Per a l'anàlisi amb qPCR es va seguir el protocol descrit en l'apartat 2.7.2.2. Es van utilitzar encebadors d'humà prèviament validats (*GATA4*, *GATA5*, *GATA6*) i els resultats es van analitzar pel mètode del delta-delta Ct utilitzant *GAPDH* com a gen constitutiu.

L'anàlisi amb Droplet Digital PCR (ddPCR) es va realitzar al laboratori del Dr. Ivan Garcia-Bassets a la Universitat de Califòrnia, San Diego (UCSD). La ddPCR és un mètode molt precís que permet una quantificació absoluta de la concentració de DNA. L'equip de ddPCR que es va utilitzar era el QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) amb el software QuantaSoft (Bio-Rad). L'equip consta d'un generador de gotes i d'un lector de fluorescència. La reacció de ddPCR es va dur a terme amb 20 µL totals, els quals contenien la Supermix de ddPCR 1x, 250 nM de sonda marcada amb un fluorocrom del gen d'estudi (*GATA4-FAM*, *GATA5-FAM*, *GATA6-FAM* o *SCN5A-FAM*), 250 nM de la sonda marcada amb un fluorocrom del gen de referència (*GAPDH-HEX* o *GATA4-HEX*), 900 nM dels encebadors comercials específics i 1 µL de cDNA, d'acord amb les recomanacions del fabricant (tots els components eren de Bio-Rad). A continuació, la reacció es va transferir al sistema generador de gotes, el qual mitjançant la presència d'oli divideix la mostra en milers de gotes de tipus emulsió aigua-oli. De cada mostra, es van traspasar 40 µL de les gotes formades a una placa especial per a l'equip de la ddPCR, i es va portar a terme la PCR en un termociclador. Les condicions de PCR eren les següents: 10 minuts a 95°C, 40 cicles de 30 segons a 94°C i 1 minut a 60°C, i 10 minuts a 98°C. Finalment, es va llegir la placa al lector de fluorescència. La fluorescència, que ve donada pels fluorocroms FAM i HEX de les sondes, permet determinar la quantitat de DNA del gen d'interès respecte al gen de referència.

2.13.2. Anàlisi de proteïnes

Per a obtenir proteïnes solubles del cor humà, es va disgregar aproximadament 0,5-1 g de mostra de ventricle esquerre humà amb un morter en nitrogen líquid. A continuació, les mostres es van resuspendre en tampó de lisi (**Taula 12**) i es van homogeneïtzar amb el Polytron (Kinematica), mantenint sempre les mostres en gel. L'homogeneïtzat obtingut es va centrifugar 15 minuts a 16.000 g i 4°C, i el sobrenedant, que contenia les proteïnes solubles, es va analitzar per electroforesi SDS-PAGE i *western blot* (apartats 2.6.4 i 2.6.5). Es van emprar els anticossos primaris α -GATA4, α -GATA5, α -GATA6 i α -ACTINA (**Taula 6**). Per a detectar GATA4 i GATA6 es va utilitzar un anticòs secundari α -cabra, mentre que per a la detecció de GATA5 i α -ACTINA es va emprar un anticòs α -conill (**Taula 7**).

2.14. Immunofluorescència de mostres de cor de ratolí

La immunofluorescència és la detecció *in situ* d'una proteïna en una cèl·lula o teixit, mitjançant la utilització d'anticossos units químicament amb fluorocroms. La reacció antígen-anticòs es pot visualitzar posteriorment amb un microscopi de fluorescència. En aquest treball es van emprar seccions de ventricle de ratolins sans, prèviament congelats, i es va immunodetectar la proteïna GATA5.

2.14.1. Preparació de la mostres de cor de ratolí

Les mostres provenen de ratolins adults de la soca B6D2F1/OlaHsd (Harlan Laboratories). Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical i, una vegada extret el cor, aquest es va tallar a l'altura de les papil·les musculars per tal d'aïllar-ne els ventricles. Posteriorment, el teixit ventricular es va fixar amb la solució de fixació (**Taula 15**) a 4°C i en agitació durant tota la nit, per tal de conservar les estructures del teixit. Després de diversos rentats amb aigua destil·lada, el teixit ventricular es va incubar amb una solució de

sacarosa (**Taula 15**) durant tota la nit a 4°C. Aquesta solució serveix per a igualar l'osmolaritat del teixit amb la del medi que s'utilitzarà en el pas següent. Les mostres es van impregnar amb el medi Tissue-Tek O.C.T. (*Optimum Cutting Temperature*; VWR, Radnor, PA, EUA), que és una formulació de glicols i resines solubles amb aigua que proporciona les condicions idònies al teixit per a ser tallat posteriorment amb el criòstat. El teixit es va congelar amb isopropanol prèviament refredat amb nitrogen líquid. Un cop congelat, es va tallar en seccions transversals amb un criòstat CM3050S (Leica, Barcelona, Espanya) i es van col·locar en un portaobjectes Superfrost plus (Thermo Scientific). Les mostres es van conservar a -80°C fins a la seva utilització.

2.14.2. Immunodetecció de GATA5

Les mostres de teixit es van descongelar 5 minuts a temperatura ambient. Aleshores es van rentar tres vegades amb PBS pH 7,4 (Gibco) durant 3 minuts en lleugera agitació, submergides en una cubeta de vidre, anomenada *coplin*, que contenia un suport per a col·locar els portaobjectes (en tots els rentats del protocol realitzats d'ara endavant es van seguir aquestes condicions). Després dels rentats es va utilitzar un bloquejador líquid per a crear una barrera hidrofòbica al voltant del teixit, impedit d'aquesta manera la pèrdua dels reactius que s'hi van afegir posteriorment. Les mostres es van bloquejar amb 100 µL de solució de bloqueig (**Taula 15**) durant 1 hora en fosc en una cambra humida. La presència de sèrum en aquesta solució permet bloquejar les unions inespecífiques del teixit amb les immunoglobulines. A continuació, es van incubar les mostres amb 100 µL de l'anticòs primari α-GATA5 (**Taula 6**), diluït a 1:50 en la solució de bloqueig, tota la nit a 4°C a la cambra humida. L'endemà, després de rentar tres vegades les mostres amb PBS, es procedí a la incubació amb 100 µL de l'anticòs secundari, i es deixà 1 hora a temperatura ambient en la cambra humida. L'anticòs secundari usat era un anti-conill conjugat amb el fluorocrom

CY3 (**Taula 7**), que dóna fluorescència vermella, a una dilució 1:400 en la solució de bloqueig. Aleshores es va realitzar la tinció dels nuclis, afegint directament sobre l'anticòs secundari 100 µL d'una solució de 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorur (DAPI; Sigma-Aldrich) diluït amb solució de bloqueig a una concentració final de 5 µg/mL, durant 10 minuts a temperatura ambient. A continuació es van fer quatre rentats més de PBS. Finalment, s'afegiren 100 µL del medi de muntatge aquós Fluoromount (Sigma-Aldrich) amb l'ajut d'un cobreobjectes. Les mostres es van conservar a 4°C fins a la seva observació amb el microscopi làser confocal espectral (NIKON A1R).

Solució	Composició
Solució de fixació	paraformaldehid al 4% (p/v) en PBS (pH 7,4)
Solució de sacarosa	20% (p/v) de sacarosa en aigua destil·lada
Solució de bloqueig	0,5% (p/v) Triton X-100; 5% FBS en PBS

Taula 15. Solucions per a la immunofluorescència.

2.15. Assajos d'acetilació i desacetilació *in vitro* i anàlisi per espectrometria de masses

Per a estudiar l'acetilació i la desacetilació de lisines de la proteïna GATA4 humana, es van realitzar assajos enzimàtics *in vitro* emprant els pèptids i els reactius descrits en els apartats 1.3. i 1.4., respectivament. Els pèptids liofilitzats es van reconstituir amb aigua per obtenir una concentració de 0,5 mM. Les mostres es van analitzar posteriorment per espectrometria de masses.

2.15.1. Assaig d'acetilació

Cadascun dels pèptids (1 nmol) es va incubar amb 300 ng de p300 recombinant i 5 mM d'acetil-CoA, i es va completar el volum amb 20 µL de la solució d'acetilació (**Taula 16**). Paral·lelament, per cada pèptid es van realitzar els corresponents controls: pèptid sol, pèptid amb acetil-CoA i pèptid amb p300. L'assaig es va dur a terme durant tota la nit a 30°C en agitació. Després de la incubació, la reacció es va aturar afegint 2,2 µL de solució 1 (**Taula 16**), per tal d'aconseguir una dilució final d'àcid fòrmic a la mostra d'1:10. Prèviament a l'anàlisi per espectrometria de masses, els pèptids es van purificar amb les puntes Zip Tip® Pipette Tips (Merck Millipore). Aquestes puntes contenen unes resines de sílica a la part inferior que permeten concentrar i dessalar els pèptids. La purificació amb Zip Tip® també es va fer servir per a eliminar l'enzim p300 (que podria interferir en l'anàlisi d'espectrometria), ja que la mida del porus de les puntes no permet el pas de l'enzim. Per a la purificació amb les puntes Zip Tip® es va seguir el protocol estàndard: (1) rentar dues vegades amb la solució 2 (**Taula 16**); (2) equilibrar la resina passant dues vegades la solució 3 (**Taula 16**); (3) unir els pèptids a les resines fent 10 cicles d'aspirar-dispensar la mostra; (4) rentar dues vegades amb la solució 4 (**Taula 16**); i (5) eluir el pèptid purificat amb la solució 1.

2.15.2. Assaig de desacetilació

Per a aquests assajos es va partir del pèptid acetilat i purificat, obtingut en el pas anterior. Primer es va eliminar el solvent de les mostres per evaporació, utilitzant un concentrador al buit (SpeedVac®, Thermo Fisher). A continuació es van afegir 300 ng d'HDAC2 o HDAC4 recombinant al pèptid acetilat i dessecat, i es va completar fins a un volum de 20 µL amb tampó de desacetilació (**Taula 16**). La reacció de desacetilació es va incubar tota la nit a 30°C en agitació. La reacció es va aturar amb 2,2 µL de la solució 1, i els

pèptids es van purificar amb les puntes Zip Tip® seguint els mateixos passos que a l'assaig d'acetilació.

2.15.3. Espectrometria de masses MALDI-TOF

L'espectrometria de masses MALDI prové de les sigles en anglès que signifiquen desorció/ionització làser assistida per matriu. El detector de ions acoblat al MALDI s'anomena TOF, que fa referència a la separació segons el temps de vol. MALDI-TOF és una tècnica extremadament sensible que permet detectar components químics o biològics en funció de la relació càrrega/massa (z/m).

Les reaccions d'acetilació o desacetilació purificades es van analitzar per MALDI-TOF. A un pou d'un plat metàl·lic Bruker Anchor Chip 384-spot MALDI (Bruker Daltonics, MA) es va fixar 1 µL de mostra juntament amb 0,5 µL de matriu (**Taula 16**). Entremig de cada quatre pous es va posar 0,5 µL de la solució de calibració (Peptide calibration Standard II, Bruker Daltonics) amb 0,25 µL de matriu. La placa es va deixar uns 30 minuts a temperatura ambient fins que la mescla cristal·litzés. Aleshores la placa es va col·locar en l'espectròmetre MALDI-TOF. L'espectrometria per MALDI-TOF s'inicia amb la irradiació, mitjançant un làser, de la mescla cristal·litzada. Conseqüentment, la matriu actua d'acceptadora de l'energia làser que transmet a la mostra, i produeix la ionització de la mostra generant ions de diferents mides. Els ions són accelerats per un camp elèctric, fins a arribar al detector. El temps que tarden els ions a arribar a aquest detector és proporcional a la seva relació m/z . (**Figura 26**)

L'espectre de masses, que es va fixar a una relació m/z entre 900 i 4.000, es va adquirir amb l'espectròmetre de masses Ultraflex MALDI-TOF (Bruker Daltonics) en mode de ions positius. L'anàlisi es va fer amb el programa FlexAnalysis v.2.0.

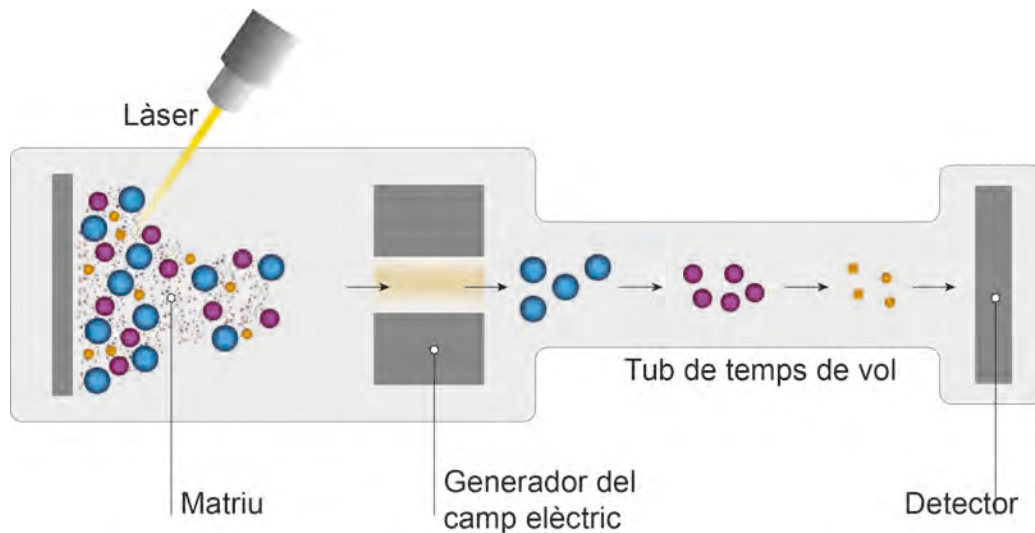


Figura 26. Esquema de l'espectròmetre MALDI-TOF. Les mostres són irradiades amb el làser i aleshores es separen en el tub de temps de vol en funció de la relació càrrega/massa. Extreta i adaptada de www.studyblue.com.

2.15.4. LC-MS/MS

La reacció d'acetilació corresponent al pèptid 3 també es va analitzar per espectrometria de masses en tàndem acoblada a un sistema de cromatografia en fase líquida (LC-MS/MS). Aquesta tècnica permet detectar la posició exacte de les modificacions posttraduccional presents en un pèptid. L'anàlisi per LC-MS/MS es va dur a terme al Centre de Regulació Genòmica (Barcelona, Espanya). El pèptid 3 acetilat es va digerir amb tripsina i posteriorment es va assecar amb un concentrador al buit (SpeedVac) i resuspendre amb 150 µL d'àcid fòrmic 1%. Una alíquota de 2 µL es va injectar al sistema LC-MS/MS (LQT-Orbitrap). Es va utilitzar la cromatografia en fase líquida amb una columna C18 (75µm Øi, 10 cm, nano Acquity, 1.7 µm BEH column) en aigua i gradient d'acetonitril de l'1 al 40% durant 20 minuts i del 40 al 60% durant 5 minuts, a una velocitat de flux de 250 nl/min. Els pèptids eluïts es van ionitzar a 1.6-2.1kV. Les masses dels pèptids (m/z 350-1700) es van detectar amb el mode Full Scan MS. Els pics es van fragmentar utilitzant heli com a gas de col·lisió amb una energia de col·lisió normalitzada del 38%; les

dades es van adquirir utilitzant el programa Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140). La identificació de proteïnes es va dur a terme amb el Proteome Discoverer (Thermo Scientific) i el cercador Sequest utilitzant la seqüència FASTA de GATA4 d'humà.

Solució	Composició
Solució d'acetilació	150 mM Hepes pH 8, 3 mM DTT en aigua ultrapurificada
Solució 1	Àcid fòrmic a l'1%,
Solució 2	Acetonitril al 100%
Solució 3	Àcid fòrmic al 0,1%
Solució 4	Acetonitril al 100% i d'àcid fòrmic al 0,1%
Solució de desacetilació	125 mM Hepes pH 8 i 690 mM NaCl
Matriu	àcid α -cyano-4hidroxi cinnamic, 2/3 etanol i 1/3 acetat

Taula 16. Solucions per a les reaccions d'acetilació i desacetilació i per a les anàlisis de MALDI-TOF

IV. RESULTATS

1. Regulació del gen *SCN5A* pels factors GATA cardíacs

1.1. En el gen *SCN5A* humà s'han predit diversos motius GATA

Amb l'objectiu d'explorar si els FT GATA cardíacs (GATA4, GATA5 i GATA6) regulen la transcripció del gen *SCN5A*, es van cercar llocs d'unió GATA, anomenats també motius GATA, a la regió compresa entre -1.125 i +857 pb respecte al TSS d'*SCN5A*. La selecció d'aquesta regió es va basar en anàlisis publicades que indiquen que el promotor (de -261 a +140 pb respecte al TSS) i l'intró 1 (de +198 a +16.368 pb respecte al TSS) contenen múltiples regions conservades que podrien ser importants per a la regulació d'*SCN5A*¹⁸⁶.

La cerca de motius GATA es va fer utilitzant dos programes bioinformàtics de predicció, MEME i TFSearch, els quals van predir diversos motius en la regió estudiada. Ambdós programes coincideixen en que la majoria dels motius GATA es troben a l'intró 1, tot i que les posicions dels motius GATA predits varien lleugerament entre un programa i l'altre, possiblement a causa dels diferents algorismes que utilitzen cadascun d'ells per a realitzar les prediccions (**Figura 27**). Aquestes observacions estan d'acord amb les anàlisis publicades, que descriuen l'intró 1 com la regió amb més densitat de regions reguladores del gen *SCN5A*¹⁸⁶. Anteriorment, ja s'havia identificat un lloc d'unió GATA a l'intró 1, la mutació del qual produeix una disminució de l'activitat del promotor *SCN5A* en cardiomiòcits neonatals de ratolí. Aquesta observació estaria d'acord amb un paper positiu d'aquest motiu en la regulació de la transcripció d'*SCN5A*¹⁸⁴. En conjunt, aquests resultats suggereixen que els FT GATA cardíacs podrien unir-se en regions reguladores del gen *SCN5A* per controlar-ne la transcripció.

>5' UTR

gaacaaagcttccacagcgtggaaggggacccaagcgggttgccctgatggccgtgttttg
 tttaaacaagaagtgtgtccccataggtccctgggcatgggcatgggagcaactgtttgtc
 agcgtatgtctccgtgtgtgtgtgcctgtgaccatgtctctgaagtgaagaacagtgggtg
 tgaagtatgtgactccaggctctgcatgtgtcaaggtgaaggttgatgtgtggtcaaga
 ggggtggaagtatatataaagaggtatatacatgtatatatatgtatgtgtgtgtgtgt
 gtttgccgcgcgcgcgtgtgtgggtgtctctgtgttggttgccctgcttctgggtctg
 ggtgtgtgtttgggtctgtcagcatgtgcgtccgtgtgttcaggtagatgtgtaccattg
 tgcagatttctgtggcatcactaagtgtgtctccaggaaagtgtgggttcgagtgtgtgtg
 tgtgtctctgtgtcagtgtgtcagtggatgtgtgtctaaagtcagtgtgggtgtctaagttt
 gtcagagtgtcttccctcagtgtcagtgtgtgtcaatgatgtgtctgtctgtgtctgtgtg
 ggtgtgtgtgggggtgtgtatctcagggtgcatgtgtgtgtctgtgtcagtgcaggta
 tgcctatggcagcgtgtgtctgtctcggcatgagtgtcagtgtatgcccggtgtccacgtg
 ggtgggtgggtgtctggtagccttcccaagtcagcaaggttgctgtgtgtgtgtgtgtata
 ctctggcgggtgtgtgtgtatgccagtggttgtaaatgtgagcctgtccgcgtccgcg
 tgggtgtgccatctgtgtgtgaagcgtgcgcgggtgcgcgtgtgtgtacccccgcctatgtc
 tgtctgtccgcgcgcgcgtgtgcggctgtctgtgtgtgtgagccccgggtcagtgtggg
 agtgtgtccgcgcgcgcgtgtgtgtgtccccctccgagcgggaggagcaccacgtgc
 ggagccctgggcgcgtgcgtctgtgggcggagccagcccgggggcccaagccccaggccga
 acccaggcggggcccgccccgaccccgcccccgaccccgcccccgagcccgccgc
 gcctgcccagcccgaggagcccgaaacagagccgcggagccg

>EXÓ 1

AGACGGCGGCGGCGCCCGTAGGATGCAGGGATCGCTCCCCGGGGCCGCTGAGCCTGCGC
 CCAGTGCCCCGAGCCCCGCGCCGAGCCGAGTCCGCGCCAAGCAGCAGCCGCCACCCCGG
 GGCCCGGCGGGGGACCAGCAG

>INTRÓ 1

gtgagcagagtgtccccgcgcgcgcggcagccctggcccgccggagccccctccgcctgccg
 ccgccccaaactttctccccgagggccgaagcctccagtccttgctgtctctccctgcc
 cgggtccgcccagcgcctccctcccgatcagtgccccagagagccggaggggggagaagg
 ggcgagatccgcccgggtggaaggtatccccgggggagacgtctctaaacaccgtgcgc
 ccccccttcccttcccttcccttcccttccgggttcccggtgcgtgtcagggccgggggagg
 ggagctgcggccccagcttcccgccatccctggcgaggtccggggaggggtctgggatt
 gggacccggataccggagggccggagaccccaaggtcagagcggcgactaggcgcccatg
 aatgtggttccagagagcggggtttgcggggggtgaccgagcagggtgggatatggggga
 ggaagccacgcaccccctttctctgggcccagggggaaccgtccgctgggggtgtcctct
 ctgtgggacgagatctctgcgcgttttagaccatgtagagatctcggtgccctttgacgcc
 ctaaagggggccgcatctcctctgtctgatctctgtgtctctcgaaggggtggagatctct

Figura 27. Possibles motius GATA en el gen SCN5A humà. La seqüència correspon a la regió de -1.125 a +857 pb respecte al TSS d'SCN5A (les posicions genòmiques segons la versió GRCh37 són de 38.692.343 a 38.690.362 pb del cromosoma 3). Els motius GATA identificats amb els recursos bioinformàtics TFSearch i MEME es marquen amb blau i taronja, respectivament.

1.2. GATA4 regula la transcripció del gen *SCN5A*

GATA4 és considerat un dels FT més rellevants de la xarxa transcripcional del cor, on actua regulant l'activitat de nombrosos promotors cardíacs, tant durant la cardiogènesi com en els cardiomiòcits adults. Atesa la importància de GATA4 al cor i la presència de possibles motius GATA al promotor i l'intró 1 d'*SCN5A*, es va estudiar el paper de GATA4 en l'expressió del gen *SCN5A*, utilitzant com a model les cèl·lules cardíques de rata H9c2.

1.2.1. GATA4 controla els nivells d'mRNA d'*SCN5A*

Per tal d'estudiar si els nivells endògens de GATA4 contribueixen a mantenir els nivells d'mRNA d'*SCN5A*, es van realitzar experiments de *knockdown* de *GATA4*. Es van transfectar cèl·lules H9c2, amb dos siRNA específics per a *GATA4* de rata (*GATA4-1* o *GATA4-2*) o bé amb siRNA control, i posteriorment es van analitzar els nivells d'mRNA de *GATA4* i *SCN5A* per qPCR. Ambdós siRNA per a *GATA4* van induir una reducció dels nivells d'mRNA de *GATA4* en un 80-90% en comparació amb el siRNA control (**Figura 28A**). Aquesta reducció dels nivells d'mRNA de *GATA4* va associada a una disminució del 40-50% dels nivells d'mRNA d'*SCN5A*, la qual cosa suggereix que GATA4 té un paper clau en regular l'expressió del gen *SCN5A* (**Figura 28B**). En paral·lel, es va analitzar l'expressió del gen *ANP*, que ha estat descrit com un gen diana de GATA4. Concretament, s'ha observat que embrions de ratolins *knockout* heterozigots per a *GATA4*^{+/-} presenten una disminució del 20% dels nivells d'mRNA de l'*ANP*¹³⁸. D'acord amb aquests estudis, en les cèl·lules H9c2 transfectades amb siRNA per a *GATA4* es va detectar una disminució del 40-60% dels nivells d'mRNA del gen *ANP* (**Figura 28C**).

Amb l'objectiu de determinar si la funció reguladora de GATA4 és general a nivell dels canals iònics, es va analitzar l'mRNA del gen *KCNH2*. Aquest gen codifica pel canal de potassi K_v11.1 i també participa en el PAC. En aquest

cas, els nivells d'mRNA de *KCNH2* es van mantenir invariables (**Figura 28D**). Aquest resultat indica que l'efecte dels siRNA per a *GATA4* no és un mecanisme general dels gens involucrats en l'activitat elèctrica del cor i demostra especificitat dels resultats sobre *SCN5A*. En conjunt, aquests experiments proposen que el factor *GATA4* endogen controla la transcripció basal del gen *SCN5A*.

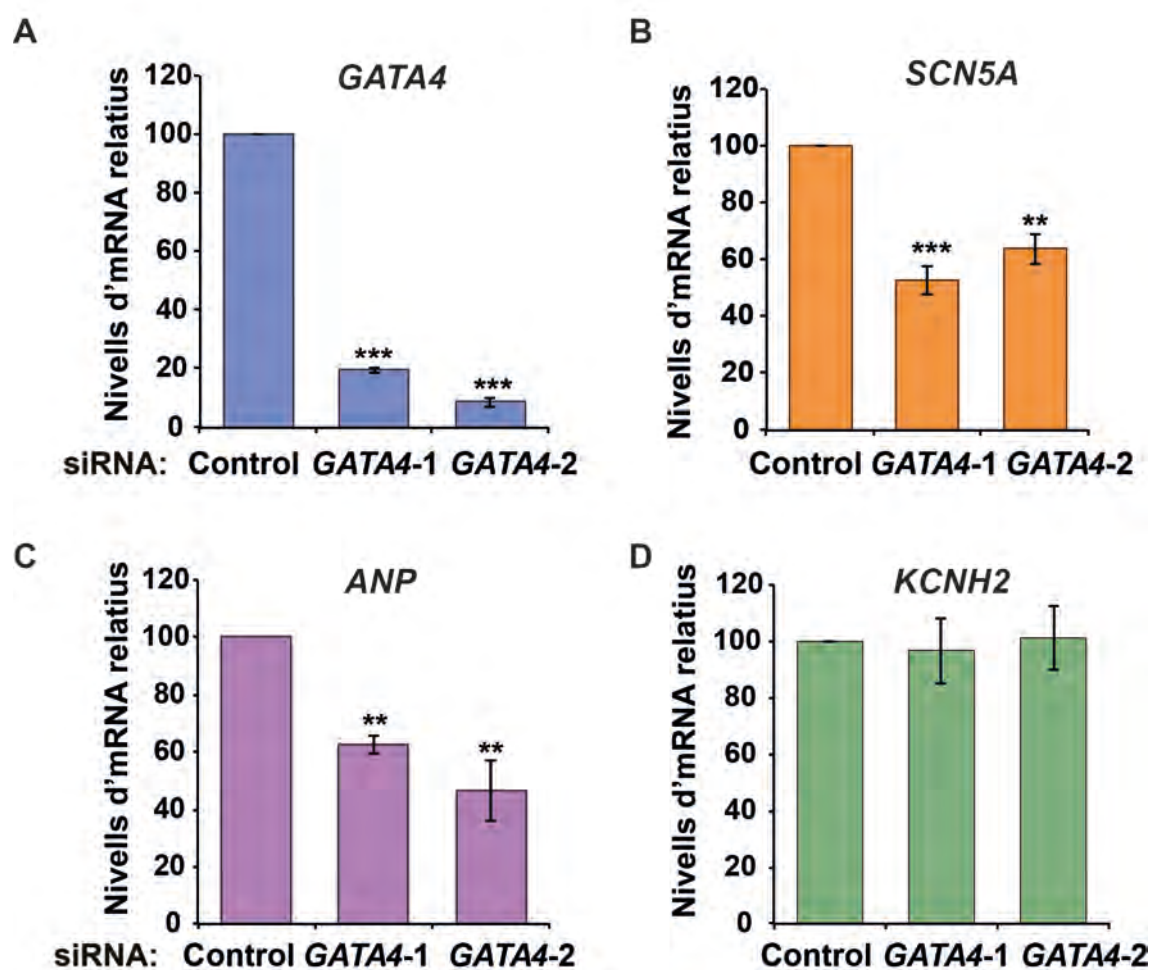


Figura 28. Efecte dels siRNA per a *GATA4* sobre els nivells d'mRNA d'*SCN5A*. Anàlisi per qPCR dels nivells d'mRNA de *GATA4* (A), *SCN5A* (B), *ANP* (C) i *KCNH2* (D), 48 hores després de transfectar cèl·lules H9c2 amb siRNA control o per a *GATA4* (siRNA *GATA4*-1 o *GATA4*-2). Els resultats mostrats estan normalitzats per β -ACTINA i representats com a percentatge respecte al siRNA control (mitjana $\pm$ ES, n=8). Per a l'anàlisi estadística es va realitzar una prova t-Student relativa al siRNA control. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

1.2.2. La fenilefrina indueix l'expressió d'*SCN5A*

La fenilefrina és un agonista específic dels receptors α_1 -adrenèrgics, els quals quan són activats inicien la via de les MAPK¹⁹⁶. En el cor, l'activació d'aquesta via dóna lloc a una fosforilació d'un ampli ventall de dianes intracel·lulars, principalment FT cardíacs. Com a resultat, es produeix una reprogramació de l'expressió de gens implicats en la hipertrofia cardíaca. GATA4 és un dels FT que esdevé fosforilat i així augmenta la seva activitat transcripcional^{166 197, 198}.

Per tal d'examinar si l'activació de GATA4 a través de la ruta de les MAPK té un efecte sobre l'expressió del gen *SCN5A*, es van realitzar experiments en cèl·lules H9c2 en presència de fenilefrina. Concretament, es van analitzar els nivells d'mRNA d'*SCN5A* per qPCR després d'estimular les cèl·lules H9c2 amb fenilefrina. Es va observar que les cèl·lules tractades amb aquest agonista adrenèrgic presentaven un augment del 50% en els nivells d'mRNA d'*SCN5A*, en comparació amb les cèl·lules no tractades (**Figura 29**). Tot i que la fenilefrina augmenta l'activitat de GATA4, no es va observar cap efecte sobre els nivells d'mRNA de *GATA4*, tal i com ja havia estat descrit¹⁶⁶. Aquests resultats suggereixen que l'activació de GATA4 induïda per la fenilefrina augmenta els nivells d'mRNA d'*SCN5A*, i recolza els experiments de siRNA que proposen que GATA4 és un activador de l'expressió d'*SCN5A*.

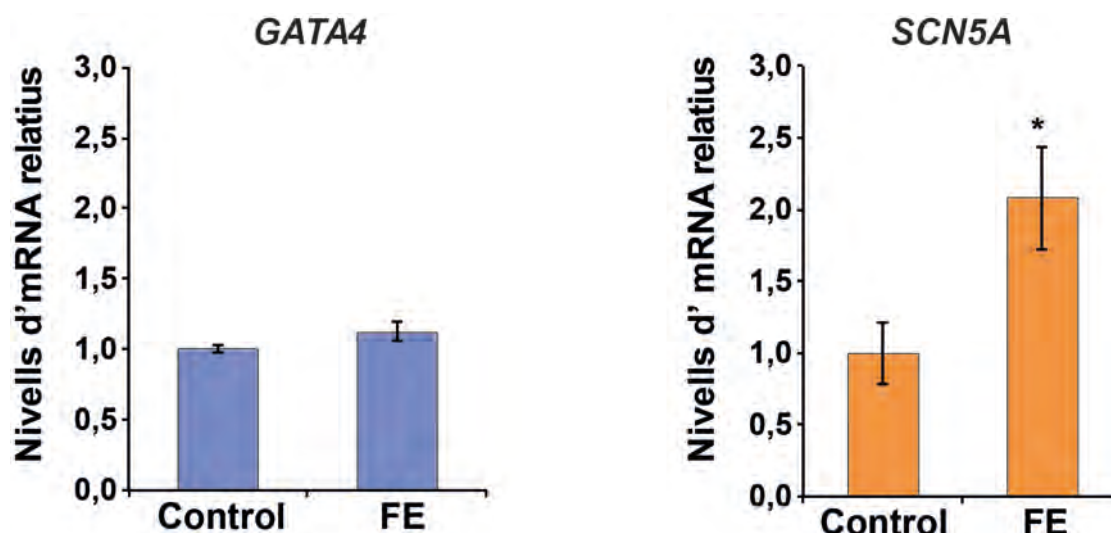


Figura 29. Efecte de la fenilefrina sobre els nivells d'mRNA d'SCN5A. Anàlisi per qPCR dels nivells d'mRNA de GATA4 i SCN5A de cèl·lules cardíques H9c2 tractades amb 30 μ M de fenilefrina (FE) durant 24 hores. Els nivells de transcrits mostrats estan normalitzats per β -ACTINA i representats com a percentatge respecte a la condició control (no tractada amb fenilefrina) (mitjana $\pm$ ES, n=6). Per a l'anàlisi estadística es va realitzar una prova t-Student relativa a la condició control. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

1.3. GATA4 i GATA5 cooperen en la regulació del promotor d'SCN5A

Diversos estudis han demostrat que els factors GATA poden funcionar cooperativament i modular de manera sinèrgica l'expressió de determinats gens¹³⁴. Aquest mecanisme de cooperació es duu a terme mitjançant la formació de complexos proteics que s'uneixen en les regions promotores o *enhancers* dels gens que regulen. Partint d'aquest precedent, es va planejar estudiar possibles sinèrgies entre els diferents factors GATA cardíacs en la regulació del promotor d'SCN5A.

1.3.1. GATA4 i GATA5 sinergitzen per a activar el promotor d'SCN5A

Tal com s'ha comentat a la introducció, els factors GATA reconeixen les mateixes seqüències en el genoma. Per aquesta raó, es va examinar si els

altres factors GATA cardíacs (GATA5 i GATA6) també participen en la regulació de la transcripció d'*SCN5A*. Es van cotransfectar cèl·lules H9c2 amb el PromotorA-luciferasa (que conté la regió promotora del gen *SCN5A* humà corresponent als nucleòtids -713 a +282 pb respecte al TSS) i quantitats creixents dels vectors d'expressió de GATA4, GATA5 o GATA6. Després de 24 hores de la transfecció, es va avaluar l'activitat del promotor d'*SCN5A* mitjançant l'anàlisi de l'activitat luciferasa dels lisats cel·lulars. Els experiments de *western blot* van confirmar que els tres vectors pels factors GATA s'expressaven correctament en les cèl·lules H9c2 prèviament transfectades (**Figura 30B**). D'acord amb els experiments de *knockdown*, es va observar que la sobreexpressió de GATA4 augmenta significativament l'activitat del promotor, de forma depenent de la dosi (**Figura 30A**). La sobreexpressió de GATA5 també va estimular significativament l'activitat del promotor, tot i que en menor mesura que GATA4. En canvi, GATA6 va mostrar un efecte lleuger sobre el promotor d'*SCN5A*, i només va donar lloc a una activació significativa a altes concentracions. Per a descartar la possibilitat que GATA6 sobreexpressat fos funcionalment defectuós, es va examinar l'efecte de GATA6 sobre el promotor del gen pancreàtic *PDX1*, que és un gen diana de GATA4 i GATA6. D'acord amb resultats prèviament publicats¹⁹⁹, es va observar que la sobreexpressió de GATA6 en cèl·lules HEK293T activa el promotor *PDX1* i, per tant, es va constatar que la proteïna GATA6 és activa transcripcionalment (**Figura 32**). En conjunt, aquests resultats indiquen que GATA4 i GATA5 són factors activadors de la transcripció d'*SCN5A*.

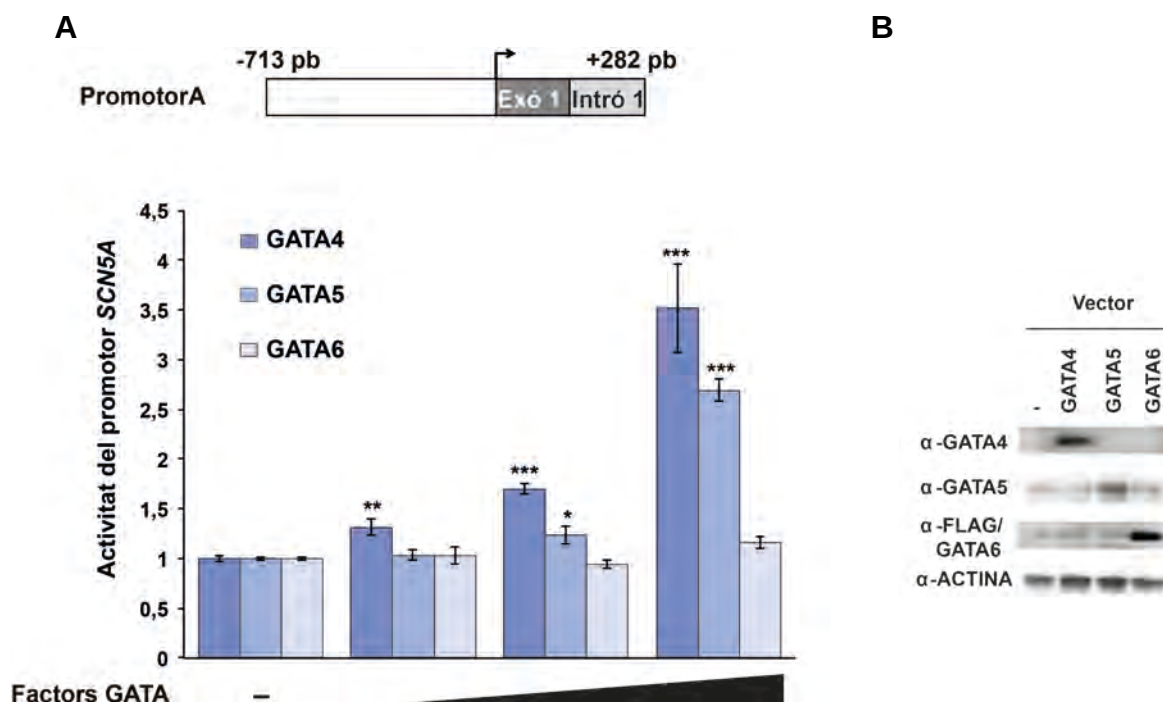


Figura 30. Efecte dels factors GATA cardíacs sobre l'activitat del promotor d'SCN5A.

A. Assajos luciferasa de les cèl·lules H9c2 transfectades amb el PromotorA-luciferasa (200 ng) i el promotor EF1 α -renilla (20 ng), juntament amb quantitats creixents (600, 1.200 i 1.800 ng) dels vectors d'expressió dels factors GATA cardíacs. La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa representats estan normalitzats pels valors de renilla i es mostren relatius al control (condició en absència de factors GATA) (mitjana $\pm$ ES, n=6). Per a l'anàlisi estadística es va realitzar una prova t-Student relativa al control. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$. **B.** *Western blot* de les cèl·lules H9c2 transfectades amb els vectors d'expressió dels factors GATA cardíacs (1.200 ng). Les proteïnes es van detectar mitjançant anticossos α -GATA4, α -GATA5 i α -Flag/GATA6. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega.

A continuació, es va examinar si els factors GATA actuen de manera sinèrgica en l'activació del promotor d'SCN5A. Es van realitzar assajos luciferasa de cèl·lules H9c2 cotransfectades amb el PromotorA-luciferasa i diferents combinacions dels vectors d'expressió de GATA4, GATA5 i GATA6. Es va observar un efecte sinèrgic en l'activació del promotor d'SCN5A en cotransfectar GATA4 i GATA5 (**Figura 31**). La combinació de GATA5 i GATA6

va donar lloc a una activació corresponent aproximadament a la suma de les activitats transcripcionals produïdes pels dos factors individualment. En canvi, en presència de GATA4 i GATA6 el nivell d'activació del promotor va ser pràcticament igual al produït per GATA4 sol. Aquest resultat suggereix que GATA4 té una major preferència pel promotor d'*SCN5A* en comparació amb GATA6. Altrament, es va observar que GATA4 i GATA6 sobreexpressades actuen sinèrgicament en l'activació del promotor de *PDX1*, tal com s'havia descrit prèviament (**Figura 32**)¹⁹⁹.

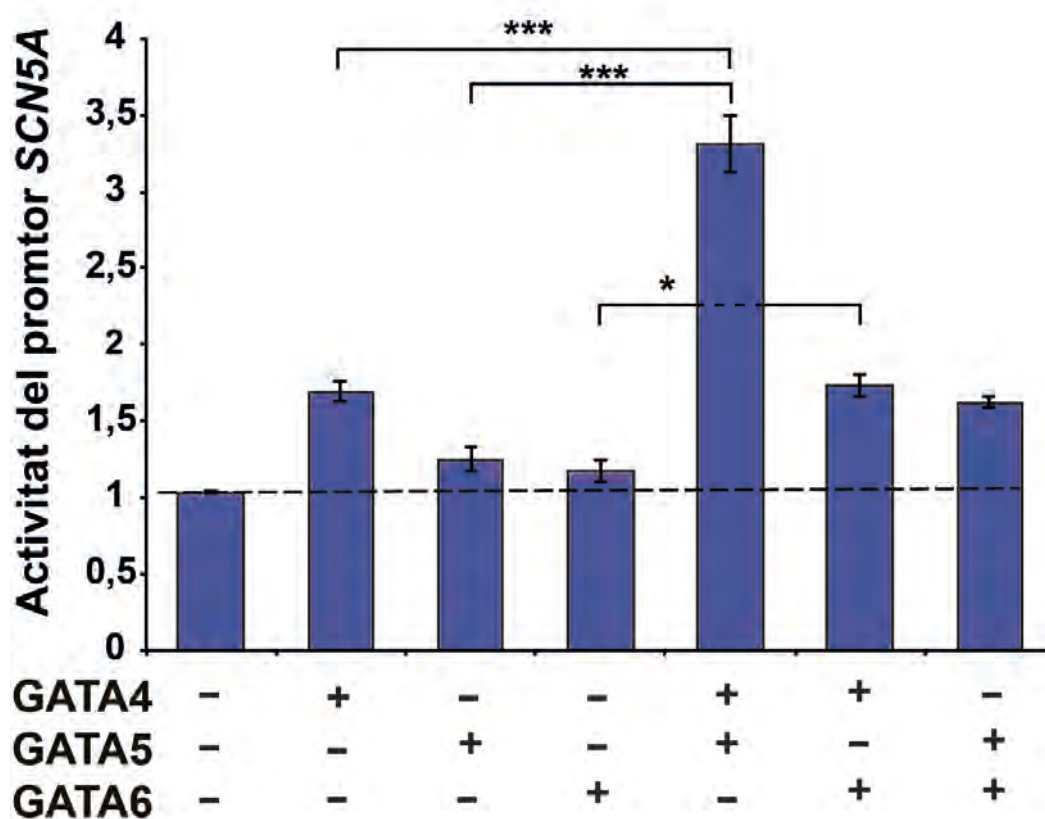


Figura 31. Efectes sinèrgics entre factors GATA cardíacs en l'activitat del promotor d'*SCN5A*. Experiments de luciferasa realitzats en cèl·lules H9c2 transfectades amb el PromotorA-luciferasa (200 ng), el promotor EF1 α -renilla (20 ng) i els vectors GATA indicats (1.200 ng). La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa estan normalitzats pels valors de renilla i representats relatius a la condició control (condició

en absència de factors GATA) (mitjana $\pm$ ES, n=6). L'anàlisi estadística per a determinar el nivell de significança de l'activitat del promotor es va realitzar mitjançant una ANOVA multifactorial, comparant les diferents combinacions de factors GATA amb cada un dels factors GATA individualment. Els valors de significança de l'activitat del promotor d'*SCN5A* en presència de cada un dels factors GATA individualment respecte el control és el mateix que s'ha mostrat a la figura 30. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

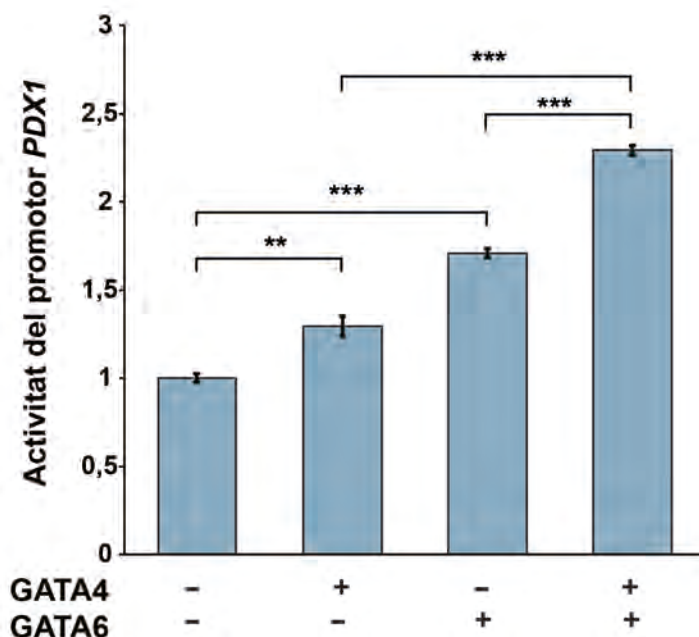


Figura 32. Efecte de GATA4 i GATA6 sobre l'activitat del promotor *PDX1*. Assajos luciferasa en cèl·lules HEK293T transfectades amb els promotors *PDX1*-luciferasa (200 ng) i EF1 α -renilla (20 ng), juntament amb els vectors d'expressió de GATA indicats (1.200 ng). La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa representats estan normalitzats pels valors de renilla i es mostren relatius al control (condició en absència de factors GATA) (mitjana $\pm$ ES, n=3). Per a l'anàlisi estadística es va realitzar una prova t-Student relativa al control. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

1.3.2. GATA4 interacciona amb GATA5

Partint de l'efecte cooperatiu observat entre GATA4 i GATA5 sobre *SCN5A*, es va decidir investigar si ambdós FT interaccionen físicament. Es van transfectar cèl·lules HEK293T amb els vectors d'expressió GATA4/HA i GATA5. Al cap de 48 hores, es va immunoprecipitar GATA4 dels lisats

cel·lulars amb un anticòs α -HA. Mitjançant l'anàlisi per *western blot* del material immunoprecipitat es va detectar una banda corresponent a GATA5, la qual cosa indica que GATA4 i GATA5 interaccionen físicament en cèl·lules (**Figura 33**; carril 3 IP). Aquesta interacció pot ser directa o bé indirecta, ja que els dos FT podrien formar part d'un mateix complex proteic però no necessàriament interaccionar físicament entre ells. L'anàlisi per *western blot* dels inputs (mostres no immunoprecipitades) va evidenciar que els vectors d'expressió de GATA4 (carril 2 input) i GATA5 (carril 3 input) s'expressaven correctament en les cèl·lules HEK293T. El resultat observat coincideix amb el d'un altre estudi que descrivia la interacció entre GATA4 i GATA5 en condicions *in vitro* en assajos de *GST-pulldown*²⁰⁰. Mentre s'estava escrivint aquesta tesi, es va publicar un resultat similar també en cèl·lules HEK293T²⁰¹.

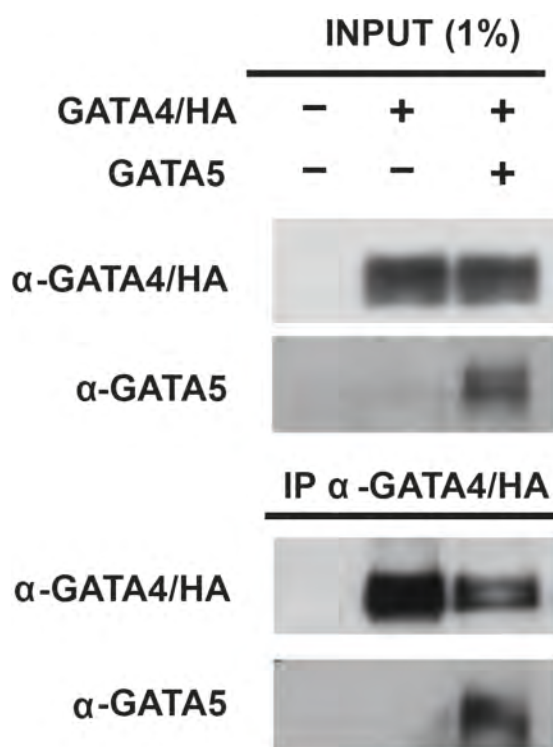


Figura 33. Immunoprecipitació de GATA4 i GATA5 en extractes cel·lulars d'HEK293T. *Western blot* a partir dels lisats de cèl·lules HEK293T prèviament transfectades amb els

vectors d'expressió de GATA4/HA (7,5 µg) i GATA5 (7,5 µg). En el panell superior es mostren els inputs (l'1% de la proteïna total) i el panell inferior correspon a les mostres immunoprecipitades amb l'anticòs α-HA.

1.4. L'activació transcripcional d'*SCN5A* per GATA4 i GATA5 és dependent de motius GATA

1.4.1. L'intró 1 d'*SCN5A* conté importants regions reguladores

Les anàlisis del gen *SCN5A* mitjançant les eines MEME i TF Search (**Figura 27**) prediuen diversos motius GATA a l'intró 1 d'*SCN5A*. Per aquesta raó es va investigar l'efecte dels factors GATA en un segon vector anomenat PromotorB-luciferasa (conté el fragment corresponent a la regió -260 a +612 pb del gen *SCN5A*). Aquest fragment inclou el promotor d'*SCN5A* i una regió de l'intró 1 més extensa que el PromotorA.

En primer lloc es va comparar l'activitat basal dels Promotors A i B en les cèl·lules H9c2. El PromotorB va mostrar una activitat tres vegades més gran que la del PromotorA (**Figura 34A**). Aquest resultat suggereix que l'intró 1 conté regions reguladores amb funció activadora de la transcripció, i concorda amb els estudis que descriuen que l'intró 1 conté abundants elements reguladors¹⁸⁶. A continuació, es va comparar l'efecte dels factors GATA4 i GATA5 en l'activitat dels Promotors A i B. Tot i que no es van detectar diferències significatives en l'activació dels promotors per GATA4 o GATA5 de forma individual, l'efecte sinèrgic de GATA4 i GATA5 va ser significativament major sobre el PromotorB que no en el PromotorA (**Figura 34B**). Finalment, també es va comparar l'efecte del *knockdown* de GATA4 sobre el PromotorA i el PromotorB. Ambdós siRNA per a *GATA4* (*GATA4-1* i *GATA4-2*) van induir una reducció similar, d'un 40-60%, de l'activitat dels promotors respecte a les cèl·lules control (**Figura 34C**). En conjunt, aquests resultats confirmen la rellevància de l'intró 1 en la regulació d'*SCN5A* pels factors GATA.

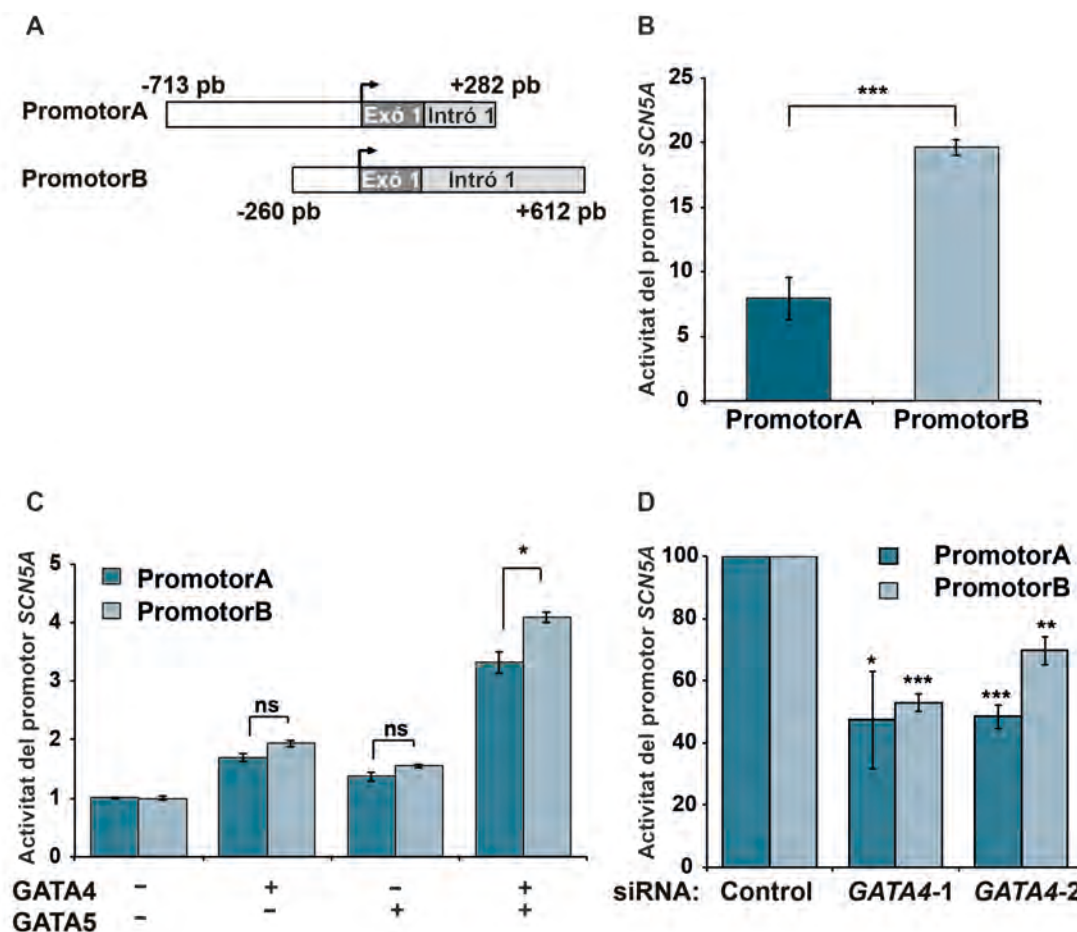


Figura 34. Activitat dels promotors A i B d'*SCN5A*. **A.** Esquema dels PromotorA i PromotorB d'*SCN5A*. Els números indiquen les posicions inicials i finals que comprenen les regions promotores, respecte al TSS (que s'indica amb una fletxa). **B.** Experiments de luciferasa realitzats en cèl·lules H9c2 transfectades amb el PromotorA-luciferasa o el PromotorB-luciferasa (200 ng) i el promotor EF1 α -renilla (20 ng). Els valors de luciferasa estan normalitzats pels valors de renilla (mitjana $\pm$ ES, n=5). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student. **C.** Experiments de luciferasa en cèl·lules H9c2 transfectades amb el PromotorA-luciferasa o el PromotorB-luciferasa (200 ng), el promotor EF1 α -renilla (20 ng) i els vectors d'expressió dels factors GATA indicats (1.200 ng). La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa estan normalitzats pels valors de renilla i representats relatius a la condició control (absència de factors GATA) (mitjana $\pm$ ES, n=6). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student. **D.** Assajos luciferasa en cèl·lules H9c2 cotransfectades amb siRNA control o per a *GATA4*

juntament amb el PromotorA-luciferasa o el PromotorB-luciferasa (200 ng) i el promotor EF1 α -renilla (20 ng). Els valors de luciferasa representats estan normalitzats pels valors de renilla i es mostren com a percentatge respecte al control (mitjana $\pm$ ES, n=3). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student respecte al siRNA control. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01 i ***p $\leq$ 0,001.

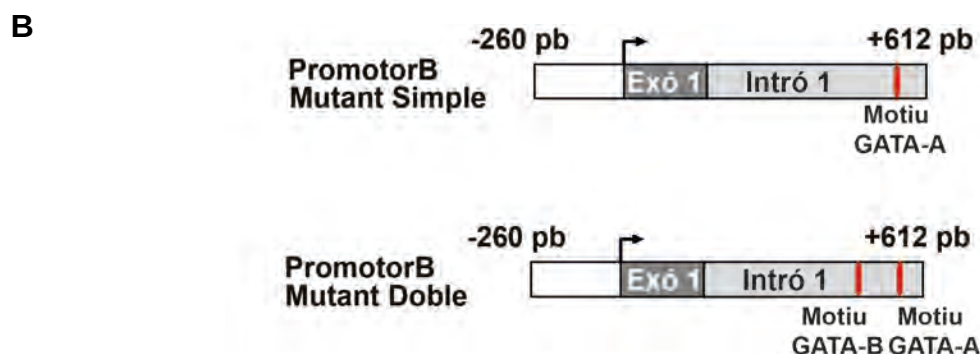
1.4.2. Dos motius GATA de l'intró 1 estan implicats en el sinergisme entre GATA4 i GATA5

A continuació, es va proposar estudiar si la funció reguladora de GATA4 i GATA5 sobre el gen *SCN5A* depèn de la presència de motius GATA. Per a fer aquests estudis, es van mutar dos motius GATA de l'intró 1 del constructe PromotorB-luciferasa. Es van seleccionar dos motius GATA que havien estat prèviament identificats en les anàlisis bioinformàtiques de predicció MEME i TFSearch: un d'ells està situat a +566/+569 pb (anomenat motiu GATA-A) i l'altre a +403/+406 pb (anomenat motiu GATA-B), respecte al TSS (**Figura 22B**). Aquests dos motius GATA estan molt conservats entre els mamífers, la qual cosa suggereix que són elements reguladors importants per a l'expressió d'*SCN5A* (**Figura 35A**). Mitjançant mutagènesi dirigida es van generar dos vectors: el mutant simple, que conté el motiu GATA-A mutat; i el mutant doble, que conté el motiu GATA-A i el motiu GATA-B mutats (**Figura 35B**). Els vectors PromotorB WT o mutats es van transfectar en cèl·lules H9c2 juntament amb vectors d'expressió dels FT GATA4 i GATA5. Els assajos luciferasa van mostrar que l'activació del promotor d'*SCN5A* per part de GATA4 disminueix significativament a mesura que augmenten el nombre de motius GATA mutats (**Figura 35C**). En presència de GATA5 es va observar una reducció similar, tot i que en aquest cas no és significativa. D'altra banda, l'efecte sinèrgic entre ambdós FT sobre el promotor d'*SCN5A* disminueix significativament en mutar els motius GATA; l'activitat del promotor es redueix aproximadament un 20% quan el lloc GATA-A està mutat, i un 40% quan ambdós llocs GATA-A i GATA-B es troben mutats. Aquests experiments indiquen que els dos motius GATA identificats a l'intró 1 participen en la

regulació del promotor d'*SCN5A* per part de GATA4 i GATA5; tot i això, no es poden considerar completament indispensables, ja que l'activitat del promotor d'*SCN5A* sense aquests dos motius (PromotorA) també augmenta en sobreexpressar GATA4 o GATA5, tot i que en menor mesura.

A

</



Motiu GATA-A: GATA → TTGC (chr3:38,690,650-38,690,653, GRCh37)
 Motiu GATA-B: TATC → GCAA (chr3:38,690,813-38,690,816, GRCh37)

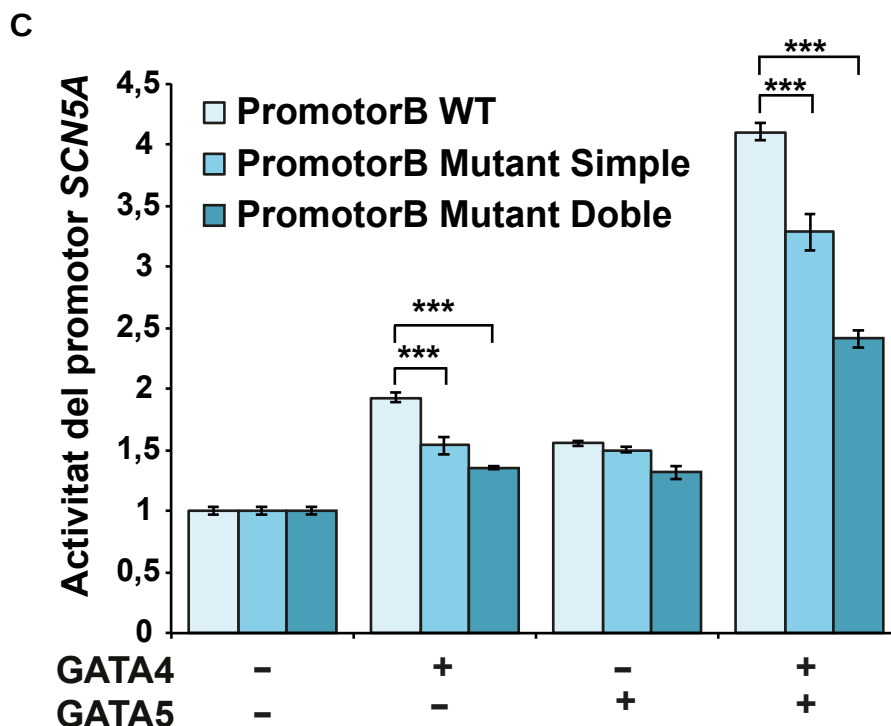


Figura 35. Efecte de dos motius GATA mutats situats a l'intró 1 en l'activació del promotor d'SCN5A per GATA4 i GATA5. A. Conservació dels dos motius GATA mutats localitzats en l'intró 1 d'SCN5A en els diferents mamífers indicats. Les dades s'han obtingut del Genome Browser de la Universitat de Califòrnia, Santa Cruz (UCSC). **B.** Esquema representatiu de les regions corresponents al PromotorB mutant simple i mutant doble. Els números indiquen la posició inicial i final respecte al TSS (representat amb una fletxa), i les línies vermelles indiquen els dos motius GATA mutats que s'han estudiat. En el quadre inferior s'indica el canvi de nucleòtids del motius GATA-A i GATA-B, així com també la posició genòmica d'acord amb el GRCh37. **C.** Experiments luciferasa en cèl·lules H9c2 prèviament transfectades amb el PromotorB-luciferasa WT o les versions mutades (200 ng) i el promotor EF1 α -renilla (20 ng), juntament amb els vectors d'expressió de GATA4 i GATA5 (1.200 ng de cada un). La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa mostrats estan normalitzats pels valors de renilla, i es mostren respecte a la condició control (absència de factors GATA) (mitjana $\pm$ ES, n=3). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01 i ***p $\leq$ 0,001.

1.5. GATA4 i GATA5 s'uneixen al promotor i intró 1 d'*SCN5A* en cor humà adult

Per a estudiar si GATA4 i GATA5 s'uneixen al promotor i intró 1 d'*SCN5A* en el cor humà, es van realitzar assajos de ChIP, a partir de mostres de teixit cardíac corresponents a ventricle esquerre humà adult. La cromatina es va aïllar de les mostres de teixit cardíac, i es va sonicar i se'n van obtenir fragments d'entre 500 i 1.000 pb. A continuació, els fragments de cromatina es van immunoprecipitar amb anticossos α -GATA4, α -GATA5 o α -GATA6. El DNA immunoprecipitat es va analitzar per qPCR amb encebadors específics per quatre regions diferents (**Taula 5**): dues de les regions estan situades al promotor i a l'intró 1 del gen *SCN5A*, concretament a -198 pb i a +505 pb respecte al TSS, respectivament; les altres dues regions estan allunyades del promotor, situades a -5.916 pb i a -8.803 pb respecte al TSS.

L'anàlisi per qPCR dels experiments de ChIP va mostrar que cap dels factors GATA s'uneix a les regions més distals del promotor (**Figura 36**). En canvi, es va detectar unió de GATA4 i GATA5 al promotor i a l'intró 1 del gen *SCN5A* en les mostres de ventricle, suggerint que ambdós FT regulen l'expressió d'*SCN5A* *in vivo*. D'altra banda, es va detectar un lleuger enriquiment de GATA6 al promotor i a l'intró 1, tot i que aquest no era significatiu respecte al control negatiu (regió de -8.803 pb). Encara que no es pot descartar que GATA6 tingui un cert paper de regulació sobre *SCN5A*, aquests resultats de ChIP donen suport als estudis realitzats en cèl·lules H9c2, en què s'observa que GATA4 i GATA5 tenen un paper més important en la regulació transcripcional d'*SCN5A*.

Per tal d'examinar si GATA4 interacciona amb GATA5 o GATA6 i coocupen les mateixes regions del gen *SCN5A* *in vivo*, es van realitzar experiments de Re-ChIP amb les mostres de teixit cardíac humà. En un primer pas, es van capturar les regions de cromatina unides a GATA4 utilitzant un anticòs α -

GATA4. En un segon pas, la cromatina immunoprecipitada amb anticòs α -GATA4 va ser sotmesa a una segona ronda d'immunoprecipitació amb anticossos α -GATA4, α -GATA5 o α -GATA6. D'aquesta manera, es van poder seleccionar les regions de DNA on GATA4 es troba unida conjuntament amb un altre factor GATA cardíac. Els resultats obtinguts van mostrar que els fragments de DNA corresponents a la regió del promotor i de l'intró 1 del gen *SCN5A* i immunoprecipitats amb α -GATA4 van ser reimmunoprecipitats eficientment amb l'anticòs α -GATA5 (**Figura 37**). Aquest resultat indica que GATA4 i GATA5 són reclutats conjuntament en el promotor i l'intró 1 del gen *SCN5A*. Tanmateix, aquesta observació suggereix que l'efecte sinèrgic observat en els experiments en H9c2 també té lloc en el teixit cardíac. Així doncs, es podria proposar que en el cor humà adult, GATA4 i GATA5 interaccionen físicament (directament o indirectament) formant un complex proteic al promotor i a l'intró 1 d'*SCN5A*. D'altra banda, els resultats de ReChIP van mostrar que la coocupació de GATA4 i GATA6 en la regió del promotor i l'intró 1 no és significatiu respecte al control.

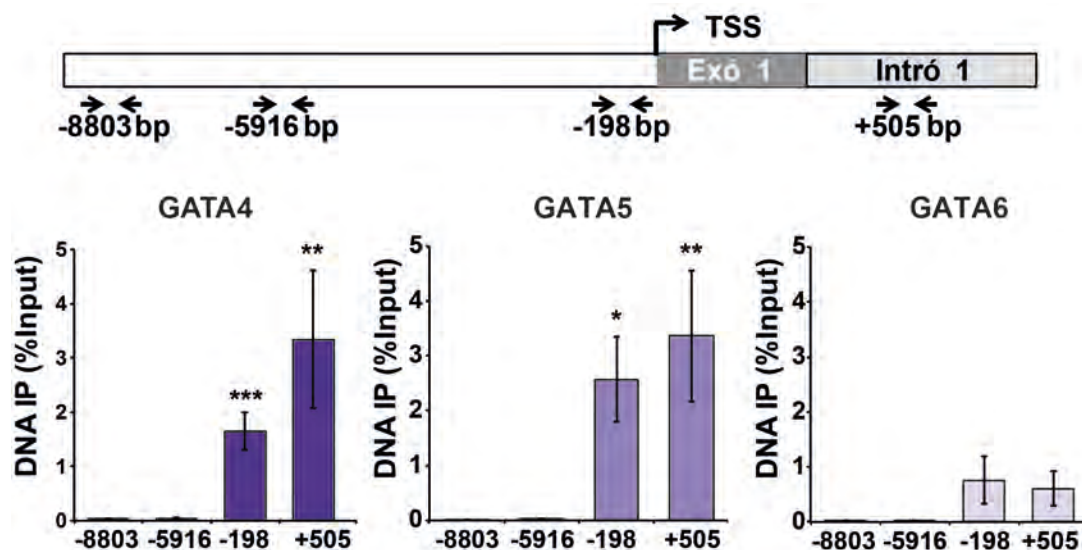


Figura 36. Anàlisi de la unió dels factors GATA cardíacs en el promotor i l'intró 1 del gen *SCN5A* en el cor humà adult mitjançant ChIP. La cromatina aïllada de les mostres de

ventricle esquerre humà es van immunoprecipitar amb anticossos α -GATA4, α -GATA5 i α -GATA6. Els resultats es mostren com a percentatge d'input (mitjana $\pm$ ES; n=6). A la part superior es mostra la posició de les quatre regions amplificades pels encebadors utilitzats en l'anàlisi de qPCR. Els números indiquen el parell de bases central de l'amplicó. L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student respecte a la regió de -8.803 pb. * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$ i *** $p\leq 0,001$.

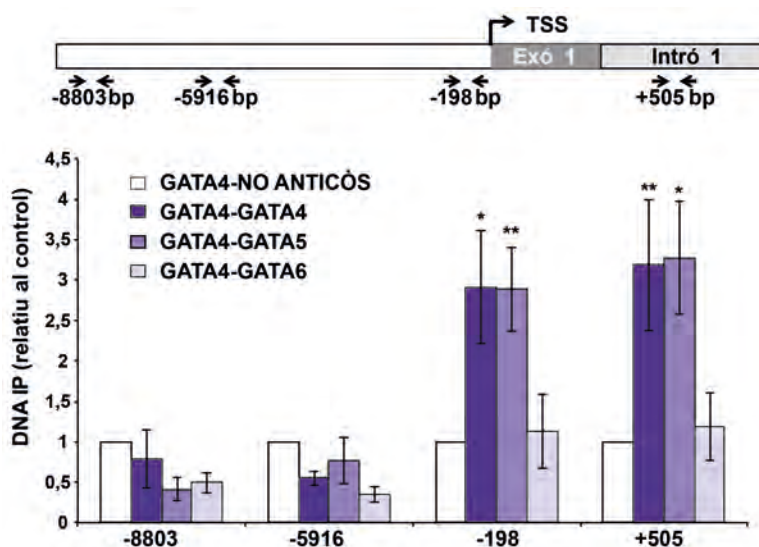


Figura 37. Anàlisi de la unió dels factors GATA cardíacs en el promotor i l'intró 1 del gen *SCN5A* en el cor humà adult mitjançant Re-ChIP. La cromatina aïllada de ventricle esquerre d'humà i immunoprecipitada amb l'anticòs α -GATA4 va ser re-immunoprecipitada amb anticossos α -GATA4, α -GATA5, α -GATA6 o sense anticòs (control negatiu). Els resultats es mostren com a percentatge respecte a l'input i relatius respecte a la condició sense anticòs (mitjana $\pm$ ES; n=6). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student respecte a la condició sense anticòs. * $p\leq 0,05$, ** $p\leq 0,01$ i *** $p\leq 0,001$.

1.6. GATA4, GATA5 i GATA6 s'expressen en el cor humà adult

L'expressió dels factors GATA cardíacs al llarg del desenvolupament s'ha estudiat en diversos models animals (ratolí, *Xenopus*, gallina, entre altres)^{127, 134}. Aquests estudis coincideixen a observar que els tres factors s'expressen en el cor durant etapes embrionàries, i que GATA4 i GATA6 també són presents en l'adult. En canvi, no està clara l'expressió de GATA5 en el cor

adult. En aquesta tesi es va realitzar, per primera vegada, un estudi exhaustiu de l'expressió de GATA4, GATA5 i GATA6, tant a nivell d'mRNA com de proteïna, en el cor humà adult. La detecció dels tres factors GATA cardíacs en els experiments de ChIP mostrats anteriorment suggereix que s'expressen en el cor adult. No obstant això, degut a la controvèrsia existent respecte GATA5 es va considerar adient analitzar l'expressió d'aquests factors en mostres de cor humà adult.

En primer lloc, es va extreure l'mRNA de les mostres de ventricle esquerre humà adult i es va obtenir el cDNA per transcriptasa inversa. L'anàlisi per qPCR del cDNA obtingut va mostrar que els tres factors s'expressen en teixit cardíac, tot i que els nivells d'mRNA de GATA4 i GATA6 són considerablement més elevats que els de GATA5 (**Figura 38**). La detecció de senyal GATA5, encara que a baixa intensitat, indica la presència de molècules d'mRNA de GATA5 en les mostres de ventricle esquerre analitzades. Per a corroborar aquesta última observació, en aquest experiment també es va analitzar l'expressió del gen pancreàtic *PDX1* (com a control negatiu) en les mateixes mostres. En aquest cas, els nivells d'mRNA van ser totalment indetectables.

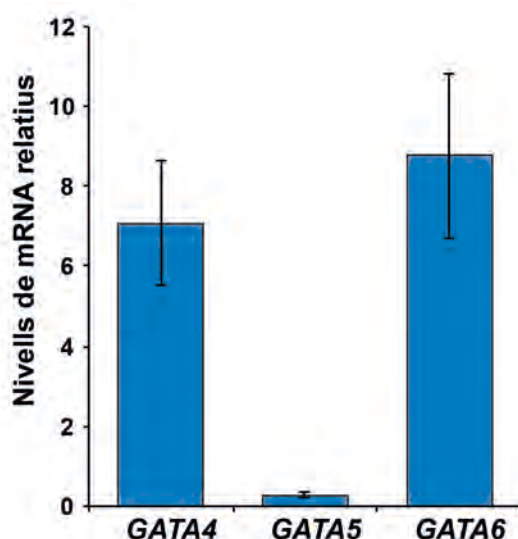


Figura 38. Anàlisi dels nivells d'mRNA de *GATA4*, *GATA5* i *GATA6* en ventricle esquerre humà adult per qPCR. Els resultats representen els nivells d'mRNA dels factors GATA cardíacs relatius als valors d'mRNA de *GAPDH* (n=5).

Posteriorment, es van analitzar els nivells d'mRNA de *GATA4*, *GATA5* i *GATA6* en 18 mostres de ventricle esquerre humà (4 mostres procedents de donants sans i 14 mostres de pacients amb insuficiència cardíaca) per ddPCR, una tècnica molt precisa i sensible per estudiar l'expressió. La tècnica de ddPCR utilitza sondes marcades amb fluorocrom i dona una quantificació absoluta dels nivells de transcrits presents en la mostra. Es van emprar sondes específiques pels tres factors GATA marcades amb el fluorocrom FAM i una sonda per *GAPDH* marcada amb HEX, la qual es va utilitzar per normalitzar els resultats obtinguts. L'anàlisi per ddPCR va permetre detectar una elevada expressió de *GATA4* i *GATA6* i uns nivells baixos d'mRNA de *GATA5* (**Figura 39A**), corroborant així els resultats obtinguts en la qPCR. Tot i això, la concentració de *GATA5* que es va detectar en les mostres de cor és significativament superior al senyal detectat en la reacció sense DNA (**Figura 39B**). Tenint en compte les 18 mostres, els nivells d'mRNA de *GATA6* eren 3,6 vegades superiors als de *GATA4*, i els nivells d'mRNA de *GATA4* 70 vegades superiors als de *GATA5*.

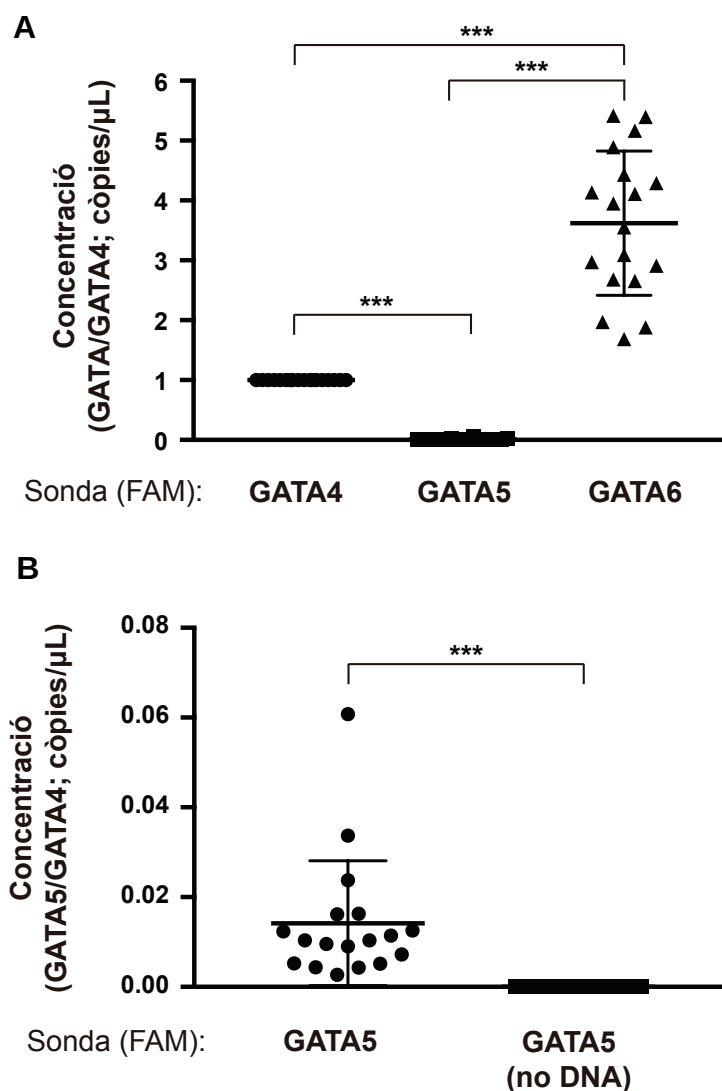


Figura 39. Anàlisi dels nivells d'mRNA de *GATA4*, *GATA5* i *GATA6* en mostres de ventricle esquerre humà per ddPCR. A. Es mostren els nivells d'mRNA de *GATA4*, *GATA5* i *GATA6*. **B.** Es mostren els nivells d'mRNA de *GATA5* comparats amb una reacció sense DNA. Per l'anàlisi es van utilitzar mostres de ventricle esquerre procedents de donants i de pacients amb insuficiència cardíaca terminal (n=18). Les sondes emprades eren *GATA4*-FAM, *GATA5*-FAM i *GATA6*-FAM. Els resultats estan expressats com a còpies d'mRNA/ μ L (mitjana $\pm$ SD), i normalitzats per *GATA4*-HEX. Cada mostra es va analitzar 12 vegades. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

A continuació, es va estudiar l'expressió dels tres factors GATA cardíacs en el cor humà adult a nivell de proteïna. Es van obtenir lisats cel·lulars a partir de les mostres de ventricle. Els lisats van ser posteriorment analitzats per *western blot* amb anticossos específics per cada factor GATA cardíac. En aquests estudis, les proteïnes GATA4, GATA5 i GATA6 van ser detectades clarament (**Figura 40**), recolzant que els tres factors GATA cardíacs s'expressen en el cor humà adult. Tot i això, la clara detecció de proteïna GATA5 per *western blot* suggereix que no hi ha una correlació directa entre els nivells de proteïna i els nivells d'mRNA de GATA5 observats.

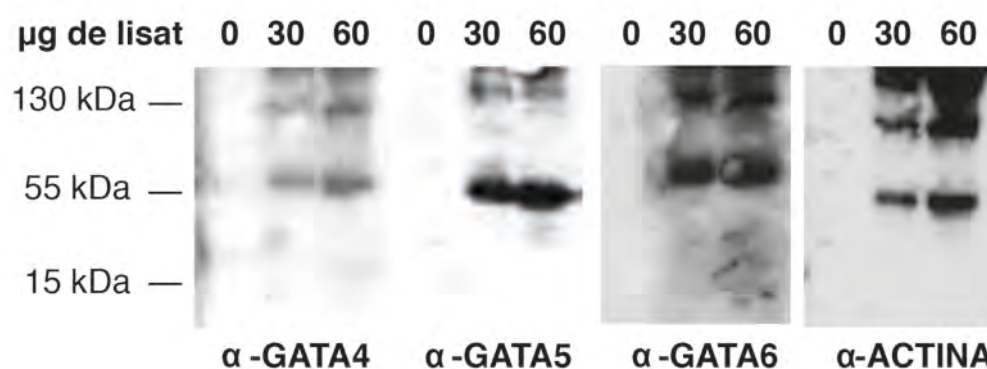


Figura 40. Anàlisi de les proteïnes GATA4, GATA5 i GATA6 en el cor humà adult per *western blot*. En un gel d'electroforesi SDS-PAGE es van carregar 0, 30 i 60 μ g de proteïna total extreta de les mostres de ventricle esquerre humà adult i es van analitzar amb anticossos α -GATA4, α -GATA5 i α -GATA6. L'actina es va utilitzar com a control de càrrega.

Per tal de corroborar la presència de la proteïna GATA5 en cor adult de mamífer es va estudiar l'expressió utilitzant un altre model animal. Es van realitzar experiments d'immunofluorescència en talls histològics procedents de la regió del ventricle esquerre de ratolí adult. GATA5 es va detectar amb un anticòs conjugat amb el fluorocrom Cy3, i els nuclis del teixit es van tenyir amb DAPI com a colorant de contrast. L'anàlisi de les tincions en un microscopi confocal Nikon A1R van mostrar una detecció clara de GATA5 en les mostres de teixit cardíac de ratolí adult (**Figura 41**). Per tant, aquest resultat recolza

les observacions en cor humà i confirma que la proteïna GATA5 s'expressa en el cor adult en mamífers.

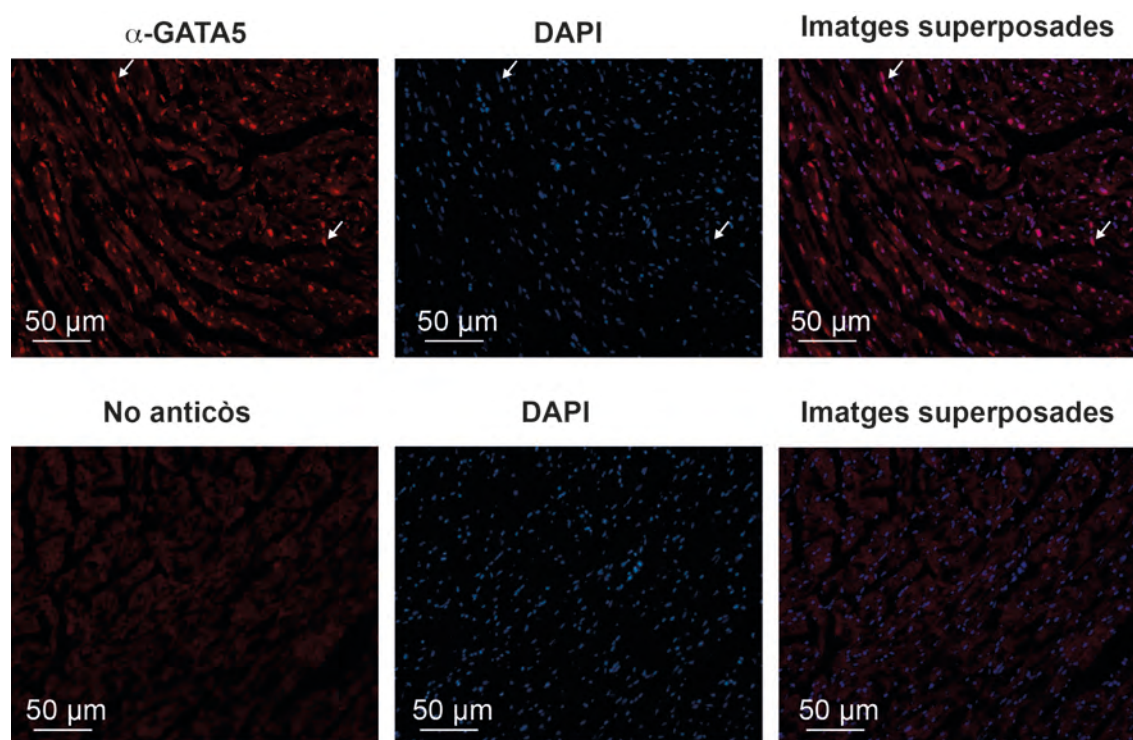


Figura 41. Anàlisi de l'expressió de GATA5 en el cor adult de ratolí. Immunofluorescència de talls histològics de cor de ratolí amb anticòs α -GATA5 i revelat amb un anticòs secundari conjugat amb Cy3 (vermell). Els nuclis estan tenyits amb DAPI (blau). Les imatges estan obtingudes amb l'objectiu de 40x.

1.7. Els nivells d'mRNA de *GATA4* i *SCN5A* correlacionen en el cor humà

Estudis previs han suggerit que una desregulació de l'expressió del gen *SCN5A* podria induir alteracions en el PAC i, conseqüentment, donar lloc a arítmies cardíques¹⁷⁹. Per tal d'estudiar aquesta hipòtesi, es va analitzar la correlació entre els nivells d'mRNA d'*SCN5A* i el corrent de Na^+ . Per mesurar el corrent d'entrada de Na^+ es va emprar el mètode de *patch-clamp*. Com a model experimental es van utilitzar oòcits de *Xenopus* prèviament injectats amb concentracions creixents de cRNA d'*SCN5A*. Els oòcits de *Xenopus* es

van considerar un model d'estudi apropiat, ja que degut a l'absència d'*SCN5A* endogen el corrent de Na^+ mesurat depèn totalment del cRNA injectat. La caracterització electrofisiològica va permetre registrar corrent de Na^+ , indicació d'una correcta expressió dels canals $\text{Na}_v1.5$ a la membrana dels oòcits després d'injectar els cRNA. Els valors de corrent màxim per cada concentració de cRNA injectat estan representats a la **figura 42A**, i mostren una relació lineal i positiva entre el corrent de Na^+ i els nivells de cRNA d'*SCN5A* ($r^2=0,9962$). A la **figura 42B** es mostren traços representatius dels corrents de Na^+ d'oòcits injectats amb 1 ng/ μL i 20 ng/ μL de cRNA, i s'observa un major corrent en els oòcits injectats amb concentracions més elevades de cRNA. Aquests resultats suggereixen que les alteracions en la regulació transcripcional del gen *SCN5A* i, per tant, les alteracions en els nivells d'mRNA d'*SCN5A*, podrien afectar directament el corrent de Na^+ en cardiomiòcits. Aquesta alteració del corrent de Na^+ , podria tenir conseqüències en el PAC i ser una possible causa d'arítmies cardíques.

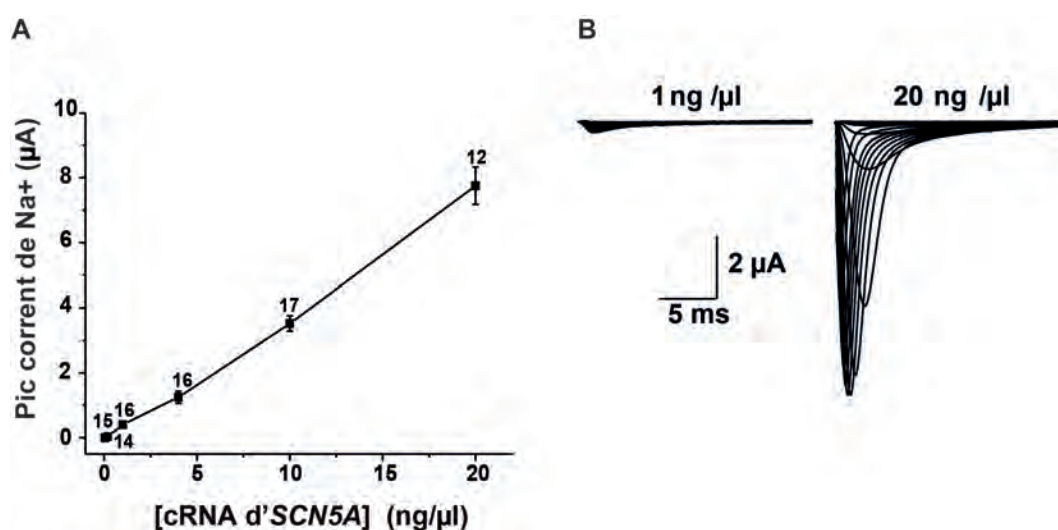


Figura 42. Estudi de la correlació entre els nivells de cRNA d'*SCN5A* i el corrent de Na^+ en oòcits de *Xenopus*. **A.** Relació entre els nivells de cRNA i el corrent de Na^+ registrat. Els punts representen els pics de màxim corrent per cada concentració i els números indiquen les rèpliques realitzades per cada condició. **B.** Traços representatius del corrent de Na^+ registrat per *patch-clamp* amb el mode *whole cell* en oòcits de *Xenopus* injectats amb 1ng/ μL i 20 ng/ μL de cRNA d'*SCN5A*.

Per tal d'examinar si els factors GATA cardíacs regulen l'expressió del gen *SCN5A* en cor humà, es va estudiar la possible correlació entre els nivells d'mRNA dels factors GATA i de l'*SCN5A* en cor humà mitjançant ddPCR. Es van utilitzar les 18 mostres de ventricle esquerre humà adult que ja s'havien utilitzat per la ddPCR en l'apartat 1.6., i es van analitzar amb sondes específiques pels tres factors GATA i per *SCN5A* marcades amb el fluorocrom FAM.

Els resultats de ddPCR van mostrar una correlació positiva i significativa (coeficient de Pearson 0,63) entre els nivells d'expressió de *GATA4* i *SCN5A*. En canvi, no es va observar correlació entre els nivells d'*SCN5A* i *GATA5* o *GATA6*, ni entre els diferents factors GATA (**Figura 43A i B**). Aquests resultats suggereixen que les variacions en els nivells d'mRNA de *GATA4* tenen un efecte sobre els nivells d'*SCN5A* en teixit cardíac i, per tant, reforcen el paper clau de *GATA4* en la regulació transcripcional d'*SCN5A* en el cor humà adult.

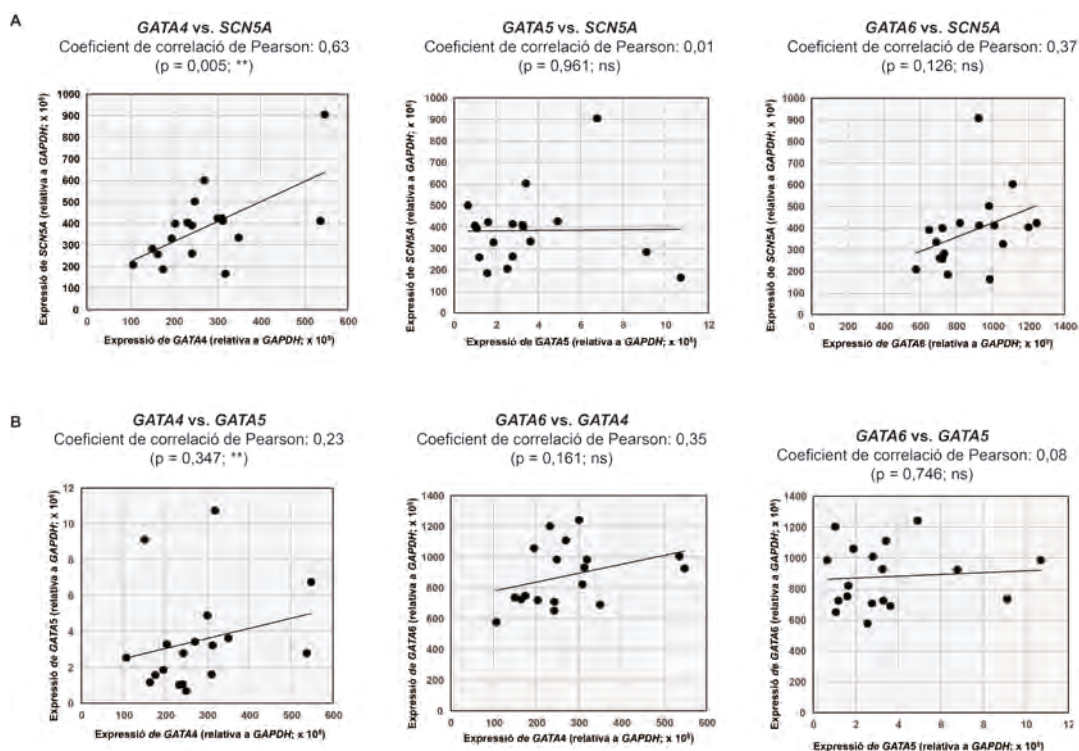


Figura 43. Estudi de la correlació entre els nivells d'mRNA d'*SCN5A* i dels factors GATA (A) i entre els diferents factors GATA (B). Anàlisi dels nivells d'mRNA de *GATA4*, *GATA5*, *GATA6* i *SCN5A* (marcats amb sondes FAM) per ddPCR de 18 mostres de ventricle esquerre humà. Es mostra la relació entre els nivells d'mRNA dels gens indicats en cada eix. Els resultats obtinguts estan normalitzats pels nivells de *GAPDH* (marcat amb sonda HEX). L'anàlisi estadística es va fer amb la correlació de Pearson, mostrada a la part superior de cada gràfic. Cada mostra es va analitzar 12 vegades. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

2. Modulació de l'activitat del promotor d'*SCN5A* per acetilació/desacetilació de GATA4

La funció del FT GATA4 està modulada per diverses modificacions posttraduccionals, entre les quals l'acetilació de lisines és una de les més estudiades. La forma acetilada de GATA4 té més afinitat d'unió al DNA i una major activitat transcripcional que no la forma sense acetilar. El balanç d'acetilació/desacetilació de GATA4 està modulat per l'activitat acetiltransferasa de p300 i l'activitat desacetilasa d'HDAC2.

Partint dels resultats obtinguts en aquesta tesi que constaten que GATA4 és un activador transcripcional del gen *SCN5A*, es va examinar si p300 i HDAC2 regulen l'activitat del promotor d'*SCN5A* a través de l'acetilació/desacetilació de GATA4. D'altra banda, es va realitzar un estudi exhaustiu per espectrometria de masses per tal de caracteritzar les lisines de GATA4 que són dianes de p300 i HDAC2.

2.1. L'activitat del promotor d'*SCN5A* està regulada per p300

Per tal d'examinar si l'activitat del promotor d'*SCN5A* està modulada per p300, es van realitzar assajos luciferasa en cèl·lules H9c2 prèviament cotransfectades amb el PromotorA-luciferasa i quantitats creixents de p300, en presència o absència de GATA4.

En absència de GATA4, es va observar un increment de l'activitat del promotor d'*SCN5A* en augmentar la concentració de p300 transfectada. Concretament, a la concentració màxima de p300 (600 ng) l'activitat del promotor va augmentar fins a set vegades respecte a la condició control (absència de GATA4 i p300; **Figura 44**). La coexpressió de GATA4 i p300 va induir una activació sinèrgica del promotor d'*SCN5A*. Aquests resultats suggereixen dos possibles mecanismes de p300 per a regular la transcripció

del gen *SCN5A*: a través de l'acetilació de les histones presents en el promotor d'*SCN5A*, o bé a través de l'acetilació de la proteïna GATA4. Cal destacar però que l'efecte observat en transfectar p300 sol podria ser degut a una acetilació de les histones, o bé també a una acetilació del GATA4 endogen.

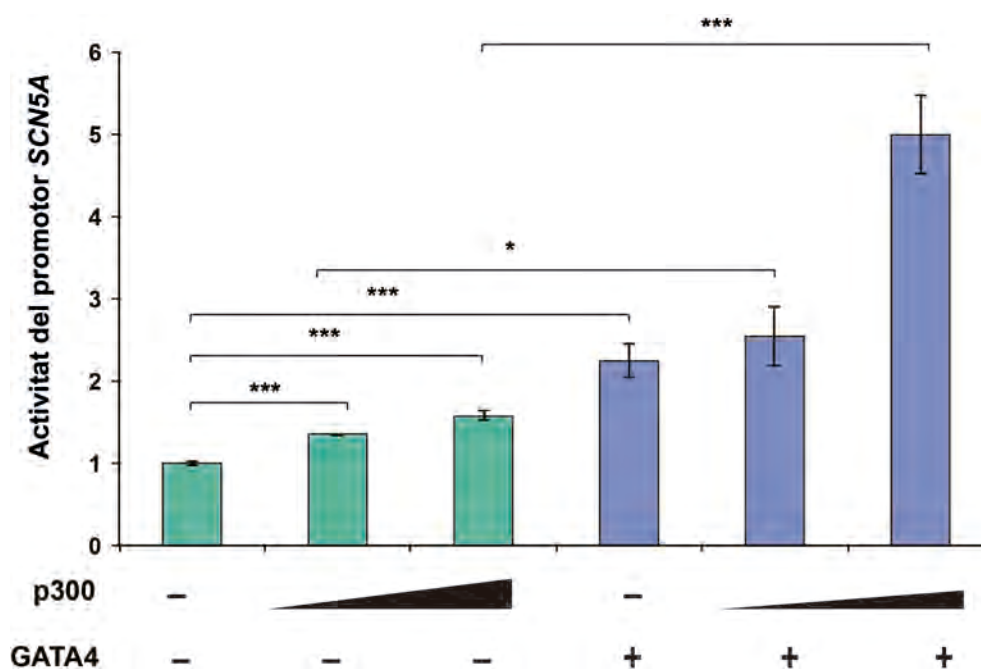


Figura 44. Efecte de GATA4 i p300 sobre l'activació del promotor d'*SCN5A*. Assaig luciferasa en cèl·lules H9c2 transfectades amb el PromotorA-luciferasa (200 ng) i els vectors d'expressió de GATA4 (1.200 ng) i p300 (300 i 600 ng), en les condicions indicades al gràfic. La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa es mostren respecte a la condició control (absència de p300 i GATA4) (mitjana $\pm$ ES, n=5). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01 i ***p $\leq$ 0,001.

Per tal de determinar si p300 està implicat en la regulació transcripcional del gen *SCN5A* *in vivo*, es van realitzar experiments de ChIP a partir de mostres de ventricle esquerre humà. Es va aïllar la cromatina del teixit cardíac i es va immunoprecipitar amb anticossos α -GATA4 i α -p300. El DNA immunoprecipitat es va analitzar amb encebadors específics per la regió del promotor (-198 pb respecte al TSS) i en dues regions distals (-8.803 i -5916

pb). Els resultats van mostrar que p300, igual que GATA4 (el qual ja s'havia mostrat a la **figura 36**), s'uneix al promotor d'*SCN5A* en cor humà adult. Aquesta unió és menor en les regions més allunyades del TSS que es van analitzar (**Figura 45**). L'enriquiment de GATA4 i p300 en la mateixa regió del promotor recolzaria un model segons el qual p300 actuaria com a coactivador de GATA4 en la regulació d'*SCN5A* en el cor humà adult, ja sigui a través de les histones o del mateix GATA4.

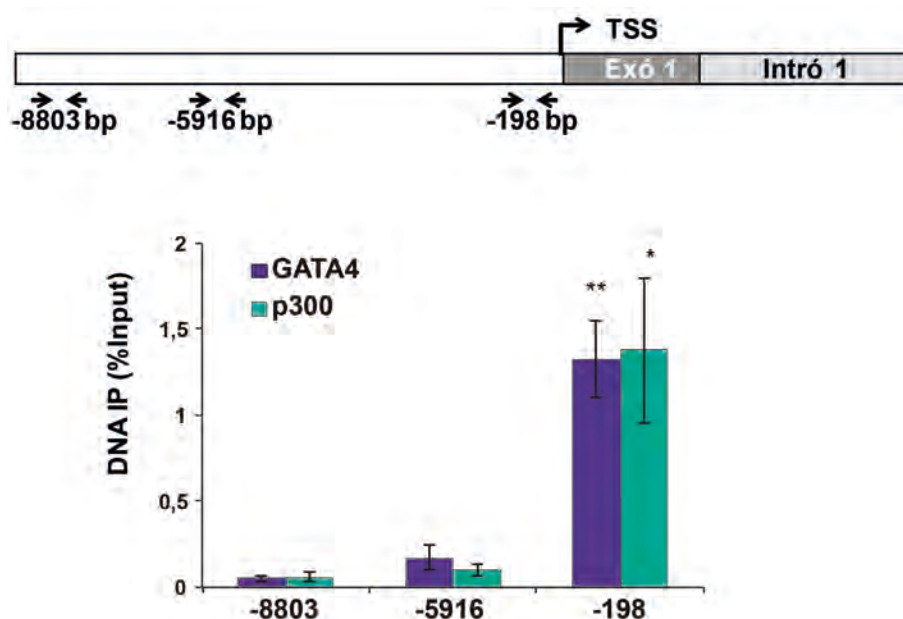


Figura 45. Anàlisi de la unió de p300 i GATA4 en el promotor i l'intró 1 del gen *SCN5A* en el cor humà adult mitjançant ChIP. Experiments de ChIP a partir de mostres de ventricle esquerre immunoprecipitades amb anticossos α -GATA4 i α -p300, seguits de l'anàlisi per qPCR en les regions indicades. Els números de l'eix de les X indiquen els parells de bases centrals de l'amplicó. Els resultats es mostren en percentatge d'input (mitjana $\pm$ ES, n=3). L'anàlisi estadística es va realitzar amb la prova t-Student relativa a la regió control (-8.803 pb). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

2.2. La regió bàsica del motiu C-Zn de GATA4 conté tres llocs d'acetilació

2.2.1. Tres lisines de GATA4 són dianes de p300

L'estudi de Takaya i col·laboradors és l'únic que fins al moment ha proporcionat evidències dels llocs d'acetilació de GATA4 per p300. Aquest estudi va definir quatre lisines de GATA4 (K311, K318, K320 i K322), localitzades a la regió bàsica del motiu C-Zn, com a dianes de p300¹⁶⁴. La determinació d'aquests llocs d'acetilació es va realitzar mitjançant assajos luciferasa, a partir dels quals van analitzar l'efecte de GATA4 WT o amb lisines mutades, en presència de p300, sobre l'activitat dels promotors *ANP* i *ET-1*. No obstant això, cal remarcar que aquest tipus d'estudi no és conclouent per a establir la posició exacta de les lisines de GATA4 acetilades.

Degut a la manca d'un estudi exhaustiu i rigorós sobre l'acetilació de GATA4, en aquesta tesi es va realitzar una anàlisi precisa i directa dels llocs d'acetilació de GATA4 per espectrometria de masses MALDI-TOF. L'objectiu principal de l'anàlisi per espectrometria de masses va ser comprovar els llocs diana de p300 que havien estat descrits per Takaya *et al*, així com també identificar possibles nous llocs d'acetilació. Per a realitzar aquests experiments, es van utilitzar cinc pèptids sintètics corresponents a la regió bàsica del motiu C-Zn de la proteïna GATA4 humana (**Figura 46** i **Taula 8**). Els pèptids inclouen les set lisines de la regió bàsica, de les quals quatre són les que ja han estat descrites com a llocs d'acetilació, i les altres tres lisines no s'acetilen segons Takaya i col·laboradors. Dels cinc pèptids, tres (pèptids 1, 2 i 3) tenen la seqüència d'aminoàcids WT i dos (pèptids 4 i 5) tenen dos o tres lisines mutades a arginines. Aquests pèptids van ser sotmesos a reaccions d'acetilació *in vitro* en presència de la proteïna recombinant humana p300 i acetil-CoA. Després de la reacció, els pèptids es van purificar i analitzar per MALDI-TOF. El grup acetil té un pes molecular de 42 Daltons (Da); per

tant, per cada acetilació la massa del pèptid augmentarà 42 Da. Amb cada pèptid es van dur a terme quatre reaccions, tres de les quals corresponien a condicions d'acetilació control (el pèptid sol, el pèptid amb p300 i el pèptid amb acetil-CoA) i una de les quals corresponia a la condició d'acetilació amb tots els components: pèptid amb p300 i acetil-CoA.

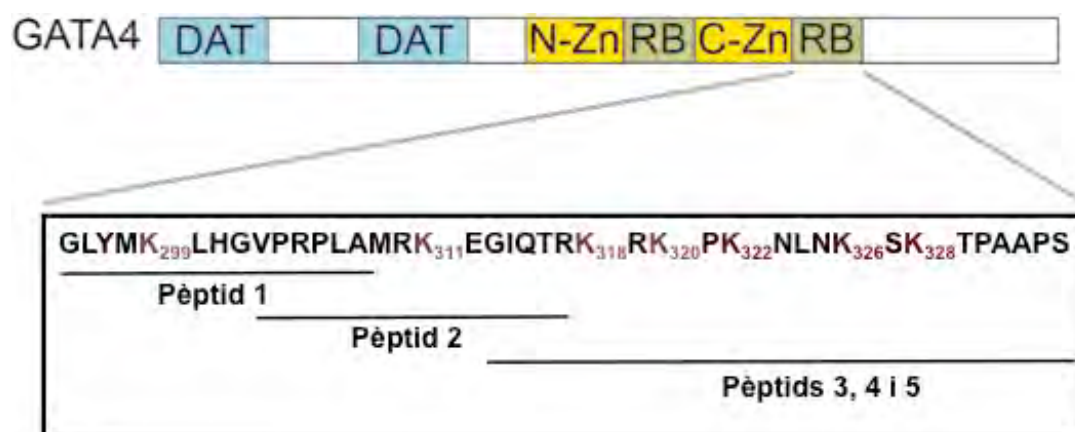


Figura 46. Pèptids sintètics de GATA4 humà. Es mostra la seqüència d'aminoàcids de la regió bàsica (RB) del motiu C-Zn de GATA4. En vermell es marquen les set lisines que conté aquesta regió i a sota els aminoàcids que inclouen cada un dels cinc pèptids. Els pèptids 4 i 5 contenen dues o tres lisines mutades a arginina.

Els resultats que es van obtenir de les anàlisis per MALDI-TOF de les reaccions de cada un dels pèptids són els següents:

- **Pèptid 1: GLYMK₂₉₉LHGVPRPLA** (Pes molecular: 1.551 Da)

El pèptid 1 conté una única lisina (K299). En les tres condicions control es va observar el pic corresponent al pèptid natiu (1.551 Da), i no es va identificar cap pic corresponent al pèptid acetilat, tal com s'esperava (**Figura 47A, B i C**). La reacció d'acetilació del pèptid 1 amb p300 i acetil-CoA, on també es va identificar el pèptid natiu, no va donar lloc a cap pic d'acetilació (**Figura 47D**), cosa que indica que p300 no acetila la lisina K299. Aquesta dada està d'acord amb l'estudi de Takaya, en el qual van observar que, en presència de p300, la

substitució de la lisina K299 per una alanina no causava canvis significatius en l'activitat transcripcional de GATA4.

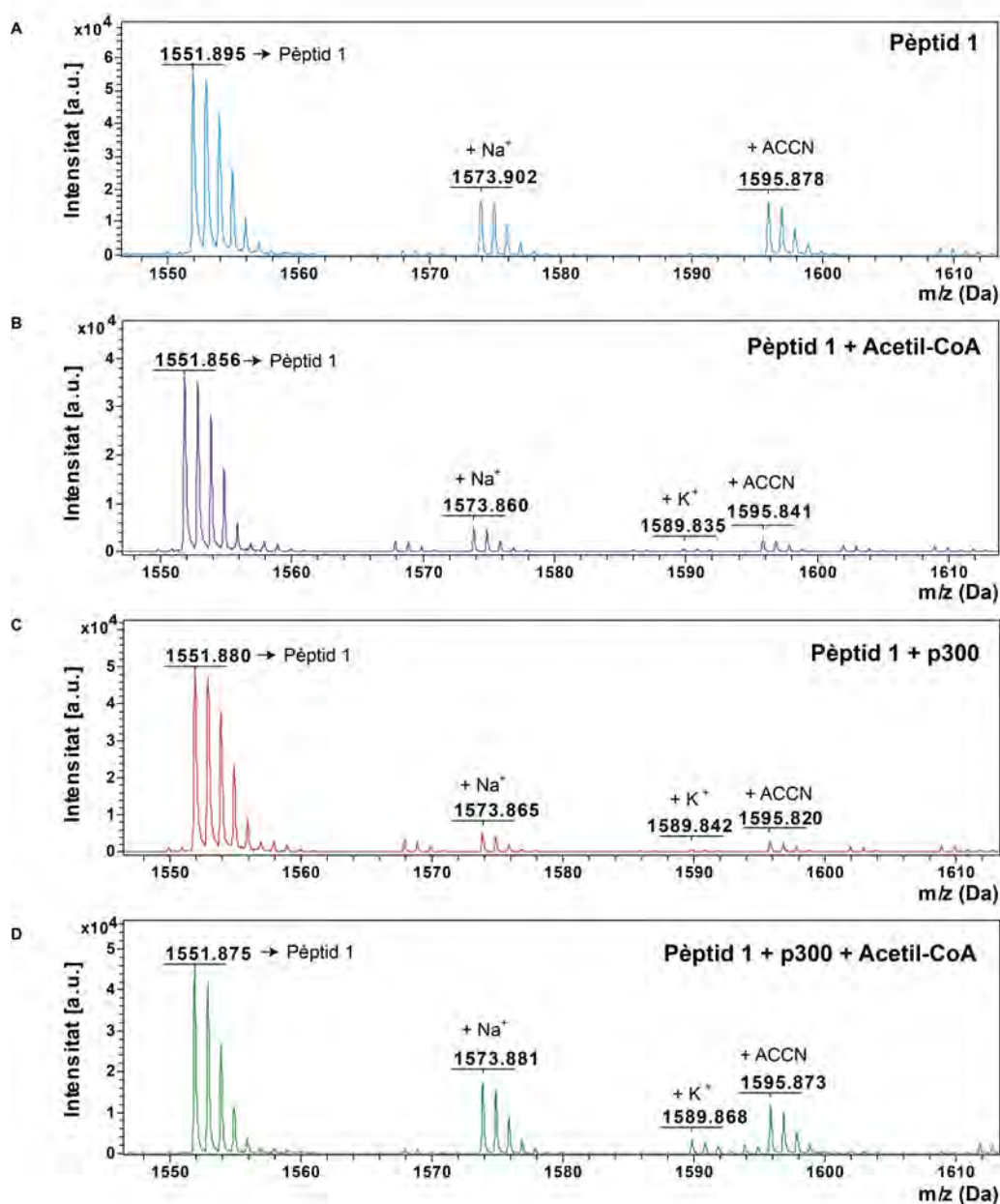
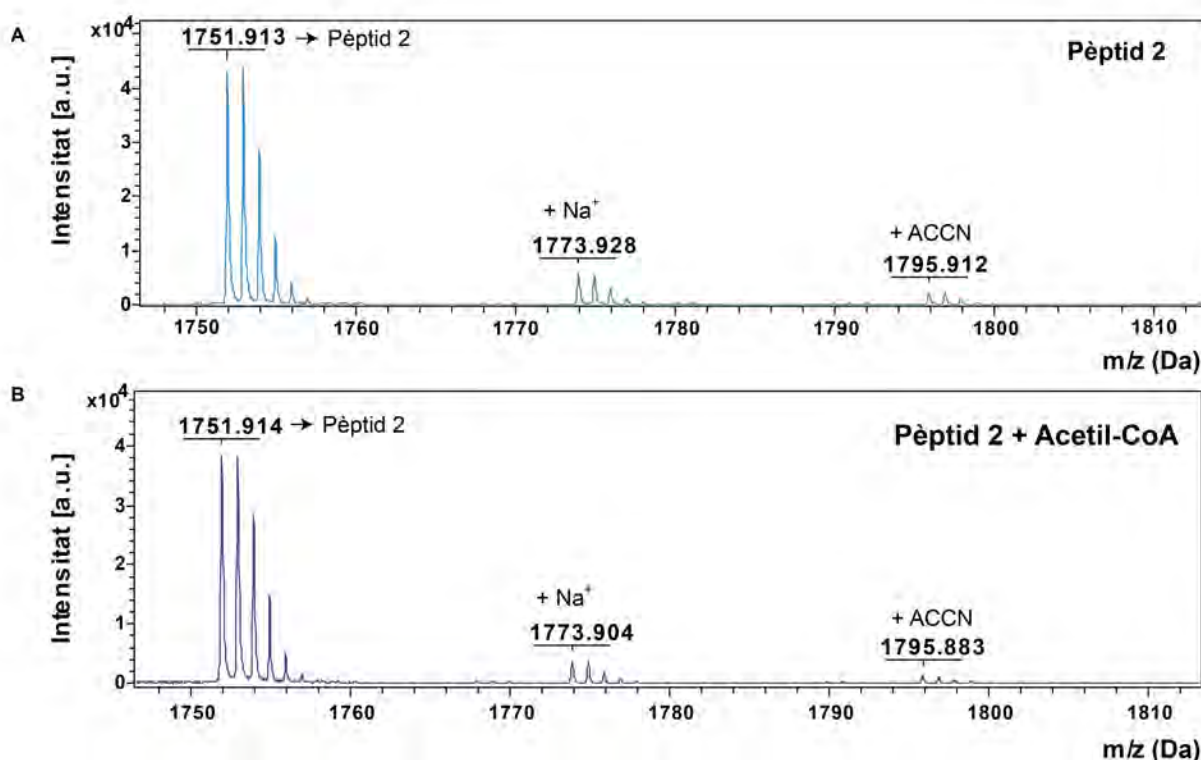


Figura 47. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació *in vitro* del pèptid 1. Espectres de masses obtinguts després d'incubar el Pèptid 1 sol (A), amb acetil-CoA (B), amb p300 (C) i amb acetil-CoA i p300 (D). En cada un dels espectres s'indica el pic

corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na^+ , K^+ o acetonitril (ACCN) afegit.

- **Pèptid 2: VPRPLAMR_{K311}EGIQTR** (Pes molecular: 1.752 Da)

El pèptid 2 conté la lisina K311. En les quatre condicions el pic de major intensitat que es va detectar corresponia al pèptid sense acetilar (1.752 Da), i en la condició d'acetilació no es va identificar cap forma acetilada del pèptid (**Figura 48A, B, C i D**). Les anàlisis suggereixen que el residu K311 no és una diana d'acetilació de p300. Aquest resultat està en desacord amb l'estudi de Takaya *et al*, en què van observar que una mutació de la lisina K311 a alanina donava lloc a una disminució de l'activitat transcripcional de GATA4 en presència de p300. Els autors van proposar que aquesta reducció de l'activitat transcripcional de GATA4 era deguda a la pèrdua d'un lloc d'acetilació.



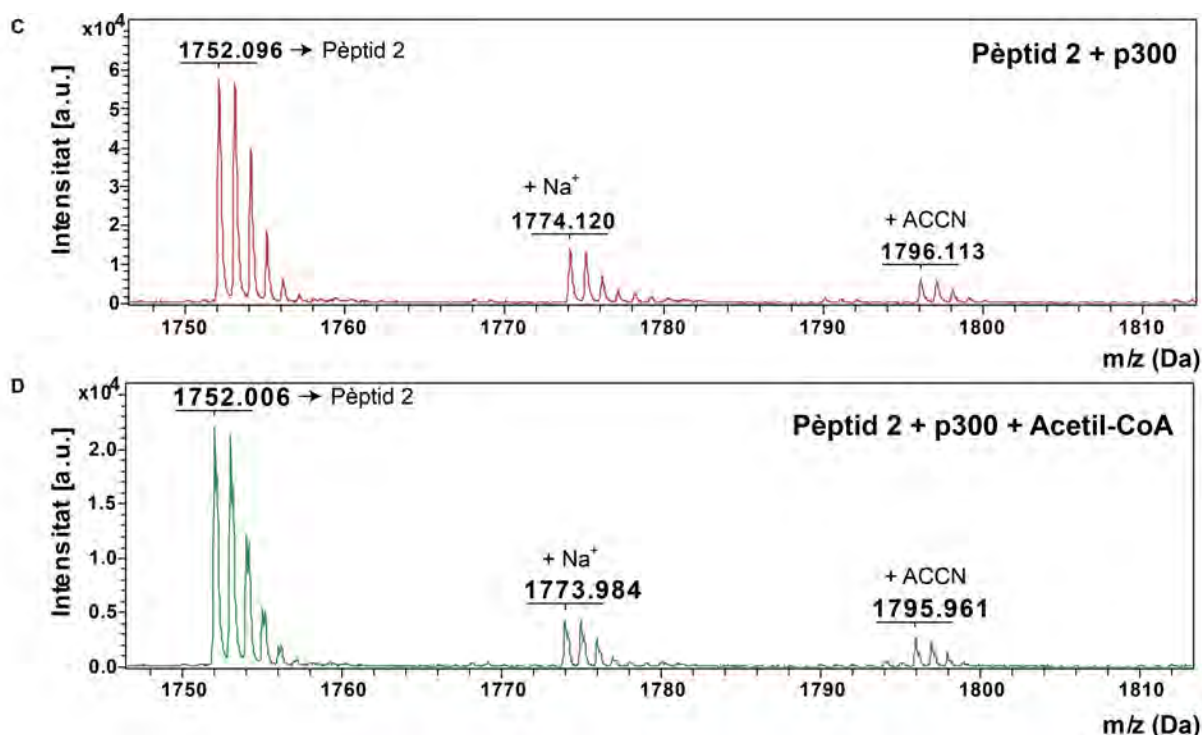


Figura 48. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació *in vitro* del pèptid 2.

Espectres de masses obtinguts després d'incubar el pèptid 2 sol (A), amb acetil-CoA (B), amb p300 (C) i amb acetil-CoA i p300 (D). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na^+ o acetonitril (ACCN) afegit.

- **Pèptid 3:** GIQTR_{K318}RK₃₂₀PK₃₂₂NLNK₃₂₆SK₃₂₈TPAAPS (Pes molecular: 2.419 Da)

El pèptid 3 conté cinc lisines, de les quals les tres primeres (K318, K320, K322) han estat descrites com a llocs d'acetilació per p300. Les condicions control van mostrar el pèptid en el seu estat natiu (2.419 Da) (**Figura 49A, B i C**). En la condició d'acetilació es van identificar pèptids no acetilats, així com pèptids mono-, di- i triacetilats, amb un pes molecular de 2.419, 2.461, 2.503 i 2.545 Da, respectivament (**Figura 49D**). Cal destacar que el pèptid triacetilat es trobava en molt baixa intensitat en comparació amb la resta de formes acetilades. Aquest efecte podria ser degut a una baixa volatilitat del pèptid triacetilat en les condicions de MALDI-TOF en què es treballava. Tot i que les

acetilacions podrien correspondre als tres residus publicats, amb aquestes dades no es pot confirmar la posició exacta de les lisines acetilades; per tant, no es pot descartar que K326 o K328 siguin llocs diana per p300.

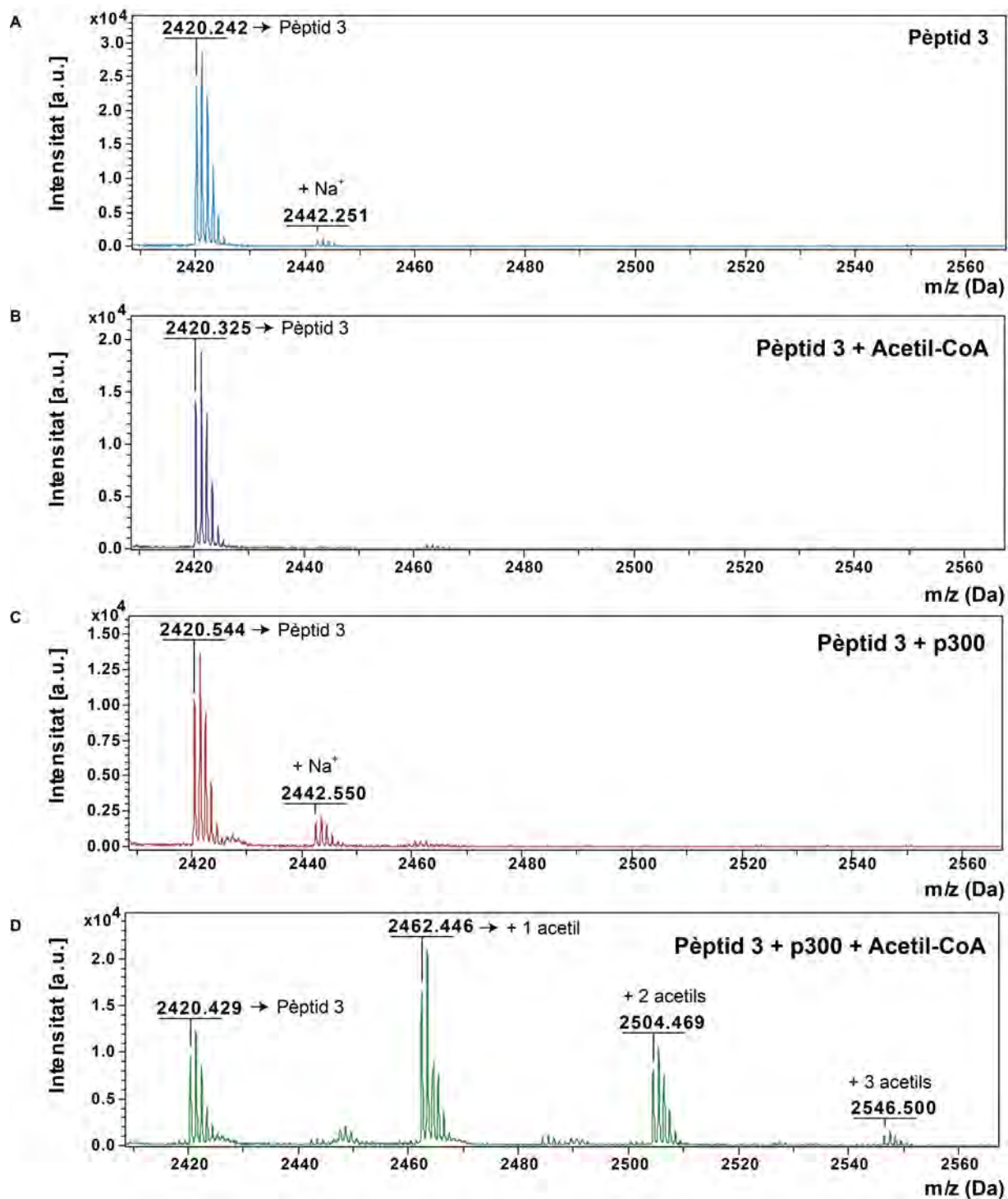
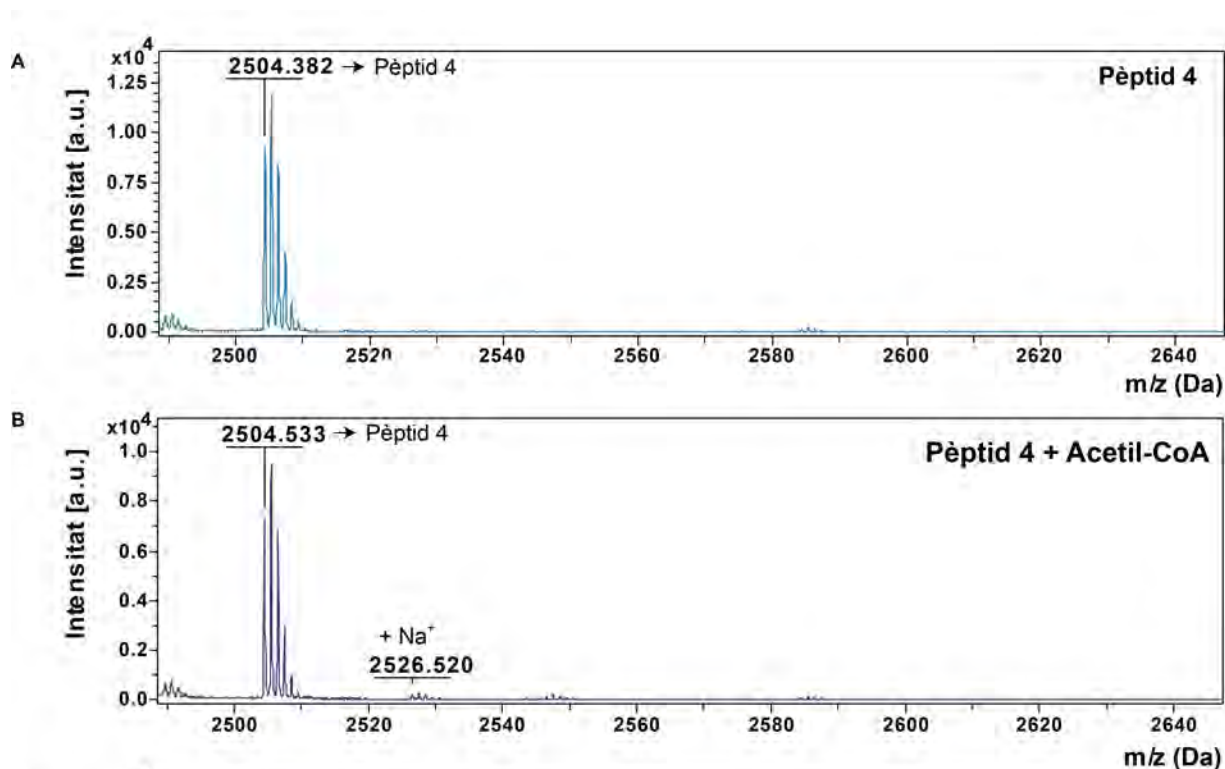


Figura 49. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació *in vitro* del pèptid 3. Espectres de masses obtinguts després d'incubar el pèptid 3 sol (A), amb acetil-CoA (B), amb p300 (C) i amb acetil-CoA i p300 (D). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultants del pèptid amb un grup Na⁺ o un o més grups acetils o afegits.

Pèptid 4: GIQTR₃₁₈RR₃₂₀PR₃₂₂NLNK₃₂₆SK₃₂₈TPAAPS (Pes molecular: 2.504 Da)

El pèptid 4, correspon a la mateixa regió del pèptid 3, però tres dels llocs d'acetilació descrits (K318, K320 i K322) han estat substituïts per arginines. En les tres condicions control es va identificar el pèptid en la forma no acetilada (2.504 Da) (**Figura 50A, B, C**). En l'assaig d'acetilació, a més del pèptid no acetilat, es van detectar pèptids monoacetilats, amb un pes molecular de 2.546 Da (**Figura 50D**). Aquest resultat indica que una de les dues lisines presents en el pèptid (K326 o K328) és diana d'acetilació per p300. Aquesta observació estaria en desacord amb l'estudi de Takaya *et al*, segons el qual cap d'aquests dos residus és acetilat per p300.



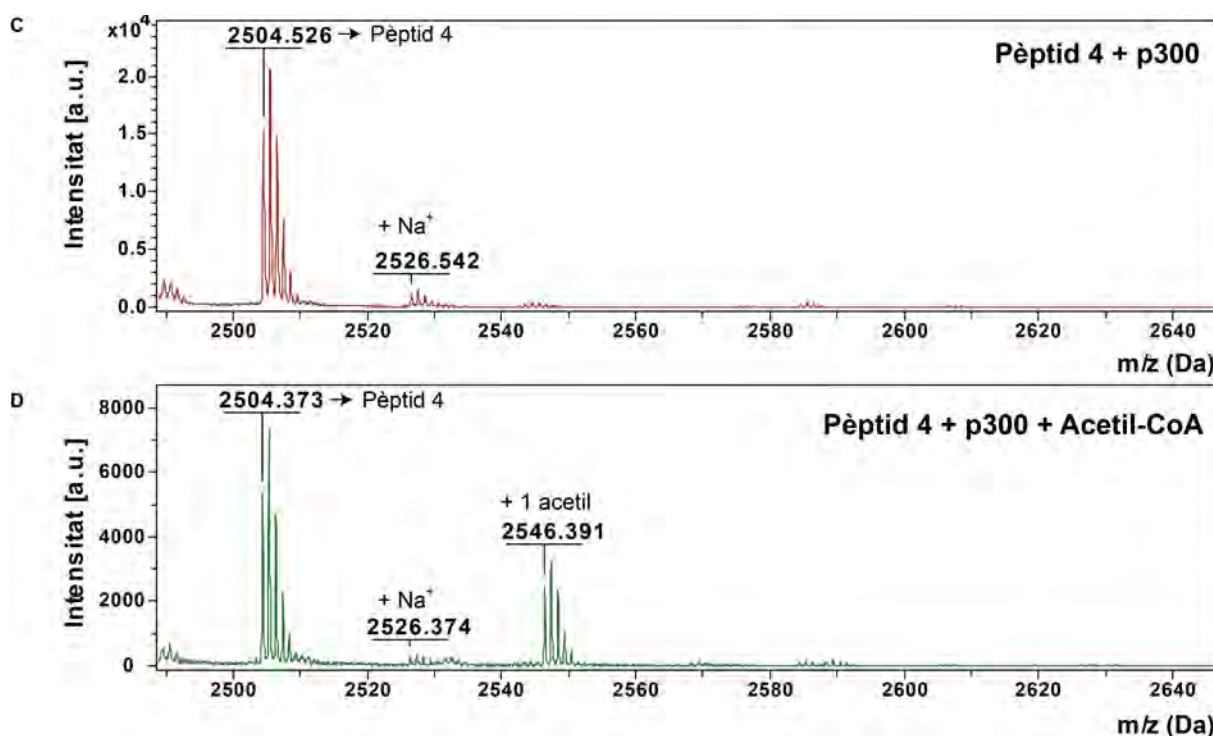


Figura 50. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació *in vitro* del pèptid 4. Espectres de masses obtinguts després d'incubar el pèptid 4 sol (A), amb acetil-CoA (B), amb p300 (C) i amb acetil-CoA i p300 (D). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na^+ o acetil afegit.

- **Pèptid 5:** GIQTR_{K318}R_{K320}PK₃₂₂NLNR₃₂₆SR₃₂₈TPAAPS (Pes molecular: 2.476 Da)

El pèptid 5 conté, de forma inversa al pèptid 4, els residus K326 i K328 substituïts per arginines. En les quatre condicions es pot observar el pic corresponent al pèptid sense acetilar (2.476 Da) (**Figura 51A, B, C i D**). En la condició d'acetilació es van detectar pèptids mono- i diacetilats (**Figura 51D**), amb un pes molecular de 2.518 i 2.560 Da, respectivament. Aquest resultat indicaria que dues de les lisines presents en el pèptid (K318, K320 o K322) són llocs acetilats per p300.

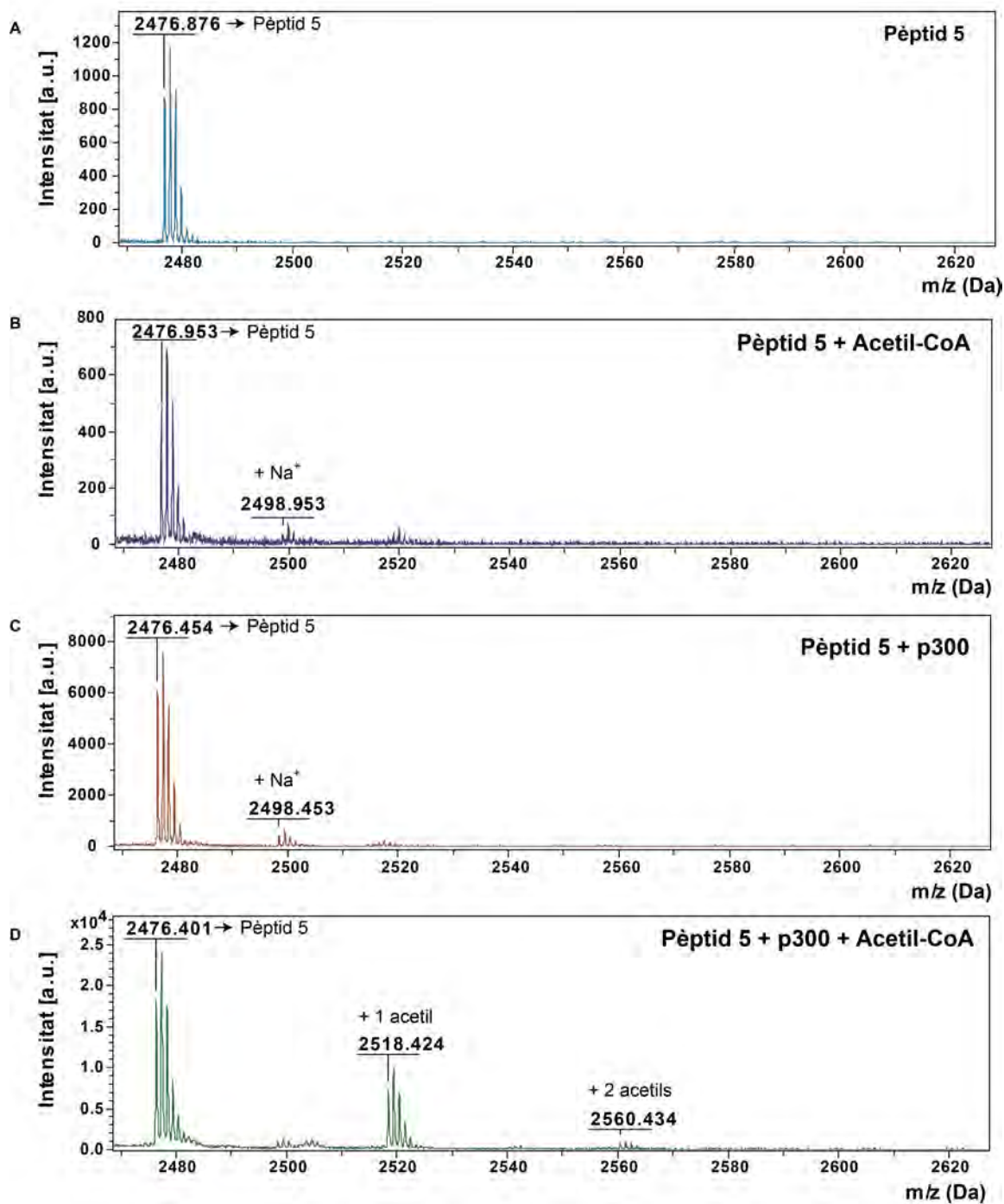


Figura 51. Anàlisi per MALDI-TOF de la reacció d'acetilació *in vitro* del pèptid 5. Espectres de masses obtinguts després d'incubar el pèptid 5 sol (A), amb acetil-CoA (B), amb p300 (C) i amb acetil-CoA i p300 (D). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na⁺ o un o dos grups acetils afegits.

En resum, els estudis de MALDI-TOF generen algunes controvèrsies respecte les quatre lisines descrites com a llocs d'acetilació en l'estudi de Takaya *et al*, que proposava les lisines K311, K318, K320 i K322 com a llocs d'acetilació. Segons els nostres estudis, lisina K311 no s'aceta i, de les lisines K318, K320 i K322, només dues són dianes d'acetilació. D'altra banda, els estudis de MALDI-TOF també assenyalen un nou lloc d'acetilació de GATA4, la lisina K326 o K328.

Per tal de clarificar quina de les dues lisines (K326 o K328) s'aceta, la reacció d'acetilació del pèptid 3 es va analitzar per LC-MS/MS. Malauradament, la qualitat dels espectres obtinguts no va permetre detectar amb certesa la lisina acetilada. No obstant això, els resultats preliminars obtinguts van identificar 3 acetilacions en el pèptid fragmentat després de la lisina K326 presentava (**Figura 52**). Tanmateix, el pèptid fragmentat després de la lisina K328 continuava presentant tres acetilacions. Aquests resultats suggereixen que la lisina K328 no s'aceta, mentre que la lisina K326 podria ser un nou residu diana de p300. Tot i això, seria necessari optimitzar les anàlisis d'LC-MS/MS per a validar quins són els tres residus acetilats per p300.

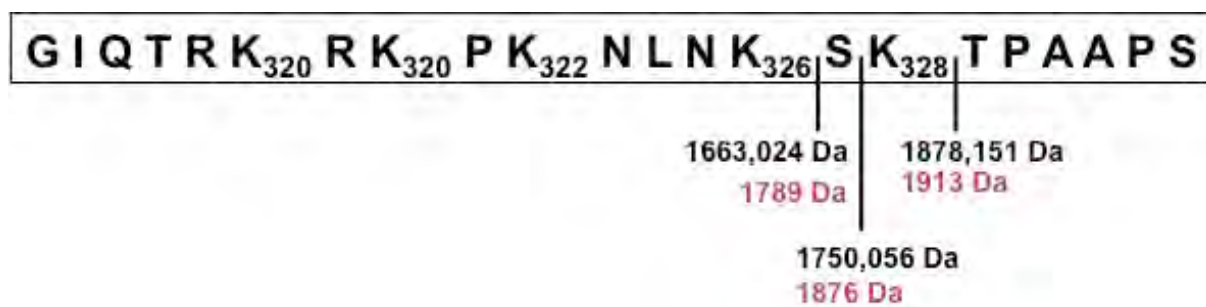


Figura 52. Anàlisi de la reacció d'acetilació *in vitro* del pèptid 3 acetilat per LC-MS/MS.

En negre s'indiquen els pesos teòrics dels fragments del pèptid 3 sense acetilar. Els pesos de 1.663,024, 1.750,056, 1.878,151 Da corresponen als pèptids després de fragmentar per la lisina K326, la serina S327, la lisina K328, respectivament. En vermell s'indiquen els pesos obtinguts amb les anàlisis de LC-MS/MS del pèptid 3 acetilat. El valor de 1.789 Da correspon al pèptid fragmentat després de la lisina de K326 més 3 acetilacions (1.663,024

Da + 42 Da + 42 Da + 42Da). El fragment obtingut després de tallar per la serina S327, amb un pes de 1.876 Da, correspon al fragment 1.789,024 Da més el pes molecular de la serina (87,08 Da). El fragment obtingut després de tallar en la lisina K328, amb un pes de 1.913 Da, correspon al fragment 1.876,056 Da més el pes molecular de la lisina (128,17 Da).

2.2.2. La lisina K326 és un nou lloc d'acetilació de GATA4

Per tal de comprovar si la lisina K326 és un lloc d'acetilació de GATA4, es van analitzar els nivells d'acetilació de GATA4 quan aquest residu estava mutat. En primer lloc, es va generar un vector d'expressió de GATA4 amb la lisina K326 mutada a alanina per mutagènesi dirigida (K326A). Aleshores es van transfectar cèl·lules HEK293T amb els vectors GATA4 WT o GATA4-K326A amb o sense tractament de TSA i NA. El TSA és un inhibidor de les desacetilases tipus I, II i IV, mentre que la NA és un inhibidor de les desacetilases tipus III. La inhibició de totes les desacetilases cel·lulars permet, doncs, detectar nivells elevats d'acetilació. Al cap de 48 hores de la transfecció, els lisats cel·lulars es van immunoprecipitar amb un anticòs α -lisines acetilades, i les mostres immunoprecipitades es van analitzar per *western blot* amb un anticòs α -GATA4. L'anàlisi per *western blot* va mostrar que la proteïna GATA4 K326A presenta uns nivells d'acetilació menors respecte la proteïna WT (**Figura 53** carrils 3 i 6 IP). Aquest resultat està d'acord amb la pèrdua d'un lloc d'acetilació en la proteïna mutant K326, i assenyala la lisina K326 com un nou lloc d'acetilació de GATA4.

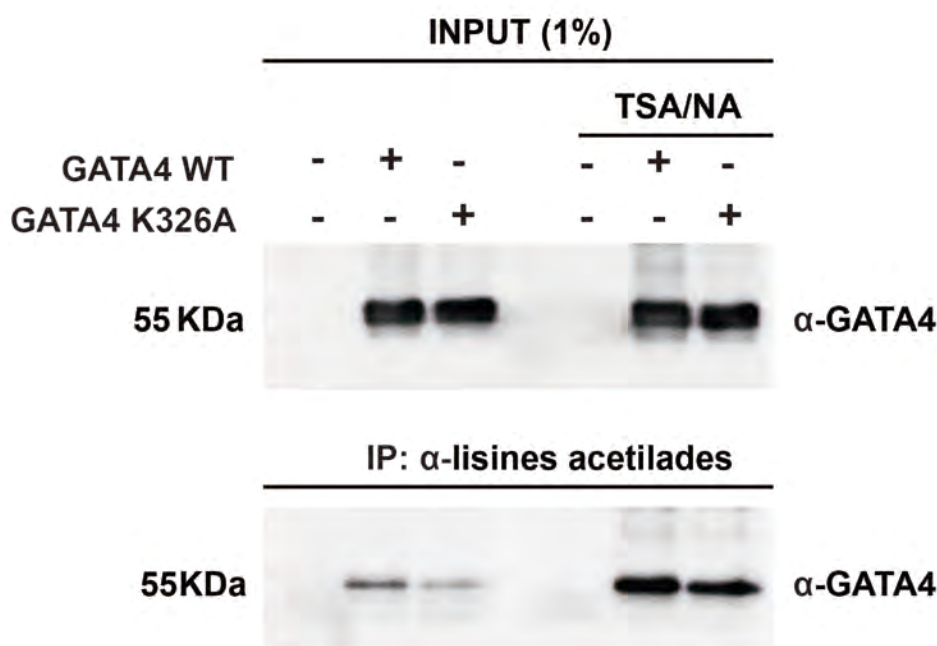


Figura 53. Efecte de la mutació K326A en els nivells d'acetilació de GATA4. Les cèl·lules HEK293T es van transfectar amb els vectors d'expressió de GATA4 WT o GATA4-K326A (10 ug). Els lisats es van immunoprecipitar amb un anticòs α -lisines acetilades i es van analitzar per *western blot* amb un anticòs α -GATA4. A la part superior es mostren els inputs (l'1% de les proteïnes totals), i a la part inferior les mostres immunoprecipitades amb l'anticòs α -lisines acetilades. Els tres últims carrils corresponen a les cèl·lules tractades amb els inhibidors de desacetilases: 400 nM de trichostatin A (TSA) i 5 mM de nicotinamida (NA).

2.3. L'activitat del promotor d'*SCN5A* està regulada per HDAC

2.3.1. HDAC2 regula el promotor d'*SCN5A* per un efecte depenent de GATA4

Diversos estudis han demostrat que la proteïna HDAC2, juntament amb el factor homeodomini HOPX, desacetila GATA4, induint una disminució de l'activitat transcripcional de GATA4⁸⁸. Un exemple n'és l'efecte repressor del complex HOPX-HDAC2 en l'expressió de la ciclina D2, que és un gen diana de GATA4.

Per tal d'estudiar si aquest mecanisme també té lloc en la regulació del gen *SCN5A*, es van realitzar experiments luciferasa en cèl·lules H9c2. En primer lloc es va observar que HDAC2, HOPX o ambdós a la vegada no indueixen un efecte significatiu sobre l'activitat promotor. En canvi, es va observar que la cotransfecció de GATA4 amb HDAC2 i HOPX disminueix significativament l'activitat del PromotorB d'*SCN5A* (**Figura 54**). No obstant això, aquesta disminució és similar quan GATA4 es cotransfecta amb d'HDAC2 o HOPX, això suggereix que HDAC2 i HOPX no necessàriament actuen cooperativament en la regulació d'*SCN5A*. Aquestes dades indiquen que HDAC2 modula l'expressió del gen *SCN5A* probablement mitjançant la desacetilació de GATA4, i no per una desacetilació de les histones del promotor, ja que no s'observa efecte quan es sobreexpressa HDAC2 sol.

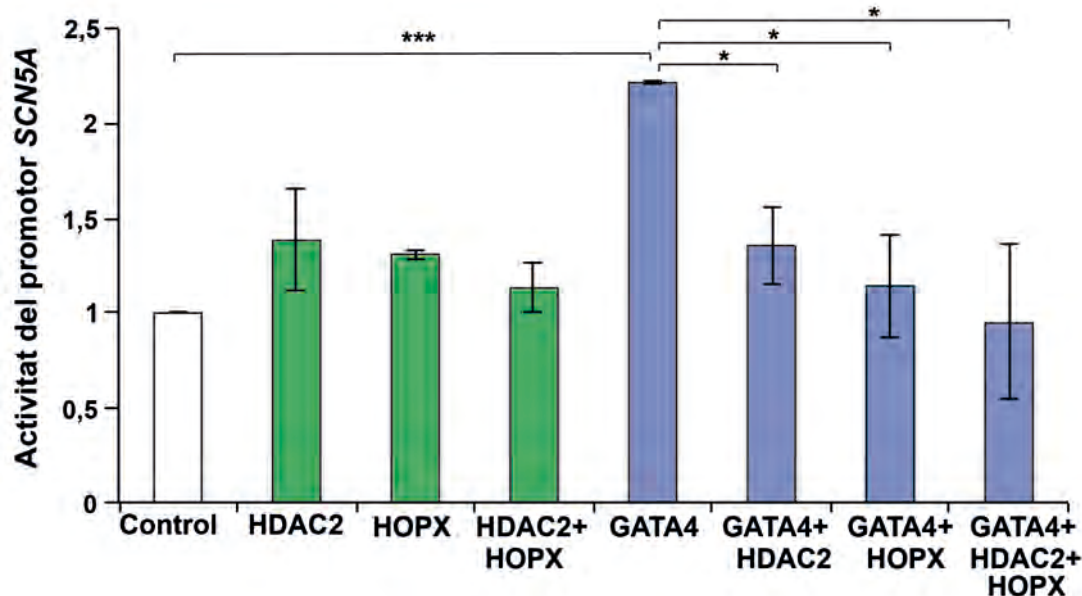


Figura 54. Efecte d'HDAC2 i HOPX sobre GATA4 en la regulació del promotor d'*SCN5A*. Les cèl·lules H9c2 es van transfectar amb el PromotorB-luciferasa (200 ng), el promotor EF-1 α -renilla (20 ng), i els vectors d'expressió de GATA4 (1.200 ng), HDAC2 (600 ng) o HOPX (600 ng). La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa estan normalitzats per renilla i relativitzats per la condició control. (mitjana $\pm$ ES;

n=4). L'anàlisi estadística es va fer amb la prova t-Student respecte el control. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ i *** $p < 0,001$.

2.3.2. HDAC4 i HDAC5 regulen l'activitat del promotor d'SCN5A

A continuació es va examinar si, a part d'HDAC2, altres HDAC de tipus I i II (HDAC1-8) també modulen la transcripció d'SCN5A per desacetilació. Per tal d'estudiar-ho es van transfectar cèl·lules H9c2 amb el PromotorA-luciferasa i els vectors d'expressió de les HDAC 1-8.

Els assajos luciferasa dels lisats cel·lulars obtinguts van mostrar que l'activitat del promotor d'SCN5A disminueix significativament en sobreexpressar HDAC4 i HDAC5. Cap de les altres HDAC sobreexpressades (HDAC1, 2, 3, 6, 7, 8) va tenir cap efecte rellevant en l'activitat del promotor (**Figura 55**). Aquestes dades estarien d'acord amb una acció repressora d'HDAC4 i HDAC5 sobre el promotor d'SCN5A. Aquest efecte podria ser degut a una desacetilació de les histones del promotor SCN5A catalitzada per HDAC4 i HDAC5, que donaria lloc a una estructura més condensada de la cromatina. També podria ser degut a que HDAC4 i/o HDAC5 participen en la desacetilació de GATA4 endògena, reduint-ne la seva activitat transcripcional.

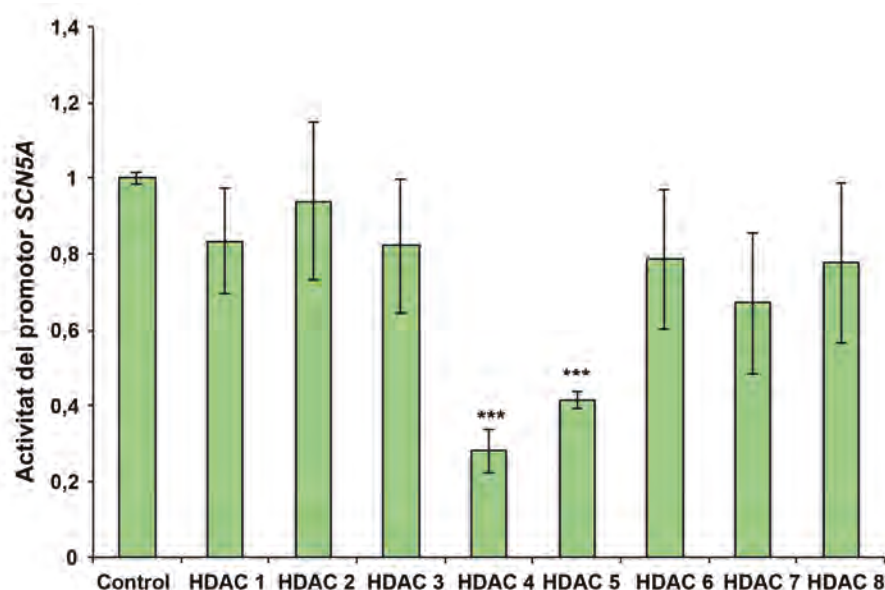


Figura 55. Efecte de les HDAC sobre l'activitat del promotor *SCN5A*. Les cèl·lules H9c2 es van transfectar amb el PromotorA-luciferasa (200 ng), el promotor EF-1 α -renilla (20 ng) i el vector d'expressió de les HDAC indicades (600 ng). La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa estan normalitzats per renilla i relativitzats per la condició control (absència d'HDAC) (mitjana $\pm$ ES; n=8). L'anàlisi estadística es va fer amb la prova t-Student respecte a la condició control. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01 i ***p $\leq$ 0,001.

Per tal d'avaluar la possibilitat que l'efecte d'HDAC4 i HDAC5 sobre *SCN5A* fos causat per una desacetilació de GATA4, es van realitzar experiments luciferasa en cèl·lules H9c2 utilitzant, en aquest cas, el PromotorB, que té una activitat transcripcional major que la del PromotorA. Es van transfectar les cèl·lules H9c2 amb el PromotorB-luciferasa i els vectors d'expressió d'HDAC4 o HDAC5, en presència o absència de GATA4. En condicions d'activitat basal del promotor (absència de GATA4), es va observar que, de manera similar al que s'havia observat en el PromotorA (**Figura 55**), HDAC4 i HDAC5 disminueixen significativament l'activitat del PromotorB (**Figura 56**). En presència de GATA4, la sobreexpressió d'HDAC4 i HDCA5 també redueix significativament l'activació depenent de GATA4, essent major l'efecte d'HDAC4. El grau de repressió induït per HDAC4 i HDAC5 en presència de GATA4 és molt similar al que es detecta en absència de GATA4. Aquests resultats suggereixen que la inhibició d'HDAC4 i HDAC5 de l'activitat del promotor d'*SCN5A* és independent a la desacetilació de GATA4, i que per tant HDAC4 i HDAC5 no són desacetilases de GATA4.

Per a confirmar aquesta hipòtesi, es va estudiar l'efecte d'HDAC4 i HDAC5 (i HDAC2 com a control positiu) sobre els nivells d'acetilació de GATA4 en experiments d'immunoprecipitació. Es van cotransfectar cèl·lules HEK293T amb GATA4 i p300 (per induir l'acetilació de GATA4), en presència d'HDAC2, HDAC4 o HDAC5. Els lisats cel·lulars es van immunoprecipitar amb l'anticòs α -lisines acetilades, i posteriorment, el material immunoprecipitat es va analitzar per *western blot* amb un anticòs α -GATA4. D'acord amb estudis

anteriors⁸⁸, es va observar que p300 augmenta l'acetilació de GATA4, mentre que HDAC2 disminueix els nivells d'acetilació de GATA4 (**Figura 57**). En canvi, HDAC4 i HDAC5 no van tenir cap efecte en els nivells d'acetilació de GATA4. Aquests resultats concorden amb els dels assajos luciferasa realitzats, que suggereixen que la regulació d'HDAC4 i HDAC5 sobre *SCN5A* no és depenent de la desacetilació de GATA4, sinó que segurament es deu a una desacetilació de les histones del promotor d'*SCN5A*, o bé d'algun altre FT regulador d'*SCN5A*.

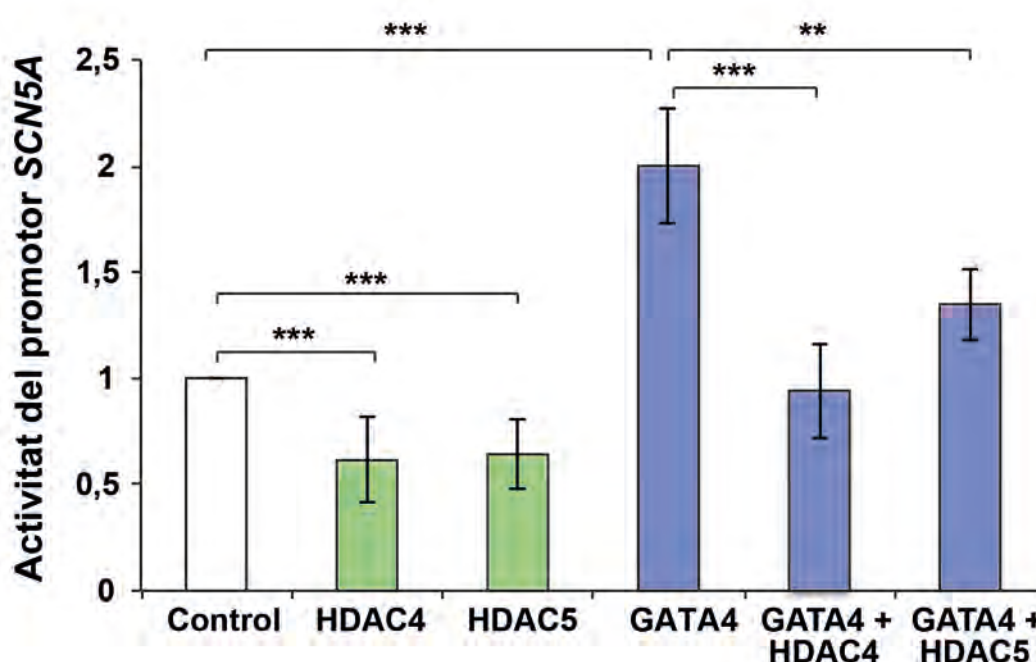


Figura 56. Efecte d'HDAC4 i HDAC5 sobre GATA4 en la regulació d'*SCN5A*. Les cèl·lules H9c2 es van transfectar amb el PromotorB-luciferasa (200 ng), el promotor EF-1 α -renilla (20 ng), i vectors d'expressió de GATA4 (1.200 ng), HDAC4 (600 ng) o HDAC5 (600 ng) segons s'indica. La quantitat total de DNA es va ajustar amb pcDNA3.1. Els valors de luciferasa es van normalitzar amb renilla i es van relativitzar respecte a la condició control (absència de GATA4 i HDAC) (mitjana $\pm$ ES; n=3). L'anàlisi estadística es va fer amb la prova t-Student. * p<0,05, **p<0,01 i ***p<0,001.

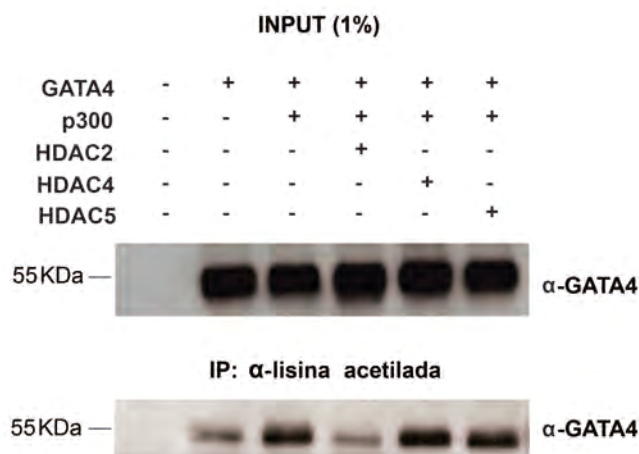


Figura 57. Efecte d'HDAC2, HDAC4 i HDAC5 en l'acetilació de GATA4. Les cèl·lules HEK293T es van transfectar amb vectors d'expressió de GATA4/HA (10 µg), p300 (10 µg), HDAC2 (7 µg), HDAC4 (7 µg) o HDAC5 (7 µg). El DNA total es va ajustar amb pcDNA3.1. Les cèl·lules es van lissar 48 hores després de la transfecció i es van immunoprecipitar amb un anticòs α-lisines acetilades, i després es van analitzar per western blot amb l'anticòs α-GATA4. L'input correspon a l'1% de la proteïna total.

2.3.3. HDAC2 desacetila pèptids de GATA4 en assajos *in vitro*.

Tot i que s'ha descrit que HDAC2 és una desacetilasa de GATA4, fins al moment no s'ha elaborat cap estudi sobre els residus de GATA4 que són dianes d'HDAC2. Per tal d'identificar aquests residus diana, es van realitzar assajos de desacetilació *in vitro* amb els pèptids sintètics de GATA4 i es van analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF. En aquests assajos es van utilitzar els pèptids 3, 4 i 5, ja que, segons les anàlisis de MALDI-TOF exposades en l'apartat 2.2.1., són acetilats per p300. En primer lloc, els pèptids es van incubar amb p300 recombinant i acetil-CoA en una reacció d'acetilació *in vitro*, per tal d'obtenir-ne la forma acetilada. Aleshores, els pèptids es van purificar i es van incubar amb HDAC2 o HDAC4 recombinant. Segons els assajos luciferasa i d'immunoprecipitació realitzats en aquesta tesi, HDAC4 no desacetila GATA4 i, per tant, es va considerar un control negatiu de la reacció de desacetilació.

- **Pèptid 3:** GIQTRK₃₁₈RK₃₂₀PK₃₂₂NLNK₃₂₆SK₃₂₈TPAAPS (Pes molecular: 2.419 Da)

El pèptid 3 esdevé mono-, di- i triacetilat després de la incubació amb p300 (**Figura 58A**). La incubació del pèptid 3 acetilat amb HDAC2 va donar lloc a una desacetilació completa del pèptid (**Figura 58B**). En canvi, en incubar-lo amb HDAC4 es van continuar observant pèptids mono-, di- i triacetilats, confirmant que HDAC4 no és una GATA4-desacetilasa (**Figura 58C**).

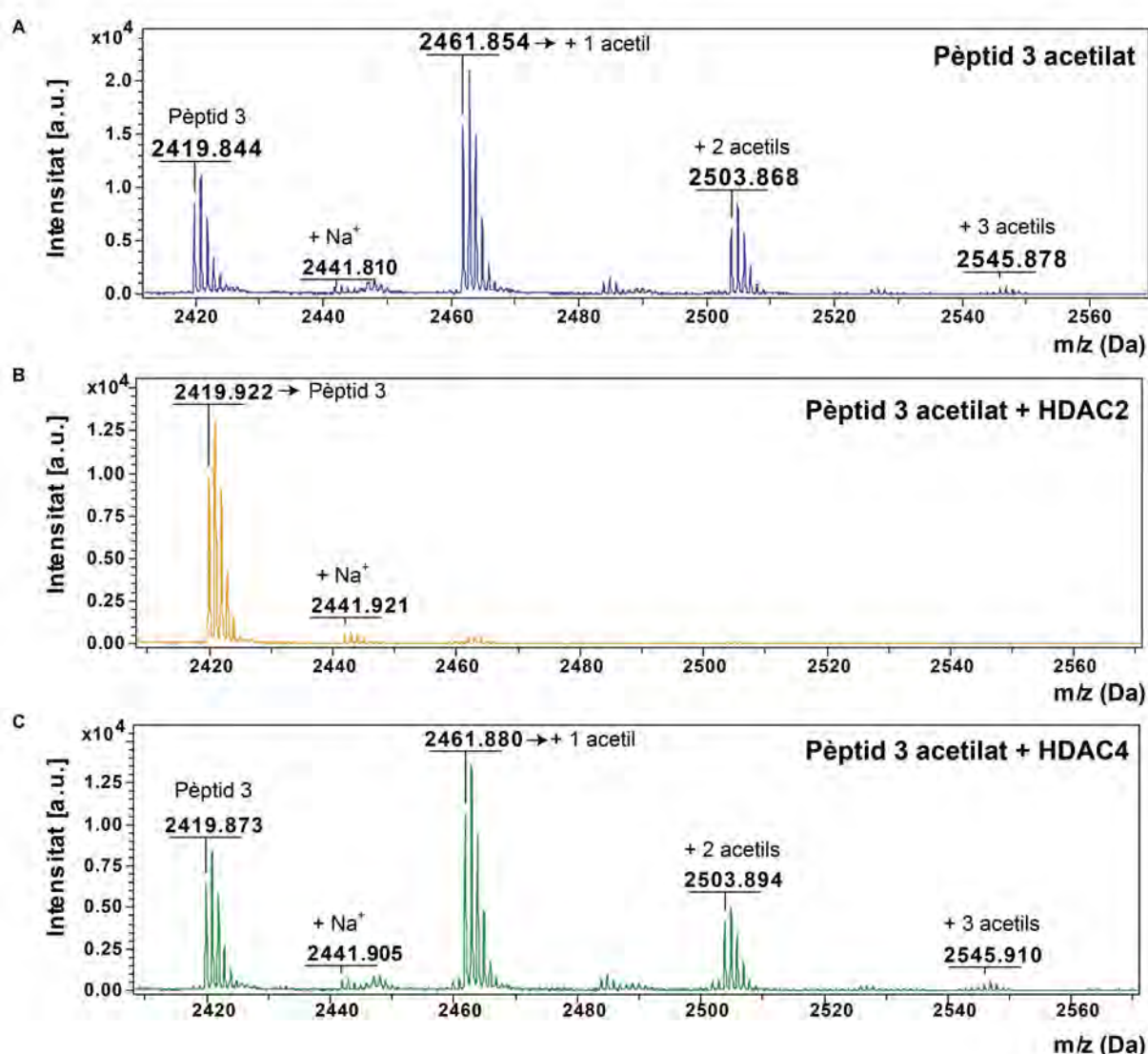


Figura 58. Anàlisi de la reacció de desacetilació *in vitro* del pèptid 3 per MALDI-TOF. Espectres de masses obtinguts del pèptid 3 acetilat (A), del pèptid 3 acetilat incubat amb

HDAC2 (B) o amb HDAC4 (C). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na^+ o acetil afegit.

- **Pèptid 4:** GIQTR₃₁₈RR₃₂₀PR₃₂₂NLNK₃₂₆SK₃₂₈TPAAPS (Pes molecular: 2.504 Da)

El pèptid 4 (amb les lisines K318, K320 i K322 mutades a arginines) esdevé monoacetilat després de la incubació amb p300 (**Figura 59A**). L'acetilació va ser revertida després de la reacció de desacetilació amb HDAC2, i es va obtenir només un pic corresponent a la forma no acetilada del pèptid (**Figura 59B**). En canvi, de forma similar al resultat amb el pèptid 3, després de la reacció de desacetilació amb HDAC4 es van continuar detectant pèptids monoacetilats (**Figura 59C**).

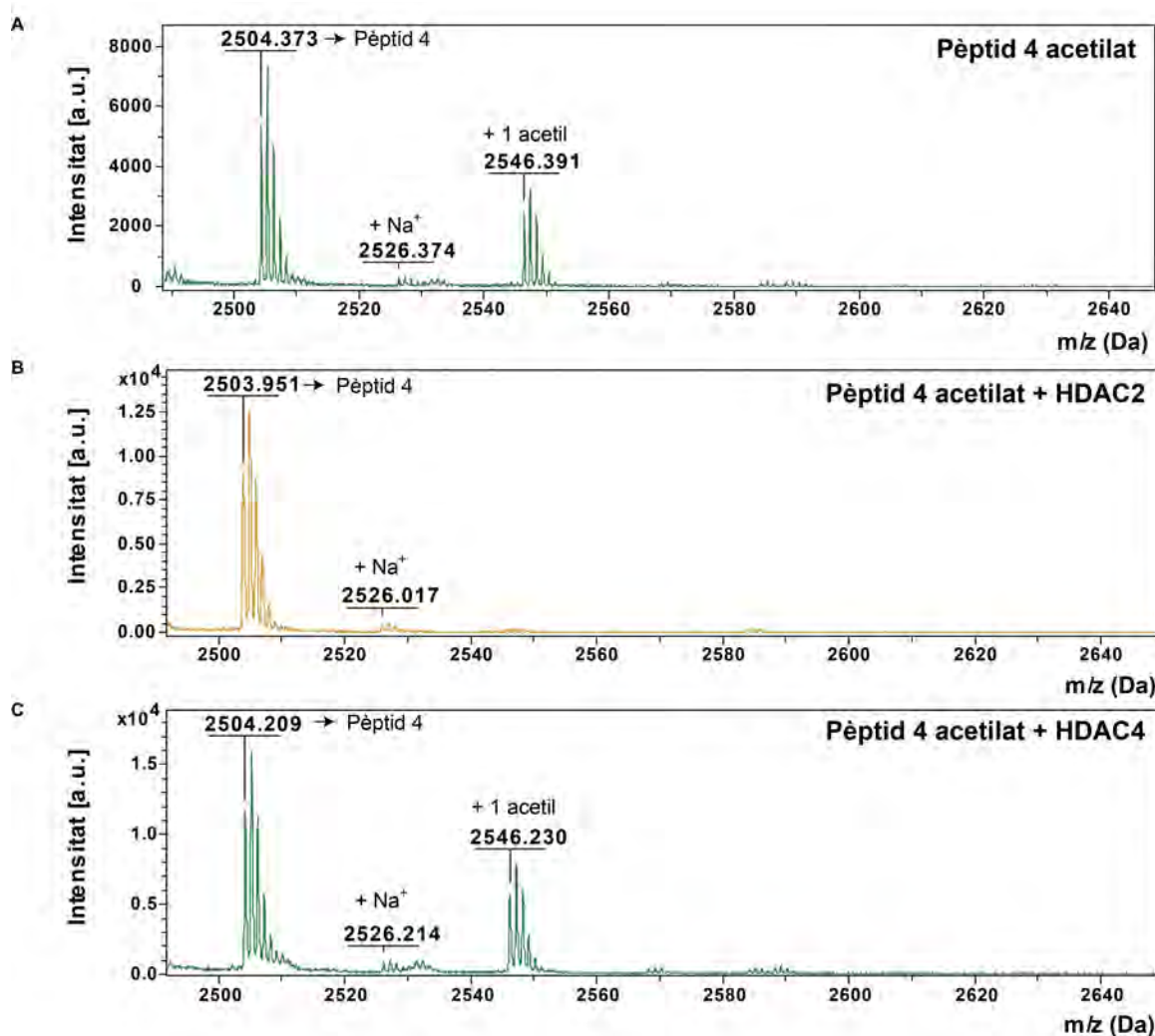
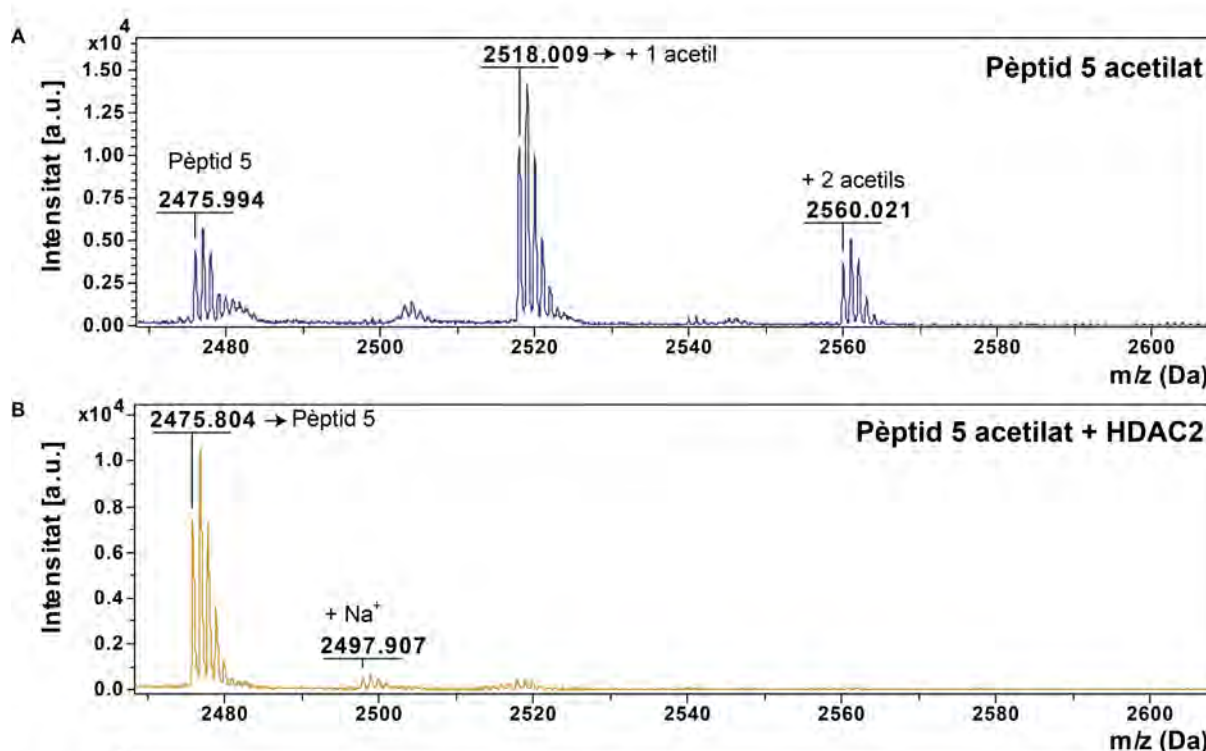


Figura 59. Anàlisi de la reacció de desacetilació *in vitro* del pèptid 4 per MALDI-TOF. Espectres de masses obtinguts del pèptid 4 acetilat (A), del pèptid 4 acetilat incubat amb HDAC2 (B) o amb HDAC4 (C). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na⁺ o acetil afegit.

- **Pèptid 5: GIQTR_{K318}R_{K320}PK₃₂₂NLNR₃₂₆SR₃₂₈TPAAPS** (Pes molecular: 2.476 Da)

El pèptid 5 (amb les lisines K326 i K328 mutades a arginines) esdevé mono- i diacetilat en la reacció d'acetilació amb p300 (**Figura 60A**). La incubació amb HDAC2 va produir la desacetilació dels pèptids mono- i diacetilats (**Figura 60B**). La reacció amb HDAC4, igual que en els altres casos, no va donar lloc a canvis en l'estat de desacetilació del pèptid, i es van continuar detectant pèptids amb una i dues acetilacions (**Figura 60C**).



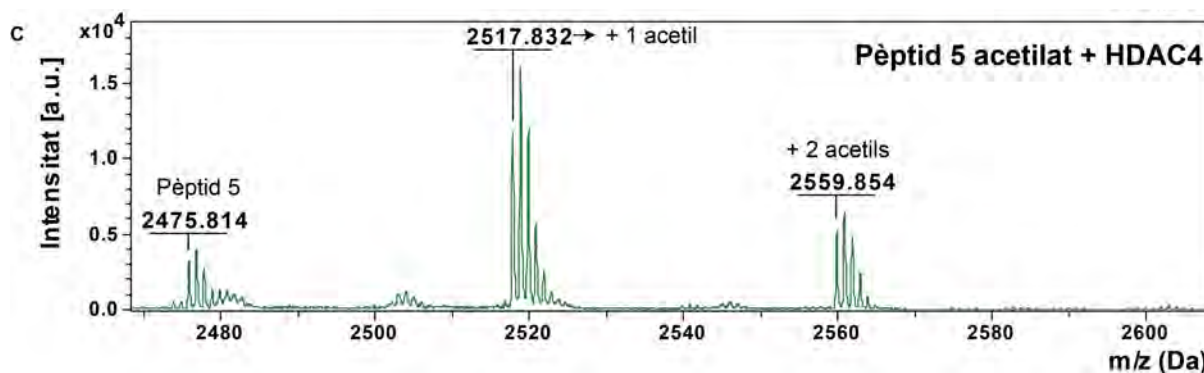


Figura 60. Anàlisi de la reacció de desacetilació *in vitro* del pèptid 5 per MALDI-TOF.

Espectres de masses obtinguts del pèptid 5 acetilat (A), del pèptid 5 acetilat incubat amb HDAC2 (B) o amb HDAC4 (C). En cada un dels espectres s'indica el pic corresponent al pèptid, així com també les espècies resultats del pèptid amb un grup Na^+ o acetil afegit.

En resum, els assajos de desacetilació *in vitro* van confirmar, tal com s'havia descrit prèviament, que HDAC2 és una GATA4-desacetilasa. Aquests resultats també confirmen que GATA4 no és una proteïna diana d'HDAC4. Per primera vegada, aquest estudi revela que la lisina K326 i dues de les lisines K318, K320 o K322 de GATA4 són dianes d'HDAC2, i indica que HDAC2 pot desacetilar les lisines que són acetilades per p300.

V. Discussió

Les canalopaties cardíques són un grup d'arítmies associades a un alt risc de MSC. La causa més freqüent d'aquestes malalties són les variants genètiques en els gens que codifiquen per canals iònics cardíacs, així com també per proteïnes reguladores d'aquests canals. Segons el canal afectat, aquestes variants poden donar lloc a alteracions del corrent de Na^+ , de K^+ o de Ca^{2+} , i en últim terme a la generació d'un PAC anòmal i a una alteració en l'activitat elèctrica cardíaca. No obstant això, són malalties amb una expressivitat variable, per aquest motiu, pacients amb una mateixa variant genètica poden presentar una àmplia varietat de fenotips.

Aquesta tesi es basa en les canalopaties que estan associades amb una alteració en el corrent de Na^+ , com són la SBr, la SQT3, la SPCC i la FAF. Tot i que les variants en regions codificants del gen *SCN5A* són la causa més coneguda d'aquestes malalties, encara es desconeixen molts factors relacionats amb la seva etiologia. Un 60-75% dels pacients amb SBr i un 20-35% dels pacients amb SQT3 no presenten cap diagnòstic genètic, i en aquests casos la causa de la malaltia és encara desconeguda. Per tant, un dels reptes actuals en aquest camp és la identificació de noves causes moleculars de canalopaties associades amb alteracions del canal $\text{Na}_v1.5$. En els darrers anys, diverses evidències han permès proposar un nou mecanisme causal d'aquestes malalties segons el qual una alteració en l'expressió del canal $\text{Na}_v1.5$ podria donar lloc a un PAC anòmal i a una major susceptibilitat a arítmies cardíques. En funció del grau d'expressió del canal, els fenotips podrien ser més o menys severos. Aquest nou mecanisme està basat en la importància d'un control estricte de la xarxa de transcripció cardíaca per tal de garantir un correcte desenvolupament i funcionament del cor. En aquest context, i tot i la rellevància del canal $\text{Na}_v1.5$ en les canalopaties cardíques, la regulació de l'expressió del gen *SCN5A* és encara un procés molt poc conegut.

En aquesta tesi s'ha dut a terme un complex estudi que ha permès identificar un nou mecanisme de regulació transcripcional d'*SCN5A* pels FT GATA cardíacs (GATA4, GATA5 i GATA6). Els resultats obtinguts es poden emmarcar en 4 grans blocs de discussió:

1. Efecte dels FT GATA cardíacs sobre la regulació del promotor d'*SCN5A*.
2. Expressió dels FT GATA cardíacs en el cor humà adult.
3. Modulació de l'activitat transcripcional d'*SCN5A* per acetilació/desacetilació.
4. Possible model molecular de regulació de l'expressió d'*SCN5A*.

1. Efecte dels FT GATA cardíacs sobre la regulació del promotor d'*SCN5A*

Els resultats obtinguts en aquesta tesi demostren que els factors GATA4 i GATA5 actuen com a potencials reguladors de la transcripció d'*SCN5A*, mentre que GATA6 té un discret efecte regulador. Els resultats obtinguts també apunten a que aquest mecanisme de regulació té lloc en el cor humà adult. Les evidències experimentals presentades per recolzar aquest mecanisme es constaten en estudis realitzats en cèl·lules de ventricle d'embrió de rata H9c2, així com també en teixit de ventricle esquerre d'humà adult. La discussió d'aquests resultats s'ha dividit en un primer apartat basat en l'estudi de regulació d'*SCN5A* pels FT GATA cardíacs a nivell molecular, i un segon apartat a on es fa referència als motius GATA com a importants regions reguladores d'*SCN5A*. Finalment, s'exposa com alteracions en la transcripció del gen *SCN5A* podrien donar lloc al desenvolupament de malalties cardíques.

1.1. Mecanisme molecular de regulació del promotor d'*SCN5A* pels FT GATA cardíacs

Els estudis moleculars duts a terme en aquesta tesi demostren que GATA4 i GATA5 interaccionen físicament entre ells i cooperen en l'activació del promotor d'*SCN5A*.

La interacció entre GATA4 i GATA5 mitjançant assajos *in vitro* d'interacció proteïna-proteïna havia estat prèviament descrit²⁰⁰. A més, la interacció GATA4-GATA5 també s'havia detectat en assajos de coimmunoprecipitació similars als que s'han presentat en aquest treball²⁰¹. Tanmateix, aquesta tesi presenta, per primera vegada, l'evidència de que GATA4 i GATA5 interaccionen en condicions *in vivo* al cor humà adult, tal i com es demostra en els experiments de Re-ChIP.

La cooperació entre factors GATA en la regulació de l'expressió gènica és un mecanisme àmpliament descrit. En un estudi amb ratolins doble heterozigots *GATA4*^{+/-}/*GATA5*^{+/-} van observar que durant la cardiogènesi GATA4 i GATA5 cooperen en l'expressió de gens cardíacs implicats en la formació del canal auriculoventricular i del tracte de sortida del ventricle¹³⁸. Concretament, els nivells de transcrits dels gens cardíacs *MEF2C*, *TBX20* i *BMP7*, es troben reduïts en els doble heterozigots, però no en els heterozigots senzills. D'altra banda, també s'ha demostrat que GATA4 i GATA5 actuen sinèrgicament en l'activació d'un gen intestinal que codifica per la proteïna d'unió als àcids grassos *FABP1*²⁰⁰. No obstant això, la regulació de GATA4 i GATA5 en l'expressió d'*SCN5A* és la primera evidència que postula que ambdós factors actuen de forma cooperativa en la regulació d'un gen cardíac en l'etapa postnatal. Aquest resultat s'ha demostrat a dos nivells: en experiments luciferasa, on s'ha observat una acció sinèrgica de GATA4 i GATA5 en l'activació del promotor d'*SCN5A*; i en experiments de ReChIP de ventricle humà adult, on s'ha observat que les dues proteïnes coocupen les mateixes

regions del gen *SCN5A* (al promotor i a l'intró 1). Així mateix, cal destacar els resultats de les anàlisis de ddPCR, on s'observa una correlació positiva i significant entre els nivells d'mRNA de *GATA4* i *SCN5A* en les mostres de ventricle. Aquest resultat remarca el paper de *GATA4* en el control dels nivells d'mRNA d'*SCN5A* en el cor humà adult. Tot i que en el present treball també es suggereix que *GATA5* és un activador d'*SCN5A*, no s'ha trobat correlació entre els nivells d'mRNA de *GATA5* i *SCN5A* en les mostres de ventricle. Aquestes observacions suggereixen que petits canvis en els nivells d'mRNA de *GATA5* no produeixen canvis significatius en l'expressió d'*SCN5A*. Es proposa, doncs, un model segons el qual *GATA4* és el principal activador d'*SCN5A*, i que *GATA4* sinergitza amb *GATA5* per produir una major activació de l'expressió d'*SCN5A*.

Diversos estudis han descrit que *GATA4* i *GATA6* actuen sinèrgicament en l'activació de gens cardíacs¹⁵⁷. En canvi, els experiments duts a terme en aquesta tesi indiquen que aquest mecanisme de regulació no succeeix en la regulació del promotor d'*SCN5A*. Aquesta hipòtesi es fonamenta amb els experiments de Re-ChIP en mostres de cor humà, on no s'observa una colocalització de *GATA4* amb *GATA6* en el promotor i l'intró 1 d'*SCN5A*. De forma similar, els assajos luciferasa en cèl·lules H9c2 indiquen que *GATA6* per si sol indueix un lleuger efecte en l'activació d'*SCN5A*, mentre que quan es coexpressa amb *GATA4* l'efecte observat és equivalent al de *GATA4* sol. Aquest resultat suggereix que *GATA4* i *GATA6* podrien competir pels mateixos llocs d'unió al DNA, essent *GATA4* el que tindria l'efecte dominant. Per tant, es podria proposar que *GATA4* i *GATA6* són redundants en la regulació d'*SCN5A*, tot i que serien necessaris més estudis per confirmar-ho. La redundància entre factors *GATA* cardíacs ha estat descrita en diversos estudis^{139, 143, 146}. En aquest sentit, s'ha observat que embrions de ratolins *knockout* de *GATA4*^{-/-} presenten un augment dels nivells d'mRNA de *GATA5* i *GATA6* en el cor, probablement per compensar la pèrdua de *GATA4*²⁰².

En aquesta tesi es proposa que GATA4 i GATA5 podrien formar part d'un mateix complex proteic, amb altres FT cardíacs centrals, que s'uniria al promotor i a l'intró 1 del gen *SCN5A* per activar de manera cooperativa la transcripció d'aquest gen. Aquesta hipòtesi es recolza en estudis que descriuen la presència de GATA4 en complexos proteics responsables de regular l'expressió de gens cardíacs. Estudis de ChIP-seq en cèl·lules HL-1, han identificat *enhancers* coocupats pels FT GATA4, NKX2-5, TBX5, SRF i MEF2A, o combinacions d'alguns d'ells¹¹⁶. Tanmateix, s'ha observat que el complex format per GATA4, NKX2.5 i TBX5 regula múltiples gens cardíacs^{160, 203}. Aquests tres FT, juntament amb TBX3, s'uneixen a dos *enhancers* d'*SCN5A*, localitzats al gen *SCN10A* i al final del gen *SCN5A*. D'altra banda, hi ha poques evidències que descriguin la participació de GATA5 i GATA6 en aquests complexos proteics. En aquest sentit, alguns estudis apunten a que GATA5 i GATA6 poden substituir GATA4 en la interacció amb altres FT; en l'activació de determinats promotors cardíacs, GATA5 pot interaccionar amb NKX2-5, i GATA6 amb MEF2, substituint GATA4. Aquest seria un altre exemple de la redundància entre els factors GATA¹⁴². Farien falta, doncs, nous estudis per determinar els components que podrien formar part del complex proteic, juntament amb GATA4 i GATA5, per activar el promotor d'*SCN5A*. En aquesta línia, estudis preliminars realitzats en paral·lel amb aquesta tesi suggereixen que GATA4, GATA5, TBX5 i NKX2.5 sinergitzen en l'activació del promotor d'*SCN5A*.

Diversos estudis han descrit que l'acetiltransferasa p300 facilita la formació de complexos on hi intervé GATA4. Per exemple, és necessària la unió de p300 amb el FT cardíac dHAND per tal que aquest últim pugui interactuar amb GATA4 i activar sinèrgicament els gens cardíacs com són *ANP*, *BNP* i α -*MHC*²⁰⁴. De manera similar, p300 facilita la interacció entre GATA4 i un FT tipus dit de zinc anomenat YY1 o també entre GATA4 i FOG-2^{166, 205}. En base aquests estudis, es pot hipotetitzar que, en l'activació del gen *SCN5A*, p300

podria interaccionar amb el complex GATA4-GATA5 (i altres FT) facilitant la unió entre ells. Aquesta hipòtesi es fonamenta a partir dels resultats obtinguts en la present tesi que indiquen que: (1) p300 actua com a coactivador transcripcional de GATA4 en l'activació d'*SCN5A*; i (2) p300 i GATA4 s'uneixen en la mateixa regió del promotor d'*SCN5A* en cor humà. Altres estudis que han demostrat la interacció entre GATA4 i p300, així com també entre GATA5 i p300 també recolzarien aquesta hipòtesi⁸⁷.

En general, la formació de complexos de vàries subunitats és un mecanisme molt comú de regulació transcripcional tant a nivell cardíac com en altres teixits. Les proteïnes que formen el complex poden ser tant específiques de teixit com proteïnes amb una expressió ubiqua, com és el cas de p300. Però només en les cèl·lules on s'expressin totes les proteïnes que formen el complex es podrà transcriure el gen que regulen, per tant, aquest mecanisme és important per l'expressió gènica diferencial ja que permet una alta especificitat. La formació de complexos proteics és un procés altament controlat que no només serveix per coregular l'expressió gènica de manera cooperativa i específica, sinó també per prevenir la interacció entre FT que tenen baixa afinitat²⁰³. La formació, de forma aberrant, de complexos poc estables que s'uneixin a regions no desitjades del genoma podria activar gens de manera inapropiada o ectòpica. Per tant, la correcta combinació de FT és important per garantir una correcta expressió gènica. Alteracions en les interaccions entre FT poden donar lloc al desenvolupament de malalties cardíques congènites¹¹¹.

1.2. Llocs d'unió GATA com a importants regions reguladores d'*SCN5A*

Les anàlisis realitzades amb els programes de predicció de llocs d'unió de FT revelen la presència de múltiples motius GATA a la regió del gen *SCN5A* estudiada (de la posició -1.125 pb fins la +857 pb respecte al TSS). Un

aspecte important a destacar és que a la regió de l'intró 1 analitzada (de +198 a +857 pb) és on s'ha predit un nombre més important de motius GATA. Això explicaria que l'efecte sinèrgic de GATA4 i GATA5 sobre el PromotorB WT, el qual conté una regió corresponent a l'intró 1 més llarga, és més important que sobre el PromotorA. D'altra banda, en aquesta tesi s'ha demostrat que dos motius GATA de l'intró 1 (de +403 a +406 pb i de +566 a +569 pb) participen en l'efecte sinèrgic de GATA4 i GATA5 en l'activació del promotor d'*SCN5A*. Concretament, els assajos luciferasa en cèl·lules H9c2 mostren que l'activitat del promotor disminueix considerablement quan aquests dos motius GATA de l'intró 1 estan mutats. Tot i això, la sobreexpressió de GATA4 i GATA5 també induïx una activació sinèrgica del PromotorA (el qual no conté aquests dos motius GATA), segurament degut a l'existència d'altres motius GATA, tal com han revelat els predictors bioinformàtics. Per tant, aquests dos motius GATA de l'intró 1, tot i ser importants, no són totalment indispensables.

De manera similar als resultats obtinguts en els assajos luciferasa, els experiments de ChIP i ReChIP en ventricle humà estan d'acord amb un model en què GATA4 i GATA5 regulen l'expressió d'*SCN5A* en el cor humà adult a través de la seva unió en el promotor i en l'intró 1 del gen. Els experiments de ChIP també mostren unió de GATA6 a les mateixes regions que GATA4 i GATA5, tot i que l'enriquiment observat no és significatiu respecte la regió distal (-8803 pb). Aquest resultat recolza el lleu efecte de GATA6 sobre l'activitat del promotor *SCN5A* observat a concentracions altes en assajos luciferasa. La redundància proposada anteriorment entre GATA4 i GATA6 estaria d'acord amb aquestes observacions.

Segons els programes de predicció la regió de l'intró 1 que s'ha estudiat en els experiments de ChIP i ReChIP (de +440 pb fins a +571 pb) conté tres motius GATA, mentre que la regió del promotor analitzada (de -237 pb fins a -160 pb) no en conté cap. A l'intró 1, GATA4 i GATA5 podrien estar interaccionant físicament formant part d'un complex proteic on només un dels

dos factors es troba unit directament al DNA. Opcionalment, també podrien estar tots dos factors units simultàniament al DNA sempre i quan es trobin dos motius GATA suficientment propers. A la regió del promotor estudiada en el ChIP, en canvi, podria ser que GATA4 i GATA5 no s'uneixin directament al DNA, sinó indirectament a través de la interacció amb altres FT cardíacs. Tanmateix, no es descarta la possibilitat que hi hagi altres motius GATA en aquesta regió del promotor que no s'hagin predit amb els programes bioinformàtics. En aquest sentit, els estudis de ChIP-seq realitzats en els darrers anys han demostrat que la predicció dels llocs d'unió de FT amb aquests programes bioinformàtics no sempre coincideix amb els resultats d'unió *in vivo* en experiments de ChIP.

És important destacar que els resultats d'aquesta tesi estan d'acord amb els estudis de ChIP-seq a partir de ventricle de ratolí adult realitzats per He i col·laboradors, on van observar unió de GATA4 al promotor d'*SCN5A* i no a les regions distals; no obstant això, difereixen en què no van detectar unió de GATA4 a l'intró 1 del gen *SCN5A* de ratolí¹⁶⁷. Aquesta divergència es podria explicar en base als resultats obtinguts en el projecte ENCODE de ratolí¹¹⁴. Segons aquest estudi, els elements reguladors en *cis* han experimentat canvis importants al llarg de l'evolució entre humà i ratolí, mentre que la xarxa de FT s'ha mantingut molt conservada. D'acord amb aquestes dades, es podria proposar que tot i les variacions en la localització dels motius GATA entre ambdues espècies, la regulació del gen *SCN5A* per GATA4 està conservada.

L'estudi de He i col·laboradors també ha permès evidenciar que els perfils d'unió de GATA4 al llarg del genoma són altament dinàmics, observant-se variacions importants entre el cor del fetus i de l'adult així com també en patologies cardíques. En el cor fetal, un 80% dels llocs ocupats per GATA4 estan en regions distals del TSS dels gens. En canvi, en el cor adult la majoria de les regions ocupades per GATA4 estan en regions proximals i només un 45% estan en zones distals¹⁶⁷. En situacions patològiques, com és el cas

d'hipertrofia cardíaca en l'adult, GATA4 passa a ocupar els llocs d'unió fetal. Això explicaria que en els casos d'hipertrofia el patró d'expressió cardíac és similar al cor fetal.

En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que el promotor i l'intró 1 del gen *SCN5A* humà contenen regions reguladores a través de les quals actuen els factors GATA cardíacs. Aquest estudi revela, doncs, una nova funció a nivell molecular de les regions reguladores del gen *SCN5A*, la majoria de les quals encara no tenen un funció coneguda.

1.3. Defectes en la regulació transcripcional d'*SCN5A* pels FT GATA cardíacs com a possibles causes de patologies cardíques

La identificació de GATA4 i GATA5 com a nous reguladors de la transcripció d'*SCN5A* suggereix que aquests factors poden estar associats amb el desenvolupament d'arítmies cardíques. Aquesta hipòtesi es recolza en: (1) els experiments luciferasa i ChIP, que demostren la funció de GATA4 i GATA5 en la regulació del gen *SCN5A*; (2) els experiments de ddPCR, on s'observa una correlació entre els nivells d'mRNA de *GATA4* i *SCN5A* en mostres de cor humà; i (3) els estudis electrofisiològics realitzats en oòcits de *Xenopus*, que mostren una correlació directa i lineal entre els nivells d'mRNA d'*SCN5A* i el corrent de Na^+ registrat a través del canal $\text{Na}_v1.5$. Això significa que alteracions en la transcripció d'*SCN5A*, per exemple degut a variacions en el mecanisme de regulació per GATA4 i GATA5, es veuran directament reflectits en la funció del canal $\text{Na}_v1.5$, i per tant, en l'activitat elèctrica cardíaca.

Les alteracions en el mecanisme de regulació de GATA4 i GATA5 sobre el gen *SCN5A* podrien tenir el seu origen en variants genètiques a les regions reguladores del promotor i intró 1 on s'uneixen GATA4 i GATA5. D'acord amb aquesta possibilitat, els assajos luciferasa realitzats en aquest treball

demostrin que variants genètiques en motius GATA de l'intró 1 del gen *SCN5A* ocasionen una disminució de l'activació del promotor per GATA4 i GATA5. De fet, s'ha descrit que una única variant genètica en un lloc d'unió de FT pot tenir un efecte important en la transcripció, afectant principalment a una pèrdua de quantitat de proteïna²⁰⁶. En aquest sentit, tal com s'ha comentat anteriorment, l'estudi de van den Boogaard i col·laboradors demostra que la variant genètica rs6801957 localitzada en un *enhancer* d'*SCN5A* impedeix la unió dels FT TBX5/TBX3 en aquesta regió reguladora. Com a conseqüència, s'observa una disminució de l'expressió del gen *SCN5A* i alteracions en la conducció elèctrica del cor^{181, 182}. En la mateixa línia, un estudi genètic publicat recentment ha reportat 26 noves variants genètiques al promotor d'*SCN5A* en pacients amb malalties aritmogèniques, entre ells SBr, FAF, entre d'altres¹⁷⁶. Del total de les 26 variants, sis d'elles estan associades amb una disminució de l'activitat del promotor d'*SCN5A*. D'altra banda, un altre estudi genètic d'una extensa cohort de pacients amb defectes en el septe ventricular va identificar quatre variants genètiques en el promotor *TBX2*. La presència d'aquestes variants està associada a una disminució de l'activitat del promotor *TBX2*, suggerint que podrien ser la causa dels defectes ventriculars que patien els pacients²⁰⁶. En resum, en els darrers anys han augmentat el nombre d'estudis que han demostrat la importància de variants genètiques en regions reguladores com a possible causa de malalties. Els resultats presentats en aquesta tesi recolzen aquests estudis.

De la mateixa manera que variants genètiques en els llocs d'unió GATA podrien induir alteracions en l'expressió d'*SCN5A*, també es podria proposar que variants en els gens que codifiquen per *GATA4* o *GATA5* podrien donar lloc a un efecte similar. De fet, s'han identificat variants en el gen de *GATA4* com a causants de malalties cardíques. Un exemple és la variant G296S, identificada en individus amb malaltia cardíaca congènita. Aquesta variant, localitzada en la regió bàsica C-terminal de *GATA4*, inhibeix la unió de *GATA4*

al DNA així com també la interacció amb els FT TBX5 i SMAD4^{119 207}. A més, en estudis en ratolins van observar que la presència d'aquesta variant està associada amb una disminució de l'expressió dels gens regulats per GATA4. Un segon exemple és la variant G303E de *GATA4*, detectada en membres d'una família amb malaltia cardíaca congènita, la qual afecta la interacció de GATA4 amb SMAD4²⁰⁷. Com a conseqüència, hi ha una disminució de l'activitat del promotor *ID2*, regulat cooperativament per GATA4 i SMAD4. I un tercer exemple, la variant C271S a *GATA4*, identificada en una família amb cardiomiopatia dilatada, la qual està associada a una alteració de l'activitat transcripcional de GATA4 i la seva interacció amb NKX2-5²⁰⁸. Tot i que hi ha menys estudis, també s'han identificat variants a *GATA5* com a responsables de malalties cardíques congènites. Per exemple, les variants L199V i Y142H associades amb malalties cardíques congènites i localitzades en el domini N-zinc i en el segon domini d'activació transcripcional, respectivament, disminueixen l'activitat transcripcional de GATA5^{201,209}.

Fins al moment no s'ha associat variants a les regions codificants dels factors GATA cardíacs o en motius GATA del gen *SCN5A* com a causants de canalopaties cardíques. Però els resultats obtinguts en aquesta tesi encoratgen a que els estudis genètics de pacients amb arítmies incloguin la seqüenciació dels gens *GATA4* i *GATA5*, així com també els llocs d'unió GATA del gen *SCN5A*. Això permetrà la identificació de variants que podrien associar-se amb arítmies cardíques. Depenent de l'efecte d'aquestes variants es podrien trobar diferents nivells d'expressió del canal Na_v1.5 i podria explicar la variabilitat dels fenotips característica de les arítmies relacionades amb el gen *SCN5A*.

En els dos motius GATA de l'intró 1 que s'han estudiat en aquesta tesi s'han identificat dues variants (rs552565807 i rs115996915), segons la base de dades del 1000 Genomes. Les variants rs552565807 i rs115996915 es localitzen a les posicions 38.649.257 i 38.691.427 del cromosoma 3 (segons

la versió GRCh38) i corresponen als canvis C>T i G>A, respectivament. Aquestes variants presenten una freqüència molt baixa en la població, amb la qual cosa es consideren variants rares. Malauradament, no hi ha dades de correlació genotip/fenotip en relació a aquestes variants. Per tant, caldrien més estudis en els individus portadors d'aquestes variants per avaluar quin és el seu efecte en l'activitat elèctrica del cor.

La manca d'estudis a nivell funcional és un problema general de moltes variants genètiques. Els estudis de GWAS han permès detectar un gran nombre de variants genètiques associades a determinats fenotips. A partir d'aquí, la comunitat científica té la tasca important de trobar el mecanisme que expliqui l'associació d'aquestes variants amb el fenotip. Sovint, la dificultat d'estudiar totes aquestes variants és perquè es localitzen en regions no codificants, de les quals se'n desconeix la funció. Per exemple, en el genoma humà s'han identificat 400.000 putatius *enhancers*, però es desconeix la funció de la majoria d'ells²¹⁰. Aquesta manca de comprensió de la funció de les regions no codificants, i en particular de les regions reguladores, recolza la importància de l'estudi dels mecanismes de funcionament de la xarxa de transcripció de gens cardíacs, els quals poden revelar noves causes de les arítmies cardíques. Un exemple, són els GWAS realitzats en pacients que presenten alteracions en l'ECG per tal de determinar quines variants podrien estar associades amb susceptibilitat a arítmies. Un gran nombre de les variants identificades es localitzen en regions no codificants properes als gens que codifiquen per canals iònics (*SCN10A*, *SCN5A*, *KCNQ1* i *KCNH2*) i FT (*TBX3*, *TBX5*, *NKX2-5* i *MEIS1*)²¹¹. Aquestes dades suggereixen que la funció d'aquests FT cardíacs en la regulació transcripcional dels canals iònics és clau pel manteniment de l'activitat elèctrica del cor.

2. Expressió dels factors GATA cardíacs en el cor humà adult

Aquesta tesi presenta, per primera vegada, un estudi exhaustiu de l'expressió dels factors GATA4, GATA5 i GATA6 en cor humà adult. Estudis en diferents models animals han demostrat que els tres factors GATA cardíacs s'expressen en el cor al llarg del desenvolupament embrionari. En el cor adult, en canvi, mentre l'expressió de GATA4 i GATA6 està demostrada, existeix certa controvèrsia respecte l'expressió de GATA5. Per una banda, en experiments de northern blot realitzats a partir de mostres de cor de ratolí adult no es va observar expressió de GATA5 en etapes postnatales¹³⁰. D'altra banda, altres estudis amb el mateix model animal van detectar la proteïna GATA5 en l'endocardi però no al miocardi adult^{127 134}. De forma similar, a partir d'experiments de northern blot o qPCR es va detectar expressió de GATA5 en el cor adult de gallina o *Xenopus*^{212 144}. Part d'aquesta divergència en relació a l'expressió de GATA5 en cor adult podria ser deguda a diferències entre espècies. Així mateix, cal destacar també que les diferents tècniques emprades (immunohistoquímica, qPCR, Northern Blot,...) tenen diferent sensibilitats, i que la zona del cor estudiada pot explicar també les diferències d'expressió. Davant d'aquesta controvèrsia, en el present treball s'han utilitzat diferents tècniques experimentals per analitzar els nivells d'mRNA i de proteïna GATA5 (així com també de la resta de factors GATA cardíacs) en ventricle esquerre de cor humà adult.

Els resultats obtinguts corroboren la presència d'mRNA i de proteïna de GATA4 i GATA6 en el cor adult. En referència a GATA5, són diverses les evidències experimentals presentades en aquest treball que estan d'acord amb una expressió de GATA5 en el cor humà adult. En primer lloc, els

experiments de ChIP i Re-ChIP realitzats a partir de les mostres de ventricle humà detecten unió de la proteïna GATA5 a la regió del promotor i l'intró 1 d'*SCN5A*. En segon lloc, l'anàlisi d'aquestes mostres per *western blot* revela una clara expressió de la proteïna GATA5. Aquests estudis a nivell de proteïna es van contrastar amb estudis d'immunofluorescència, els quals també van mostrar expressió de GATA5 en mostres de cor de ratolí adult. El *western blot* dels lisats de cèl·lules H9c2 prèviament transfectades amb el vector d'expressió per GATA5 no deixa dubte que l'anticòs utilitzat en aquests experiments (ChIP, Re-ChIP, *western blot* i immunofluorescència) reconeix específicament la proteïna GATA5. El mateix anticòs específic per GATA5 ha estat utilitzat en altres estudis^{213, 214}. Finalment, anàlisis per qPCR i per ddPCR van detectar nivells baixos d'mRNA de *GATA5* a ventricle esquerre humà, tot i que estan per sobre els límits de detecció. En contra, els nivells d'mRNA del gen pancreàtic *PDX1* van ser totalment indetectable en cor humà (però no en mostres de pàncrees).

En conjunt, aquestes dades suggereixen la presència d'mRNA de *GATA5* en el cor humà adult, tot i que no hi ha una correlació directa entre els nivells d'mRNA i de proteïna de GATA5. No obstant això, diversos estudis en cèl·lules de mamífers han demostrat una manca de correlació entre els nivells d'mRNA i de proteïna, la qual podria ser deguda a: (1) una velocitat de síntesi d'mRNA molt més baixa que la velocitat de síntesi de proteïna, (2) una vida mitja de la proteïna més alta que la de l'mRNA^{215, 216}. Aquesta discrepància entre els nivells d'mRNA i de proteïna GATA5, juntament amb la manca d'estudis a nivell de proteïna, podria explicar part de la controvèrsia que existeix entre els diferents estudis publicats pel que fa l'expressió de GATA5. Cal remarcar que la tècnica de northern blot utilitzada en els primers estudis no és tan sensible com la qPCR o la ddPCR, el que podria explicar que no arribés a detectar els nivells d'mRNA de *GATA5*.

Els resultats de ddPCR a partir de mostres de ventricle indiquen que GATA6 és el factor GATA cardíac que presenta una major expressió, seguit per GATA4 i GATA5 (aquest últim amb una expressió molt menor). Aquests resultats són similars als nivells d'expressió dels factors GATA observats en estudis de RNA-seq a partir de mostres de cor de pacients que han sofert un infart i amb altres patologies cardíques²¹⁷.

3. Modulació de l'activitat del promotor d'*SCN5A* per acetilació/desacetilació de GATA4

Aquesta tesi presenta evidències que l'activitat del promotor d'*SCN5A* està regulada per un balanç d'acetilació/desacetilació el qual, en part, és depenent GATA4.

3.1. Regulació transcripcional del gen *SCN5A* per acetilació.

3.1.1. Mecanisme de cooperació entre GATA4 i p300

Els resultats obtinguts suggereixen que la regulació del promotor d'*SCN5A* per GATA4 està modulada per l'acetiltransferasa p300, i que aquest efecte també té lloc *in vivo* en el cor humà adult. Aquesta hipòtesi es recolza en dues evidències experimentals. En primer lloc, els assajos luciferasa indiquen que GATA4 i p300 actuen sinèrgicament en l'activació del promotor d'*SCN5A*. I en segon lloc, els experiments de ChIP mostren que GATA4 i p300 s'uneixen a la regió del promotor d'*SCN5A* en teixit cardíac. En estudis anteriors ja s'havia descrit que p300 actua com un coactivador de GATA4, induint un augment de l'activitat dels gens cardíacs *ANP*, β -*MHC* i α -*MHC*¹⁶⁵. A més, estudis de ChIP-seq de cors de ratolí han detectat un enriquiment de p300 en la majoria de les regions del genoma ocupades per GATA4, suggerint que actuen cooperativament en la regulació de l'expressió de gens cardíacs^{116, 167}.

La cooperació entre GATA4 i p300 implica interacció física entre ambdues proteïnes¹⁶⁵. El domini ric en aminoàcids cisteïnes i histidines del domini C-terminal de p300 és necessari per la interacció amb qualsevol dels dos motius de zinc de la proteïna GATA4. El mecanisme de cooperació que s'ha descrit proposa que GATA4 recluta p300 en regions reguladores (*enhancers* i promotors), i aleshores p300 acetila GATA4. D'altra banda, també s'ha

proposat que p300 acetila la lisina 27 de la histona H3 (H3K27ac), una modificació associada amb *enhancers* i promotors transcripcionalment actius. Per tant, s'ha proposat que GATA4, reclutant p300, promou un augment de l'acetilació d'H3K27 i, per tant, una activació dels promotors diana de GATA4. En aquest sentit, estudis de ChIP-seq de cor d'embrió han mostrat que les regions reguladores de gens implicats en el desenvolupament cardíac presenten una elevada coocupació de GATA4 i la histona H3K27ac. Aquesta coocupació no s'observa en regions reguladores de gens que no s'expressen durant el desenvolupament.

Per tal de determinar si l'ocupació de la histona H3K27ac coincideix amb els llocs d'unió de GATA4 del gen *SCN5A* en el ventricle esquerre d'humà adult, s'han utilitzat les dades obtingudes en el RoadMap Epigenomics Project²¹⁸. El RoadMap Epigenomics Project es va crear per recopilar informació sobre l'epigenoma de diferents teixits humans, i les dades obtingudes són públicament accessibles. Resultats de ChIP-seq obtinguts a partir de ventricle esquerre humà, que es recullen en aquest projecte públic, mostren que les regions del promotor (-198 pb) i l'intró 1 (+505 pb) d'*SCN5A*, on s'ha detectat unió de GATA4, estan enriquits amb H3K27ac, mentre que a les dues regions distals (-8803 i -5976 pb) no es detecta senyal d'aquesta marca d'histona (**Figura 61**). Aquestes dades estan d'acord amb un model en què en el cor humà adult, on el gen *SCN5A* és transcripcionalment actiu, GATA4, unit a GATA5, reclutaria p300 i aquest acetilaria H3K27 del promotor d'*SCN5A*.

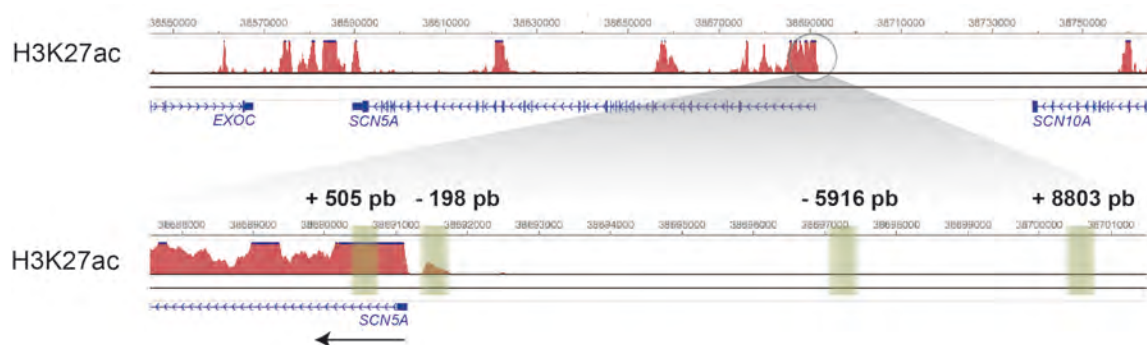


Figura 61. ChIP-seq d'H3K27ac en mostres de ventricle esquerre humà adult segons dades publicades en el RoadMap Epigenomics Project. A la part superior s'observen els pics d'H3K27ac al llarg del gen *SCN5A*, i en la part inferior es mostren les quatre regions ampliades que s'han estudiat en els estudis de ChIP i Re-ChIP d'aquesta tesi. La fletxa negra indica la direcció del gen *SCN5A*. Extreta i adaptada de <http://www.roadmapepigenomics.org>.

En els assajos luciferasa realitzats en el present treball s'ha observat que la sobreexpressió de p300 en cèl·lules cardíques H9c2 també indueix un augment de l'activitat transcripcional del promotor *SCN5A*. Aquest efecte podria ser fruit de la interacció de p300 amb FT activadors endògens (entre ells GATA4) de les cèl·lules H9c2, i que conseqüentment es produís l'acetilació de la histona H3K27 del promotor i l'intró 1 d'*SCN5A*. Tot i això, també s'ha descrit que p300 pot acetilar igualment els promotors en absència d'activadors²¹⁹.

3.1.2. Llocs dianes d'acetilació de GATA4 per p300

En aquesta tesi s'ha realitzat un estudi d'acetilació *in vitro* per tal de determinar els llocs d'acetilació de GATA4. Fins al moment, la majoria de publicacions s'han basat en els llocs d'acetilació de GATA4 descrits per Takaya i col·laboradors, ja que és l'únic treball on s'han estudiat. Per a determinar aquests llocs d'acetilació, en l'estudi de Takaya *et al* van cotransfectar cèl·lules COS7 (les quals no tenen factors GATA) amb vectors d'expressió de GATA4 que contenien lisines mutades a alanines, juntament amb un vector d'expressió de p300. Els assajos luciferasa van mostrar que la funció activadora de la transcripció de les proteïnes GATA4 amb les lisines K311, K318, K320 i K322 mutades, ja sigui simultàniament o de manera individual, era significativament menor en comparació a la proteïna WT. A partir d'aquests resultats, van descriure que de les set lisines presents en la regió bàsica del motiu C-Zn de GATA4, K311, K318, K320 i K322 són els llocs dianes d'acetilació per p300. En relació a aquest estudi, caldria remarcar que,

tot i que l'acetilació de GATA4 està relacionada amb una funció activadora, la mesura de l'activitat transcripcional de GATA4 no és un mètode directe per la determinació dels residus acetilats de p300. En base a aquesta limitació, en la present tesi es van realitzar assajos d'acetilació *in vitro* de pèptids de GATA4 i posteriorment es van analitzar per espectrometria de masses MALDI-TOF. Es va considerar que aquesta era una tècnica més adequada i directa per a la determinació de quins residus de GATA4 són dianes d'acetilació de p300.

Els estudis d'acetilació *in vitro* realitzats en aquesta tesi, i d'acord amb l'estudi de Takaya *et al*, han confirmat que la lisina K299 i la K328 no s'acetilen. No obstant això, els resultats obtinguts divergeixen amb els estudis de Takaya *et al* en els aspectes següents: (1) contràriament al descrit per Takaya *et al*, els experiments de MALDI-TOF indiquen que la lisina K311 de GATA4 no s'acetila; (2) de les lisines K318, K320 i K322, només dues esdevenen acetilades per p300, i no totes com s'havia descrit; (3) la lisina K326 s'acetila i, per tant, és un nou lloc d'acetilació per p300 no descrit fins al moment. Aquest resultat ha estat confirmat en estudis d'immunoprecipitació en cèl·lules amb el mutant GATA4 K326A. Takaya *et al* van proposar que no era un lloc diana de p300 després d'observar que la mutació K326A no disminueix l'activitat transcripcional de GATA4. En conjunt, es podria proposar que la lisina K326 s'acetila però no té una implicació directa en l'activitat de GATA4. Per definir quines de les dues lisines s'acetilen d'entre les K318, K320 i K322 serien necessàries anàlisis de LC-MS/MS.

3.2. Modulació del gen *SCN5A* per desacetilació

Es va examinar l'efecte de les HDAC en la regulació transcripcional d'*SCN5A*. En primer lloc, els estudis es van centrar amb HDAC2, ja que en l'estudi de Trivedi i col·laboradors han descrit que HDAC2 desacetila GATA4. En aquest estudi, van detectar que la interacció de GATA4 amb HDAC2 està estabilitzada pel factor homeodomini HOPX, el qual s'encarrega de reclutar

HDAC2 en l'activació dels gens de la ciclina D2 i la quinasa Cdk4 de ratolí⁸⁸. Els resultats d'aquesta tesi indiquen que HDAC2 per si sola no té cap efecte sobre els nivells basals de transcripció del promotor d'*SCN5A*. No obstant això, quan HDAC2 es coexpressa amb GATA4 induïx a una repressió de l'activitat del promotor. Aquestes dades suggereixen que l'efecte d'HDAC2 sobre el promotor d'*SCN5A* és per desacetilació de GATA4 i no per desacetilació de les histones. Amb els resultats obtinguts en aquesta tesi no es pot confirmar si HOPX intervé en aquest mecanisme de regulació, ja que l'efecte d'HDAC2 sobre l'activació del promotor (via desacetilació de GATA4) no varia en presència o absència de HOPX. Cal tenir en compte, però, que el fet que no s'observin diferències podria ser degut a la presència de HOPX endogen a les cèl·lules H9c2.

En l'estudi de Trivedi i col·laboradors la desacetilació de GATA4 per HDAC2 es va detectar en experiments d'immunoprecipitació utilitzant un anticòs α -lisines acetilades. En aquesta tesi s'han confirmat aquests resultats publicats mitjançant assajos d'immunoprecipitació i desacetilació *in vitro* amb pèptids de GATA4 i posterior anàlisi per MALDI-TOF. Per una banda, en els assajos d'immunoprecipitació es va observar que HDAC2 redueix els nivells d'acetilació de GATA4 induïts per p300. D'altra banda, els pèptids de GATA4 acetilats per p300 *in vitro* són completament desacetilats en presència d'HDAC2. Per tant, els resultats apunten que HDAC2 desacetila dues de les lisines K318, K320 o K322 així com la lisina K326. Aquesta és la primera evidència dels residus específics de GATA4 que són dianes d'HDAC2.

Posteriorment es va estudiar si altres HDAC (HDAC1-8) estan implicades en l'activitat del promotor d'*SCN5A*. Es va observar que les HDAC4 i HDAC5 induïxen una repressió significativa d'un 80% i 50%, respectivament, de l'activitat del promotor d'*SCN5A*. HDAC4 i HDAC5, desacetilases de classe II, estan altament expressats al cor, i diversos estudis demostren la seva importància a nivell cardíac²²⁰. La repressió produïda és similar quan es

sobreexpressa HDAC4 i HDAC5 sols respecte les condicions en què es coexpressen cadascun d'ells amb GATA4. Això suggereix que l'efecte repressor d'HDAC4 i HDAC5 no és degut a una desacetilació de GATA4, sinó que podria estar relacionat amb una desacetilació de les histones del promotor o d'altres FT implicats en la regulació d'*SCN5A*. Aquesta observació es recolza en experiments d'immunoprecipitació, on s'observa que la sobreexpressió d'HDAC4 i HDAC5 no té cap efecte sobre els nivells d'acetilació de GATA4. Així mateix, els experiments de desacetilació *in vitro* han confirmat que HDAC4 no desacetila GATA4.

4. Possible model molecular de regulació de l'expressió d'*SCN5A*

Tal com ja s'ha comentat, els mecanismes que regulen l'expressió del gen *SCN5A* encara són poc coneguts. Això constitueix un factor limitant per entendre la base de moltes canalopaties cardíques que cursen amb alteració del corrent de Na^+ . Els estudis realitzats en aquesta tesi han permès revelar un nou mecanisme de regulació basat amb els factors GATA cardíacs. A partir de les dades obtingudes es proposa el següent model de regulació transcripcional d'*SCN5A* que es podria donar en el cor humà adult (**Figura 62**).

Els FT cardíacs GATA4 i GATA5 reconeixrien i s'unirien als motius GATA de la regió del promotor i l'intró 1 d'*SCN5A*. GATA4 i GATA5 interaccionarien físicament entre ells però només un dels dos s'uniria directament als motius GATA del DNA. En els casos en què trobin dos motius GATA molt propers, aleshores seria possible la unió dels dos simultàniament. Altrament, també podria ser que cap dels dos s'unís directament al DNA, sinó que interaccionessin a través d'algun altre FT unit al DNA que també formaria part del complex GATA4-GATA5. Els FT cardíacs NKX2.5, TBX5 i MEF2A, serien possibles candidats de formar un complex proteic amb GATA4-GATA5. La formació del complex permetria actuar cooperativament en l'activació del promotor d'*SCN5A*.

Una vegada el complex unit al DNA, GATA4 reclutaria p300, que podria regular l'expressió d'*SCN5A* a través de diversos mecanismes. Gràcies a la seva activitat acetiltransferasa, p300 acetilaria les lisines de la regió bàsica del motiu C-Zn de GATA4, concretament, la lisina K326 i dues de les següents lisines: K318, K320 o K322. GATA4 en estat acetilat tindria una major afinitat pel DNA i activaria el promotor d'*SCN5A*. D'altra banda, p300 podria també

acetilar i interaccionar amb GATA5, NKX2.5, TBX5 i MEF2A, tal i com ja s'ha publicat anteriorment, induint també un increment de l'activitat del promotor^{87, 221, 222}. El reclutament de p300 també estimularia l'acetilació de les histones H3K27 presents al promotor d'*SCN5A*, amb la qual cosa la cromatina en aquesta regió seria menys compacta i més accessible a la unió de FT. En conjunt, aquestes vies moleculars afavoririen un estat transcripcionalment actiu de la cromatina i una regulació positiva de l'RNA Pol II i, per tant, el resultat final seria una activació de la transcripció d'*SCN5A*.

L'activitat del promotor d'*SCN5A* estaria contrarestada per un mecanisme de desacetilació. En aquest mecanisme hi intervindrien membres de la família HDAC, les quals no interaccionarien directament al DNA, sinó que durien a terme la seva funció a través de la unió amb FT. L'acetilació de GATA4, i per tant la seva funció activadora d'*SCN5A*, estaria modulada per HDAC2. GATA4, unit al promotor i a l'intró 1 d'*SCN5A* juntament amb GATA5 (i probablement amb altres FT), reclutaria HDAC2. La interacció entre HDAC2 i GATA4 podria estar facilitada per HOPX. HDAC2 revertiria l'acetilació de les lisines de GATA4 catalitzada per p300. La desacetilació de GATA4 per HDAC2 induiria una inhibició de l'activitat de GATA4 i, per tant, una repressió transcripcional del promotor d'*SCN5A*.

L'activitat del promotor estaria també regulada per HDAC4 i HDAC5 però, a diferència d'HDAC2, el mecanisme no seria depenent de GATA4. HDAC4 i HDAC5 regularien *SCN5A* a través de la desacetilació d'histones del promotor o altres FT. Faltarien nous estudis que permetin determinar els FT que reclutarien HDAC4 i HDAC5 per tal de produir aquest efecte. La desacetilació de les histones induiria un estat més condensat de la cromatina i, per tant, menys favorable per la transcripció. Fins al moment no hi ha evidències que GATA4 o GATA5 interaccionin amb HDAC4 o HDAC5, però s'ha suggerit que altres FT cardíacs puguin interaccionar-hi, com per exemple MEF2A²²³.

En global, el model molecular proposat com a nou mecanisme de regulació de la transcripció *SCN5A* té com a punt central la cooperació entre GATA4 i GATA5 a través de la unió a motius GATA al promotor i a l'intró 1. Aquest mecanisme estaria modulats per un balanç entre acetilació, a través de p300, i desacetilació, a on intervindrien HDAC2, HDAC4 i HDAC5.

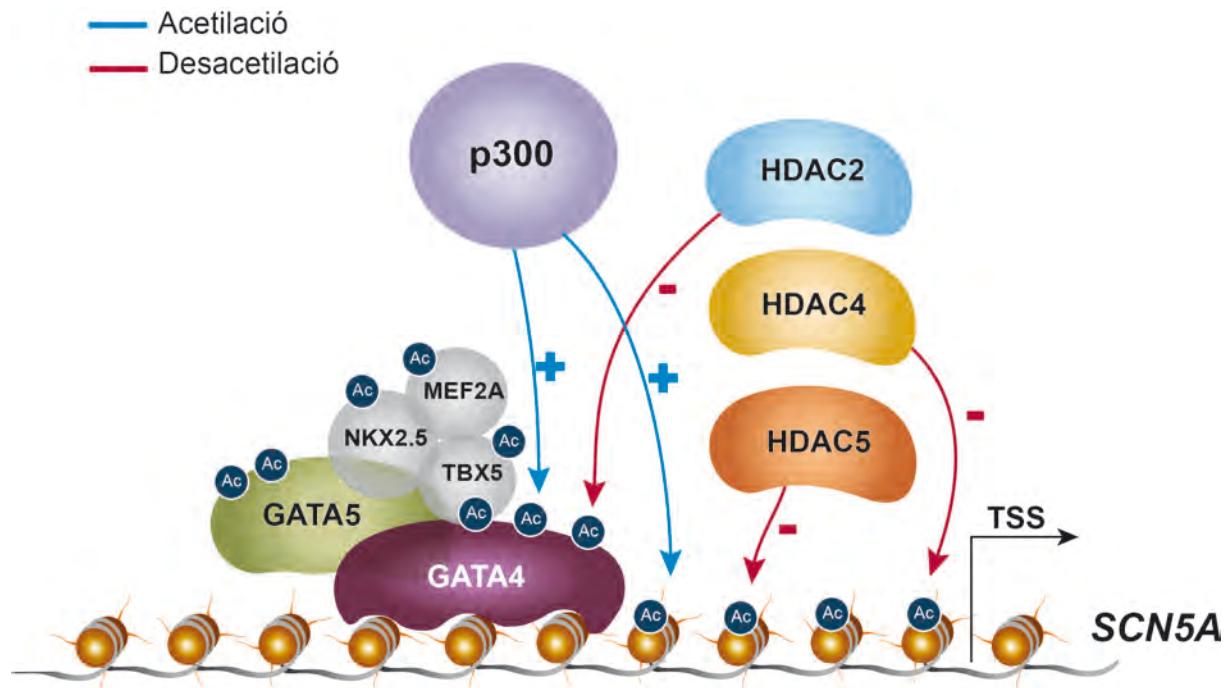


Figura 62. Model molecular de regulació de l'expressió d'*SCN5A*. Es representa el mecanisme molecular que es proposa en aquesta tesi de regulació de l'expressió de l'*SCN5A*. Els signes positius indiquen activació de la transcripció i els signes negatius repressió de la transcripció.

VI. Conclusions

1. Experiments realitzats en models cel·lulars demostren que els factors de transcripció GATA4 i GATA5 interaccionen i activen sinèrgicament el promotor del gen *SCN5A*.
2. Dos motius GATA presents a l'intró 1 del gen *SCN5A* humà (a +403/+406 i a +566/+569 pb, respecte al lloc d'inici de transcripció del gen) són importants en l'activació sinèrgica del promotor d'*SCN5A* per GATA4 i GATA5 .
3. GATA4 i GATA5 coocupen el promotor i l'intró 1 del gen *SCN5A* en el ventricle humà adult. Tenint en compte les conclusions anteriors, aquest resultat suggereix que GATA4 i GATA5 s'uneixen a regions reguladores del gen *SCN5A* i regulen de manera cooperativa la seva expressió *in vivo*.
4. En el ventricle humà adult, els nivells d'mRNA d'*SCN5A* i de *GATA4* (analitzats per Droplet Digital PCR) correlacionen positivament i significativament, fet que dóna suport al paper de GATA4 en la regulació de l'expressió d'*SCN5A* en el cor humà.
5. Els resultats demostren nivells detectables d'mRNA de *GATA5* i presència de proteïna GATA5 en el ventricle humà adult. Aquestes observacions clarifiquen la controvèrsia existent en la literatura sobre l'expressió d'aquest factor de transcripció en etapes postnatales. Els resultats també confirmen l'expressió de GATA4 i GATA6 en el cor adult, tal com ja s'havia descrit.
6. Estudis electrofisiològics en oòcits de *Xenopus* evidencien que els nivells d'mRNA d'*SCN5A* i el corrent de sodi que circula a través del canal de sodi cardíac $Na_v1.5$ estan directament correlacionats. Per tant,

una alteració en els mecanismes de regulació transcripcional del gen *SCN5A* aniria lligat a una pertorbació del corrent de sodi cardíac, fet que podria causar una arítmia. Aquesta alteració en els mecanismes de regulació podria ser causada per variants genètiques en regions reguladores d'*SCN5A* -per exemple, en llocs d'unió dels factors GATA- o bé variants als gens *GATA4* o *GATA5* que provoquin un alteració de la seva funció.

7. La transcripció del gen *SCN5A* està modulada per un balanç d'acetilació i desacetilació. Per una banda l'acetilació de GATA4 per p300 augmenta l'activitat del promotor d'*SCN5A*, mentre que la desacetilació de GATA4 per HDAC2 disminueix l'activitat del promotor. Per altra banda, *SCN5A* està regulat per desacetilació a través d'HDAC4 i HDAC5 per un mecanisme independent de GATA4.
8. A partir d'assajos d'acetilació i desacetilació *in vitro* analitzats per espectrometria de masses s'ha identificat la lisina K326 de GATA4, localitzada en el domini d'unió al DNA, com un nou lloc d'acetilació per p300. La lisina K326 és desacetilada per HDAC2. Aquests experiments també han corroborat que dues de les lisines K318, K320 o K322, presents també en aquest domini, són dianes de p300 i HDAC2.
9. Els resultats trobats encoratgen a continuar en la recerca de nous mecanismes de regulació transcripcional d'*SCN5A* per tal de revelar noves causes del 60-75% de pacients amb SBr i del 20-35% de pacients amb SQTL sense diagnòstic genètic.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Marban E. Cardiac channelopathies. *Nature* 2002;**415**:213-218.
2. Munshi NV. Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circulation research* 2012;**110**:1525-1537.
3. Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiological reviews* 2005;**85**:1205-1253.
4. Keating MT, Sanguinetti MC. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias. *Cell* 2001;**104**:569-580.
5. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias--diagnosis and therapy. *Nature reviews Cardiology* 2012;**9**:319-332.
6. Amin AS, Asghari-Roodsari A, Tan HL. Cardiac sodium channelopathies. *Pflugers Arch* 2010;**460**:223-237.
7. Brackenbury WJ, Isom LL. Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Frontiers in pharmacology* 2011;**2**:53.
8. Detta N, Frisso G, Salvatore F. The multi-faceted aspects of the complex cardiac Nav1.5 protein in membrane function and pathophysiology. *Biochimica et biophysica acta* 2015;**1854**:1502-1509.
9. Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel Nav1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochimica et biophysica acta* 2013;**1833**:886-894.
10. Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 2000;**26**:13-25.
11. Rook MB, Evers MM, Vos MA, et al. Biology of cardiac sodium channel Nav1.5 expression. *Cardiovascular research* 2012;**93**:12-23.
12. Armstrong CM. Na channel inactivation from open and closed states. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;**103**:17991-17996.
13. Theile JW, Cummins TR. Recent developments regarding voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of inherited and acquired neuropathic pain syndromes. *Frontiers in pharmacology* 2011;**2**:54.
14. Chugh SS, Reinier K, Teodorescu C, et al. Epidemiology of sudden cardiac death: clinical and research implications. *Progress in cardiovascular diseases* 2008;**51**:213-228.
15. Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, et al. Task Force on Sudden Cardiac Death, European Society of Cardiology. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2002;**4**:3-18.
16. Campuzano O, Beltran-Alvarez P, Iglesias A, et al. Genetics and cardiac channelopathies. *Genet Med* 2010;**12**:260-267.
17. Wu Q, Zhang L, Zheng J, et al. Forensic Pathological Study of 1656 Cases of Sudden Cardiac Death in Southern China. *Medicine* 2016;**95**:e2707.

18. Fishman GI, Chugh SS, Dimarco JP, *et al.* Sudden cardiac death prediction and prevention: report from a National Heart, Lung, and Blood Institute and Heart Rhythm Society Workshop. *Circulation* 2010;**122**:2335-2348.
19. Kong MH, Fonarow GC, Peterson ED, *et al.* Systematic review of the incidence of sudden cardiac death in the United States. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;**57**:794-801.
20. Deo R, Albert CM. Epidemiology and genetics of sudden cardiac death. *Circulation* 2012;**125**:620-637.
21. Noseworthy PA, Newton-Cheh C. Genetic determinants of sudden cardiac death. *Circulation* 2008;**118**:1854-1863.
22. Marsman RF, Tan HL, Bezzina CR. Genetics of sudden cardiac death caused by ventricular arrhythmias. *Nature reviews Cardiology* 2014;**11**:96-111.
23. Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Brugada R, *et al.* Cardiovascular translational medicine (IV): The genetic basis of malignant arrhythmias and cardiomyopathies. *Revista espanola de cardiologia* 2009;**62**:422-436.
24. Centers for Disease C, Prevention. State-specific mortality from sudden cardiac death--United States, 1999. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2002;**51**:123-126.
25. Eckart RE, Scoville SL, Campbell CL, *et al.* Sudden death in young adults: a 25-year review of autopsies in military recruits. *Annals of internal medicine* 2004;**141**:829-834.
26. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, *et al.* HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* 2011;**13**:1077-1109.
27. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Genetic testing in heritable cardiac arrhythmia syndromes: differentiating pathogenic mutations from background genetic noise. *Current opinion in cardiology* 2013;**28**:63-71.
28. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2013;**161**:1-14.
29. Wilde AA, Brugada R. Phenotypical manifestations of mutations in the genes encoding subunits of the cardiac sodium channel. *Circulation research* 2011;**108**:884-897.
30. Brugada J, Brugada R, Brugada P. Channelopathies: a new category of diseases causing sudden death. *Herz* 2007;**32**:185-191.

31. Bezzina CR, Barc J, Mizusawa Y, *et al.* Common variants at SCN5A-SCN10A and HEY2 are associated with Brugada syndrome, a rare disease with high risk of sudden cardiac death. *Nature genetics* 2013;**45**:1044-1049.
32. Poelzing S, Forleo C, Samodell M, *et al.* SCN5A polymorphism restores trafficking of a Brugada syndrome mutation on a separate gene. *Circulation* 2006;**114**:368-376.
33. Brugada P, Brugada J. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *Journal of the American College of Cardiology* 1992;**20**:1391-1396.
34. Antzelevitch C, Brugada P, Brugada J, *et al.* Brugada syndrome: a decade of progress. *Circulation research* 2002;**91**:1114-1118.
35. Duthoit G, Fressart V, Hidden-Lucet F, *et al.* Brugada ECG pattern: a physiopathological prospective study based on clinical, electrophysiological, angiographic, and genetic findings. *Frontiers in physiology* 2012;**3**:474.
36. Berne P, Brugada J. Brugada syndrome 2012. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2012;**76**:1563-1571.
37. Brugada P, Benito B, Brugada R, *et al.* Brugada syndrome: update 2009. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* 2009;**50**:352-372.
38. Brugada J, Brugada R, Antzelevitch C, *et al.* Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation* 2002;**105**:73-78.
39. Kapplinger JD, Tester DJ, Alders M, *et al.* An international compendium of mutations in the SCN5A-encoded cardiac sodium channel in patients referred for Brugada syndrome genetic testing. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2010;**7**:33-46.
40. Hartshorne RP, Catterall WA. The sodium channel from rat brain. Purification and subunit composition. *The Journal of biological chemistry* 1984;**259**:1667-1675.
41. Hartshorne RP, Messner DJ, Coppersmith JC, *et al.* The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *The Journal of biological chemistry* 1982;**257**:13888-13891.
42. Morgan K, Stevens EB, Shah B, *et al.* beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;**97**:2308-2313.
43. Nielsen MW, Holst AG, Olesen SP, *et al.* The genetic component of Brugada syndrome. *Frontiers in physiology* 2013;**4**:179.

44. Hoogendijk MG, Opthof T, Postema PG, *et al.* The Brugada ECG pattern: a marker of channelopathy, structural heart disease, or neither? Toward a unifying mechanism of the Brugada syndrome. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 2010;**3**:283-290.
45. Meregalli PG, Wilde AA, Tan HL. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovascular research* 2005;**67**:367-378.
46. Brugada R, Brugada J, Antzelevitch C, *et al.* Sodium channel blockers identify risk for sudden death in patients with ST-segment elevation and right bundle branch block but structurally normal hearts. *Circulation* 2000;**101**:510-515.
47. Belhassen B, Glick A, Viskin S. Efficacy of quinidine in high-risk patients with Brugada syndrome. *Circulation* 2004;**110**:1731-1737.
48. Ohgo T, Okamura H, Noda T, *et al.* Acute and chronic management in patients with Brugada syndrome associated with electrical storm of ventricular fibrillation. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2007;**4**:695-700.
49. Schwartz PJ, Stramba-Badiale M, Crotti L, *et al.* Prevalence of the congenital long-QT syndrome. *Circulation* 2009;**120**:1761-1767.
50. Goldenberg I, Moss AJ. Long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 2008;**51**:2291-2300.
51. Cookson W, Liang L, Abecasis G, *et al.* Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nature reviews Genetics* 2009;**10**:184-194.
52. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual review of genomics and human genetics* 2006;**7**:29-59.
53. Orphanides G, Reinberg D. A unified theory of gene expression. *Cell* 2002;**108**:439-451.
54. Kohli S, Ahuja S, Rani V. Transcription factors in heart: promising therapeutic targets in cardiac hypertrophy. *Current cardiology reviews* 2011;**7**:262-271.
55. Luse DS. The RNA polymerase II preinitiation complex: Through what pathway is the complex assembled? *Transcription* 2013;**5**.
56. Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature structural & molecular biology* 2004;**11**:394-403.
57. Ahn SH, Kim M, Buratowski S. Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Molecular cell* 2004;**13**:67-76.
58. Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 2013;**140**:3079-3093.
59. Schroder S, Herker E, Itzen F, *et al.* Acetylation of RNA polymerase II regulates growth-factor-induced gene transcription in mammalian cells. *Molecular cell* 2013;**52**:314-324.

60. Levine M. Paused RNA polymerase II as a developmental checkpoint. *Cell* 2011;**145**:502-511.
61. Knuesel MT, Meyer KD, Bernecky C, et al. The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes & development* 2009;**23**:439-451.
62. Yin JW, Wang G. The Mediator complex: a master coordinator of transcription and cell lineage development. *Development* 2014;**141**:977-987.
63. Creppe C, Buschbeck M. Elongator: an ancestral complex driving transcription and migration through protein acetylation. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011;**2011**:924898.
64. Winkler GS, Kristjuhan A, Erdjument-Bromage H, et al. Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;**99**:3517-3522.
65. Wittschieben BO, Otero G, de Bizemont T, et al. A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme. *Molecular cell* 1999;**4**:123-128.
66. Mora A, Sandve GK, Gabrielsen OS, et al. In the loop: promoter-enhancer interactions and bioinformatics. *Briefings in bioinformatics* 2015.
67. Dalvai M, Fleury L, Bellucci L, et al. TIP48/Reptin and H2A.Z requirement for initiating chromatin remodeling in estrogen-activated transcription. *PLoS genetics* 2013;**9**:e1003387.
68. Dalvai M, Bellucci L, Fleury L, et al. H2A.Z-dependent crosstalk between enhancer and promoter regulates cyclin D1 expression. *Oncogene* 2013;**32**:4243-4251.
69. Smale ST, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter. *Annual review of biochemistry* 2003;**72**:449-479.
70. Yang C, Bolotin E, Jiang T, et al. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* 2007;**389**:52-65.
71. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2003;**60**:1647-1658.
72. Borggreffe T, Yue X. Interactions between subunits of the Mediator complex with gene-specific transcription factors. *Seminars in cell & developmental biology* 2011;**22**:759-768.
73. Whyte WA, Orlando DA, Hnisz D, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 2013;**153**:307-319.
74. West AG, Gaszner M, Felsenfeld G. Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes & development* 2002;**16**:271-288.
75. Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 2000;**103**:263-271.

76. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007;**128**:693-705.
77. Ling G, Waxman DJ. DNase I digestion of isolated nuclei for genome-wide mapping of DNase hypersensitivity sites in chromatin. *Methods in molecular biology* 2013;**977**:21-33.
78. Maleszewska M, Kaminska B. Is glioblastoma an epigenetic malignancy? *Cancers* 2013;**5**:1120-1139.
79. Georgopoulos K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nature reviews Immunology* 2002;**2**:162-174.
80. Zhao YQ, Jordan IK, Lunyak VV. Epigenetics components of aging in the central nervous system. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2013;**10**:647-663.
81. Wang YM, Zhou P, Wang LY, et al. Correlation between DNase I hypersensitive site distribution and gene expression in HeLa S3 cells. *PloS one* 2012;**7**:e42414.
82. Van Bortle K, Corces VG. The role of chromatin insulators in nuclear architecture and genome function. *Current opinion in genetics & development* 2013;**23**:212-218.
83. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* 2011;**21**:381-395.
84. Allis CD, Berger SL, Cote J, et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 2007;**131**:633-636.
85. Parthun MR. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene* 2007;**26**:5319-5328.
86. Yanazume T, Hasegawa K, Morimoto T, et al. Cardiac p300 is involved in myocyte growth with decompensated heart failure. *Molecular and cellular biology* 2003;**23**:3593-3606.
87. Kakita T, Hasegawa K, Morimoto T, et al. p300 protein as a coactivator of GATA-5 in the transcription of cardiac-restricted atrial natriuretic factor gene. *The Journal of biological chemistry* 1999;**274**:34096-34102.
88. Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, et al. Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell* 2010;**19**:450-459.
89. Gregoret IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology* 2004;**338**:17-31.
90. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 2009;**461**:819-822.
91. Black JC, Whetstone JR. Tipping the lysine methylation balance in disease. *Biopolymers* 2013;**99**:127-135.
92. Yang Y, Bedford MT. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature reviews Cancer* 2013;**13**:37-50.

93. Takeuchi T, Watanabe Y, Takano-Shimizu T, *et al.* Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2006;**235**:2449-2459.
94. Cloos PA, Christensen J, Agger K, *et al.* Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & development* 2008;**22**:1115-1140.
95. Yun M, Wu J, Workman JL, *et al.* Readers of histone modifications. *Cell research* 2011;**21**:564-578.
96. Musselman CA, Lalonde ME, Cote J, *et al.* Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nature structural & molecular biology* 2012;**19**:1218-1227.
97. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000;**403**:41-45.
98. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;**293**:1074-1080.
99. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, *et al.* Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics* 2007;**39**:311-318.
100. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, *et al.* Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;**107**:21931-21936.
101. Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, *et al.* Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nature genetics* 2008;**40**:897-903.
102. Petty E, Pillus L. Balancing chromatin remodeling and histone modifications in transcription. *Trends in genetics : TIG* 2013;**29**:621-629.
103. Wu H, Zhang Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes & development* 2011;**25**:2436-2452.
104. Derreumaux S, Chaoui M, Tevanian G, *et al.* Impact of CpG methylation on structure, dynamics and solvation of cAMP DNA responsive element. *Nucleic acids research* 2001;**29**:2314-2326.
105. Geahigan KB, Meints GA, Hatcher ME, *et al.* The dynamic impact of CpG methylation in DNA. *Biochemistry* 2000;**39**:4939-4946.
106. Zou X, Ma W, Solov'yov IA, *et al.* Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins. *Nucleic acids research* 2012;**40**:2747-2758.
107. Kavalali ET, Nelson ED, Monteggia LM. Role of MeCP2, DNA methylation, and HDACs in regulating synapse function. *Journal of neurodevelopmental disorders* 2011;**3**:250-256.
108. Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development* 2001;**15**:2343-2360.

109. Gilbert N, Thomson I, Boyle S, *et al.* DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction. *The Journal of cell biology* 2007;**177**:401-411.
110. Stefanovic S, Barnett P, van Duijvenboden K, *et al.* GATA-dependent regulatory switches establish atrioventricular canal specificity during heart development. *Nature communications* 2014;**5**:3680.
111. Zhou P, He A, Pu WT. Regulation of GATA4 transcriptional activity in cardiovascular development and disease. *Current topics in developmental biology* 2012;**100**:143-169.
112. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008;**451**:943-948.
113. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 2006;**313**:1922-1927.
114. Stergachis AB, Neph S, Sandstrom R, *et al.* Conservation of trans-acting circuitry during mammalian regulatory evolution. *Nature* 2014;**515**:365-370.
115. Schlesinger J, Schueler M, Grunert M, *et al.* The cardiac transcription network modulated by Gata4, Mef2a, Nkx2.5, Srf, histone modifications, and microRNAs. *PLoS genetics* 2011;**7**:e1001313.
116. He A, Kong SW, Ma Q, *et al.* Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;**108**:5632-5637.
117. Jay PY, Harris BS, Maguire CT, *et al.* Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *The Journal of clinical investigation* 2004;**113**:1130-1137.
118. Rojas A, Kong SW, Agarwal P, *et al.* GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and Cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Molecular and cellular biology* 2008;**28**:5420-5431.
119. Misra C, Sachan N, McNally CR, *et al.* Congenital heart disease-causing Gata4 mutation displays functional deficits in vivo. *PLoS genetics* 2012;**8**:e1002690.
120. Bimber B, Dettman RW, Simon HG. Differential regulation of Tbx5 protein expression and sub-cellular localization during heart development. *Developmental biology* 2007;**302**:230-242.
121. Wang L, Fan C, Topol SE, *et al.* Mutation of MEF2A in an inherited disorder with features of coronary artery disease. *Science* 2003;**302**:1578-1581.
122. Tsuchihashi T, Maeda J, Shin CH, *et al.* Hand2 function in second heart field progenitors is essential for cardiogenesis. *Developmental biology* 2011;**351**:62-69.
123. McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, *et al.* The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac

- ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* 2005;**132**:189-201.
124. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Current topics in developmental biology* 2012;**100**:253-277.
 125. Parmacek MS. Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circulation research* 2007;**100**:633-644.
 126. Miano JM. Myocardin in biology and disease. *Journal of biomedical research* 2015;**29**:3-19.
 127. Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, *et al.* GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovascular research* 2004;**63**:196-207.
 128. Lowry JA, Atchley WR. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. *Journal of molecular evolution* 2000;**50**:103-115.
 129. Aronson BE, Stapleton KA, Krasinski SD. Role of GATA factors in development, differentiation, and homeostasis of the small intestinal epithelium. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2014;**306**:G474-490.
 130. Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, *et al.* GATA-4 activates transcription via two novel domains that are conserved within the GATA-4/5/6 subfamily. *The Journal of biological chemistry* 1997;**272**:8515-8524.
 131. Gao J, Chen YH, Peterson LC. GATA family transcriptional factors: emerging suspects in hematologic disorders. *Experimental hematology & oncology* 2015;**4**:28.
 132. Molkentin JD, Antos C, Mercer B, *et al.* Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 and GATA transcription factors in the developing heart. *Developmental biology* 2000;**217**:301-309.
 133. Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, *et al.* GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Molecular and cellular biology* 2005;**25**:1215-1227.
 134. Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Seminars in cell & developmental biology* 1999;**10**:85-91.
 135. Chen Y, Bates DL, Dey R, *et al.* DNA binding by GATA transcription factor suggests mechanisms of DNA looping and long-range gene regulation. *Cell reports* 2012;**2**:1197-1206.
 136. Trainor CD, Omichinski JG, Vandergon TL, *et al.* A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Molecular and cellular biology* 1996;**16**:2238-2247.
 137. Bates DL, Chen Y, Kim G, *et al.* Crystal structures of multiple GATA zinc fingers bound to DNA reveal new insights into DNA recognition and self-

- association by GATA. *Journal of molecular biology* 2008;**381**:1292-1306.
138. Laforest B, Nemer M. GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Developmental biology* 2011;**358**:368-378.
 139. Singh MK, Li Y, Li S, *et al.* Gata4 and Gata5 cooperatively regulate cardiac myocyte proliferation in mice. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:1765-1772.
 140. Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *The Journal of biological chemistry* 2000;**275**:38949-38952.
 141. Holtzinger A, Evans T. Gata5 and Gata6 are functionally redundant in zebrafish for specification of cardiomyocytes. *Developmental biology* 2007;**312**:613-622.
 142. Peterkin T, Gibson A, Loose M, *et al.* The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Seminars in cell & developmental biology* 2005;**16**:83-94.
 143. Peterkin T, Gibson A, Patient R. Redundancy and evolution of GATA factor requirements in development of the myocardium. *Developmental biology* 2007;**311**:623-635.
 144. Jiang Y, Evans T. The *Xenopus* GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Developmental biology* 1996;**174**:258-270.
 145. Latinkic BV, Kotecha S, Mohun TJ. Induction of cardiomyocytes by GATA4 in *Xenopus* ectodermal explants. *Development* 2003;**130**:3865-3876.
 146. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, *et al.* GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes & development* 1997;**11**:1048-1060.
 147. Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development* 2002;**129**:4045-4055.
 148. Molkentin JD, Tymitz KM, Richardson JA, *et al.* Abnormalities of the genitourinary tract in female mice lacking GATA5. *Molecular and cellular biology* 2000;**20**:5256-5260.
 149. Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, *et al.* The transcription factor GATA6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 1999;**126**:723-732.
 150. Peterkin T, Gibson A, Patient R. GATA-6 maintains BMP-4 and Nkx2 expression during cardiomyocyte precursor maturation. *The EMBO journal* 2003;**22**:4260-4273.
 151. Gove C, Walmsley M, Nijjar S, *et al.* Over-expression of GATA-6 in *Xenopus* embryos blocks differentiation of heart precursors. *The EMBO journal* 1997;**16**:355-368.

152. Morrissey EE, Tang Z, Sigrist K, *et al.* GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes & development* 1998;**12**:3579-3590.
153. Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, *et al.* [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Revista española de cardiología* 2006;**59**:473-486.
154. Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circulation research* 2003;**92**:1079-1088.
155. Oka T, Maillet M, Watt AJ, *et al.* Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation research* 2006;**98**:837-845.
156. Liang Q, De Windt LJ, Witt SA, *et al.* The transcription factors GATA4 and GATA6 regulate cardiomyocyte hypertrophy in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 2001;**276**:30245-30253.
157. Charron F, Paradis P, Bronchain O, *et al.* Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Molecular and cellular biology* 1999;**19**:4355-4365.
158. Belaguli NS, Sepulveda JL, Nigam V, *et al.* Cardiac tissue enriched factors serum response factor and GATA-4 are mutual coregulators. *Molecular and cellular biology* 2000;**20**:7550-7558.
159. Morin S, Charron F, Robitaille L, *et al.* GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *The EMBO journal* 2000;**19**:2046-2055.
160. Garg V, Kathiriyia IS, Barnes R, *et al.* GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 2003;**424**:443-447.
161. Nadeau M, Georges RO, Laforest B, *et al.* An endocardial pathway involving Tbx5, Gata4, and Nos3 required for atrial septum formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;**107**:19356-19361.
162. Munshi NV, McAnally J, Bezprozvannaya S, *et al.* Cx30.2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development* 2009;**136**:2665-2674.
163. Manuylov NL, Tevosian SG. Cardiac expression of Tnnt1 requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *TheScientificWorldJournal* 2009;**9**:575-587.
164. Takaya T, Kawamura T, Morimoto T, *et al.* Identification of p300-targeted acetylated residues in GATA4 during hypertrophic responses in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 2008;**283**:9828-9835.
165. Dai YS, Markham BE. p300 Functions as a coactivator of transcription factor GATA-4. *The Journal of biological chemistry* 2001;**276**:37178-37185.

166. Sunagawa Y, Morimoto T, Takaya T, *et al.* Cyclin-dependent kinase-9 is a component of the p300/GATA4 complex required for phenylephrine-induced hypertrophy in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:9556-9568.
167. He A, Gu F, Hu Y, *et al.* Dynamic GATA4 enhancers shape the chromatin landscape central to heart development and disease. *Nature communications* 2014;**5**:4907.
168. Yilbas AE, Hamilton A, Wang Y, *et al.* Activation of GATA4 gene expression at the early stage of cardiac specification. *Frontiers in chemistry* 2014;**2**:12.
169. Kawamura T, Ono K, Morimoto T, *et al.* Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 2005;**280**:19682-19688.
170. Liang Q, Wiese RJ, Bueno OF, *et al.* The transcription factor GATA4 is activated by extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-mediated phosphorylation of serine 105 in cardiomyocytes. *Molecular and cellular biology* 2001;**21**:7460-7469.
171. van Berlo JH, Elrod JW, Aronow BJ, *et al.* Serine 105 phosphorylation of transcription factor GATA4 is necessary for stress-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;**108**:12331-12336.
172. He A, Shen X, Ma Q, *et al.* PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes & development* 2012;**26**:37-42.
173. Chen M, Yi B, Sun J. Inhibition of cardiomyocyte hypertrophy by protein arginine methyltransferase 5. *The Journal of biological chemistry* 2014;**289**:24325-24335.
174. Wang J, Feng XH, Schwartz RJ. SUMO-1 modification activated GATA4-dependent cardiogenic gene activity. *The Journal of biological chemistry* 2004;**279**:49091-49098.
175. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, *et al.* Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science* 2012;**337**:1190-1195.
176. Yagihara N, Watanabe H, Barnett P, *et al.* Variants in the SCN5A Promoter Associated With Various Arrhythmia Phenotypes. *Journal of the American Heart Association* 2016;**5**.
177. Uzieblo-Zyczkowska B, Gielerak G, Siedlecki P, *et al.* Genetic diversity of SCN5A gene and its possible association with the concealed form of Brugada syndrome development in Polish group of patients. *BioMed research international* 2014;**2014**:462609.
178. Vatta M. Intronic variants and splicing errors in cardiovascular diseases. *Heart rhythm : the official journal of the Heart Rhythm Society* 2009;**6**:219-220.

179. Leoni AL, Gavillet B, Rougier JS, *et al.* Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a(+/-) mouse model. *PloS one* 2010;**5**:e9298.
180. Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, *et al.* Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation* 2006;**113**:338-344.
181. van den Boogaard M, Smemo S, Burnicka-Turek O, *et al.* A common genetic variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression. *The Journal of clinical investigation* 2014;**124**:1844-1852.
182. van den Boogaard M, Wong LY, Tessadori F, *et al.* Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *The Journal of clinical investigation* 2012;**122**:2519-2530.
183. Sotoodehnia N, Isaacs A, de Bakker PI, *et al.* Common variants in 22 loci are associated with QRS duration and cardiac ventricular conduction. *Nature genetics* 2010;**42**:1068-1076.
184. Yang P, Kupersmidt S, Roden DM. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovascular research* 2004;**61**:56-65.
185. Dellow KA, Bhavsar PK, Brand NJ, *et al.* Identification of novel, cardiac-restricted transcription factors binding to a CACC-box within the human cardiac troponin I promoter. *Cardiovascular research* 2001;**50**:24-33.
186. Atack TC, Stroud DM, Watanabe H, *et al.* Informatic and functional approaches to identifying a regulatory region for the cardiac sodium channel. *Circulation research* 2011;**109**:38-46.
187. Shang LL, Sanyal S, Pfahnl AE, *et al.* NF-kappaB-dependent transcriptional regulation of the cardiac scn5a sodium channel by angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;**294**:C372-379.
188. Pagans S, Kauder SE, Kaehlcke K, *et al.* The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell Host Microbe* 2010;**7**:234-244.
189. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental cell research* 1976;**98**:367-381.
190. Zimmer T, Biskup C, Bollensdorff C, *et al.* The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 2002;**186**:13-21.
191. Marques SM, Esteves da Silva JC. Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB life* 2009;**61**:6-17.
192. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-408.

193. Gilmour DS, Lis JT. Detecting protein-DNA interactions in vivo: distribution of RNA polymerase on specific bacterial genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984;**81**:4275-4279.
194. Gomes NP, Bjerke G, Llorente B, et al. Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program. *Genes & development* 2006;**20**:601-612.
195. Furlan-Magaril M, Rincon-Arango H, Recillas-Targa F. Sequential chromatin immunoprecipitation protocol: ChIP-reChIP. *Methods in molecular biology* 2009;**543**:253-266.
196. Markou T, Hadzopoulou-Cladaras M, Lazou A. Phenylephrine induces activation of CREB in adult rat cardiac myocytes through MSK1 and PKA signaling pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2004;**37**:1001-1011.
197. Li T, Liu Z, Hu X, et al. Involvement of ERK-RSK cascade in phenylephrine-induced phosphorylation of GATA4. *Biochimica et biophysica acta* 2012;**1823**:582-592.
198. Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circulation research* 2002;**91**:776-781.
199. Carrasco M, Delgado I, Soria B, et al. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2012;**122**:3504-3515.
200. Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, et al. Cooperative interactions among intestinal GATA factors in activating the rat liver fatty acid binding protein gene. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2006;**291**:G297-306.
201. Kassab K, Hariri H, Gharibeh L, et al. GATA5 mutation homozygosity linked to a double outlet right ventricle phenotype in a Lebanese patient. *Molecular genetics & genomic medicine* 2016;**4**:160-171.
202. Watt AJ, Battle MA, Li J, et al. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;**101**:12573-12578.
203. Luna-Zurita L, Stirnimann CU, Glatt S, et al. Complex Interdependence Regulates Heterotypic Transcription Factor Distribution and Coordinates Cardiogenesis. *Cell* 2016;**164**:999-1014.
204. Dai YS, Cserjesi P, Markham BE, et al. The transcription factors GATA4 and dHAND physically interact to synergistically activate cardiac gene expression through a p300-dependent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2002;**277**:24390-24398.
205. Bhalla SS, Robitaille L, Nemer M. Cooperative activation by GATA-4 and YY1 of the cardiac B-type natriuretic peptide promoter. *The Journal of biological chemistry* 2001;**276**:11439-11445.

206. Pang S, Liu Y, Zhao Z, *et al.* Novel and functional sequence variants within the TBX2 gene promoter in ventricular septal defects. *Biochimie* 2013;**95**:1807-1809.
207. Moskowitz IP, Wang J, Peterson MA, *et al.* Transcription factor genes Smad4 and Gata4 cooperatively regulate cardiac valve development. [corrected]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;**108**:4006-4011.
208. Li RG, Li L, Qiu XB, *et al.* GATA4 loss-of-function mutation underlies familial dilated cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications* 2013;**439**:591-596.
209. Wei D, Bao H, Zhou N, *et al.* GATA5 loss-of-function mutation responsible for the congenital ventriculoseptal defect. *Pediatric cardiology* 2013;**34**:504-511.
210. Consortium EP. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 2012;**489**:57-74.
211. van den Boogaard M, Barnett P, Christoffels VM. From GWAS to function: genetic variation in sodium channel gene enhancer influences electrical patterning. *Trends in cardiovascular medicine* 2014;**24**:99-104.
212. Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, *et al.* GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *The Journal of biological chemistry* 1994;**269**:23177-23184.
213. Bosse T, Piaseckyj CM, Burghard E, *et al.* Gata4 is essential for the maintenance of jejunal-ileal identities in the adult mouse small intestine. *Molecular and cellular biology* 2006;**26**:9060-9070.
214. Chandrasekar B, Mummidi S, Claycomb WC, *et al.* Interleukin-18 is a pro-hypertrophic cytokine that acts through a phosphatidylinositol 3-kinase-phosphoinositide-dependent kinase-1-Akt-GATA4 signaling pathway in cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry* 2005;**280**:4553-4567.
215. Schwanhaussner B, Busse D, Li N, *et al.* Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 2011;**473**:337-342.
216. Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews Genetics* 2012;**13**:227-232.
217. Herrer I, Rosello-Lleti E, Rivera M, *et al.* RNA-sequencing analysis reveals new alterations in cardiomyocyte cytoskeletal genes in patients with heart failure. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2014;**94**:645-653.
218. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, *et al.* The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nature biotechnology* 2010;**28**:1045-1048.
219. Szerlong HJ, Prenni JE, Nyborg JK, *et al.* Activator-dependent p300 acetylation of chromatin in vitro: enhancement of transcription by

- disruption of repressive nucleosome-nucleosome interactions. *The Journal of biological chemistry* 2010;**285**:31954-31964.
220. Wang Z, Qin G, Zhao TC. HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. *Epigenomics* 2014;**6**:139-150.
 221. Li T, Li YM, Jia ZQ, *et al.* Carboxyl terminus of Nkx2.5 impairs its interaction with p300. *Journal of molecular biology* 2007;**370**:976-992.
 222. Chandrasekaran S, Peterson RE, Mani SK, *et al.* Histone deacetylases facilitate sodium/calcium exchanger up-regulation in adult cardiomyocytes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009;**23**:3851-3864.
 223. Zhao X, Sternsdorf T, Bolger TA, *et al.* Regulation of MEF2 by histone deacetylase 4- and SIRT1 deacetylase-mediated lysine modifications. *Molecular and cellular biology* 2005;**25**:8456-8464.

ANNEX 1

Accepted Manuscript

Transcriptional regulation of the sodium channel gene (*SCN5A*) by GATA4 in human heart

Anna Tarradas, Mel lina Pinsach-Abuin, Carlos Mackintosh, Oriol Llorà-Batlle, Alexandra Pérez-Serra, Montserrat Batlle, Félix Pérez-Villa, Thomas Zimmer, Ivan Garcia-Bassets, Ramon Brugada, Pedro Beltran-Alvarez, Sara Pagans

PII: S0022-2828(16)30389-3
DOI: doi:[10.1016/j.yjmcc.2016.10.013](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.10.013)
Reference: YJMCC 8474

To appear in: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*

Received date: 3 June 2016
Revised date: 7 October 2016
Accepted date: 24 October 2016



Please cite this article as: Tarradas Anna, Pinsach-Abuin Mel lina, Mackintosh Carlos, Llorà-Batlle Oriol, Pérez-Serra Alexandra, Batlle Montserrat, Pérez-Villa Félix, Zimmer Thomas, Garcia-Bassets Ivan, Brugada Ramon, Beltran-Alvarez Pedro, Pagans Sara, Transcriptional regulation of the sodium channel gene (*SCN5A*) by GATA4 in human heart, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (2016), doi:[10.1016/j.yjmcc.2016.10.013](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.10.013)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Transcriptional regulation of the sodium channel gene (*SCN5A*) by GATA4 in human heart

Anna Tarradas^{1,2}, Mel·lina Pinsach-Abuin^{1,2,3}, Carlos Mackintosh PhD³, Oriol Llorà-Batlle^{1,2}, Alexandra Pérez-Serra^{1,2}, Montserrat Batlle PhD⁴, Félix Pérez-Villa MD PhD⁴, Thomas Zimmer PhD⁵, Ivan Garcia-Bassets PhD³, Ramon Brugada MD PhD^{1,2,6}, Pedro Beltran-Alvarez PhD^{1,2,7*}, and Sara Pagans PhD^{1,2*}.

¹Medical Sciences Department, School of Medicine, University of Girona, 17071 Girona, Spain

²Institut d'Investigació Biomèdica de Girona, 17190 Salt, Spain

³School of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093-0648, USA

⁴Thorax Institute, Cardiology Department, Hospital Clínic, University of Barcelona, Institute of Biomedical Research August Pi i Sunyer, 08036 Barcelona, Spain

⁵Institute for Physiology II, University Hospital, 07743 Jena, Germany

⁶Hospital Universitari Dr. Josep Trueta, 17001 Girona, Spain

⁷Present address: School of Biological, Biomedical, and Environmental Sciences, University of Hull, HU6 7RX, Hull, UK

***Contributed equally as corresponding authors.** Pedro Beltran-Alvarez: p.beltran-alvarez@hull.ac.uk; Sara Pagans: sara.pagans@udg.edu.

Cardiovascular Genetics Center
Institut d'Investigació Biomèdica de Girona
Edifici M2, Parc Hospitalari Martí i Julià
17190 Salt, Spain
Phone: +34 872 987087

Abstract

Aberrant expression of the sodium channel gene (*SCN5A*) has been proposed to disrupt cardiac action potential and cause human cardiac arrhythmias, but the mechanisms of *SCN5A* gene regulation and dysregulation still remain largely unexplored. To gain insight into the transcriptional regulatory networks of *SCN5A*, we surveyed the promoter and first intronic regions of the *SCN5A* gene, predicting the presence of several binding sites for GATA transcription factors (TFs). Consistent with this prediction, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and sequential ChIP (Re-ChIP) assays show co-occupancy of cardiac GATA TFs GATA4 and GATA5 on promoter and intron 1 *SCN5A* regions in fresh-frozen human left ventricle samples. Gene reporter experiments show GATA4 and GATA5 synergism in the activation of the *SCN5A* promoter, and its dependence on predicted GATA binding sites. *GATA4* and *GATA6* mRNAs are robustly expressed in fresh-frozen human left ventricle samples as measured by highly sensitive droplet digital PCR (ddPCR). *GATA5* mRNA is marginally but still clearly detected in the same samples. Importantly, *GATA4* mRNA levels are strongly and positively correlated with *SCN5A* transcript levels in the human heart. Together, our findings uncover a novel mechanism of GATA TFs in the regulation of the *SCN5A* gene in human heart tissue. Our studies suggest that GATA5 but especially GATA4 are main contributors to *SCN5A* gene expression, thus providing a new paradigm of *SCN5A* expression regulation that may shed new light into the understanding of cardiac disease.

Keywords: *SCN5A*; transcriptional regulation; GATA4; GATA5; GATA6; cardiac arrhythmias

Abbreviations

Chromatin immunoprecipitation: ChIP
Complementary RNA: cRNA
Droplet digital PCR: ddPCR
GATA binding sites: GATA-BS
Human embryonic kidney: HEK
Sequential ChIP: Re-ChIP
Sodium channel, voltage-gated, type V alpha subunit: Na_v1.5
Transcription start site: TSS
Transcription factor: TF
Wild-Type: WT

1. Introduction

Sodium channel, voltage-gated, type V alpha subunit (Na_v1.5) drives the sodium current that initiates the upstroke of the cardiac action potential [1]. Na_v1.5 interacts with several regulatory proteins (β -subunits, Nedd4-2 ubiquitin ligase, calmodulin, among others) that modulate Na_v1.5 membrane trafficking and function [2]. Genetic mutations in the *SCN5A* gene, which encodes the Na_v1.5 subunit, have been linked to cardiac arrhythmias (Brugada syndrome, long QT syndrome type 3, idiopathic ventricular fibrillation, atrial fibrillation, progressive cardiac conduction defects, congenital sick sinus syndrome, and sudden infant death syndrome) [1, 3].

However, recent findings also suggest that aberrant *SCN5A* gene expression may increase susceptibility to arrhythmogenic diseases. For example, low Na_v1.5 levels in heterozygous *Scn5a* +/- knockout mice recapitulate cardiac defects found in human individuals carrying disease-associated *SCN5A* mutations, and the severity of these defects is directly correlated with levels of Na_v1.5 expression [4]. In addition, certain haplotypes in the *SCN5A* promoter have been associated with aberrant *SCN5A* promoter activity and QRS duration on the electrocardiogram [5]. Finally, a common genetic variant (rs6801957) found in a distal *SCN5A* enhancer region has been associated with abnormal *SCN5A* expression and slow cardiac conductance [6, 7]. The rs6801957 variant impairs T-box transcription factor 3 and 5 (TBX3/TBX5) binding to the enhancer, and has been proposed to promote changes in *SCN5A* expression. Collectively, these few studies suggest that dysregulation of *SCN5A* gene expression may be linked to cardiac disease, and that understanding the mechanisms of *SCN5A* transcriptional regulation may uncover novel determinants of sodium channel-related cardiac diseases.

The core promoter of the human *SCN5A* gene spans from nucleotides -261 to +140 relative to the transcription start site (TSS, +1) [8], and it contains conserved regions with putative regulatory functions. Downstream conserved regions may also contain potential *cis*-regulatory elements, between TSS and exon 1 and within intron 1 [9]. In particular, intron 1 contains a predicted GATA1 binding site (BS). Mutation of this site reduces the promoter activity of the *Scn5a* gene in neonatal mouse cardiomyocytes, suggesting a direct role of GATA TFs in the regulation of basal *SCN5A* transcription [8]. The mammalian genome encodes six GATA TFs (GATA1-6). From those, GATA4, GATA5 and GATA6 are expressed in mesoderm- and endoderm-derived tissues, including the heart. [10]. GATA-BS are present in *cis*-regulatory regions of multiple cardiac-specific genes and are required for their proper cardiac expression [11]. GATA4 is considered a master regulator of cardiac transcriptional networks, and plays a key role in cardiogenesis and in adult cardiac cells [12]. Mechanistically, GATA4 acts synergistically with other TFs and activates gene expression by promoting H3K27ac deposition [13]. Of note, GATA4 has been described to be involved in the developing atrioventricular cardiac conduction system; accordingly, heterozygous *Gata4* +/- mice display short PR intervals

[14]. Mutations in the *GATA4* gene affecting DNA binding or interactions to other TFs have also been linked to heart dysfunction [15, 16].

Here, we explored a potential role of GATA TFs on transcriptional regulation of the human *SCN5A* gene. We found that cardiac GATA TFs, mainly *GATA4* and also *GATA5*, regulate the expression of the *SCN5A* gene via a synergistic mechanism. In fresh-frozen human heart samples, we observed that *GATA4* transcript levels positively correlate with *SCN5A* transcript levels. Overall, we suggest that *GATA4* plays a major role in the regulation of the *SCN5A* gene in the human heart, which may shed new light into the understanding of human cardiac arrhythmias.

2. Materials and Methods

2.1. Cells, Antibodies and Primers

Cardiac cells derived from embryonic rat ventricle (H9c2 cells) and human embryonic kidney 293 (HEK293) cells were maintained under standard cell culture conditions. Antibodies used in the experiments were: α -*GATA4* (sc-1237x), α -*GATA5* (sc-9054x), α -*GATA6* (sc-7244x) (all from Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), α -HA (ab1424, Abcam, Cambridge, UK), α -actin (A2066, Sigma, St Louis, MO, USA), and α -FLAG (F1804, Sigma). Secondary HRP antibodies were: α -rabbit (32460), α -goat (31402), and α -mouse (32430) (all from Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

For qPCR gene expression analyses, we used the following rat primers: *Gata4* (QT02350684) and *Scn5a* (QT00186263) from Qiagen (Hilden, Germany); *Nppa* (R_Nppa_1) and *Kcnh2* (R_Kcnh2_1) from Sigma; β -actin (Fw 5'AGCCATGTACGTAGCCATCC', Rv 5'CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA3'). For droplet digital PCR (ddPCR) analyses, we used the following validated expression probes: *GATA4*-FAM (dHsaCPE5050488), *GATA5*-FAM (dHsaCPE5036300), *GATA6*-FAM (dHsaCPE5037510), *GATA4*-HEX (dHsaCPE5050489), and *GADPH*-HEX (dHsaCPE5031597) from Bio-Rad.

2.2. Plasmids and Site Directed Mutagenesis

Details for plasmids and site directed mutagenesis are provided in Supplementary Materials and Methods.

2.3. Computational Analyses

TFSEARCH and MEME bioinformatic tools were used to identify GATA-BS in the *SCN5A* proximal promoter (from positions - 1125 bp to +857 bp from the TSS).

2.4. Human Cardiac Tissue Collection

Human left ventricle samples were collected from fourteen end-stage heart failure patients undergoing cardiac transplantation (Hospital Clínic, Barcelona). Control left ventricle heart samples, not used for transplantation, were obtained from four organ donors (Hospital Clínic, Barcelona). All individuals signed a written consent to participate in the study. Biopsies were collected from the explanted heart, washed and snap-frozen in liquid nitrogen immediately after surgery. To ensure minimum variation due to sample collection, all samples were dissected from the same heart area, the anterior wall of the left ventricle, by the same person. Histologically, samples comprise the three heart layers (epicardium, myocardium and endocardium). All procedures were approved by the ethical committees of the Hospital Dr. Josep Trueta de Girona and the Hospital Clínic de Barcelona and conform the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

2.5. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) and Sequential Chromatin Immunoprecipitation (Re-ChIP) Assays

ChIP and Re-ChIP assays were performed using human adult left ventricle samples. ChIP was adapted from Gomes *et al*, 2006 [17] and Re-ChIP from Furlan-Magaril *et al*, 2009 [18]. An expanded description of these techniques is available in Supplementary Materials and Methods.

2.6. Transient Transfection and Luciferase Assays

PromoterA-luciferase or PromoterB-luciferase (200 ng), EF1 α Promoter-Renilla (20 ng) constructs, and GATA expression vectors were transfected into H9c2 cells using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) following the manufacturer's specifications. We transfected 1200 ng of each GATA expression vectors, except for the dose-response experiment in which we used 600, 1200 and 1800 ng. DNA for each condition was equalized with pcDNA3.1. Cells were harvested 48 hours later with passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA), and processed for firefly and renilla luciferase activity with Dual Luciferase Reporter Assay System on a GloMax-96 luminometer (Promega).

2.7. RNAi Experiments

We transfected H9c2 cells with 25 nM of ON-TARGETplus Non-targeting Pool (D-001810-10) or two different siGENOME siRNA Rat *Gata4* (D-090725-02 and D-090725-03; all from Dharmacon, Thermo Scientific) using Dharmapfect (Thermo Scientific). Forty-eight hours post-transfection, we isolated total RNA

using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and treated the samples with DNase I to remove genomic DNA contamination. After reverse transcription of 1 µg of RNA (Reverse Transcription kit, Qiagen) we performed qPCR with validated primers for the target genes (*Gata4*, *Scn5a*, *Nppa*, *Kcnh2*, and *β-Actin*) and the Kapa-SYBR Green detection (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) on a Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Hauppauge, NY, USA).

For the luciferase experiments, H9c2 cells were transfected with 25 nM of control or *Gata4* siRNAs and re-transfected after 24 hours with PromoterA-luciferase or PromoterB-luciferase (200 ng) and EF1αPromoter-Renilla (20 ng) constructs. Cells were harvested 24 hours later and processed for luciferase assay as described above.

2.8. Co-immunoprecipitation Experiments

We co-transfected HEK293 cells with HA/GATA4 (5 µg) and GATA5 (5 µg) expression vectors using Lipofectamine 2000. Forty-eight hours after transfection we lysed the cells in IP lysis buffer (50 mmol/L Tris HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% NP-40 and Protease Inhibitors Cocktail (PI; Roche, Madrid, Spain)) and incubated 1 mg of the total lysate with α-HA antibody. The immunocomplexes were subjected to Western blot with α-GATA5 antibody. 1% of total protein was used as input.

2.9. Sodium Current Recordings

Xenopus laevis oocytes were obtained as described in the Supplementary Materials and Methods section. *In vitro* transcription of *SCN5A* gene was done using the mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit (Life Technologies). Synthetic transcript (cRNA) concentration was determined using a NanoDrop spectrophotometer and checked by agarose gel electrophoresis. Different *SCN5A* cRNA dilutions were injected in *Xenopus laevis* oocytes and after 3 days at 18 °C, four batches of oocytes were tested. We measured sodium currents by whole cell patch-clamp technique using two-microelectrode voltage clamp. Peak current was determined at -20 mV and the holding potential was at -120 mV. Measurements were performed using reduced extracellular Na⁺ (20 mM).

2.10. Gene Expression Analysis in Human Heart Tissue by Droplet Digital PCR

We disrupted 30 mg of human left ventricle samples with a glass dounce homogenizer in RLT buffer (Qiagen), and purified the total RNA using the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. To avoid contamination with genomic DNA we included a step of DNase I treatment. Reverse transcription was performed as described above. Quantification by ddPCR was carried out in 20 µL reactions containing 1x ddPCR Supermix for Probes (No dUTP), 250 nM of each commercial probe,

900 nM specific commercial primers, and 1 μ L or diluted cDNA according to manufacturer's recommendations (PCR conditions: 10 min at 95°C, 40 cycles of 30 sec at 94°C and 30 sec at 55°C, and 10 min at 98°C). Droplet generation and absolute droplet quantification was performed in a QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad) using the QuantaSoft Software (Bio-Rad), and analysis was performed using Excel (Microsoft) and Prism (GraphPad). Quantification references: human GAPDH-HEX and GATA4-HEX.

2.11. Statistical Analyses

Data are reported as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was conducted with SPSS or GraphPad Prism 6 version for Mac (GraphPad). For two-groups-only comparisons, we conducted two-tailed t-test. For analysis of multiple groups, we conducted one-way ANOVA, multiple comparisons comparing the mean of each group to the mean of every other group. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), and $p \leq 0.001$ (***).

3. Results

3.1. GATA4 and GATA5 Co-Occupy the SCN5A Proximal Promoter in Human Heart

To explore the potential role of GATA TFs in the regulation of the human SCN5A gene, we surveyed the SCN5A promoter for the presence of GATA-BS in the region comprised between -1125 and +857 bp of the SCN5A gene (hereafter referred to as SCN5A proximal promoter; +1 referring to the TSS). This *in silico* analysis predicted multiple GATA-BS in the SCN5A promoter and intron 1 (Supplementary Figure S1).

Cardiac TFs GATA4, GATA5 and GATA6 are 85% identical in their amino acid sequence within the DNA binding domain, thus the three bind virtually to the same predicted GATA-BS [10]. We examined the binding of GATA4, GATA5 and GATA6 across the SCN5A promoter and first intronic regions in fresh-frozen human heart samples by ChIP analysis. Soluble chromatin of human adult left ventricles was prepared and incubated with GATA4, GATA5 or GATA6 antibodies (Figure 1A). In agreement with our computational prediction, qPCR analysis of the immunoprecipitated material showed robust binding of GATA4 and GATA5 near to the TSS (-198 bp) and intron 1 (+505 bp) regions of the SCN5A gene. We did not detect binding of these TFs to the distal regions analyzed (-8803 and -5916 bp), which did not contain predicted GATA-BS. We observed some level of GATA6 binding on the same regions as GATA4 and GATA5, but ChIP enrichment was not statistically significant relative to control (Figure 1A).

To examine whether GATA4 and GATA5 co-occupy the same DNA molecules of the *SCN5A* promoter or whether instead both occupy different DNA molecules, we next performed Re-ChIP analyses in fresh-frozen human heart samples. Soluble chromatin fragments of the *SCN5A* gene first immunoprecipitated with GATA4 antibodies were efficiently re-immunoprecipitated with GATA5 antibodies (Figure 1B). These results suggest that GATA4 and GATA5 bind to the same DNA molecules of the *SCN5A* promoter and intron 1 regions. In support of our ChIP analysis, GATA6 did not show significant co-enrichment (Figure 1B).

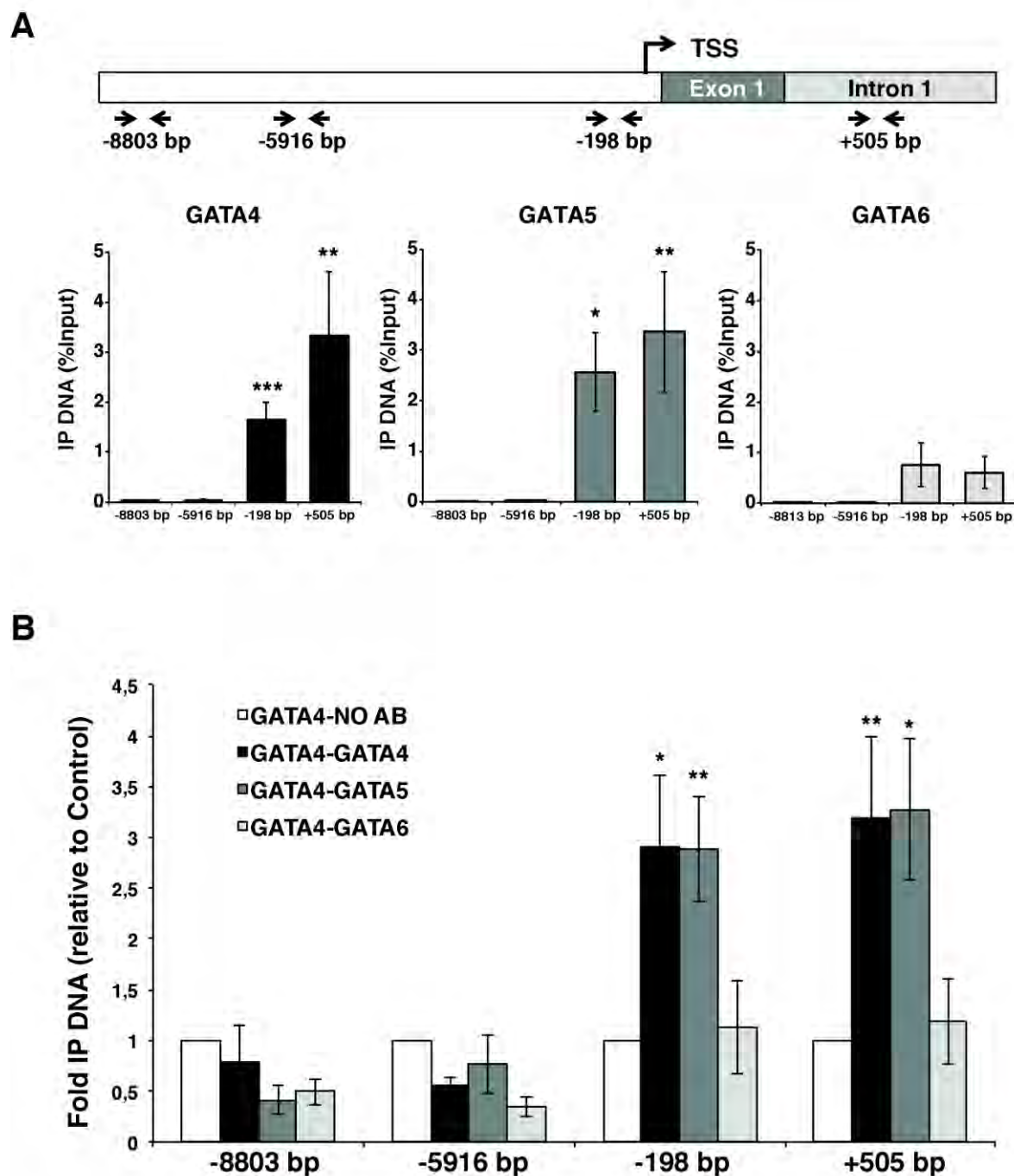


Figure 1. GATA4 and GATA5 bind to the *SCN5A* proximal promoter in the human heart. **A.** ChIP assays from human left ventricle samples using antibodies against GATA4, GATA5 and GATA6, followed by qPCR. Numbers indicate central base pairs of amplicons. Results are shown as percentage of input (mean $\pm$ SEM, n=6). Significance was examined by the t-test relative to negative control (-8803 bp) region. **B.** Re-ChIP assays from human left ventricle samples. Chromatin was incubated with α -GATA4 antibody, and then immunocomplexes were subjected to a second round of immunoprecipitation using antibodies against GATA4, GATA5, GATA6 or without antibody (control). Results are shown as fold immunoprecipitated DNA relative to the control condition (mean $\pm$ SEM, n=6). Significance was examined by the t-test relative to no antibody control. *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01, and ***p $\leq$ 0.001.

3.2. GATA TFs Regulate *SCN5A* Gene Transcription

To evaluate the functional relevance of GATA TF binding to the *SCN5A* promoter and intron 1 regions, we next performed reporter assays in rat cardiac H9c2 cells. These cells derive from rat embryonic ventricle, and are a well-established “cardiac-like” cellular model to study gene expression [19]. We first examined whether endogenous rat GATA4 regulates rat *Scn5a* expression. Efficient RNAi-based *Gata4* knockdown (80-90%) with two independent siRNAs induced 40-50% reduction in rat *Scn5a* mRNA expression (Figure 2A; decrease of GATA4 protein levels in *Gata4*-siRNA transfected cells shown in Supplementary Figure S2). As expected, mRNA levels of atrial natriuretic factor (*Nppa*), a well-known GATA4 target [20] [21], were similarly reduced upon *Gata4* siRNA transfection, but we did not observe the same effect on mRNA expression of the non-GATA4 target *Kcnh2* gene, which encodes a potassium channel involved in the repolarization phase of the cardiac action potential. These results support the specificity of our findings, and suggest that GATA4 positively regulates *SCN5A* gene expression.

Next, we determined whether GATA TF regulatory effects on the *SCN5A* gene occur via binding to the promoter and first intronic regions, as suggested by the ChIPs assays in human cardiac tissue. We performed reporter assays using a PromoterA-luciferase construct, containing the luciferase gene under control of the fragment -713 to +282 bp (relative to the TSS) of the human *SCN5A* gene. We transfected H9c2 cells with the PromoterA-luciferase construct and increasing amounts of GATA4, GATA5 or GATA6 expression vectors (analysis by Western blot confirmed correct expression of these three proteins; Figure 2B, right panel). GATA4 stimulated *SCN5A* promoter activity in a dose-dependent manner (Figure 2B, left panel). GATA5 also stimulated *SCN5A* promoter activity, although to a lesser extent than GATA4. GATA6

overexpression led to marginal, but still significant activation at high concentrations. To exclude the possibility that overexpressed GATA6 was not fully transcriptionally active, we also tested the effect of GATA6 overexpression on the pancreatic and duodenal homeobox 1 (*Pdx1*) promoter, a known target for both GATA4 and GATA6 [22]. We observed that GATA6 overexpression activates the reporter gene through the *Pdx1* promoter (Supplementary Figure S3).

GATA4 and GATA6 synergistically activate the natriuretic peptide *Nppa* and *Nppb* genes [20], as well as the pancreatic *Pdx1* gene [22]. To test for GATA TF synergies in the control of the *SCN5A* gene, we co-transfected different combinations of GATA4, GATA5 and GATA6 expression vectors in H9c2 cells. We observed a synergistic effect on expression of the reporter gene when GATA4 and GATA5 were co-transfected (Figure 2C). However, we did not see evidence of synergistic effects upon co-transfection of GATA4 and GATA6, or GATA5 and GATA6. Notably, when GATA4 and GATA6 were co-transfected we detected a similar level of activation to the observed after overexpression of GATA4 alone. In a parallel experiment, we tested the effect of GATA4 and GATA6 co-expression on the *Pdx1* promoter. In this case, we observed synergistic activation of GATA4 and GATA6, as previously reported [22] (Supplementary Figure S3). Altogether, these results suggest a major role of GATA4/5 synergism in the activation of the *SCN5A* promoter.

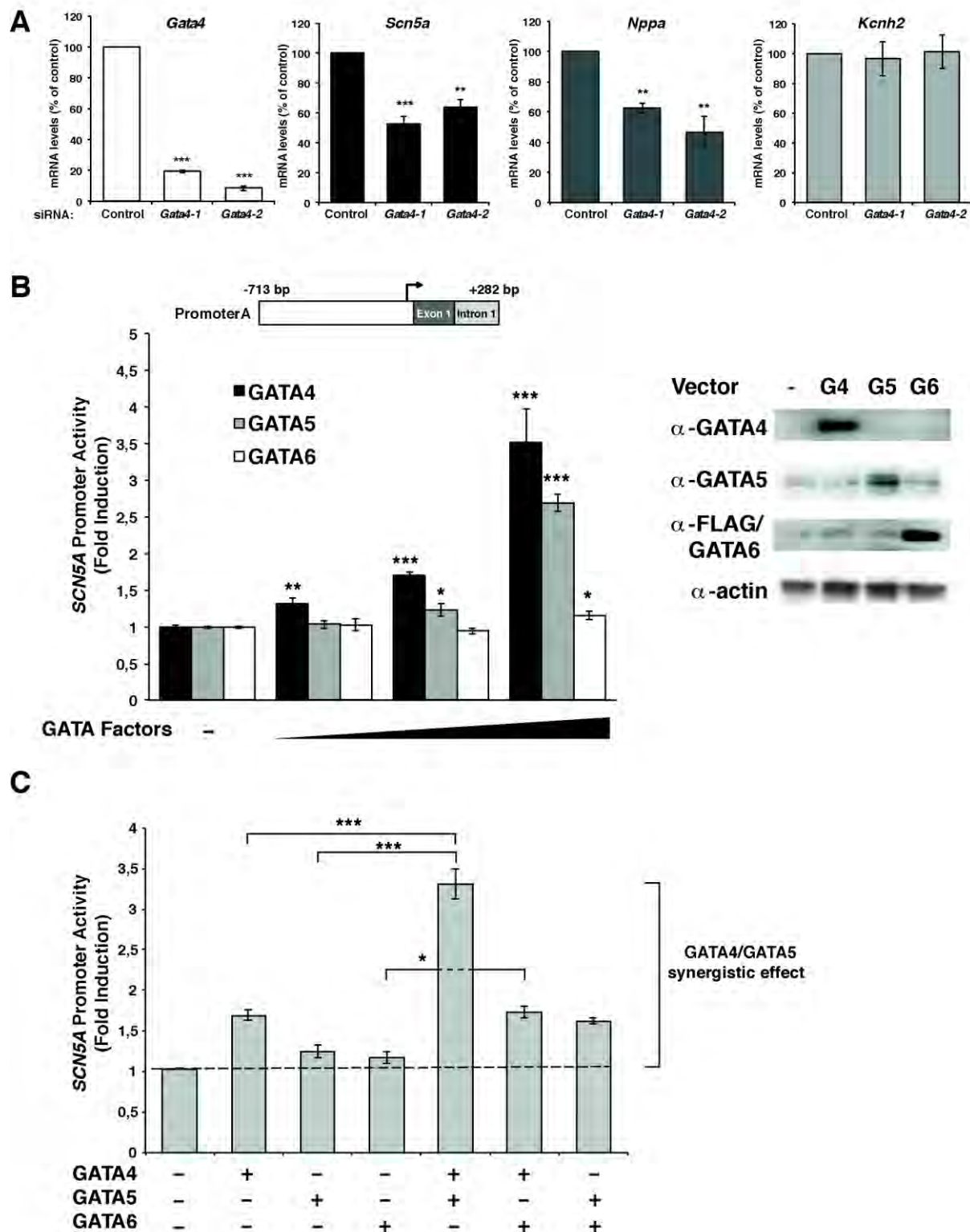


Figure 2. GATA TFs activate the *SCN5A* promoter. **A.** *Gata4* siRNAs downregulate *Scn5a* expression. qPCR analysis of *Gata4*, *Scn5a*, *Nppa* and *Kcnh2* mRNA levels from H9c2 cells transfected with control or *Gata4* siRNAs (1 and 2). Transcript levels were normalized to β -*Actin* mRNA and reported as percentage relative to control siRNA (mean $\pm$ SEM, n=8). Significance was examined by the t-test relative to control siRNA. **B. Left panel.** Luciferase

experiments in H9c2 cells transfected with PromoterA-luciferase construct and increasing amounts (600, 1200 and 1800 ng) of the indicated GATA TF expression vectors. Luciferase values were normalized to renilla and are shown as fold induction relative to non-overexpressing control conditions (mean $\pm$ SEM, $n=6$). Significance was examined by the t-test relative to control. **Right panel.** Western blot of transfected samples shows correct expression of GATA TFs. **C.** Luciferase experiments in H9c2 cells transfected with PromoterA-luciferase and the indicated GATA factor (1200 ng). Luciferase values were normalized with renilla and are shown as fold induction relative to control (mean $\pm$ SEM, $n=6$). Multiple group comparison was performed using the ANOVA test. Statistical significance of *SCN5A* promoter activity in the presence of each GATA TF relative to control conditions is not shown in Figure 2C for clarity, and was as indicated in Figure 2B. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and *** $p \leq 0.001$.

3.3. GATA4/GATA5 Synergism Is Decreased In Mutated Intron 1 GATA-BS

Our ChIP and Re-ChIP experiments show that, in addition to the region upstream TSS, GATA TFs also bind to the intronic 1 region (+505 bp). We therefore tested the effects of GATA TFs on a second construct, PromoterB-luciferase, that contains the luciferase gene under control of the fragment -260 to +612 bp from the *SCN5A* gene (Supplementary Figure S1). PromoterB showed 3-fold higher transcriptional activity on the reporter gene than PromoterA (Figure 3A), which supported previous findings suggesting that intron 1 contains additional *cis*-positive regulatory elements [8]. In addition, GATA4/5 synergism was greater on PromoterB than on PromoterA (Supplementary Figure S4), but we observed a similar (~40-60%) reduction in *SCN5A* promoter activity associated to *Gata4* knockdown in both promoter constructs (Figure 3B). These data suggest that the effect of *Gata4* knockdown on *Scn5a* mRNA levels in Figure 2A is the result of a promoter-dependent activity, although we cannot completely exclude the possibility that *Gata4* siRNAs could have other indirect effects.

We also tested whether the regulatory roles of GATA4 and GATA5 on the *SCN5A* promoter were dependent on the presence of specific GATA-BS. For this purpose, we generated two new versions of PromoterB-luciferase construct containing mutations in one or two predicted GATA-BS (Figure 3C and Supplementary Figure S1B). These predicted elements, located within the intron 1 region, are highly conserved among mammals (Supplementary Figure S5). Luciferase assays showed that activation of the *SCN5A* promoter by GATA4 decreased with the number of mutated GATA-BS. Similarly, GATA4 and GATA5 synergism was significantly reduced in GATA-BS mutant constructs (Figure 3C). These findings further support that GATA4 and GATA5 mediate their regulatory actions on *SCN5A* transcription via GATA-

BS. However, those sites present in intron 1 would not be completely indispensable, since transcriptional activity of a promoter construct without these sites (PromoterA) is also increased upon GATA TFs overexpression (Figures 2B and 2C).

Since GATA4 and GATA5 co-regulate the *SCN5A* promoter, we also tested whether GATA4 and GATA5 interact. We transfected HEK293 cells with HA-tagged GATA4 and GATA5 expression vectors and immunoprecipitated GATA4 from the lysates using anti-HA antibodies. GATA5 was detected in the immunoprecipitated material by Western blot, suggesting that GATA4 and GATA5 interact, directly or indirectly (Figure 3D). Collectively, our data suggest that GATA4 and GATA5 form a complex and synergistically activate *SCN5A* transcription via GATA-BS, including, but not exclusively, the most conserved GATA-BS in intron 1.

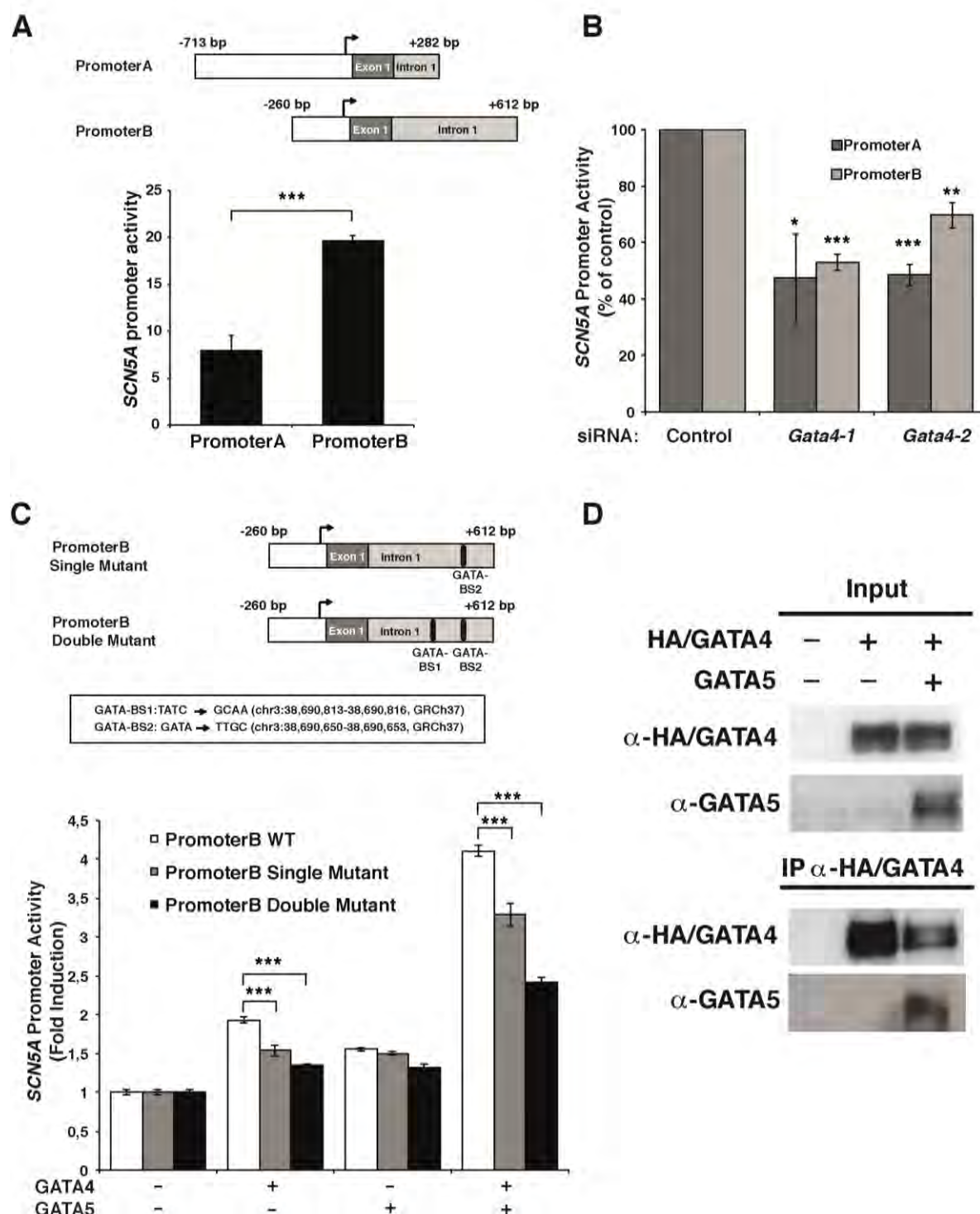


Figure 3. GATA4/GATA5 synergism is decreased in mutated intron 1 GATA-BS. **A.** Luciferase assays in H9c2 cells transiently transfected with PromoterA-luciferase or PromoterB-luciferase (200 ng) and EF1αPromoter-Renilla (20 ng). Luciferase values were normalized with renilla (mean ± SEM, n=5). Significance was examined by the t-test. **B.** Luciferase experiments in H9c2 cells transfected with PromoterA-luciferase or PromoterB-luciferase, and control or *Gata4* siRNAs. Luciferase values were normalized with renilla and

are shown as percentage over control (mean $\pm$ SEM, n=3). Significance was examined by the t-test relative to control siRNA. **C. Top.** Schematic representation of the single and double mutant PromoterB constructs. The numbers indicate the initial and the end position from the TSS (represented by an arrow) and the black lines indicate the mutated GATA-BS. Nucleotide changes for GATA-BS1 and GATA-BS2 and their genomic position according to GRCh37 are also shown. **Bottom.** Luciferase experiments in H9c2 cells transfected with PromoterB-luciferase WT or mutated constructs and the indicated GATA factor expression vectors. Luciferase values were normalized with renilla and are shown as fold induction relative to control (mean $\pm$ SEM, n=3). Significance was examined by the t-test assay relative to the WT construct. **D.** Total lysates from HEK293 cells transfected with GATA4-HA and GATA5 expression vectors were immunoprecipitated with α -HA antibody. Western blot of input and immunoprecipitated samples is shown. Images are representative of two independent experiments. *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01, and ***p $\leq$ 0.001.

3.4. Correlation of *GATA4* and *SCN5A* mRNA levels in Human Adult Heart

To examine whether changes in *SCN5A* RNA directly correlate with sodium currents, we took advantage of *Xenopus* oocytes, which lack endogenous *SCN5A* and are a common model system in electrophysiological studies [23]. We injected increasing amounts of synthetic complementary RNA (cRNA) encoding human *SCN5A* in *Xenopus* oocytes and measured the corresponding $\text{Na}_v1.5$ current using whole cell patch-clamp. We observed a positive and linear correlation between peak $\text{Na}_v1.5$ current and injected levels of *SCN5A* cRNA ($r^2=0.9962$; Figure 4A). Thus, the relative levels of *SCN5A* mRNA may have direct, linear biological effects.

To investigate a direct relationship between levels of *SCN5A* mRNA and GATA TFs in human heart tissue, we next applied the high sensitive and accurate droplet digital (ddPCR) approach. In fresh-frozen left ventricle samples (four samples from healthy donors and fourteen samples from end-stage heart failure patients), we detected robust *GATA4*, *GATA6*, and *SCN5A* mRNA expression, as well as marginal but still clear signal over background for *GATA5* mRNA (relative levels were as follows: *GATA4* levels were 76-fold higher than *GATA5* levels, and *GATA6* levels were 2.6-fold higher than *GATA4* levels; Figure 4B). Similarly, we detected the three GATA TFs by Western blot in a fresh-frozen human left ventricle sample (Supplementary Figure S6), although an accurate measurement of relative expression was not possible since each antibody intrinsically displays a particular affinity for its antigen.

Notably, we observed a positive and significant (Pearson coefficient 0.63) correlation between *GATA4* and *SCN5A* transcripts in human adult cardiac tissue (Figure 4B). No significant correlation was detected between *GATA5* or

GATA6 and SCN5A mRNA levels, or among GATA TFs (Figure 4B). Altogether, these results further support that GATA4 plays a major role in the regulation of SCN5A mRNA levels in human adult heart.

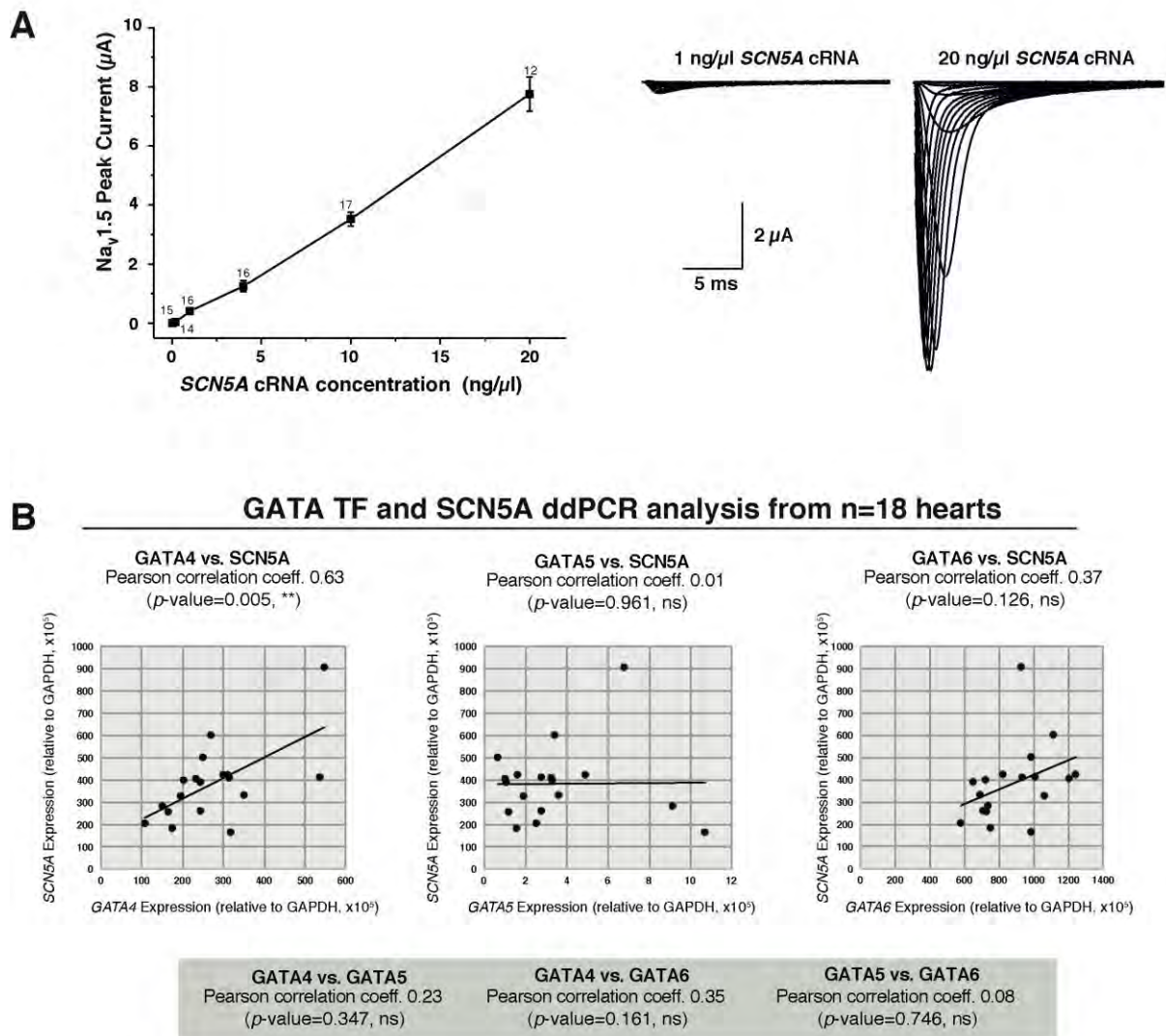


Figure 4. A. Left. Peak Na_v1.5 current measurements of *Xenopus* oocytes injected with the indicated SCN5A cRNA concentrations. Numbers mean the measurements done in each condition. **Right.** Representative whole cell sodium current traces recorded from *Xenopus* oocytes injected with 1 and 20 ng/μl of SCN5A cRNA. **B.** Droplet digital PCR analysis of GATA TF and SCN5A mRNA levels in n=18 human left ventricle samples. Data are displayed in scatter plots to compare each GATA TF with SCN5A mRNA levels, and Pearson correlation analysis was performed to determine statistical significant correlation. **p*≤0.05, ***p*≤0.01, and ****p*≤0.001.

4. Discussion

This study reveals that GATA4 synergizes with GATA5 in the activation of the *SCN5A* gene via binding to GATA-BS within the *SCN5A* proximal promoter and intron 1 regions. This conclusion is supported by experiments performed in human adult left ventricle tissue, as well as in a cell line derived from rat embryonic ventricle. Our ddPCR analysis also reveals a positive and significant correlation between GATA4 (but not GATA5 or GATA6) and *SCN5A* mRNA levels in human cardiac samples, thus supporting a direct role of GATA4 in regulating *SCN5A* gene expression in the human heart. We should note, however, the limitation of this ddPCR analysis, since heart samples included the three heart layers (epicardium, myocardium and endocardium). Thus, the relative abundance of each layer in each sample may affect the overall measured levels of GATA factors and *SCN5A*, since *SCN5A* expression has been reported to vary across the human cardiac ventricular wall [24].

Previous reports showed synergistic effects of GATA4 with other TFs, including GATA6 [20], Nkx2-5 [25], TBX5 [16], and MEF2 [26]. Consistent with these effects, recent ChIP-seq studies in mouse cardiomyocytes identified cardiac enhancers co-occupied by multiple TFs, including GATA4 [27-29]. Notably, GATA4 was shown to co-locate with TBX3, TBX5, and NKX2-5 on two enhancers, included within the mouse *Scn10A* gene and downstream of the *Scn5a* gene [6, 30]. These two enhancers activate *Scn5a* transcription by looping with the *Scn5a* promoter, as it was shown by 4C-seq [7]. Here, therefore, we favor a mechanism by which GATA4 may function with GATA5 and other TFs, yet to be determined, to regulate the *SCN5A* gene. Although the role of GATA5 in the human adult heart remains unclear [10, 11, 31-34], our results favor a model in which GATA4 and GATA5 co-regulate the *SCN5A* gene, and we speculate that part of the controversy about GATA5 expression in the adult heart can be explained by divergent mRNA and protein GATA5 levels.

Our ChIP and Re-ChIP experiments suggest that GATA4 and GATA5 bind to the *SCN5A* promoter and intron 1 regions in the human adult heart, while no binding is detected in far upstream regions (-8803 bp and from -5916 bp). These observations are in agreement with recent findings showing that, in mouse fetal heart, ~80% of GATA4 sites are distal to TSS regions; however, in mouse adult heart, GATA4 shifts to TSS-proximal locations, and only ~45% of GATA4 sites are distally located [13]. In this study, He et al. detected GATA4 ChIP-seq signal at the mouse *Scn5a* promoter, but not at intron 1 [13]. Data from the Mouse ENCODE Project revealed that *cis*-regulatory elements have undergone important evolutionary changes between human and mouse, but the regulatory networks are highly conserved between orthologous cell types of both species [35]. Consistently, we speculate that, although GATA4-BS differ between human and mouse, GATA4 function as regulator of *SCN5A*

gene is preserved. This possibility is supported by the observation of substantial reduction in H3K27 acetylation, a histone mark associated with active transcription, on the *Scn5a* promoter in *Gata4* knockout mouse embryos, thus confirming the importance of GATA4 in *SCN5A* gene expression activation [13].

The identification of GATA4 and GATA5 as novel regulators of *SCN5A* transcription raises the possibility that these factors may be associated with arrhythmogenic diseases. Genetic variants in *GATA4* (or *GATA5*) genes could be related to arrhythmogenic diseases via dysregulation of *SCN5A* expression. The effect of mutations on GATA4 (and GATA5) function could determine the levels of Na_v1.5 channel expression, which could explain the variability of phenotypes associated with *SCN5A*-related arrhythmias. In support of this idea, *Gata4* +/- mice, although viable, display short PR intervals [14].

Our data also raises the intriguing question whether genetic variation in GATA-BS could lead to arrhythmogenic diseases. Single nucleotide variants (SNVs), insertions, and deletions affecting GATA-BS could impair GATA TF regulatory functions on the *SCN5A* gene, thereby modulating *SCN5A* expression or even protecting from cardiac arrhythmias. The 1000 Genomes database includes two SNVs in the GATA-BS regions studied here, rs552565807 and rs115996915, but direct studies would be needed to identify their potential effects in *SCN5A* expression. In any case, the possibility that genetic variations in GATA-BS could lead to arrhythmias is already supported by genome-wide association (GWAS) studies indicating that most disease-associated variants lie within regulatory regions [36]. Indeed, *de novo* discovery of mutations in nonexonic regions (versus exonic regions) holds the promise that uncovering the transcriptional regulation of cardiac genes can lead to a better understanding of heart diseases.

5. Conclusions

In this study, we report the regulatory role of GATA4 on the *SCN5A* gene in human heart. Our work provides evidences that: 1) GATA4 and GATA5 co-occupy the *SCN5A* promoter and the first intronic regions, interact, and synergize to regulate the expression of the *SCN5A* gene in human heart tissue; 2) two GATA-BS found in intron 1 are important but not the sole contributor elements for this regulatory role; and, 3) GATA4 and *SCN5A* mRNA levels positively correlate in adult human hearts. Overall, we anticipate that the study of NaV1.5-related arrhythmias will need to extend to GATA TFs and GATA-BS.

Sources of Funding

This work was supported by Spanish Government (SAF2011-27627 and RYC-2011-08216), 7PM-PEOPLE Marie Curie International Reintegration Grant (PIRG07-GA-2010-268395) and Fundació Obra Social La Caixa (Barcelona, Spain). AT acknowledges a predoctoral fellowship from University of Girona (BR2012/47), MP-A a predoctoral fellowship from Generalitat de Catalunya (2014FI_B 00586) and PB-A a Sara Borrell post-doctoral fellowship from Instituto de Salud Carlos III (CD10/00275).

Acknowledgments

We thank Dr. Jeffrey Molkentin (Cincinnati Children's Hospital, USA) for kindly providing the pMT₂-GATA4 vector, Dr. Anabel Rojas (CABIMER, Spain) for the pRK-GATA5, pCMV-GATA6-FLAG and pGL3-Pdx1 vectors, Dr. Jonathan A. Epstein, (Penn Cardiovascular Institute, USA) for the pCGN-GATA4-HA vector, and Dr. Dan Roden (Vanderbilt University, USA) for the *SCN5A*promoter-luciferase vector. We thank Laia Bosch-Pressegué and Alejandro Vaquero (IDIBELL, Spain) for sharing their expertise on the Re-ChIP experiments, Sara Cervantes-Roldan (IDIBAPS, Spain) for sharing reagents and members of the Cardiovascular Genetics Center for helpful discussions.

Disclosures

None.

References

- [1] Zimmer T, Surber R. SCN5A channelopathies--an update on mutations and mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;98:120-36.
- [2] Shy D, Gillet L, Abriel H. Cardiac sodium channel NaV1.5 distribution in myocytes via interacting proteins: the multiple pool model. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833:886-94.
- [3] Darbar D, Kannankeril PJ, Donahue BS, Kucera G, Stubblefield T, Haines JL, et al. Cardiac sodium channel (SCN5A) variants associated with atrial fibrillation. *Circulation*. 2008;117:1927-35.
- [4] Leoni AL, Gavillet B, Rougier JS, Marionneau C, Probst V, Le Scouarnec S, et al. Variable Na(v)1.5 protein expression from the wild-type allele correlates with the penetrance of cardiac conduction disease in the Scn5a(+/-) mouse model. *PLoS One*. 2010;5:e9298.
- [5] Bezzina CR, Shimizu W, Yang P, Koopmann TT, Tanck MW, Miyamoto Y, et al. Common sodium channel promoter haplotype in asian subjects underlies variability in cardiac conduction. *Circulation*. 2006;113:338-44.
- [6] van den Boogaard M, Wong LY, Tessadori F, Bakker ML, Dreizehnter LK, Wakker V, et al. Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *J Clin Invest*. 2012;122:2519-30.
- [7] van den Boogaard M, Smemo S, Burnicka-Turek O, Arnolds DE, van de Werken HJ, Klous P, et al. A common genetic variant within SCN10A modulates cardiac SCN5A expression. *J Clin Invest*. 2014;124:1844-52.
- [8] Yang P, Kupersmidt S, Roden DM. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res*. 2004;61:56-65.
- [9] Atack TC, Stroud DM, Watanabe H, Yang T, Hall L, Hipkens SB, et al. Informatic and functional approaches to identifying a regulatory region for the cardiac sodium channel. *Circ Res*. 2011;109:38-46.
- [10] Molkenstein JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2000;275:38949-52.
- [11] Pikkarainen S, Tokola H, Kerkela R, Ruskoaho H. GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovasc Res*. 2004;63:196-207.
- [12] Peterkin T, Gibson A, Loose M, Patient R. The roles of GATA-4, -5 and -6 in vertebrate heart development. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:83-94.
- [13] He A, Gu F, Hu Y, Ma Q, Yi Ye L, Akiyama JA, et al. Dynamic GATA4 enhancers shape the chromatin landscape central to heart development and disease. *Nat Commun*. 2014;5:4907.
- [14] Munshi NV, McAnally J, Bezprozvannaya S, Berry JM, Richardson JA, Hill JA, et al. Cx30.2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development*. 2009;136:2665-74.
- [15] Misra C, Sachan N, McNally CR, Koenig SN, Nichols HA, Guggilam A, et al. Congenital heart disease-causing Gata4 mutation displays functional deficits in vivo. *PLoS Genet*. 2012;8:e1002690.

- [16] Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424:443-7.
- [17] Gomes NP, Bjerke G, Llorente B, Szostek SA, Emerson BM, Espinosa JM. Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program. *Genes & Dev*. 2006;20:601-12.
- [18] Furlan-Magaril M, Rincon-Arano H, Recillas-Targa F. Sequential chromatin immunoprecipitation protocol: ChIP-reChIP. *Methods Mol Biol*. 2009;543:253-66.
- [19] Kee HJ, Eom GH, Joung H, Shin S, Kim JR, Cho YK, et al. Activation of histone deacetylase 2 by inducible heat shock protein 70 in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2008;103:1259-69.
- [20] Charron F, Paradis P, Bronchain O, Nemer G, Nemer M. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol*. 1999;19:4355-65.
- [21] Laforest B, Nemer M. GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Dev Biol*. 2011;358:368-78.
- [22] Carrasco M, Delgado I, Soria B, Martin F, Rojas A. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest*. 2012;122:3504-15.
- [23] Gutter C, Benndorf K, Zimmer T. Characterization of N-terminally mutated cardiac Na(+) channels associated with long QT syndrome 3 and Brugada syndrome. *Frontiers Physiol*. 2013;4:153.
- [24] Gaborit N, Le Bouter S, Szuts V, Varro A, Escande D, Nattel S, et al. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *Journal Physiol*. 2007;582:675-93.
- [25] Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *EMBO J*. 1997;16:5687-96.
- [26] Morin S, Charron F, Robitaille L, Nemer M. GATA-dependent recruitment of MEF2 proteins to target promoters. *EMBO J*. 2000;19:2046-55.
- [27] He A, Kong SW, Ma Q, Pu WT. Co-occupancy by multiple cardiac transcription factors identifies transcriptional enhancers active in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:5632-7.
- [28] Wamstad JA, Alexander JM, Truty RM, Shrikumar A, Li F, Eilertson KE, et al. Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage. *Cell*. 2012;151:206-20.
- [29] Luna-Zurita L, Stirnimann CU, Glatt S, Kaynak BL, Thomas S, Baudin F, et al. Complex Interdependence Regulates Heterotypic Transcription Factor Distribution and Coordinates Cardiogenesis. *Cell*. 2016;164:999-1014.
- [30] Arnolds DE, Liu F, Fahrenbach JP, Kim GH, Schillinger KJ, Smemo S, et al. TBX5 drives *Scn5a* expression to regulate cardiac conduction system function. *J Clin Invest*. 2012;122:2509-18.
- [31] Jiang Y, Evans T. The *Xenopus* GATA-4/5/6 genes are associated with cardiac specification and can regulate cardiac-specific transcription during embryogenesis. *Dev Biol*. 1996;174:258-70.

- [32] Morrissey EE, Ip HS, Tang Z, Lu MM, Parmacek MS. GATA-5: a transcriptional activator expressed in a novel temporally and spatially-restricted pattern during embryonic development. *Dev Biol* 1997;183:21-36.
- [33] Laverriere AC, MacNeill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem*. 1994;269:23177-84.
- [34] Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10:85-91.
- [35] Stergachis AB, Neph S, Sandstrom R, Haugen E, Reynolds AP, Zhang M, et al. Conservation of trans-acting circuitry during mammalian regulatory evolution. *Nature*. 2014;515:365-70.
- [36] Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. 2012;337:1190-5.

Transcriptional regulation of the sodium channel gene (*SCN5A*) by GATA4 in human heart

Highlights:

- GATA4 and GATA5 co-occupy the promoter and the first intron of the *SCN5A* gene.
- GATA4 and GATA5 interact and synergize to regulate the expression of the *SCN5A* gene.
- Two GATA-binding sites within *SCN5A* intron 1 are important for GATA4/5 synergism.
- *GATA4* and *SCN5A* mRNA levels positively correlate in adult human hearts.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Materials and Methods

Plasmids and Site Directed Mutagenesis

The pMT₂-GATA4 expression vector was a kind gift of Dr. Jeffrey Molkentin (Cincinnati Children's Hospital, Cincinnati, OH, USA) [1]. The pRK-GATA5 and the pCMV-GATA6-FLAG expression vectors were a kind gift of Dr. Anabel Rojas, CABIMER, Sevilla, Spain. The pCGN-GATA4-HA expression vector (a kind gift from Jonathan A. Epstein, Penn Cardiovascular Institute, Philadelphia, PA, USA) [2] was used in the immunoprecipitation assays.

Two *SCN5A* promoter-luciferase constructs of variable length were used: PromoterA (from -713 to +282 bp, from the TSS) cloned in a pSGG, was purchased from Switchgear Genomics (Menlo Park, CA, USA), and PromoterB (from -260 to +612 bp) cloned in a pGL3, was a kind gift from Dr. Dan Roden (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) [3]. The EF1 α Promoter-Renilla construct has previously been described [4].

The PromoterB construct was used as a template to generate mutations of two GATA motifs (TATC to GCAA located at position +403/+406, designed as mutation 1, and GATA to TTGC located at position +566 /+569, designed as mutation 2) using the QuickChange Site-Directed Mutagenesis system (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and the following primers (mutations underlined). Mutation 1: (Fw) 5'-CGCCCGGCTGGAGGGGCAACCCGGGGGAGACGTC-3' and (Rv) 5'-GACGTCTCCCCCGGGTTGCCCTCCAGCCGGGCG-3'. Mutation 2: (Fw) 5'-CTGGGATTGGGACCCGTTGCCCGGAGGCCGGAGACC-3' and (Rv) 5'-GGTCTCCGGCCTCCGGGCAACGGGTCCCAATCCCAG-3'.

The Single Mutant construct contained the mutation 2, and the Double Mutant construct both mutations. After verifying the presence of the desired mutations by sequencing, the constructs were digested with *SacI* and *NcoI* and the fragments were subcloned into a pcDNA3.1 expression vector.

The pGL3-*Pdx1*-wildtype reporter plasmid containing a 1,927-bp fragment of the mouse *Pdx1* promoter region was a kind gift of Dr. Anabel Rojas [5].

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) and Sequential Chromatin Immunoprecipitation (Re-ChIP) Assays

100 mg of heart ventricular tissue were cut into small pieces and cross-linked with 1% formaldehyde in PBS with Protease Inhibitors Cocktail (PI) during 10 min at room temperature on a rotating platform. The reaction was stopped in 0.125 mol/L of glycine for 5 min. After two washes with cold PBS, we disaggregated the tissue with a glass dounce homogenizer in PBS and pelleted at 100 g, 1 min. To release the nuclei, we resuspended the cell pellet in 6 volumes of lysis buffer (5 mmol/L PIPES pH 8, 85 mmol/L KCl, 0.5% NP-40 supplemented with PI), incubated in ice for 10 min, and then centrifuged at 400 g for 10 min. We resuspended the nuclei pellet in Szak's Ripa buffer (150 mmol/L NaCl, 1% Igepal CA-630, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl at pH 8.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaF, 5 mmol/L sodium butyrate, 0.5 mmol/L AEBSF and PI) and incubated 5 min in ice. We sonicated the chromatin using the Bioruptor® NGS (Diagenode, Liège, Belgium) during 30 cycles (30 seconds ON, 30 seconds OFF each cycle) at high setting. Samples were loaded into 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), to check that size of chromatin fragments ranged between 200-500 bp. Next, we centrifuged samples at 1340 g, 10 min at 4 °C and precleared the supernatant containing chromatin for 2 h with 20 μ l of DiaMag protein G-coated magnetic beads (Diagenode) and Szak's Ripa buffer, except 2% of the supernatant that was kept

as input fraction. For each IP, we incubated overnight at 4 °C the chromatin with 5 µg of antibody and 20 µl of DiaMag protein G-coated magnetic beads preblocked with 1 mg/ml BSA and 0.3 mg/ml salmon sperm DNA. Antibodies used for immunoprecipitation were α-GATA4, α-GATA5 and α-GATA6. After capturing the beads with a magnetic rack, we washed the beads as following: twice with RIPA buffer, four times with wash buffer (100 mmol/L Tris HCl pH 8.5, 500 mmol/L NaCl, 1% v/v Nonidet P-40 and 1.5% w/v deoxycholic acid), twice with RIPA and twice with TE 1x. To elute the immunocomplexes, we incubated for 10 min at 65 °C with 250 µl of Tails Elution buffer (70 mmol/L Tris HCl pH 8, 7 mmol/L EDTA and 1.5% w/v SDS) and removed the beads with the magnetic rack. We treated the samples with RNase and Proteinase K followed by the reverse cross-linking for 5 h at 65 °C with NaCl to 200 mmol/L final concentration. We purified the DNA using NucleoSpin® Gel & PCR clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany) following the manufacturer's specifications. We analyzed the immunoprecipitated material by qPCR using primers specific for multiple regions of the human *SCN5A* locus (Supplementary Table S1). Results are shown as percentage of input.

For Re-ChIP assays, after the first immunoprecipitation with GATA4 antibody, beads were washed twice with RIPA buffer and the immunocomplexes were eluted two times with 75 µl of 10 mM DTT for 15 min at room temperature. To avoid DTT effects on the second antibody, elutes were diluted 10-times with RIPA buffer. Next, the second immunoprecipitation was performed overnight at 4 °C, incubating the elutes with 20 µl of DiaMag protein G-coated magnetic beads previously preblocked and 5 µg of α-GATA4, α-GATA5 or α-GATA6 antibodies or without antibody (control condition). The magnetic beads were then washed twice with RIPA buffer and once with wash buffer, RIPA buffer and finally with TE. Elution of the immunocomplexes and the following steps are the same described for the ChIP protocol.

Xenopus laevis oocytes

Oocytes were obtained from *Xenopus laevis* (Nasco Biologicals & Educational Kits Production Facility, Fort Atkinson, WI, USA) under anesthesia as follows: frogs were first placed into tap water containing 0.12 % Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate (Tricaine) for 20 min. Reflex tests were performed to confirm successful anesthesia (pedal withdrawal reflex). Anesthetized frogs were briefly rinsed with water and placed immediately on ice for surgical removal of ovarian lobes, as previously described [6].

The *Xenopus laevis* experiments were approved by the local government of the Free State of Thuringia (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz) under the registration number 02-037/13 and performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes.

Isolation of Soluble Proteins from Human Heart and Western Blot

Human left ventricle samples (approximately 0.5-1 g) were grounded using a mortar and pestle in liquid nitrogen, and homogenized (Polytron, Kinematica) in 50 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl containing PI, on ice. Samples were centrifuged (15 min, 16,000 g, 4 °C) and supernatant was kept at –80 °C until used. Lysates were then analyzed by Western blot using antibodies against GATA4, GATA5, GATA6 and Actin.

[illegible]

B

>5' UTR

```

gaacaaagcttccacagcgtggaaggggacccaagcgggttgccctgatggccctgttttg
tttaaacagaagtgtgtccccataggtcctgggcatgggcatgggagcaactatattgtc
agcgtatgtctccgtgtgtgtgtgcctgtgaccatgtctctgagtgagaaacagtgggtg
tgtaagtatgtgactccaggctctgcatgtgtcaagggtgaaggttgatgtggctcaaga
gggtggaagtatatataaaagaggtatatacatgtatatatatgtatgtgtgtgtgtgt
gtttgcgcgcgcgcgtgtgtgggtgtctctgtgttggttgccctgcttgcctctgggtctg
gggtgtgtgtttggttctgtcagcatgtgcgtccgtgtgttcaggtagatgtgtaccattg
tgcagatttctgtggcatcactaagtgtgtctccaggaaagtgtgggttcgagtgaagtgtg
tgtgtctctgtgtcagtgtgtcagtggatgtgtgtctaaagtcagtgtgggtgtctaaagttt
gtcagagtgtcttctcagtgtcagtgtgtgtcaatgatgtgtctgtctgtgtctgtgtg
gggtgtgtgggggtgtgtatctgtctcagggtgcatgtgtgtgtctgtgtcagtgcaggta
tgccatggcagcgtgtgtctgtctcggcatgagtgtcagtgtatgcccggtgtccacgtg
gggtgggtgggtgtctggtagccttcccaagtcagcaaggttgctgtgtgtgtgtgtgtata
ctctggcgggtgtgtgtgtgtatgccagtgtttgttaatgtgagcctgtccgcgtccgcg
tggtgtgcccattctgtgtggaagcgtgcgcgggtgcgcgtgtgtgtacccccgcctatgtc
tgtctgtccgcggccgcgtgtgcggctgtctgtgtgtgtgagccccgggtcagtgtggg
agtgtgcgccccggcggggcgtgtgtgtgtccccctccgagcggggcggagcaccacgtgc
ggagccctgggcgcgtcgtctgtggggcggagccagccccggggcccccaagccccaggccga
acccaggcggggcccgccccgacccccgcccccgacccccgcccccaaccccgagcccgcc
gcctgccagccccgggagccccaacagagccgcggagccg

```

>EXON 1

```

AGACGGCGGCGGCGCCCGTAGGATGCAGGGATCGCTCCCCGGGGCCGCTGAGCCTGCGC
CCAGTGCCCCGAGCCCCGCGCCGAGCCGAGTCCGCGCCAAGCAGCAGCCGCCACCCCGG
GGCCCCGGCCGGGGGACCAGCAG

```

>INTRON 1

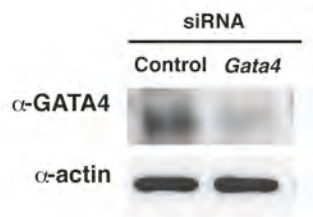
```

gtgagcagagtgtccccgcgcggcagccctggcccgccggagccccctccgcctgccg
ccgcccacttttctccccgagggccgaagcctccagtccttgcgtgtctctccctgcc
cgggtccgcgccagccgtctccctcccgatcagtgccccagagagccggagggggagaagg
ggcgcagatccgcgggtgtgaggggtatcccgggggagacgtctctaaacaccgtgcgc
cccccttcccttcccttctcccttccgggttcccggtgcgtgtgcagggccggggagg
ggagctgcggccccagcttcccgccatccctggcgcaggtctcggggagggtctgggatt
gggaccccgataccggaggccggagaccccaaggtcagagcggcgactaggcgcccatg
aatgtggttccagagagcgggggttgcgggggtgaccgagcaggtctgagatataggga
ggaagccacgcaccccctttctctgggcccagggggaaccgtccgctggggctgtcctct
ctgtgggacgagatctctgcgcgttttagaccatgtagagatctcgggtgccctttgacgcc
ctaaagggcccgcatctcctctctgatctctgtgtctctcgaaggggtggagatctct

```

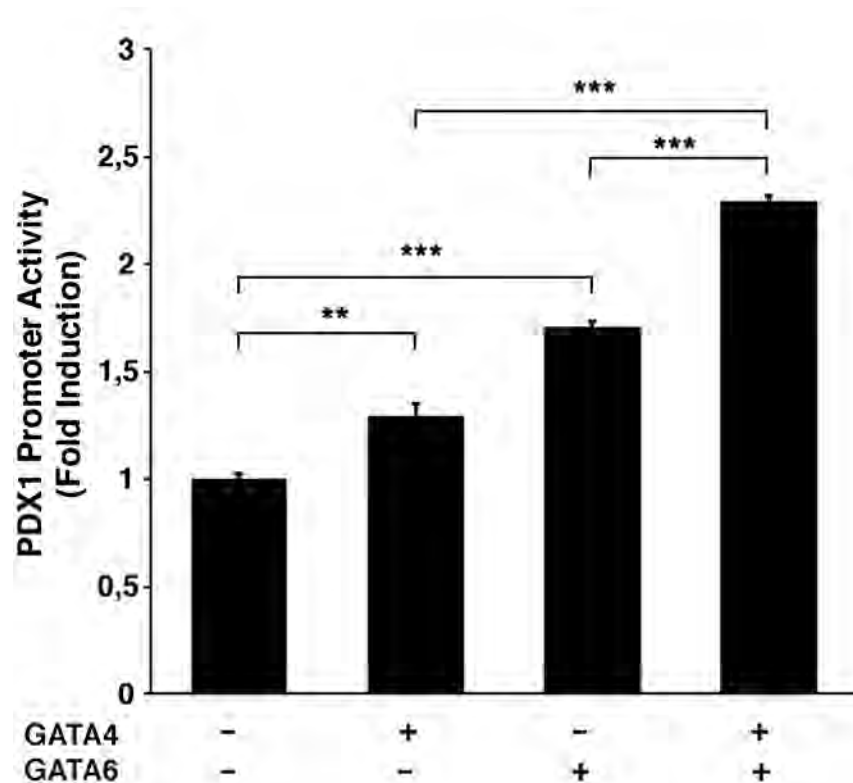
Supplementary Figure S1. GATA-BS identified in the human *SCN5A* proximal promoter (1982bp; chr3: 38,692,343 - 38,690,362; according to GRCh37). In **A** and **B** the regions corresponding to the PromoterA (from -713 to +282 bp) and PromoterB (from -260 to +612 bp), respectively, are shown in grey. The GATA binding sites identified by TFSEARCH are shown in blue boxes, and by MEME in orange boxes. The mutated GATA-BS in PromoterB are shown in red: mutation 1 changes TATC to GCAA at position +403/+406 bp (chr3: 38,690,813 – 38,690,816); and mutation 2 changes GATA to TTGC at position +566/+569 bp (chr3: 38,690,650 – 38,690,653). Arrows indicate the transcription start site of the human *SCN5A* gene.

Supplementary Figure 2



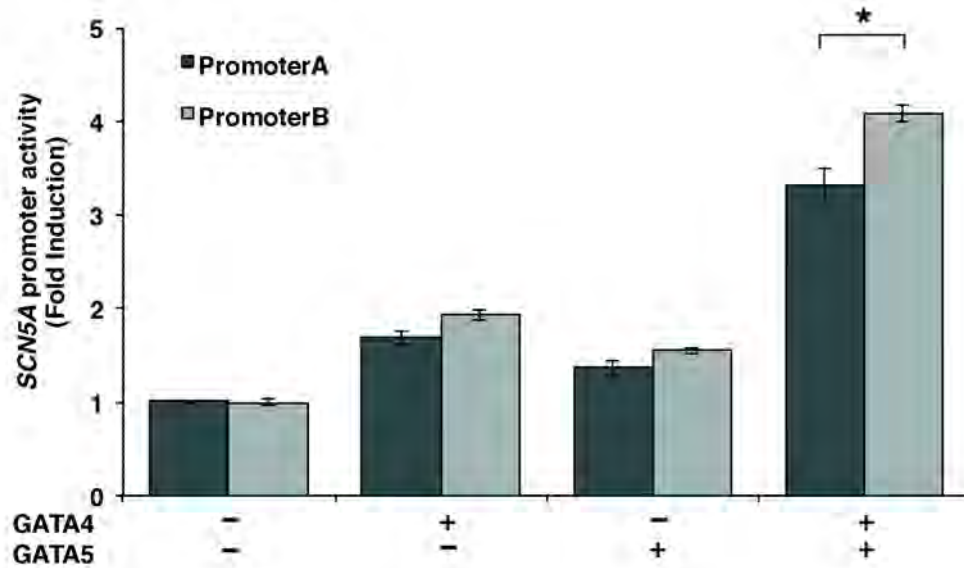
Supplementary Figure S2. Decrease of GATA4 protein levels in *Gata4* siRNA-transfected cells. H9c2 cells were transfected with control or *Gata4-1* siRNAs, lysed after 48 h and analyzed by Western blot.

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure S3. GATA4 and GATA6 synergize to activate the *Pdx1* promoter. Luciferase experiments performed in HEK293 cells transiently transfected with the *Pdx1*-luciferase (200 ng) and EF1 α Promoter-Renilla (20 ng) reporter vectors, together with GATA4 and GATA6 expression vectors (600 ng). Luciferase values were normalized with renilla and are shown as fold induction relative to control (mean $\pm$ SEM, n=3). Significance was tested by the t-test relative to control or double overexpressed conditions as shown. *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01, and ***p $\leq$ 0.001).

Supplementary Figure 4



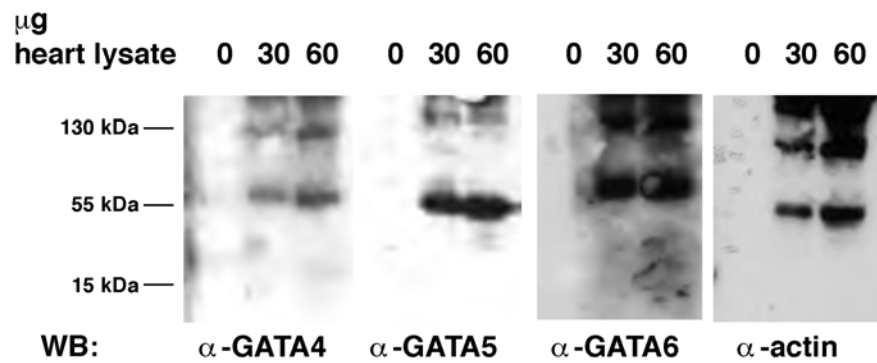
Supplementary Figure S4. GATA4/5 synergism on PromoterA and PromoterB constructs. Luciferase experiments in H9c2 cells transiently transfected with PromoterA-luciferase or PromoterB-luciferase (200 ng), EF1 α Promoter-Renilla (20 ng) and the indicated GATA TF expression vectors (1200 ng of each). Normalized values with renilla are shown as fold induction relative to control condition (mean $\pm$ SEM, n=6). Significance was examined in a t-test. *p $\leq$ 0.05, **p $\leq$ 0.01, and ***p $\leq$ 0.001.

Supplementary Figure 5

	GATA-BS1												GATA-BS2																							
Human	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G
Chimp	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Bonobo	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Gorilla	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Orangutan	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Gibbon	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Rhesus	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
ab-eating_macaque	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Baboon	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Green_monkey	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Proboscis_monkey	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
snub-nosed_monkey	A	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	T	A	G	
Marmoset	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Squirrel_monkey	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Tarsier	G	G	C	C	T	C	A	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Mouse_lemur	C	G	C	C	T	T	A	G	G	T	A	T	C	C	G	G	T	C	C	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	
Bushbaby	G	G	C	C	T	T	A	G	G	T	A	T	C	C	A	G	G	T	C	G	C	C	A	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	
Tree_shrew	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	-	C	C	C	G	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G
Mouse	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	=	A	C	C	A	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G
Dog	G	G	C	C	T	C	G	G	T	A	T	C	C	G	G	G	T	C	C	C	C	C	C	G	G	G	T	A	C	C	T	C	C	A	G	

Supplementary Figure S5. Conservation of GATA-BS1 and GATA-BS2 sites located in intronic 1 region of the *SCN5A* gene in different mammals. Data was obtained from UCSC Genome Browser.

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure S6. GATA4, GATA5 and GATA6 are expressed in the human adult heart. Western blots of total protein from human left ventricle samples (0, 30 and 60 μg) were analyzed with antibodies against GATA4, GATA5 and GATA6. Actin was used as loading control. Images are representative of three independent experiments.

Supplementary Table S1

Position Relative to TSS	Start	End	Genomic Region	Sequence
-8,833 to -8,772 bp	38,700,052	38,699,991	5'UTR	Fw: 5'-gggactccagtcctctttcc-3' Rv: 5'-ccccagcatccagatttcta-3'
-5,976 to -5,857 bp	38,697,193	38,697,074	5'UTR	Fw: 5'-taaaggcaggattgggtcac-3' Rv: 5'-tttgaaggcatgagcagttg-3'
-237 to -160 bp	38,691,454	38,691,377	Promoter	Fw: 5'-ccgcctatgtctgtctgtcc-3' Rv: 5'-gcacactcccacactgacc-3'
+440 to +571 bp	38,690,779	38,690,648	Intron 1	Fw: 5'-cccttcccttccctttcctt-3' Rv: 5'-ggtatccgggtcccaatcc-3'

Primers used for the qPCR analysis of the ChIP and Re-ChIP samples. The table shows the positions of the primers relative to the *SCN5A* TSS, the start and the end of the human genomic position (according to GRCh37), the *SCN5A* genomic region corresponding to these positions, and the sequence of the Forward (Fw) and Reverse (Rv) primers.

Supplementary References:

- [1] Molkentin JD, Kalvakolanu DV, Markham BE. Transcription factor GATA-4 regulates cardiac muscle-specific expression of the alpha-myosin heavy-chain gene. *Mol Cell Biol* 1994;14:4947-57.
- [2] Trivedi CM, Zhu W, Wang Q, Jia C, Kee HJ, Li L, Hannenhalli S, Epstein JA. Hopx and Hdac2 interact to modulate Gata4 acetylation and embryonic cardiac myocyte proliferation. *Dev Cell* 2010;19:450-9.
- [3] Yang P, Kupersmidt S, Roden DM. Cloning and initial characterization of the human cardiac sodium channel (SCN5A) promoter. *Cardiovasc Res* 2004;61:56-65.
- [4] Pagans S, Kauder SE, Kaehlcke K, Sakane N, Schroeder S, Dormeyer W, Trievel RC, Verdin E, Schnolzer M, Ott M. The Cellular lysine methyltransferase Set7/9-KMT7 binds HIV-1 TAR RNA, monomethylates the viral transactivator Tat, and enhances HIV transcription. *Cell Host Microbe* 2010;7:234-44.
- [5] Carrasco M, Delgado I, Soria B, Martin F, Rojas A. GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis. *J Clin Invest* 2012;122:3504-15.
- [6] Zimmer T, Biskup C, Bollensdorff C, Benndorf K. The beta1 subunit but not the beta2 subunit colocalizes with the human heart Na⁺ channel (hH1) already within the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 2002;186:13-21.