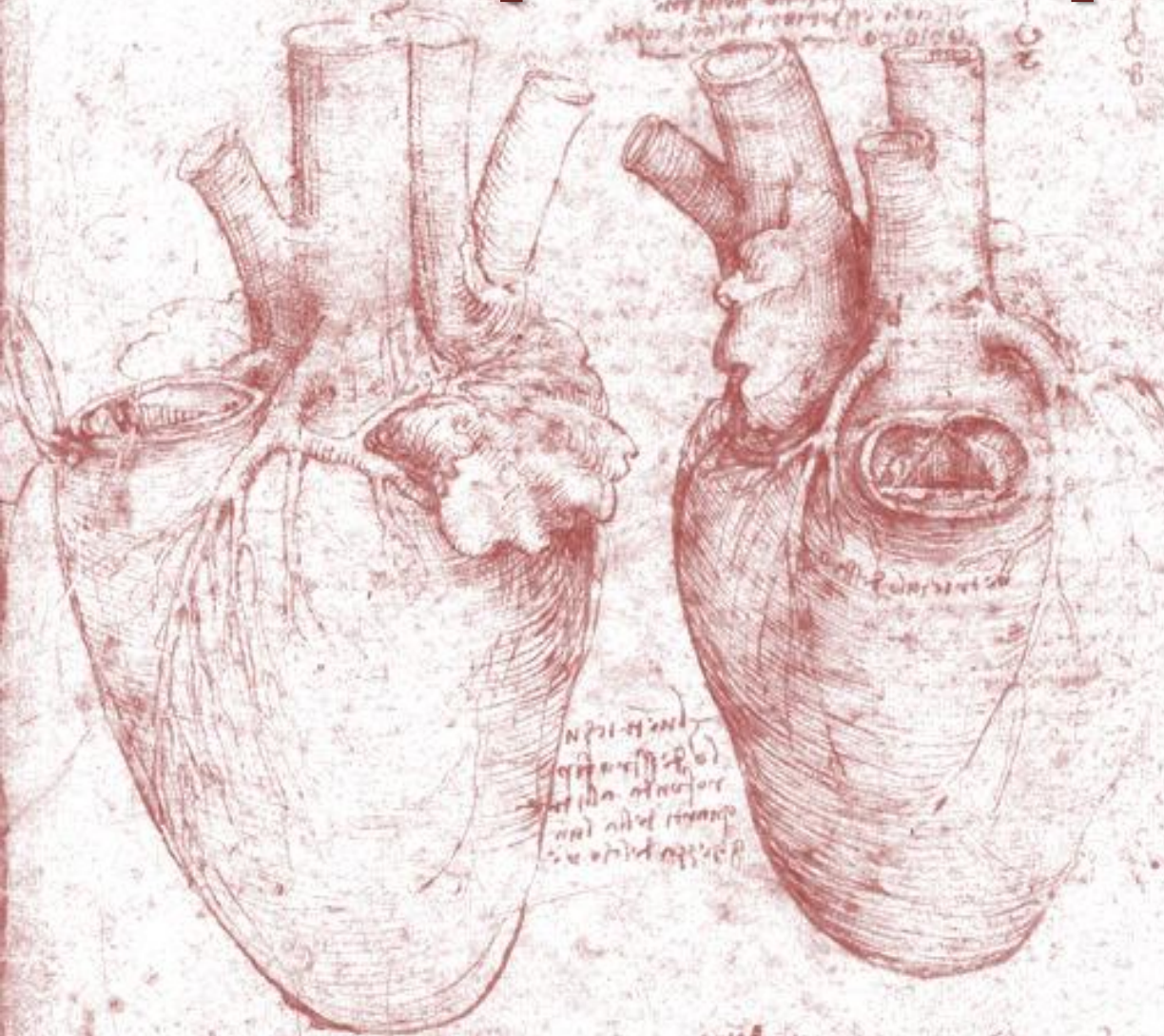
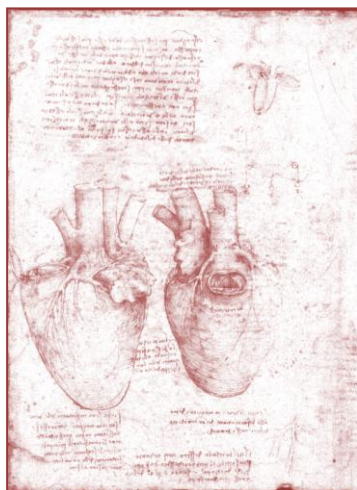


UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultad de Ciencias
Instituto Universitario de Ciencias de la Salud

Identificación y caracterización de genes con expresión diferencial izquierda- derecha en el miocardio ventricular neonatal: Implicaciones fisiopatológicas



Raquel Iglesias Reinoso
A Coruña, Junio 2010



Portada: Como imagen de fondo, los exquisitos dibujos de la mano maestra de Leonardo da Vinci del corazón de un buey (*Royal Library, Windsor 19074v. Mechanism of the ventricles of the heart. The Royal Collection, Her Majesty Queen Elizabeth II*)



FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Biología

Celular y Molecular

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE

CIENCIAS DE LA SALUD

Unidad de Biología del Desarrollo

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CON EXPRESIÓN
DIFERENCIAL IZQUIERDA-DERECHA EN EL MIOCARDIO VENTRICULAR
NEONATAL: IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS**

Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Biología por

Raquel Iglesias Reinoso

DIRECTORES:

Dr. Mario Torrado Oubiña

Dr. Alexander T. Mikhailov Khodorevsky

TUTORA:

Dra. Josefina Méndez Felpeto

A CORUÑA

2010



Dr. MARIO TORRADO OUBIÑA, DOCTOR EN BIOLOGÍA E INVESTIGADOR DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA Y **Dr. ALEXANDER MIKHAILOV KHODOREVSKY**, CATEDRÁTICO DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE RUSIA Y DIRECTOR ADJUNTO DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

AUTORIZAN:

A Raquel Iglesias Reinoso a presentar el trabajo titulado "IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL IZQUIERDA-DERECHA EN EL MIOCARDIO VENTRICULAR NEONATAL: IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS" para optar al grado de Doctora en Biología, el cual ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Biología del Desarrollo del Instituto Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña.

Y para que así conste se expide la presente en A Coruña, a 26 de Marzo de 2010

Fdo.: Dr. Mario Torrado

Fdo.: Dr. Alexander Mikhailov



Dra. JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, CATEDRÁTICA DE LA UNIVERSIDAD DE A CORUÑA

INFORMA QUE:

En calidad de tutora de la Tesis Doctoral titulada "IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL IZQUIERDA-DERECHA EN EL MIOCARDIO VENTRICULAR NEONATAL: IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS", realizada por Raquel Iglesias Reinoso, ratifica la autorización de los directores de la misma, Dr. Alexander Mikhailov y Dr. Mario Torrado, para su presentación y tramitación.

Y para que así conste firmo la presente en A Coruña, a 26 de Marzo de 2010

Fdo.: Dra. Josefina Méndez Felpeto

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación correspondiente a los Proyectos de Investigación:

1.- "Genes reguladores del programa cardíaco fetal en la cardiomiopatía dilatada experimental: Análisis de las implicaciones fisiopatológicas mediante transfección génica *in vivo*" (SAF2004-01462), financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia" (2004-2007). Investigador principal: Dr. A. T. Mikhailov.

2.- "Modulación de la expresión cardíaca del gen *myocardin* en el proceso de la cardiomiopatía dilatada en cerdos neonatales mediante transfección génica *in vivo* con fines terapéuticos" (PGIDIT04BTF161601PR), financiado por la Xunta de Galicia (2004-2007). Investigador principal: Dr. A. T. Mikhailov.

3.- "Modulación terapéutica experimental de la expresión génica cardíaca: silenciamiento del gen regulador *myocardin* por interferencia de ARN en el modelo porcino de insuficiencia cardíaca" (SAF2008-00337), financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2008-2011). Investigador principal: Dr. A. T. Mikhailov.

4.- "Reprogramación de la expresión génica en la insuficiencia cardíaca mediante el silenciamiento del gen regulador *myocardin*" (08CSA008161PR), financiado por la Xunta de Galicia (2008-2011). Investigador principal: Dr. A. T. Mikhailov.

Los resultados del trabajo realizado durante el transcurso de esta Tesis Doctoral han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

1.- Torrado, M., Iglesias, R., Nespereira, B., Centeno, A., López, E., Mikhailov, A.T. (2009). Intron retention generates ANKRD1 splice variants that are co-regulated with the main transcript in normal and failing myocardium. *Gene* **440**: 28-41.

2.- Torrado, M., Iglesias, R., Nespereira, B., Mikhailov, A.T. (2010). Identification of candidate genes potentially relevant to chamber-specific remodelling in postnatal ventricular myocardium. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2010, Article ID 603159, 10 pages. Doi: 10.1155/2010/603159.

3.- Torrado, M., Iglesias, R., Centeno, A., López, E., Mikhailov, A.T. (2010). Exon-skipping BNP variant is overexpressed in failing myocardium and attenuates BNP production in vitro. *Experimental Biology and Medicine*. (Enviado).

Los resultados del trabajo realizado han sido presentados y discutidos en los siguientes congresos internacionales:

- **Heart Failure 2008**, (Congress organised by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Milán-Italia).

Torrado, M., Iglesias, R., Centeno, A., Mikhailov, A.T. (2008). A novel alternative spliced variant of the brain natriuretic peptide gene is superior to BNP as a molecular marker of ventricular dysfunction. *Eur. J. Heart Fail.* **7 (Suppl. 1)**: 109.

- *Heart Failure 2009*, (Congress organised by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology together with Annual Congress of the European Section of the International Society for Heart Research, Nice-France).

Torrado, M., Iglesias, R., Centeno, A., Lopez, E., Castro-Beiras, A., Mikhailov, A.T. (2009). Enhanced expression of alternative splice variants of the cardiac ankyrin repeat domain 1 gene can represent an adaptive response of the failing myocardium. *Eur. J. Heart Fail.* **8 (Suppl. 2)**: 110.

Agradecimientos

Al Departamento de Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de A Coruña (UDC), por aceptarme en el Programa de Doctorado de Genética, Bioquímica y Biotecnología (2005-2007), así como al profesorado encargado de impartir las materias correspondientes. Mis agradecimientos especiales a la tutora del proyecto de mi tesis, la catedrática Josefina Méndez Felpeto, por asesorarme en todo momento y responder con amabilidad a mis dudas y preguntas a lo largo de la ejecución de mi trabajo doctoral.

A la dirección del Instituto Universitario de Ciencias de la Salud de la UDC, en particular al Dr. Alfonso Castro Beiras y al Dr. Javier Muñiz, por permitirme hacer uso de las instalaciones y del equipamiento del centro, y por evaluar positivamente mi candidatura para la concesión de dos contratos como titulada universitaria (2006; 2007). Del mismo modo agradezco al Vicerrectorado de Investigación por el contrato pre-doctoral de la UDC durante el bienio 2008-2009.

A los profesionales que han condicionado la ejecución del presente proyecto:

- A los Doctores Javier Muñiz, Marisa Crespo y Constancio Medrano del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña por facilitarnos el acceso a las muestras de corazón humano.
- A la Unidad de Cirugía Experimental del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, en concreto a su Director, Alberto Centeno Cortés, por acercarme al manejo de los animales de experimentación y a la recogida de muestras.
- Al Dr. Max Rothschild (*Iowa State University, U.S.A.*) por enviarnos gratuitamente oligonucleótidos purificados por HPLC para el análisis DDRT-PCR.
- Al Dr. Stanislav Tomarev (*NIH, Bethesda, U.S.A.*) por el asesoramiento en los métodos de transfección celular.
- A Cristina Trillo y a Javier Aldama (Roche, España) por prestarme la oportunidad de conocer y utilizar el equipo *RTCA SP Station* (Roche), el sofisticado y por ahora único equipo que permite evaluar la proliferación celular en tiempo real en los experimentos de manipulación celular *in vitro*.
- A ex miembros del grupo, Beatriz Nespereira y Yolanda Bouzamayor quienes me iniciaron en el ámbito de la investigación molecular cuando todavía era una

estudiante universitaria de cuarto curso (2004). También a Lucía, mi nueva compañera de laboratorio, por las conversaciones que hemos tenido y por dar un retoque femenino al entorno laboral.

Y por último, y en el lugar más destacado, a mis maestros a los que admiro y respeto, mis directores de la Tesis Doctoral, los Doctores Mario Torrado y Alexander Mikhailov, por aceptarme, como una colega más, en su Grupo de Investigación y por confiar en mí en todo momento a pesar de los baches que he atravesado en el transcurso de estos cinco años. Gracias por su ayuda en el trabajo experimental diario, en el análisis e interpretación de los resultados y en la redacción de la Tesis Doctoral y por transmitirme los conocimientos relativos a las "Ciencias de la vida", porque he aprendido de ellos y han sido fundamentales para poder llevar a cabo mi trabajo. Gracias a Alexander Mikhailov por transmitirme el espíritu internacional de la investigación/colaboración científica y a Mario Torrado por convertirme en una especialista en biología molecular moderna. En definitiva les agradezco lo que han hecho por mí, en mi nombre y en nombre de mis padres.

A mis seres queridos

A mis padres: Poco después de empezar la aventura que significa la preparación de la Tesis Doctoral y con motivo de mi 27 cumpleaños, mi madre me citó la frase de *Ralph Waldo Emerson*: “En la vida, los años enseñan muchas cosas que los días desconocen”. Desde entonces esta frase me ha recordado que trabajando con optimismo cada día se pueden lograr objetivos que en un principio parecen inalcanzables. A ellos, Felipe y Peregrina, les quiero dar las gracias por ser los mejores para mí, por haber invertido su tiempo, esfuerzo y corazón en criarme y educarme de la mejor manera posible y por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera Universitaria y un Doctorado. Les aseguro, que de un modo u otro, no habrá sido en vano. Gracias por apoyarme fueran cuales fuesen mis decisiones y por intentar ayudarme y aconsejarme en lo que creían que sería mejor para mí. Con el mismo argumento agradezco a mis hermanos Miguel y Felipe.

A mis sobrinos: Axel y Miguelito, y a mi sobrina: Lola, por ofrecerme su cariño.

A mis amigos y amigas en general: A los que aprecio, porque he tenido la gran suerte de tenerlos a mi lado siempre que los he necesitado.

A Iván: Gracias por ser comprensivo a lo largo de estos tres últimos años, y también por su apoyo incondicional que me ha permitido seguir adelante con este proyecto.

A Coruña, Junio 2010

Índice

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	9
ABREVIATURAS	13
I. INTRODUCCIÓN	19
1. Preámbulo al análisis de la regionalización izquierda-derecha del miocardio ventricular a nivel molecular.....	21
2. La remodelación hipertrófica del miocardio ventricular postnatal es inicialmente una respuesta adaptativa del corazón ante diferentes tipos de sobrecarga.....	21
3. La especificación molecular del eje izquierdo-derecho en el miocardio ventricular es un evento temprano en el desarrollo embrionario.....	25
4. La regionalización izquierda-derecha de la expresión génica en el miocardio ventricular fetal, neonatal y adulto.....	28
4.1. Desarrollo fetal.....	28
4.2. Desarrollo neonatal.....	30
4.3. Desarrollo postnatal/estado adulto.....	31
5. Hipótesis y diseño experimental de investigación.....	33
II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL Y OBJETIVOS	37
III. MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Obtención de muestras cardíacas porcinas.....	43
1.1. Animales, mantenimiento y experimentación.....	43
1.2. Aislamiento de tejidos cardíacos.....	44
2. Obtención de muestras cardíacas humanas.....	44
3. Análisis de la expresión génica: Métodos bioquímicos.....	45
3.1. Extracción proteica.....	45
3.1.1. Lisados celulares/tisulares totales.....	45
3.1.2. Extracción proteica secuencial.....	46
3.2. Determinación de la concentración proteica.....	47
3.3. Separación electroforética en geles de poliacrilamida.....	47
3.4. Inmuno-electrotransferencia (<i>Western blot</i>).....	48
3.5. Inmunocitoquímica.....	49

4. Análisis de la expresión génica: Métodos moleculares.....	50
4.1. Aislamiento de ARN y síntesis de ADN complementario.....	50
4.2. "Differential display mRNA reverse transcription-PCR" (DDRT-PCR).....	50
4.3. RT-PCR semicuantitativa.....	52
4.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	55
4.5. Amplificación rápida de extremos de ADNc.....	56
5. Clonación génica molecular.....	58
5.1. Vectores de expresión y diseño de las construcciones.....	58
5.2. Obtención y ligación de los insertos.....	59
5.3. Transformación bacteriana.....	60
5.4. Aislamiento de ADN plasmídico.....	61
6. Expresión proteica recombinante en bacterias.....	63
6.1. Transformación de cepas de <i>E.coli</i>	63
6.2. Inducción de la expresión proteica.....	64
6.3. Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad.....	64
7. Expresión proteica recombinante en células eucariotas.....	66
7.1. Cultivo celular.....	66
7.2. Transfección.....	66
8. Transcripción/traducción <i>in vitro</i>	70
IV. RESULTADOS.....	71
Capítulo 1. El análisis transcripcional revela la regionalización de la expresión génica en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos.....	73
1.1. Introducción.....	73
1.2. Resultados.....	74
1.2.1. La tecnología DDRT-PCR es suficiente para realizar un perfilado molecular global del miocardio ventricular neonatal.....	74
1.2.2. El análisis DDRT-PCR identifica los genes que se expresan diferencialmente entre dos ventrículos de cerdos recién nacidos.....	77
1.3. Comentario: Logros y propuestas.....	82
Capítulo 2. ANKRD1/CARP: La retención de intrones genera las variantes nuevas que se expresan en el miocardio normal y patológico.....	87

2.1. Introducción.....	87
2.2. Resultados.....	88
2.2.1. Las variantes del gen <i>ankrd1</i> que retienen el intron 8 se expresan en el corazón porcino neonatal.....	88
2.2.2. Varias configuraciones de los transcritos de <i>ankrd1</i> que retienen el intron 8 se detectan en el corazón porcino neonatal.....	92
2.2.3. Los transcritos <i>ankrd1</i> con intrones retenidos se traducen eficazmente en ensayos de expresión proteica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	94
2.2.4. Los transcritos <i>ankrd1</i> con intrones retenidos manifiestan una distribución asimétrica (izquierda versus derecha) en el corazón porcino neonatal.....	97
2.2.5. Los transcritos <i>ankrd1</i> con intrones se <i>up</i> -regulan en el miocardio ventricular en el modelo porcino de insuficiencia cardíaca.....	100
2.2.6. En el miocardio de cerdos neonatales, la expresión forzada del <i>ankrd1</i> sin intrones produce la <i>up</i> -regulación de sus transcritos que retienen intrones.....	101
2.2.7. Los ortólogos de las variantes porcinas de <i>ankrd1</i> con intrones se detectan en el corazón humano.....	104
2.3. Comentario: Logros y propuestas.....	106
Capítulo 3. NPPB/BNP: Una nueva variante generada por el <i>skipping</i> del exón 2 se sobre-expresa en el miocardio ventricular estresado <i>in vivo</i> y atenúa la producción y la secreción de BNP <i>in vitro</i>.....	109
3.1. Introducción.....	109
3.2. Resultados.....	111
3.2.1. El <i>skipping</i> del exón 2 genera una nueva variante de NPPB que se expresa asimétricamente en el corazón de cerdos recién nacidos.....	111
3.2.2. El transcrito $\Delta E2$ -NPPB se traduce eficazmente en sistemas celulares de expresión proteica.....	113
3.2.3. La expresión de $\Delta E2$ -NPPB se <i>down</i> -regula en el miocardio porcino durante el desarrollo postnatal.....	117
3.2.4. La expresión de $\Delta E2$ -NPPB se re-activa en el modelo porcino de insuficiencia cardíaca diastólica.....	118
3.2.5. $\Delta E2$ -NPPB atenúa la acumulación y la secreción de NPPB en ensayos celulares <i>in vitro</i>	120
3.2.6. Las variantes de NPPB generadas por el <i>skipping</i> de exones se detectan en el miocardio humano normal y cardiomiopático.....	123
3.3. Comentario: Logros y propuestas.....	125
V. DISCUSIÓN.....	129

5.1. La expresión génica regionalizada en el miocardio perinatal supone una predisposición molecular a distintos tipos del remodelado hipertrófico postnatal.....	132
5.2. Posible relevancia funcional de la expresión de las nuevas variantes de ANKRD1 y NPPB en el miocardio normal y patológico.....	136
5.2.1. Variantes/isoformas de ANKRD1/CARP.....	137
5.2.2. Variantes/isoformas de NPPB/BNP.....	140
5.3. Sinopsis.....	142
VI. CONCLUSIONES.....	143
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	147

Índice de figuras y tablas

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Tipos de hipertrofia ventricular fisiológica y patológica (Heineke y Molkenstin, 2006; modificado).....	24
Figura 2. Desarrollo cardíaco temprano de mamíferos (citado por; Dunwoodie, 2007; modificado).....	26
Figura 3. Dinámica del grosor de la pared libre del ventrículo izquierdo y del ventrículo derecho en cerdos neonatales (Torrado <i>et al.</i> , 2004; modificado).....	31

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 4. Control de la integridad de los ARN totales aislados del ventrículo izquierdo (VI) y derecho (VD) de cerdos recién nacidos (N5 y N6).....	51
Figura 5. Ejemplos representativos de la aplicación de la técnica de DDRT-PCR para el análisis de la expresión génica diferencial en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos.....	54
Figura 6. Diseño de la aplicación de la tecnología DDRT-PCR para el análisis transcripcional del miocardio del VI versus VD en cerdos recién nacidos.....	56
Figura 7. Curvas de disociación (A) y electroforegrama de amplicones (B) obtenidos mediante SYBR Green qPCR.....	59
Figura 8. Mapas de los vectores utilizados (según las descripciones de: Stratagene, Invitrogen y Sigma).....	62
Figura 9. Identificación electroforética de los plásmidos portadores de los insertos generados por clonación (gel de agarosa del 0.8% teñido con bromuro de etidio).....	65
Figura 10. El equipo RTCA SP (A) y esquema del principio de la medición de la impedancia (B) (modificado de; <i>RTCA SP Instrument Operator's Manual</i> , Roche).....	68
Figura 11. Experimento de titulación celular de COS-7 en el equipo RTCA SP.....	69

IV. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Figura 12. Representación esquemática del número de los fragmentos de ADNc generados por cada combinación de los oligonucleótidos con los ADNc del VI o del VD de cerdos recién nacidos.....	74
Figura 13. Análisis mediante DDRT-PCR de la expresión génica en los ventrículos izquierdo/derecho (VI/VD) de cerdos recién nacidos.....	75
Figura 14. Frecuencias de la distribución del número (A) y tamaño (B) de bandas generadas por DDRT-PCR.....	76
Figura 15. Ejemplos representativos de la expresión génica predominante en el ventrículo izquierdo de cerdos recién nacidos (Geles PAAG no desnaturalizantes del 8% teñidos con SYBR Green I).....	78

Figura 16. Ejemplos representativos de la expresión génica predominante en el ventrículo derecho de cerdos recién nacidos (Geles PAAG no desnaturalizantes del 8% teñidos con SYBR Green I).....	79
Figura 17. Dimensiones cardíacas (A, B) y secciones transversales del ventrículo izquierdo/derecho (C, D) de cerdos neonatales.....	82
Figura 18. Estimación de los niveles de ARNm de <i>myostatin</i> (MSTN) en el VI y VD de cerdos recién nacidos y de 20 días.....	83
CAPÍTULO 2	
Figura 19. Identificación de las variantes de <i>splicing</i> de <i>ankrd1</i> porcino.....	89
Figura 20. Caracterización de las variantes de <i>splicing</i> de <i>ankrd1</i> porcino generadas por retención de intrones.....	90
Figura 21. Resultados del análisis BLAST para los intrones 8, 7 y 6 del gen <i>ankrd1</i> porcino en la base de datos NCBI EST.....	91
Figura 22. Secuencias de aminoácidos de las isoformas de ANKRD1 porcino que retienen intrones.....	93
Figura 23. Estructura C-terminal de las isoformas ANKRD1 sin intrones y que retienen intrones.....	94
Figura 24. Expresión de las construcciones de <i>ankrd1</i> sin intrones y que retienen intrones en ensayos de expresión libres de células (IVTT).....	95
Figura 25. Expresión de las construcciones de <i>ankrd1</i> sin intrones y que retienen intrones en ensayos basados en células COS-7.....	96
Figura 26. Los ARNm de <i>ankrd1</i> que retienen intrones están presentes en el citoplasma de los cardiomiocitos de cerdos neonatales.....	98
Figura 27. Expresión izquierda predominante de los transcritos de <i>ankrd1</i> que retienen intrones en el corazón de cerdos recién nacidos.....	99
Figura 28. Las variantes de <i>ankrd1</i> que retienen intrones están co-upreguladas con el transcrito regular en el miocardio de cerdos neonatales con la ICD.....	100
Figura 29. La expresión forzada <i>in vivo</i> de <i>ankrd1</i> regular recombinante produce la up-regulación de los transcritos endógenos <i>ankrd1</i> que retienen intrones en el miocardio de cerdos neonatales transfectados.....	102
Figura 30. La expresión forzada <i>in vivo</i> de <i>ankrd1</i> regular recombinante resulta en el aumento de la proteína ANKRD1 endógena en el miocardio porcino transfectado.....	103
Figura 31. Los transcritos <i>ankrd1</i> con intrones se detectan en el corazón humano de neonatos y adultos.....	105
CAPÍTULO 3	
Figura 32. Identificación, caracterización y expresión de una nueva variante de BNP generada por el <i>skipping</i> del exón 2 (Δ E2-NPPB) en el corazón de cerdos recién nacidos.....	111
Figura 33. Secuencias de nucleótidos/aminoácidos de Δ E2-NPPB y dominios identificados en la estructura primaria de la proteína.....	112
Figura 34. Análisis de la expresión proteica de Δ E2-NPPB porcino en ensayos basados en <i>E. coli</i>	114

Figura 35. Análisis de la expresión proteica de $\Delta E2$ -NPPB porcino en ensayos basados en células COS-7.....	115
Figura 36. Niveles cardíacos del ARNm de $\Delta E2$ -NPPB en el desarrollo postnatal porcino.....	118
Figura 37. Niveles cardíacos del ARNm de $\Delta E2$ -NPPB en la ICD experimental.....	119
Figura 38. La proteína $\Delta E2$ -NPPB afecta la producción y secreción del precursor NPPB según lo revelado por los ensayos de co-transfección celular.....	121
Figura 39. Importancia de los péptidos sintéticos: FL- $\Delta E2$ -NPPB, PLP y KSW en la acumulación de la proteína NPPB en las células COS-7 transfectadas.....	122
Figura 40. Identificación y perfiles de expresión de las variantes de NPPB generadas por el <i>skipping</i> de exones en el miocardio humano.....	124

V. DISCUSIÓN

Figura 41. Representación esquemática simplificada de las fases y ramificaciones del presente trabajo.....	133
--	-----

ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Expresión génica diferencial en el VI/VD del corazón postnatal/adulto de mamíferos.....	32
--	----

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2. Animales, procedimientos experimentales y obtención de muestras.....	43
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el análisis <i>Western blot</i>	49
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en DDRT-PCR.....	53
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en RT-PCR, qPCR y 3'RACE.....	57
Tabla 6. Vectores de expresión proteica recombinante.....	63
Tabla 7. Cepas de <i>E.coli</i> utilizadas.....	67

IV. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Tabla 8. Análisis de los transcritos identificados por DDRT-PCR que se <i>up</i> -regulan en el VI/VD de cerdos neonatales.....	80
---	----

Abreviaturas

Abreviaturas

aa: aminoácido
ACTC1: actin, alpha, cardiac muscle 1
AD: aurícula derecha
ADAMTS3: ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 3
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ADNp: ADN plasmídico
AI: aurícula izquierda
AMP: ampicilina
ANKRD1: ankyrin repeat domain 1 protein
ANP: atrial natriuretic peptide
APOBC3F: apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like3F
ARN: ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATF-4: activating transcription factor 4
ATP: adenosine triphosphate
ATPase: adenosine triphosphatase
ATP5C1: ATP synthase, H⁺transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide1
Atp2a2: Ca²⁺-ATPase
α-actin: alpha-actin
α-actinin: alpha-actinin
α-MHC: alpha-myosin heavy chain
BLAST: basic local alignment search tool
BNP: brain natriuretic peptide
BSA: bovine serum albumin
β-MHC: beta-myosin heavy chain
CAM: cloranfenicol
CARP: cardiac ankyrin repeat protein
CBP: calmodulin binding peptide
CEP290: centrosomal protein 290 kDa
CMD: cardiomiopatía dilatada
CMV: citomegalovirus
Col1a2: procollagen, type I, α2
COS-7: CV-1 (simian) in Origin and carrying the SV40 genetic material-7
CTSH: cathepsin H
Cx40: connexin 40
DDRT-PCR: differential display RT-PCR

D: skipping
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNasa: desoxirribonucleasa
dNTPs: deoxyribonucleotide triphosphates
Dox: Doxorubicin
DTT: dithiothreitol
ECACC: European Collection of Cell Cultures
EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid
EEC: European Economic Community
EGTA: ethylene glycol tetraacetic acid
EST: expressed sequence tag
FCD: fallo cardíaco diastólico
FHF: first heart field
FITC: fluorescein isothiocyanate
Fn-1: fibronectin-1
GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gatm: glycine amidinotransferase (L-arginine)
HAND1: heart and neural crest derivatives expressed protein 1, también conocida como eHAND (extraembrionic tissues, heart, autonomic nervous system and neural crest derivatives expressed protein 1)
HAND2: heart and neural crest derivatives expressed protein 2, también conocida como dHAND (deciduum, heart, autonomic nervous system and neural crest derivatives expressed protein 2)
His: histidina
HPLC: high performance liquid chromatography
HRP: horseradish peroxidase
IC: insuficiencia cardíaca
ICC: insuficiencia cardíaca crónica
IgG: inmunoglobulina G
INHBA: inhibin, beta A
IPTG: isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside
Islet1: insulin gene enhancer protein ISL-1
IVTT: in vitro transcription/translation
JMJD1C: jumonji domain containing 1C
Kcnk3: K⁺channel, subfamily K, member 3
LAMP: lysosome-associated membrane proteins
LB: Luria Bertani
Lgals3: lectin, galactose binding, soluble 3
MAP3K7IP2: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2
MCK: muscle creatine kinase

MLC1A: myosin light chain 1 atrial isoform
MLC2A: myosin light chain 2 atrial isoform
MLC1V: myosin light chain 1 ventricular isoform
MLC2V: myosin light chain 2 ventricular isoform
MLC3F: myosin light chain 3F isoform
Mmp24: matrix metalloproteinase 24
MSTN: myostatin
Myocd: myocardin
NCBI: National Center for Biotechnology Information
ND6: mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6
NMD: nonsense-mediated mRNA decay
NPPA: natriuretic peptide precursor A
NPPB: natriuretic peptide precursor B
PAAG: polyacrylamide gel
PBS: phosphate buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PDE3A: phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited
PHB2: prohibitin 2
Ptgds: prostaglandin D2 synthase (21 kDa)
PTPLAD1: protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1
PVDF: polivinilidenofluoruro
qPCR: PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
3'-RACE PCR: rapid amplification of 3' cDNA end by PCR
RFU: unidades de fluorescencia relativas
RNasa: ribonucleasa
Rpl19: ribosomal protein L19
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
SBF: suero bovino fetal
SBL 2X: Sample Buffer Laemmli 2X
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SERPINB9: serpin peptidase inhibitor, clade B (ovoalbúmina), member 9
SHF: second heart field
SLC41A1: solute carrier family 41, member 1
SLC8A1: solute carrier family 8
SOC: super optimal broth with catabolite repression
SPTBN1: spectrin, beta, non-erythrocytic 1
SRF: serum response factor
TAE: Tris-acetate-EDTA
TBE: Tris-borate-EDTA

TBS: tris buffered saline

Tbx5: T-box transcription factor

TGF- β 1: transforming growth factor- β 1

T_m: temperatura melting

TNMD: tenomodulin

TNNT2: troponin T type 2

TPM2: tropomyosin 2

TTN: titin

TX-100: Triton X-100

U6: small nuclear RNA

Ubc: ubiquitin B

3'-UTR: three prime untranslated region

VD: ventrículo derecho

VI: ventrículo izquierdo

WB: Western blot

Wnt: Derivado de la combinación del nombre del gen "wingless", identificado en *Drosophila*, y de su homólogo "int-1", identificado en ratones

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

I. Introducción

I. Introducción

1. Preámbulo al análisis de la regionalización izquierda/derecha del miocardio ventricular a nivel molecular

El corazón es una bomba contráctil regulada por estímulos biomecánicos y neurohumorales y encargada de mantener un flujo sanguíneo según las demandas del organismo. Los cardiomiocitos y sus sarcómeros son las unidades básicas responsables del proceso de contracción miocárdica. Dado que los cardiomiocitos no proliferan después del nacimiento, estas células experimentan hipertrofia, aumentando la capacidad del corazón para responder adecuadamente a distintos tipos de estrés.

Esta recopilación bibliográfica tiene como pretensión principal demostrar que la respuesta molecular diferencial (izquierda/derecha) del miocardio ventricular depende no sólo del tipo de estrés biomecánico (sobrecarga de presión o de volumen) sino también podría estar condicionada por propiedades intrínsecas de cada ventrículo. La presentación y discusión de los datos bibliográficos se dividen en tres apartados principales, con cierta redundancia entre sí: la caracterización estructural de distintos tipos de remodelado hipertrófico del miocardio ventricular en condiciones fisiológicas y patológicas, las manifestaciones moleculares del eje izquierdo-derecho del miocardio ventricular primordial en el desarrollo embrionario temprano, y la regionalización izquierda/derecha de la expresión génica en el miocardio ventricular fetal, neonatal y adulto.

La mayor parte de esta revisión se enfoca en los distintos patrones de expresión entre dos cámaras ventriculares que se observan en distintas situaciones fisiológicas a lo largo del desarrollo embrionario/fetal y durante la maduración funcional postnatal del corazón de mamíferos. Sin embargo, ciertos aspectos de la expresión génica cardíaca se discuten, donde es posible, en relación con aspectos básicos de la formación estructural y funcionamiento de las cámaras ventriculares izquierda/derecha en distintas situaciones fisiopatológicas.

2. La remodelación hipertrófica del miocardio ventricular postnatal es inicialmente una respuesta adaptativa del corazón ante diferentes tipos de carga hemodinámica

El corazón de mamíferos, incluyendo humanos, está dividido en cuatro cavidades (cámaras), las dos superiores o aurículas, y las dos inferiores o ventrículos. Las cámaras derechas e izquierdas están separadas por un tabique (*septum*) aurículo-ventricular, y las aurículas y ventrículos se comunican a través de válvulas aurículo-ventriculares, las denominadas tricúspide, en el lado derecho, y bicúspide (mitral), en el lado izquierdo. Cada ventrículo recibe sangre de la

aurícula del mismo lado del corazón. Los ventrículos son las cámaras del corazón cuya función es suministrar la sangre para la circulación sistémica, en el caso del ventrículo izquierdo (VI), y para la circulación pulmonar, en el caso del ventrículo derecho (VD). Cada una de las cámaras ventriculares está especializada para responder diferencialmente a las condiciones hemodinámicas tanto durante el desarrollo fetal como en la vida adulta. Consecuentemente, en el corazón adulto el VI y VD está compuesto por poblaciones celulares con características específicas estructurales, moleculares, contráctiles, metabólicas, electro-fisiológicas y funcionales (Katz, 2001; Walker, Buttrick, 2009). También, existen evidencias experimentales de que, en el corazón adulto, la respuesta del VI y VD al estrés similar y el remodelado ventricular podría ser diferente (Zungu *et al.*, 2008).

El corazón es el primer órgano en funcionar en el embrión y empieza a latir cuando todavía tiene forma tubular (el día 21-23 de embarazo en humanos o el día 9 postcoital en ratones) lo que indica que las células precursoras miocárdicas ya contienen miofibrillas contráctiles. Sin embargo, la diferenciación terminal y maduración funcional de los cardiomiocitos se prolonga al período postnatal hasta la adolescencia. Estos procesos se reflejan en los cambios característicos de la forma de los cardiomiocitos. Los cardiomiocitos embrionarios son células poligonales con pocas miofibrillas y con contactos "célula-célula" a lo largo de todo su perímetro. La elongación de los cardiomiocitos y el alineamiento progresivo de sus miofibrillas ocurren durante el período fetal tardío o incluso durante el período neonatal temprano. A medida que el desarrollo postnatal avanza, los cardiomiocitos empiezan a hipertrofiarse cambiando su forma en dependencia del tipo de carga hemodinámica (de presión o de volumen).

El proceso hipertrófico se caracteriza por cambios en la expresión génica, estructura celular e intersticial que producen las alteraciones características en la geometría y función de los ventrículos, colectivamente llamados remodelación o remodelado ventricular. Generalmente, y desde un punto de vista clínico, se aplica el término remodelado a las modificaciones estructurales de los ventrículos bajo condiciones patológicas. En el presente trabajo, y desde el punto de vista de la biología del desarrollo, utilizamos este término tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Teniendo en cuenta una perspectiva simplista, se pueden distinguir dos tipos principales de hipertrofia del miocardio ventricular postnatal: la concéntrica y la excéntrica. En el VI postnatal, una sobrecarga fisiológica de presión provoca, dentro de los cardiomiocitos, un aumento en el número de sarcómeros "en paralelo", aumentando el grosor transversal celular, y proporcionalmente, el grosor de la pared del VI sin incremento asociado del diámetro de su cavidad (es decir, el remodelado hipertrófico concéntrico). Por el contrario, en el VD postnatal una sobrecarga fisiológica de volumen resulta en un aumento

longitudinal ("en serie") de los sarcómeros de los miocitos, provocando un crecimiento alargado de la pared del VD (es decir, el remodelado hipertrófico excéntrico) (revisado en: Carreño *et al.*, 2006; Heineke, Molkenkin, 2006; Muhl *et al.*, 2008).

Generalmente visto, la respuesta hipertrófica es un importante mecanismo adaptativo que resulta en un mayor número de elementos contráctiles del cardiomiocito, menor estrés de la pared ventricular (aumento del grosor de la pared en la hipertrofia concéntrica), y mayor proporción volumen-latido (incremento del volumen diastólico en la hipertrofia excéntrica). Por eso, la hipertrofia constituye uno de los mecanismos compensatorios fisiológicos que permiten al miocardio ventricular sobrellevar la carga hemodinámica no solo a lo largo del proceso de maduración cardíaca postnatal sino también durante la vida adulta. Así, por ejemplo, la hipertrofia fisiológica secundaria al aumento de la carga de presión (ejercicio físico o embarazo) resulta en el remodelado concéntrico del VI (Fig. 1). Es interesante destacar que algunos tipos de ejercicio físico, que provocan un aumento en la carga de volumen, resultan en el desarrollo del remodelado excéntrico del VI (Muhl *et al.*, 2008). Es decir, tanto el remodelado hipertrófico concéntrico como excéntrico representa uno de los principales mecanismos por los que los ventrículos compensan la sobrecarga de trabajo con preservación de sus funciones sistólica y diastólica.

La respuesta hipertrófica del miocardio (tanto concéntrica como excéntrica) puede ser desencadenada no solo por factores fisiológicos asociados con el crecimiento postnatal normal, actividad física o embarazo sino también por mecanismos patológicos de sobrecarga de presión y/o volumen secundarios a la hipertensión arterial, cardiomiopatías y/o infarto de miocardio. Una sobrecarga anormalmente alta o crónica resultaría, a pesar del desarrollo inicial de la hipertrofia ventricular compensatoria, en un progresivo remodelado patológico y una disfunción contráctil del miocardio produciéndose la insuficiencia cardíaca (Fig. 1). En caso del estrés patogénico sistólico (derivado de un sobre-aumento de la presión sistémica), el desarrollo de la hipertrofia concéntrica se acompaña no solo por el consiguiente aumento del grosor de los cardiomiocitos sino también por un incremento desproporcionado de los fibroblastos y de la matriz intersticial en el miocardio, lo que es un dato distintivo de la hipertrofia concéntrica patológica. Este tipo de hipertrofia es el que se observa, con frecuencia, en pacientes con estenosis aórtica o con hipertensión arterial. En el caso de la hipertrofia excéntrica, como consecuencia de una sobrecarga patogénica de volumen, el aumento de la tensión de la pared ventricular en diástole resultaría en un alargamiento de los cardiomiocitos con un aumento de la cavidad de la cámara ventricular. Este tipo de hipertrofia se observa fundamentalmente en fases avanzadas de la cardiomiopatía dilatada y en las insuficiencias valvulares

cardíacas.

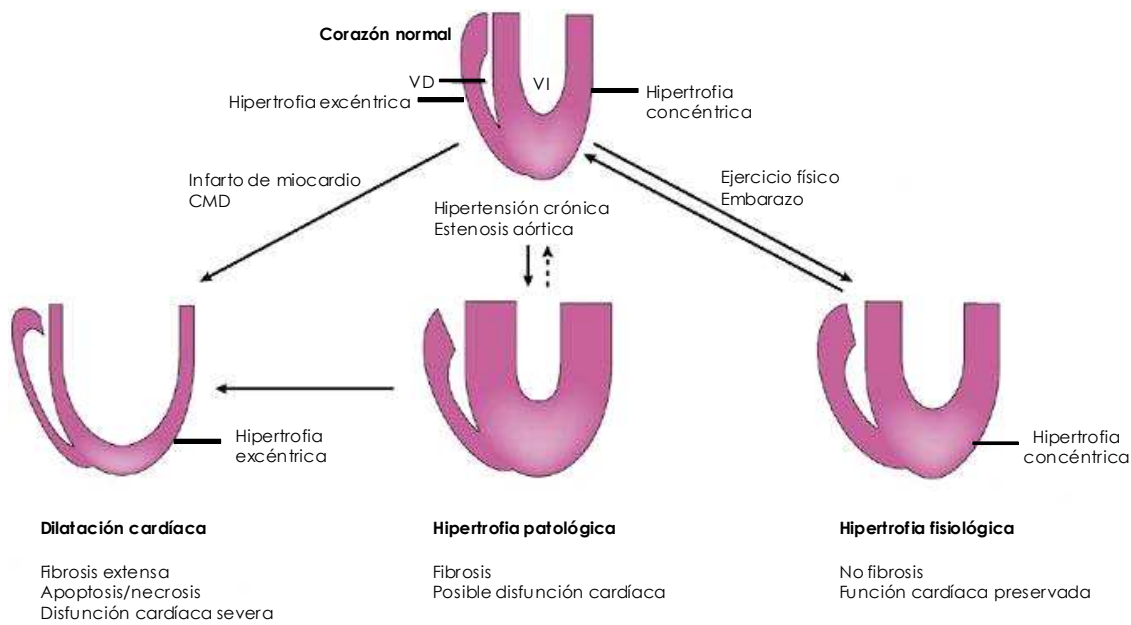


Figura 1. Tipos de hipertrofia ventricular fisiológica y patológica (Heineke, Molkenin, 2006; modificado). Las definiciones “hipertrofia concéntrica/excéntrica” son meramente descriptivas y se basan en diferencias en los perfiles morfológicos de los ventrículos: la hipertrofia concéntrica se caracteriza por un aumento del espesor de la pared y de la masa miocárdica sin modificaciones del volumen de la cámara ventricular, mientras que la hipertrofia excéntrica resulta en el aumento de la masa miocárdica con un incremento del volumen de la cámara ventricular. Tanto la sobrecarga de presión como la de volumen producen alteraciones en la geometría y el grosor de ambos ventrículos. Así, cuando la causa inicial de la hipertrofia es una sobrecarga de presión, la tensión sistólica de la pared del ventrículo aumenta bruscamente, lo que provoca la hipertrofia concéntrica de los cardiomiocitos. Cuando la causa primaria de la hipertrofia es una sobrecarga de volumen, aumenta la tensión diastólica del ventrículo, lo que provoca alargamiento de los cardiomiocitos y dilatación ventricular. Desde el punto de vista clínico, se distinguen dos tipos de remodelado concéntrico/excéntrico: (1) normal fisiológico (crecimiento y maduración del corazón durante el período postnatal, ejercicio físico o embarazo) y (2) patológico. Las flechas continuas indican asociaciones entre los estadios del remodelado; las flechas discontinuas indican una posible reversión del proceso. CMD – cardiomiopatía dilatada; VI – ventrículo izquierdo; VD – ventrículo derecho.

Concluyendo, el remodelado hipertrófico no solo es crítico para el desarrollo y la función del corazón postnatal sino que está implicado en la patogénesis de varias condiciones patológicas del sistema cardiovascular. En este sentido, es interesante resaltar que el desarrollo de la hipertrofia ventricular adaptativa o mal adaptativa podría representar una respuesta generalizada del miocardio ventricular a distintos estímulos biomecánicos, y que la hipertrofia *per se* no provoca el desarrollo del fenotipo patológico (Perrino *et al.*, 2006). De hecho, el análisis transcripcional comparativo de la hipertrofia concéntrica provocada por el

ejercicio físico (hipertrofia adaptativa) *versus* la hipertrofia concéntrica provocada por la estenosis aórtica (hipertrofia mal adaptativa) ha revelado un número de genes cuya expresión se altera de un modo similar en ambas situaciones experimentales. Los genes con patrones similares de la expresión en ambos modelos de la hipertrofia concéntrica son los de las rutas de la traducción de señales, contracción miocárdica y remodelación del citoesqueleto de miocitos (Sheehy *et al.*, 2009).

Las rutas moleculares mediante las cuales el miocardio ventricular interpreta diferentes tipos de sobrecarga (de presión o de volumen) para desarrollar respectivamente fenotipos distintos y divergentes del remodelado hipertrófico (concéntrico o excéntrico) siguen siendo poco caracterizadas (Lemmens *et al.*, 2007). Dado que en el período postnatal el VI está preferentemente expuesto a la carga de presión sistémica mientras que el VD a la carga de volumen, el estudio de la expresión génica comparativa entre los dos ventrículos, en distintas fases del desarrollo postnatal, podría servir, en nuestra opinión, para caracterizar las diferentes configuraciones moleculares del remodelado hipertrófico del miocardio ventricular. Esta sugerencia se refuerza por las evidencias recientes de que en mamíferos la determinación y especificación molecular del eje izquierdo-derecho del miocardio ventricular se establece antes del nacimiento, en los estadios tempranos del desarrollo embrionario.

3. La especificación molecular del eje izquierdo/derecho en el miocardio ventricular es un evento temprano en el desarrollo embrionario

Los resultados de numerosos estudios de biología del desarrollo de la última década indican que distintas poblaciones de células precursoras contribuyen a la formación y especialización del VI *versus* VD, estos procesos están acompañados por distintos patrones de expresión génica (revisado en: Moorman, Christoffels, 2003; De Castro *et al.*, 2003; Olson, 2004; Buckingham *et al.*, 2006; Dunwoodie, 2007; Pérez-Pomares *et al.*, 2009; Muñoz-Chápuli, Pérez-Pomares, 2010).

Esta recopilación bibliográfica recoge los datos de patrones de expresión de genes en el miocardio embrionario de mamíferos (los aspectos comparativos del tema se detallan en: Franco *et al.*, 2002; Christoffels *et al.*, 2004; Pérez-Pomares *et al.*, 2009). Dado que, dentro de los mamíferos, los mecanismos celulares y moleculares del desarrollo del corazón se han precisado con el uso de ratones, comentamos brevemente las fases principales de la morfogénesis cardíaca haciendo referencia a este animal modelo (Fig. 2). En las primeras fases del desarrollo embrionario, dos regiones simétricas del mesodermo demuestran una predeterminación pro-miocárdica, expresando una serie de factores de transcripción relevantes a la programación de la diferenciación miocárdica. En el

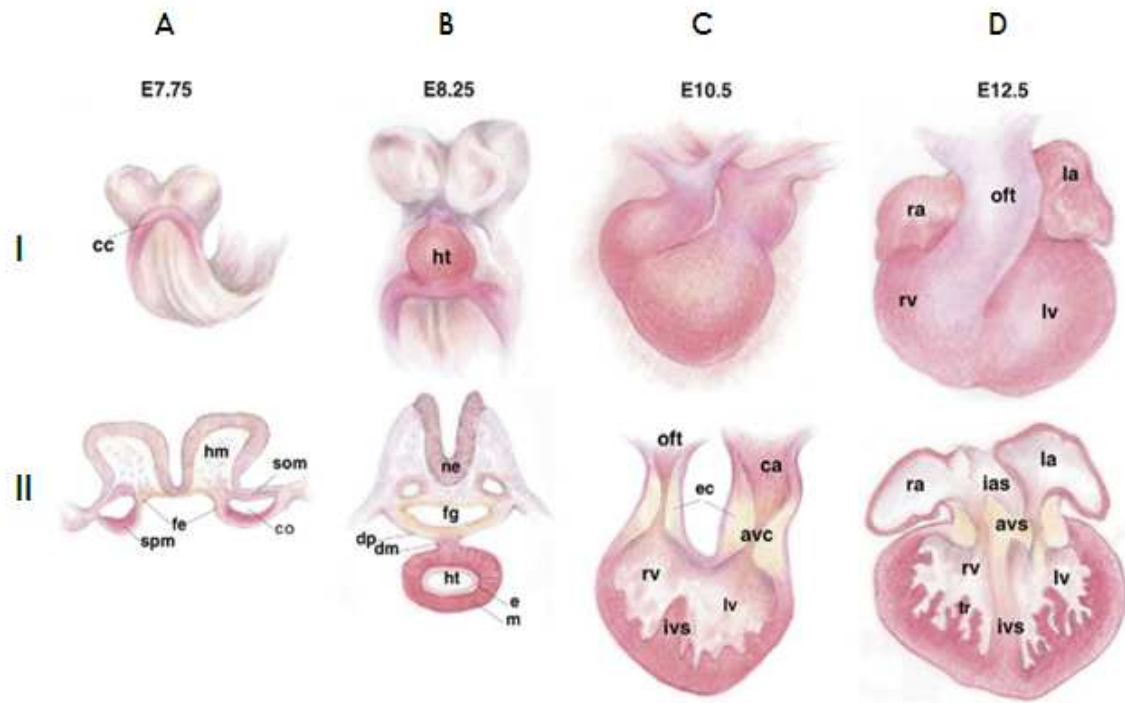


Figura 2. Desarrollo cardíaco temprano de mamíferos (citado por: Dunwoodie, 2007; modificado). I - primordio cardíaco, II – sección del primordio. **avc-** canal auriculoventricular; **avs-** tabique auriculoventricular; **ca-** aurícula común; **cc-** cresta cardíaca; **co-** celoma; **dm-** mesocardio dorsal; **dp-** pericardio dorsal; **e-** endocardio; **fe-** endodermo del intestino anterior; **fg-** intestino anterior; **hm-** mesodermo de la cabeza; **ht-** tubo cardíaco; **ias-** tabique interauricular; **ivs-** tabique interventricular; **la-** aurícula izquierda; **lv-** ventrículo izquierdo; **m-** miocardio; **ne-** epitelio neural; **oft-** tracto de salida; **ra-** aurícula derecha; **rv-** ventrículo derecho; **som-** mesodermo somático; **spm-** mesodermo esplácnico; **tr-** trabéculas.

estadio E7.75 del desarrollo, estas dos regiones pro-miocárdicas se fusionan en la línea media del embrión y dan lugar a la cresta cardíaca. Más tarde (estadio E8.25), las células de la cresta cardíaca forman el tubo cardíaco lineal (Fig. 2B) que se separa del mesodermo dorsal, se prolonga dentro de la cavidad pericardial y sufre un movimiento en espiral hacia la derecha formando el asa cardíaca (Fig. 2C). Luego el asa cardíaca se inflexiona y comienza a tabicarse para formar las cavidades del corazón (Fig. 2D). Es a partir de estos estadios cuando las regiones ventriculares y auriculares empiezan a vislumbrarse a nivel morfológico estructural.

En mamíferos, se reconocen actualmente al menos dos zonas primordiales que contribuyen al desarrollo del corazón: el primer campo cardíaco o FHF (*first heart field*) y el segundo campo cardíaco o SHF (*second heart field*). Los cardiomiocitos, que forman el miocardio ventricular izquierdo y derecho, derivan, en su mayoría, de las células precursoras de distintos campos cardíacos primarios. En ratones, y de un modo general, está aceptado que las células del FHF contribuyen principalmente al futuro VI mientras que los precursores del SHF contribuyen mayormente al VD (revisado en: Dunwoodie, 2007). Aunque esta

generalización es relativamente reciente, existen ya ciertas contradicciones sobre el grado de la contribución del FHF y SHF a la población celular del VI y del VD, respectivamente (véase la discusión detallada en: Buckingham *et al.*, 2005; Muñoz-Chápuli, Pérez-Pomares, 2010). Sin embargo, la identificación y el análisis de la expresión de los factores de transcripción relacionados con la diferenciación de las células progenitoras del FHF y SHF, en combinación con los modelos *knock-out* en los que se deleciona un gen correspondiente, sugieren que la mayoría de las células que participan en la formación del VI y el VD provienen del FHF y SHF, respectivamente.

En ratones, el factor de transcripción *Tbx5* se expresa específicamente en el FHF y la pérdida del gen *Tbx5* resulta en una severa hipoplasia del VI mientras que el desarrollo del VD no se afecta (Bruneau *et al.*, 2001). El gen *Islet1* se expresa en el SHF. El análisis del linaje celular ha revelado que los progenitores del SHF, que expresan *Islet*, contribuyen con la mayoría de los miocitos del VD y solo con unas células del VI (Cai *et al.*, 2003). En la misma dirección, la inactivación del gen *Isl1* en ratones afecta severamente a la formación del VD resultando en el desarrollo de un solo ventrículo que manifiesta la expresión génica característica para el VI (Moretti *et al.*, 2007).

Los factores de transcripción de la familia *basic helix-loop-helix*, *HAND1/eHAND* y *HAND2/dHAND*, también se expresan muy temprano en el corazón embrionario. En ratones, el gen *Hand1/eHand* se expresa en los progenitores del FHF de la cresta cardíaca (estadio E7.75; Cserjesi *et al.*, 1995). El análisis quimérico supone que el gen *Hand1/eHand* determina el desarrollo del VI (Riley *et al.*, 2000). De todos modos, la eliminación del gen *Hand1/eHand* resulta en una hipoplasia severa del VI (McFadden *et al.*, 2005). Por el contrario, el gen *Hand2/dHand* se expresa en los progenitores del SHF de la cresta y del tubo cardíacos (estadios E8 – E9), con una prevalencia de su expresión en el futuro VD. La pérdida del gen *Hand2/dHand* resulta en una hipoplasia severa del VD, y en el ventrículo singular de estos embriones se expresa el gen *Hand1/eHand* (Srivastava *et al.*, 1997).

Evidentemente, más genes de los que han sido mencionados anteriormente se encuentran involucrados en las redes moleculares combinatorias que determinan la especificación diferencial inicial de las cámaras ventriculares (véase Franco *et al.*, 2002; Christoffels *et al.*, 2004; Dunwoodie, 2007). Sin embargo, esperamos que esta breve revisión sea suficiente para resaltar un punto importante: las primeras diferencias de la expresión génica entre el futuro miocardio sistémico (VI) y pulmonar (VD) en el desarrollo cardíaco muy temprano, ilustradas, respectivamente, por los genes *Tbx5* y *Hand1* (VI) e *Islet1* y *Hand2* (VD).

Hay que subrayar que no solo los reguladores transcripcionales (como, por

ejemplo, los HANDs) sino también algunos marcadores miocardio-asociados se expresan diferencialmente en el ventrículo primordial común (véase Fig. 2) de embriones tempranos. Así, en ratones, la expresión del gen de *atrial natriuretic peptide* (ANP; una hormona cardíaca) se detecta, por primera vez, en la parte ventral del asa cardíaca de la cual se forma, más tarde, el miocardio trabecular del futuro VI (Christoffels *et al.*, 2000). En ratas, el gen de *connexin 40* (Cx40) demuestra una clara regionalización asimétrica temporal de su expresión embrionaria, con una abundancia del transcrito y de la proteína en el futuro VI (estadios E10.5 – E11.5; Delorme *et al.*, 1997). De un modo similar, en embriones tempranos de ratones (estadio E9) una proteína de la matriz extracelular, *flectin* (miembro de la clase II de las miosinas no musculares), se expresa predominantemente en la parte exterior izquierda del ventrículo común (Tsuda *et al.*, 1998).

Así pues, antes de que las cámaras ventriculares empiecen a vislumbrarse a nivel estructural, los primordios ventriculares izquierdo/derecho, constituidos por células progenitoras de distintos campos cardíacos, demuestran patrones asimétricos de la expresión génica. A continuación se exponen las evidencias experimentales de una regionalización izquierda-derecha de la expresión génica en las cámaras ventriculares en los estadios más avanzados del desarrollo embrionario/fetal y durante el período postnatal/adulto.

4. La regionalización izquierda/derecha de la expresión génica en el miocardio ventricular fetal, neonatal y adulto

Nuestro análisis de los datos relevantes a las diferencias izquierda-derecha en la expresión génica en el miocardio ventricular se expone teniendo en cuenta los periodos principales (fetal, neonatal, postnatal) de la formación/maduración de los ventrículos que, en su lugar, están condicionados por los distintos tipos de circulación. Consecuentemente, no se precisa la dinámica temporal individual de la expresión de un gen concreto a lo largo del desarrollo/maduración del corazón.

4.1. Desarrollo fetal

En este apartado se detallan los datos sobre las diferencias transcripcionales del eje izquierdo/derecho en el miocardio ventricular fetal durante y después de la formación del tabique (*septum*) interventricular que divide la cavidad ventricular común en dos cámaras (izquierda y derecha). La formación del tabique se acompaña por el desarrollo del miocardio trabecular en ambos ventrículos y por el establecimiento de la circulación fetal. En la circulación fetal, la función propulsora del VD es mayor en comparación con el VI, sin embargo, los dos ventrículos son de tamaño y espesor de la pared casi iguales.

Uno de los ejemplos más llamativos de la expresión génica asimétrica en el miocardio ventricular es el del gen de ANP cuya expresión en fetos tempranos de ratones (estadio E11.5 y E14) es más alta en el VI en comparación con el VD (Zeller *et al.*, 1987; Houweling *et al.*, 2005). El mismo patrón de expresión se detecta también en neonatos de un día después del nacimiento, a pesar de la disminución de la expresión del gen en ambos ventrículos (Zeller *et al.*, 1987).

La expresión asimétrica izquierda-derecha de los genes de miosinas sarcoméricas (*alpha-myosin heavy chain* – α -MHC; *myosin light chain 1A* – MLC1A; *myosin light chain 2A* – MLC2A) se caracteriza por otra dinámica temporal durante el desarrollo embrionario/fetal (Zammit *et al.*, 2000). En el corazón embrionario en el estadio E10.5 (véase Fig. 2), la expresión de estos genes (restringida al futuro miocardio ventricular) es similar en ambos primordios ventriculares. Más tarde (estadio E12.5), sin embargo, se detecta una clara asimetría en la distribución de los transcritos correspondientes con una abundancia significativa en el VD en comparación con el VI. Se observan patrones similares de expresión asimétrica (VD versus VI) de estos genes en los estadios más tardíos del desarrollo fetal (estadios E14.5 - E16.5) pero no en neonatos, en los cuales la expresión de estos genes es similar en ambos ventrículos. El análisis de la expresión de los genes que codifican otros tipos de proteínas sarcoméricas (tales como α -MHC, MLC1V, MLC2V, α -actin) no ha revelado diferencias significativas entre el VI y VD durante el desarrollo fetal. Por el contrario, se ha detectado una expresión predominante del gen *Hand1/eHand* y del gen *Hand2/dHand* en el VI y el VD, respectivamente (Zammit *et al.*, 2000).

Entre otros ejemplos del eje derecho-izquierdo fetal se destaca el gen de *muscle creatine kinase* (MCK) que demuestra un patrón transitorio de la expresión asimétrica “izquierda/derecha” (predominante en el VI) durante los estadios tempranos; en fases más avanzadas del desarrollo fetal el gen se expresa de un modo uniforme en todas las cámaras cardíacas (Lyons, 1991). Con una dinámica temporal parecida, el gen de *myosin light chain 3F* (MLC3F) se expresa exclusivamente en el VI en fetos de ratones, sin embargo este patrón asimétrico de su expresión no se detecta en el corazón postnatal (Kelly *et al.*, 1995).

En mamíferos, el crecimiento del corazón fetal aumenta significativamente durante el último tercio de la gestación. A lo largo de este período, y paralelamente al aumento de la masa celular, en ambos ventrículos se aumenta el número de cardiomiocitos bi- y multi-nucleares incapaces de replicarse (Huttenbach *et al.*, 2001; Burrell *et al.*, 2003; Jonker *et al.*, 2007). Al término de esta fase tardía de gestación, el número de cardiomiocitos finalmente diferenciados es más alto en el VD en comparación con el VI. Sin embargo, y como es posible deducir de los

resultados publicados (Reini *et al.*, 2009), en fetos tardíos y neonatos de oveja la expresión de los genes de la familia de *insulin-like growth factors*, que estimulan la proliferación de los cardiomiocitos, es similar en ambos ventrículos.

De forma resumida, los datos permiten concluir que en mamíferos: (1) la formación de las cámaras ventriculares fetales se asocia con una expresión génica diferencial y predominante en uno u otro ventrículo, (2) en la mayoría de los casos, esta expresión asimétrica se manifiesta en estadios tempranos del desarrollo fetal, (3) a medida que el desarrollo fetal avanza, las diferencias transcripcionales entre el VI y VD se nivelan y (4) algunos de los genes reguladores del eje izquierdo-derecho (en concreto, *Hand1/eHand* y *Hand2/dHand*) retienen sus patrones de expresión asimétrica en el miocardio ventricular a lo largo del período fetal.

4.2. Desarrollo neonatal

Después del nacimiento, la presión sistólica en el VI y la resistencia vascular sistémica aumentan drásticamente mientras que la presión sistólica en el VD y la resistencia pulmonar disminuyen (Guyton, Hall, 2006). Tanto la sobrecarga de presión del VI como la sobrecarga de volumen del VD induce el crecimiento de ambos ventrículos que se realiza mediante la hipertrofia celular (neonatos de cerdos y ratones) o después de la multiplicación celular final seguida por la hipertrofia de los cardiomiocitos (neonatos de ratas; véase Morgan, Beinlich, 1997). Sin embargo, el patrón de crecimiento hipertrófico durante el período neonatal temprano es distinto en el VI en comparación con el VD. Así, por ejemplo, en cerdos neonatales el VI aumenta rápido el grosor de su pared libre mientras que el grosor del VD disminuye (Fig. 3; Torrado *et al.*, 2004).

En la bibliografía actual encontramos solo trabajos singulares dedicados al estudio comparativo de la expresión génica entre el VI y el VD en mamíferos durante el período neonatal temprano. En cerdos recién nacidos, el gen de *ankyrin repeat domain 1 protein* (ANKRD1/CARP; un marcador de la hipertrofia ventricular y del daño cardíaco; véase Mikhailov, Torrado, 2008) se expresa a niveles de 10-15 veces más altos en el VI en comparación con el VD mientras que la expresión de los genes involucrados en la especificación ventricular molecular izquierda/derecha (*Hand1/eHand*, *Hand2/dHand*) es similar en ambos ventrículos. Del mismo modo, no se han detectado diferencias izquierda/derecha en los niveles de las proteínas sarcoméricas (α -MHC, α -actin, α -actinin, MLC1V, MLC2V, troponin, desmin) en los ventrículos de estos animales (Torrado *et al.*, 2004).

La expresión asimétrica de ANKRD1 en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos no es el único ejemplo de las diferencias moleculares/bioquímicas entre el VI y VD: la actividad de los enzimas, *creatine kinase* e *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, es más alta en el VI que en el VD de estos neonatos (Quaglieta

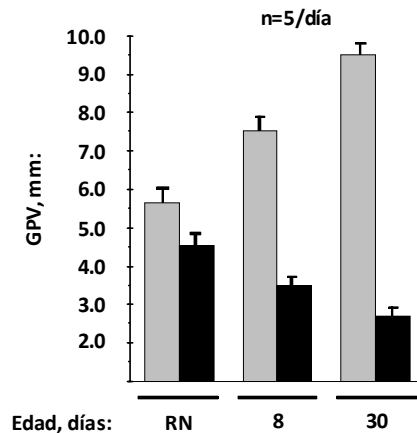


Figura 3. Dinámica del grosor de la pared libre del ventrículo izquierdo y del ventrículo derecho en cerdos neonatales (Torrado *et al.*, 2004; modificado). GPV – grosor de la pared del ventrículo; RN – recién nacidos; ventrículo izquierdo – gris; ventrículo derecho – negro.

et al., 2008).

En cerdos, la prevalencia de la expresión de *ankrd1* en el VI frente al VD se observa a lo largo del período neonatal (Torrado *et al.*, 2004, 2005, 2006). En ratones de un día de la vida postnatal, la expresión del gen de ANP es predominante en el VI (Zeller *et al.*, 1987). Durante el desarrollo neonatal, la expresión del gen de ANP disminuye en ambos ventrículos y en ratones neonatales de 12 semanas de vida las diferencias en la expresión del gen en el VI frente al VD no se detectan (Vikstrom *et al.*, 1998).

Como se deduce de los datos discutidos anteriormente, el remodelado hipertrófico del miocardio ventricular durante el desarrollo neonatal temprano se asocia con una prevalencia de la expresión de algunos marcadores de la hipertrofia ventricular (ANKRD1, ANP) en el miocardio sistémico (VI) frente al pulmonar (VD). Por otra parte, no se debe olvidar una cierta deficiencia de la información sobre el tema que se pone de manifiesto y la necesidad del análisis de las diferencias transcripcionales entre el VI y el VD de neonatos a gran escala.

4.3. Desarrollo postnatal/estado adulto

La comparación directa de los perfiles de expresión génica en el VI versus VD de ratones postnatales (8 semanas de edad), mediante la técnica de *microarray* (*microarrays* de 25000 genes/ESTs de ratones), ha revelado diferencias en los niveles de expresión de genes pertenecientes a diversas familias. La mayor parte de estos genes se expresa a niveles más altos en el VD frente al VI (Tabibiazar *et al.*, 2003). Hay que subrayar que solo un pequeño grupo de estos demostraron diferencias en cuanto a la expresión de 2-3 veces entre ambos ventrículos (Tabla 1). En ratones adultos, los músculos papilares del VD contienen

mayoritariamente la isoforma α -MHC y minoritariamente la isoforma β -MHC en comparación con los músculos papilares del VI (Brooks *et al.*, 1987).

El estudio transcripcional a gran escala del corazón de ratas adultas (*microarrays* de 13834 de los ADNc de roedores) reveló que el 92.5% de los genes se expresa de un modo similar en ambos ventrículos. Dentro del grupo restante, la expresión del 5.8% de los genes es predominante en el VD, mientras que el 1.7% de los genes se caracteriza por una expresión relativamente elevada en el VI (Chugh *et al.*, 2003). Los genes con diferencias significativas en sus niveles de expresión entre los dos ventrículos de ratas adultas se indican en la Tabla 1. Adicionalmente, en ratas de 6 semanas de la vida postnatal la expresión del gen codificante de la subunidad II de *cytochrome c oxidase* es más elevada en el VI en comparación con el VD (Zungu *et al.*, 2008).

La comparación de los datos presentados en la Tabla 1 supone que las diferencias transcripcionales izquierda/derecha detectadas en el miocardio ventricular postnatal podrían ser especie-específicas, incluso dentro de los roedores. Otros resultados están en la línea de esta sugerencia. Así, en ratones adultos los niveles de expresión del gen ANP son similares en ambos ventrículos (Vikstrom *et al.*, 1998). Sin embargo, en ratas, el transcripto del gen ANP es, aproximadamente, 5 veces más abundante en el VI en comparación con el VD (Boluyt *et al.*, 1994).

Tabla 1. Expresión génica diferencial en el VI/VD del corazón postnatal/adulto de mamíferos

Corazón de	Gen codificante de	Símbolo	Método de detección	Prevalencia en VI/VD (veces)	Referencia
Ratón*	<i>Ubiquitin B</i>	Ubc	Microarray	VI (1,98)	Tabibiazar <i>et al.</i> , 2003*
	<i>Prostaglandin D2 synthase (21 kDa)</i>	Ptgds	Microarray	VI (2.1)	
	<i>Lectin, galactose binding, soluble 3</i>	Lgals3	Microarray	VD (3.9)	
	<i>Fibronectin-1</i>	Fn-1	Microarray	VD (2.86)	
	<i>Glycine amidinotransferase (L-arginine)</i>	Gatm	Microarray	VD (3.0)	
Rata	Ca^{2+} -ATPase	Atp2 α 2	Microarray	VD (7.12)	Chugh <i>et al.</i> , 2003*
	<i>Matrix metalloproteinase 24</i>	Mmp24	Microarray	VD (12.66)	
	<i>Procollagen, type I, α2</i>	Col1 α 2	Microarray	VD (2.54)	
	<i>K⁺ channel, subfamily K, member 3</i>	Kcnk3	Microarray	VD (6.5)	
Rata	<i>Atrial natriuretic peptide</i>	Nppa	Northern blot	VI (\approx 5)	Boluyt <i>et al.</i> , 1994
	<i>Transforming growth factor-β1</i>	TGF- β 1	Northern blot	VI (\approx 4)	
	<i>Fibronectin-1</i>	Fn-1	Northern blot	VI (3-5)	

* Se presentan los genes con diferencias en cuanto a la expresión de dos o más veces entre el VI/VD. VI- ventrículo izquierdo; VD- ventrículo derecho.

En su conjunto, y de un modo general, los resultados presentados en este apartado sugieren que en el miocardio ventricular postnatal: (1) un número reducido de genes manifiesta diferencias transcripcionales izquierda/derecha y que (2) estas diferencias son cuantitativas y representan, en primer lugar, las modulaciones en la expresión de los factores de proliferación/diferenciación celular (*transforming growth factor- α*), proteínas de matriz extracelular (fibronectinas, colágenos), modificadores post-transcripcionales (*ubiquitin*), proteínas de canales iónicos, y de algunas enzimas (metaloproteinasas).

5. Hipótesis y diseño experimental de investigación

Nuestro análisis de los antecedentes del tema demuestra que en mamíferos desde la etapa de iniciación del desarrollo cardíaco hasta la formación del corazón adulto existen diferencias en cuanto a la expresión génica entre las dos cámaras ventriculares (VI/VD). En este contexto, se destacan dos observaciones clave para la planificación de este trabajo. La primera es que a medida que el desarrollo fetal avanza, las diferencias transcripcionales entre los dos ventrículos, con un tamaño y espesor similares, se nivelan. La segunda es que en animales recién nacidos sí que se detectan las diferencias en la expresión de los marcadores de la hipertrofia ventricular (*ANKRD1*, *ANP*) entre los ventrículos antes de que las diferencias de su remodelado hipertrófico se pongan de manifiesto a nivel celular/estructural. En un principio, esta respuesta molecular diferencial del VI versus VD de recién nacidos a diferentes tipos de sobrecarga hemodinámica supone una cierta dicotomía izquierda/derecha en la configuración molecular inicial del miocardio ventricular previo al remodelado hipertrófico neonatal.

Esta posibilidad ha sido el punto de partida que llevó a la hipótesis de que el estudio transcripcional comparativo de la expresión génica en el VI en comparación con el VD en mamíferos recién nacidos podría identificar los genes/factores que están específicamente asociados (o intervienen directamente) con el desarrollo de distintos patrones del remodelado hipertrófico durante el período postnatal. Si nuestra hipótesis es correcta, estos factores podrían también ser utilizados como indicadores moleculares del tipo y grado del remodelado hipertrófico tanto en la salud como en la enfermedad cardíaca. En este último contexto, los modelos de la insuficiencia cardíaca (IC) en mamíferos superiores juegan un papel primordial en la investigación cardiovascular traslacional (Dixon *et al.*, 2009). Hemos desarrollado un nuevo modelo de la IC mediante la administración del antibiótico anti-tumoral cardiotóxico, *Doxorubicin* (Dox), a cerdos neonatales (Torrado *et al.*, 2003, 2004, 2006). El análisis morfométrico del corazón en animales control ha demostrado que el corazón porcino neonatal representa un modelo natural tanto del remodelado hipertrófico concéntrico como excéntrico (Torrado

et al., 2004).

Así, se ha propuesto como modelo para el presente estudio, el corazón de cerdos recién nacidos. Como criterios adicionales para esta elección se han tenido en cuenta los siguientes aspectos:

- 1.- El corazón porcino es muy parecido al humano en cuanto a su desarrollo fetal, anatomía, tamaño y función (Crick *et al.*, 1998).
- 2.- Son animales ampliamente comercializados, con protocolos establecidos de su reproducción artificial, un aspecto importante para poder conseguir los animales neonatales.
- 3.- El tamaño del corazón de cerdos recién nacidos permite la disección y aislamiento de cada una de las cámaras y en cantidades suficientes para su análisis posterior molecular, bioquímico y celular (Torrado *et al.*, 2004, 2006).

El planteamiento estratégico-metodológico propuesto para la realización del presente proyecto ha consistido, en primer lugar, en el análisis masivo de la expresión génica en el VI en comparación con el VD en cerdos recién nacidos mediante la técnica *mRNA differential display*. Por esta vía esperamos identificar, seleccionar y caracterizar los genes cuya expresión está asociada preferiblemente con una u otra cámara ventricular antes de las manifestaciones del remodelado hipertrófico a nivel celular/estructural. Este análisis transcripcional comparativo constituirá el primer objetivo (muy importante) para el desarrollo del proyecto.

Esperamos que los resultados obtenidos de este análisis permitan, a partir de la confirmación (mediante las tecnologías complementarias) de los cambios diferenciales de expresión génica, identificar los factores conocidos con funciones específicas (especialmente los reguladores de la expresión génica y del crecimiento celular), mientras que los transcritos todavía no anotados serán el blanco para la experimentación adicional constituyendo los correspondientes objetivos adicionales. Es decir, pretendemos identificar, clonar y caracterizar los transcritos todavía no catalogados cuya expresión demuestra las diferencias izquierda/derecha en el miocardio neonatal normal. Como una aportación adicional, pretendemos también evaluar los niveles de expresión de los genes así caracterizados en las muestras cardíacas obtenidas de cerdos con la IC provocada por Dox y en las obtenidas tras el trasplante cardíaco en pacientes con cardiomiopatía dilatada.

Desde un punto de vista general, las contribuciones del presente proyecto de investigación están condicionadas por el papel potencialmente importante que podrían jugar los genes que participen en la respuesta inicial diferencial de

los cardiomiocitos a distintos insultos biomecánicos (sobrecarga de presión o de volumen). En consecuencia esperamos que la principal contribución científica del trabajo que planteamos sea la identificación, por primera vez, de los genes-respuesta correspondientes y su caracterización molecular/funcional.

II. Objetivos

II. Marco teórico conceptual y objetivos

El marco teórico conceptual consiste en la proposición de que la respuesta transcripcional del miocardio ventricular al estrés biomecánico se determina no solo por el tipo de sobrecarga hemodinámica (de presión o de volumen) sino también por una configuración molecular diferente en las distintas cámaras ventriculares. Formalmente visto, esta proposición está sustentada en datos que demuestran que en mamíferos, desde la etapa de iniciación del desarrollo cardíaco hasta la formación del corazón adulto, existen diferencias en la expresión génica entre los dos ventrículos, aunque el corazón está expuesto a distintas condiciones de la circulación fetal *versus* postnatal.

En este trabajo, pretendemos poner a prueba esta sugerencia especulativa, tomando como punto de partida un modelo natural que es el corazón de neonatos porcinos.

En este contexto, los dos objetivos principales de la tesis doctoral son los siguientes:

1.- El análisis transcripcional a gran escala, mediante la tecnología *mRNA differential display*, del VI en comparación con el VD de cerdos recién nacidos con el fin de identificar los genes cuya expresión está preferiblemente asociada con el VI o VD antes de las manifestaciones morfológicas del remodelado hipertrófico concéntrico (VI) y excéntrico (VD).

2.- Identificar y caracterizar los transcritos todavía no anotados cuyos niveles demuestran las diferencias izquierda/derecha significativas en el miocardio de recién nacidos porcinos y evaluar los niveles de su expresión en el miocardio ventricular en el modelo porcino y en pacientes con la insuficiencia cardíaca severa.

III. Materiales y Métodos

III. Materiales y Métodos

1. Obtención de muestras cardíacas porcinas

1.1. Animales, mantenimiento y experimentación

Los animales han sido tratados de acuerdo con la directiva 86/609/EEC y el Decreto 296/2008 de la Comisión Europea de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, y todos los protocolos han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación de Galicia. En el presente trabajo se han utilizado cerdos domésticos neonatales (*Sus scrofa*) de raza *Large White*. Los animales recién nacidos, obtenidos de un distribuidor comercial, se han trasladado a las instalaciones de la Unidad de Cirugía Experimental (UCE) del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) manteniéndolos posteriormente en una incubadora para cerdos neonatales (Nütinger System) provisto de un sistema de alimentación automatizada. Se han aislado y conservado muestras de tejido cardíaco procedentes de cerdos neonatales de los siguientes tres grupos (véase Tabla 2): 1) intactos de distinta edad (sin tratamiento experimental), 2) con insuficiencia cardíaca diastólica (ICD) provocada por inyecciones intravenosas del antibiótico antitumoral cardiotoxico *Doxorubicin* (Dox, Tedec-Meiji Farma), y 3) después de la transfección génica intracardíaca con las

Tabla 2. Animales, procedimientos experimentales y obtención de muestras

Experimentación	Edad de manipulación, días	Edad del sacrificio, días	Muestra de la cámara cardíaca	Número de animales	Referencia al protocolo
Sin experimentación	–	RN	VI, VD, AI, AD	5	Torrado <i>et al.</i> , 2004, 2006
Sin experimentación	–	20	VI, VD, AI, AD	5	Torrado <i>et al.</i> , 2004, 2006
Inducción de la ICD:					
<i>Doxorubicin</i> en PBS	6-8	30	VI, VD, AI, AD	12	Torrado <i>et al.</i> , 2003, 2004
PBS	6-8	30	VI, VD, AI, AD	12	
Transfección génica intracardíaca con:					
vector ANKRD1/CARP	6	8	VI	8	Torrado <i>et al.</i> , 2008, 2009
vector vacío	6	8	VI	8	

RN - recién nacidos; ICD - insuficiencia cardíaca diastólica inducida por inyecciones intravenosas del agente cardiotoxico *Doxorubicin*; PBS- solución salina isotónica; ANKRD1/CARP- *ankyrin repeat domain 1 protein/cardiac ankyrin repeat protein*; Vector vacío- p3XFLAG-CMV-14 (Sigma); VI/VD- ventrículo izquierdo/derecho; AI/AD- aurícula izquierda/derecha.

construcciones portadoras del gen porcino codificante de *ankyrin repeat domain 1 protein* (ANKRD1/CARP) o con el vector vacío. La transfección génica intra-miocárdica se ha ejecutado vía transtorácica con microcatéteres endoscópicos bajo control visual por fibra óptica en tiempo real, monitorizando las funciones cardíacas (ritmo cardíaco, presión arterial, ECG) durante y después de la transfección. El aislamiento y purificación a gran escala del ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos y destinado para las transfecciones *in vivo* ha sido realizado por el Dr. Mario Torrado utilizando columnas de intercambio aniónico (*PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit*, Invitrogen). El ADN plasmídico eluido de las columnas ha sido precipitado con isopropanol, resuspendido en agua libre de endotoxinas (Sigma), cuantificado espectrofotométricamente y conservado hasta -30°C hasta su utilización. En todo el procedimiento se ha empleado material de plástico estéril y apirogénico. Se ha inyectado al miocardio de cada animal 1.0 mg de ADN (volumen final 400-500 µl, equilibrados con 1/10 volumen de PBS 10x, Invitrogen) distribuidos en 4-5 inyecciones (100 µl cada una) en la pared libre del ventrículo izquierdo (Torrado *et al.*, 2009). La inducción de la ICD y transfección del corazón porcino *in vivo* se han realizado por el personal de la UCE del CHUAC según los protocolos establecidos previamente por nuestro equipo investigador (véase Tabla 2). A lo largo del período de observación/manipulación, el personal colaborador de la UCE del CHUAC ha monitorizado (una vez a la semana) el estado de los animales experimentales según los siguientes criterios: 1) temperatura corporal, 2) peso del animal, y 3) analítica bioquímica/sanguínea.

1.2. Aislamiento de tejidos cardíacos

El aislamiento de tejidos cardíacos, en todas las variantes de experimentación anteriormente mencionadas, se ha realizado según el siguiente protocolo estándar: (1) los cerdos neonatales se han anestesiado (Ketamina, 2-4 mg/kg); (2) la cavidad torácica se ha abierto y se ha determinado la presión ventricular sistólica/diastólica utilizando un transductor de la presión (Drägerwerk UM3.1) conectado a un dispositivo de captura de la señal (Drägerwerk AG); (3) se ha extraído el corazón entero, se ha colocado en una placa Petri sobre hielo, se ha pesado y fotografiado mientras estaba latiendo; (4) el corazón se ha seccionado transversalmente al nivel medio de la longitud del ventrículo izquierdo (VI) y se han tomado fotografías de la luz de las cámaras ventriculares; (5) inmediatamente después, se ha aislado la pared libre de cada ventrículo, diseccionándola en 9-10 fragmentos (aproximadamente de 1x1 cm). Las aurículas de cada corazón han sido diseccionadas en 3-4 fragmentos cada una; (6) las muestras así obtenidas se han congelado en nitrógeno líquido y almacenado hasta su uso a -80°C. Los puntos del protocolo 1 y 2 han sido realizados en condiciones estériles por

parte del personal colaborador de la UCE del CHUAC. El análisis morfométrico posterior ha consistido en la determinación del grosor de la pared libre del VI y VD utilizando imágenes digitales de las secciones transversales del corazón (Torrado *et al.*, 2004). Los detalles específicos del aislamiento de las muestras en dependencia del tipo de procesamiento experimental se describen en los apartados correspondientes de los resultados.

2. Obtención de muestras cardíacas humanas

Las muestras del miocardio normal del VI se han obtenido de cinco corazones procedentes de donantes adultos y no trasplantados por razones técnicas. Las muestras del miocardio patológico se han obtenido del VI de cinco corazones explantados procedentes de pacientes (48-63 años de edad) con la cardiomiopatía dilatada avanzada tras la operación del trasplante cardíaco ortotópico. Adicionalmente, se han conservado muestras cardíacas obtenidas post-operativamente de dos pacientes (2 y 12 meses de edad) con defectos cardíacos intra-septales que entraron en parada irreversible en el proceso de la anestesia general. Las muestras se han aislado en el quirófano (por cirujanos del CHUAC) conservándolas en la solución *RNA lysis buffer* (Ambion) y congelándolas posteriormente a -80°C . El protocolo ha sido aprobado por el Comité de Ética del CHUAC. La obtención de las muestras se ha realizado con el previo consentimiento informado de los pacientes o de los relativos familiares en cargo.

3. Análisis de la expresión génica: Métodos bioquímicos

3.1. Extracción proteica

3.1.1 Lisados celulares/tisulares totales

Cultivos E. coli. Se han preparado extractos proteicos a partir de cultivos bacterianos transformados con diferentes construcciones génicas e inducidos posteriormente para la expresión proteica recombinante (véase apartado 6.2). Los cultivos en medio líquido se centrifugaron durante 20 min a 4300 g, 8°C (Heraeus Multifuge 3SR). Tras eliminar el medio de cultivo las células sedimentadas se resuspendieron en la solución salina tamponada de fosfatos, pH 7.4 (PBS) y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. El sedimento final se ha homogeneizado (en proporción 1:10; volumen/volumen) en el tampón, *Sample Buffer Laemmli 2X* (SBL 2X: 125 mM Tris-HCl, pH 6.8; 20% glicerol; 4% SDS; 0.005% *Bromophenol Blue*; Invitrogen) suplementado con 715 mM β -mercaptoethanol (Sigma), 50 mM *dithiothreitol* (DTT, Sigma) e inhibidores de proteasas (Roche). El

homogeneizado se incubó a 100°C durante 5 min centrifugándolo posteriormente durante 30 min a 20000 g y 15°C ("Avanti-30", Beckman). Las alícuotas del sobrenadante obtenido se conservaron a -80°C.

Células COS-7. Se han preparado extractos proteicos de células COS-7 transfectadas con diferentes construcciones génicas en placas de 12 pocillos, de 3.8 cm² cada uno (véase apartado 7.2). Después de recoger el medio de cultivo, las células se lavaron con dos cambios consecutivos de PBS. Inmediatamente después de eliminar el PBS, se añadió SBL 2X distribuyéndolo por toda la superficie del pocillo. Después de la solubilización de las células, el lisado se ha transferido a un tubo Eppendorf y se ha procesado como ha sido descrito en el apartado anterior. Los sobrenadantes de los lisados celulares se conservaron a -80°C. Con el objetivo de estudiar la secreción de proteínas recombinantes expresadas en células COS-7 transfectadas, los medios de cultivo se transfirieron a tubos Eppendorf y se centrifugaron dos veces, la primera a 200 g (20 min, 4°C) y la segunda a 20000 g (20 min, 4°C). Los sobrenadantes finales se mezclaron con un volumen igual de SBL 2X, se incubaron a 100°C durante 5 min y, finalmente se conservaron a -80°C. En algunos casos, los medios de cultivo fueron previamente filtrados (unidades "Amicon-50", 50 kDa) seguido por la concentración de los filtrados en unidades "Amicon-3" (3 kDa). Los filtrados concentrados en 10-20 veces se mezclaron con los volúmenes equivalentes de SBL 2X y se procesaron como esta escrito anteriormente.

Tejido cardíaco. Se utilizaron las muestras del VI de cerdos neonatales normales, tratados con Dox o transfectados in vivo mediante la entrega directa de diferentes construcciones génicas en el corazón in vivo (véase el apartado 1.1). En todos los casos, las muestras congeladas a -80°C fueron trasladadas a placas Petri, colocadas sobre hielo seco, mecánicamente pulverizadas y homogeneizadas ("Pellet Pestle Motor", Sigma) en SBL 2X en proporción 1:9 (peso tejido/volumen SBL 2X). Los homogeneizados se incubaron a 100°C durante 5 min centrifugándolos posteriormente 30 min a 20000 g y 15 °C ("Avanti-30", Beckman). Las alícuotas de los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -80°C.

3.1.2. Extracción proteica secuencial

La extracción diferencial de proteínas según su localización subcelular se aplicó a las células COS-7 transfectadas con diferentes construcciones génicas (véase el apartado 7.2). Las células se lavaron mediante tres cambios consecutivos de PBS. Después del último lavado, se eliminó el PBS y las células fueron extraídas en placas de cultivo utilizando los tampones de "ProteoExtract Subcellular

Proteome Extraction Kit" (CalBioChem) según el protocolo 7.1 ("Subcellular extraction of adherent tissue culture cells") del fabricante. De modo complementario, los cultivos equivalentes de células COS-7 fueron tripsinizados (0,25% tripsina, 0,04% EDTA; Invitrogen) durante 4 min a 37°C. Las suspensiones celulares, después de 3 lavados en PBS, fueron extraídas según el protocolo 7.2 ("Suspension grown tissue culture cells") del fabricante (CalBioChem). En cada variante experimental, una vez transcurrido el proceso de la extracción, se obtuvieron cuatro fracciones: Fracción 1 (proteínas citosólicas), Fracción 2 (proteínas de membranas/organelas celulares), Fracción 3 (proteínas de núcleos) y Fracción 4 (proteínas de la matriz citoesquelética). Las alícuotas de las fracciones obtenidas fueron conservadas a -80°C.

3.2. Determinación de la concentración proteica

Debido a la presencia de SDS (y de otros detergentes) en los lisados/extractos celulares/tisulares, la concentración proteica se ha determinado utilizando la tecnología colorimétrica "RC DC Protein Assay" (Bio-Rad) que se aplica a las proteínas solubilizadas con una amplia gama de detergentes incluyendo hasta un 10% de SDS. Se aplicaron los ensayos correspondientes del fabricante en tubos Eppendorf leyendo posteriormente la absorbancia de las muestras coloreadas a 750 nm (espectrofotómetro "Ultrospec 1000E"; Pharmacia Biotech). La concentración proteica total de cada muestra experimental se determinó utilizando como proteína de referencia la albúmina de suero bovino (BSA, Sigma).

3.3. Separación electroforética en geles de poliacrilamida

Los extractos proteicos se analizaron mediante la separación electroforética en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) utilizando la cámara "Mini-Protean III" (Bio-Rad) y cristales con espaciadores de 1 mm de grosor. Los geles se han preparado utilizando una solución de acrilamida:bisacrilamida estabilizada ("Protogel", National Diagnostics). Se ha utilizado el sistema electroforético discontinuo preparando un gel concentrador a pH 6.8 (del 5%) y geles separadores a pH 8.8 y a una concentración variable (del 8%, 10%, 12% o 15%) para optimizar la separación de proteínas de un determinado peso molecular. A dos pocillos de cada gel se aplicaron los marcadores de peso molecular (PM) ("Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis"; Amersham Biosciences, rango de PM de 14.4 a 97 kDa, y "SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard", Invitrogen, rango de 4 a 250 kDa). La separación electroforética se ha realizado a un voltaje constante de 100 V durante la concentración (20 min) y de 200 V durante la separación (40 - 80 min), utilizando el tampón de electroforesis de

“Bio-Rad” (25 mM Tris, pH 8.3; 192 mM glicina; 0.1% SDS). Al finalizar la separación, los geles fueron: (1) teñidos en soluciones de decreciente concentración de azul de Coomassie R-250 (“Merck”) exactamente como está descrito (Mikhailov, Pásaro, 1994) o (2) trasladados a la membrana (Western blot). Los geles teñidos se escanearon por transmitancia con un filtro rojo utilizando el densitómetro GS-700 (Bio-Rad). La determinación de valores de PM y el análisis cuantitativo de las fracciones de interés se llevó a cabo con el software “Quantity One” (Bio-Rad). Finalmente, los geles se secaron (secador de geles “Hoefer-GD2000”, Amersham Biosciences) según las recomendaciones del fabricante.

3.4. Inmunolectrotransferencia (Western blot)

Se aplicó la metodología de Western blot según el protocolo descrito en (Mikhailov, Pásaro, 1994) utilizando la cámara “Mini-Trans-Blot” (Bio-Rad) y membranas de polivinilidenofluoruro (PVDF; 0.45 μm ; “Hybond-P”, Amersham Biosciences). Previamente al traslado, las membranas se hidrataron mediante incubaciones secuenciales en metanol 100% (30 s), agua ultrapura (Milli-Q, Millipore) autoclavada (3 lavados de 5 min cada uno) y tampón de transferencia (25 mM Tris, pH 8.3; 192 mM glicina, Bio-Rad) con un 20% metanol (20 min). La electrotransferencia se ha realizado a un voltaje constante de 120 V durante 2 h. Después del traslado, las membranas: (1) se lavaron en agua ultrapura autoclavada (10 min), (2) se secaron a temperatura ambiente (30 min), (3) se incubaron en metanol (30 s) con el lavado posterior en agua ultrapura autoclavada (tres cambios; 5 min cada uno) y (4) se bloquearon los sitios libres de membrana incubándola en el tampón de inactivación (50 mM Tris, pH 8.0; 300 mM NaCl; 20% suero de caballo inactivado; Sigma) en agitación permanente durante un mínimo de 2 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron en presencia de anticuerpos primarios (Tabla 3), diluídos en el tampón de inactivación, en agitación permanente durante la noche a 4°C. Después de 4 lavados en el tampón balanceado de Tris (TBS: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 15 min cada uno), las membranas se han incubado con anticuerpos secundarios (Tabla 3) conjugados con la peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase – HRP; Sigma) en agitación durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se lavaron en el tampón TBS con 0.1% Triton X-100 (TX-100; Merk) durante 1 h (5 cambios de solución). Finalmente las membranas fueron incubadas durante 5 min en la solución de los sustratos quimioluminiscentes “Super-Signal West Pico” (Pierce Biotechnology), expuestas a las películas “BioMAX Light” (Kodak) (1 - 15 min, en dependencia de la intensidad de la señal), y las películas han sido reveladas utilizando las soluciones GBX Developer and Fixer (Sigma). La especificidad de la inmunodetección ha sido confirmada en

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en el análisis Western blot

Anticuerpo contra	Especie/Tipo	Generados por	Formato	Dilución
myc epítipo	ratón/monoclonal	Sigma	IgG1	1/1000 - 1/5000
FLAG epítipo	ratón/monoclonal	Sigma	IgG1	1/1000 - 1/20000
FL-ANKRD1 porcino	conejo/policlonal	Davids Biotechnologie	IgG	1/500 - 1/1000
Péptido PLP porcino	conejo/policlonal	Davids Biotechnologie	IgG	1/250 - 1/500
IgG ratón	cabra/policlonal	Sigma	Fragmento Fab marcado con HRP	1/10000 - 1/20000
IgG conejo	cabra/policlonal	Sigma	IgG marcado con HRP	1/10000 - 1/20000

FLAG - epítipo sintético; *myc* - epítipo localizado dentro de la secuencia EQKLISEEDL del oncogen *c-myc* humano; FL-ANKRD1 - proteína porcina, *ankyrin repeat domain 1*, expresada en *E. coli* el marco de lectura completo y purificada por cromatografía de afinidad (para más detalle véase el Capítulo 2 de Resultados); PLP - péptido sintético (PLPCSPSKQLLF) de la región C-terminal de la forma de *splicing* alternativo del gen porcino NPPB (véase el Capítulo 3 de Resultados); HRP - peroxidasa de rábano picante.

comparación con controles positivos (Western blot con proteínas relevantes recombinantes) y negativos (Western blot con anticuerpos primarios neutralizados por inmunógeno). La equivalencia de la carga proteica se ha confirmado por: (1) inmunodetección del enzima glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) y (2) tinción proteica de las membranas, después de la inmunodetección, con "Amido negro" (Mikhailov, Pásaro, 1994). Finalmente, las señales de inmunodetección fueron escaneadas (densitómetro GS-700; Bio-Rad) y cuantificadas utilizando el software "Quantity-One" (Bio-Rad).

3.5. Inmunocitoquímica

Las células COS-7 han crecido en portaobjetos de vidrio especiales para el cultivo celular, dentro de contenedores de poliestireno de 2 cámaras (BD Falcon). Dos días después de ser transfectadas con los plásmidos portadores de las construcciones fusionadas al epítipo FLAG o transfectadas con el vector vacío (control negativo), las células se han lavado en PBS, fijado en metanol pre-enfriado (durante 10 min a -20°C), permeabilizado con acetona pre-enfriada (durante 1 min a -20°C), y luego lavado 4 veces en TBS, pH 8.0 (Sigma). Las células fueron posteriormente incubadas en TBS conteniendo un 2% de suero de caballo (Sigma) y con anticuerpos anti-FLAG(M2) monoclonales de ratón conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma) a una concentración 1.0 - 5.0 mg/ml en solución de bloqueo TBS. Finalmente, las células se han lavado cuatro veces con TBS, montado en la solución para prevenir la pérdida de fluorescencia (SlowFade Gold antifade; Invitrogen), y visualizado bajo un microscopio "Nikon Eclipse 600" equipado con Epi-fluorescencia, acoplado a una cámara "Nikon DS-U1" y a un ordenador asociado.

4. Análisis de la expresión génica: Métodos moleculares

4.1. Aislamiento de ARN y síntesis de ADN complementario

El ARN total ha sido aislado utilizando RNeasy Midi o Mini Kits (Qiagen). Las muestras de tejido cardíaco congeladas han sido directamente homogeneizadas en el tampón RLT (Qiagen) usando el homogeneizador (Ultra-Turrax T8, IKA), digeridas con proteinasa K (Qiagen), cargadas en las columnas RNeasy Midi (Qiagen), digeridas con ADNasa libre de ARNasas (Qiagen) y procesadas de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En ocasiones también se ha aislado el ARN total presente en el citoplasma de los cardiomiocitos. En este caso los fragmentos del ventrículo izquierdo porcino aislado ex tempore han sido disociados en PBS complementado con 0.5 mg/ml colagenasa (Sigma) y 0.1 mg/ml tripsina (Invitrogen) a la temperatura ambiente según el protocolo descrito para disociación celular del miocardio neonatal (Osinska, Lemanski, 1993). La suspensión resultante de los cardiomiocitos ha sido sedimentada (200 g, 3 min, 20°C) y el ARN citoplasmático ha sido aislado de los cardiomiocitos utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen) según el protocolo del fabricante específico para tal fin. Los ARN totales tisulares y los ARN totales citoplasmáticos han sido conservados a -80°C. La cuantía y pureza de ARN aislado ha sido determinada espectrofotométricamente a 260 nm y a 260-280 nm, repectivamente, y su integridad se ha confirmado mediante la separación electroforética en geles de formaldehído-agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio (Fig. 4). La síntesis de ADN complementario (ADNc) se ha realizado en una reacción de transcripción reversa (TR) conteniendo: 4 mg del ARN total, 500 ng del oligonucleótido Oligo(dT)12-18 (Invitrogen), 200U de la transcriptasa reversa SuperScript III Reverse transcriptase (Invitrogen), y 40U del inhibidor RNase OUT Recombinant RNase (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. EL ADNc obtenido se ha conservado en alícuotas a -80°C, hasta su posterior utilización como molde para reacciones de PCR semicuantitativa o PCR en tiempo real.

4.2. "Differential display mRNA reverse transcription-PCR" (DDRT-PCR)

Se utilizó la variante de DDRT-PCR no radiactiva (Kokame et al., 1998) con separación electroforética de los productos de PCR en geles de poliacrilamida (PAAG) teñidos con SYBR Green I (Sigma). Previamente, los ARN totales aislados independientemente del VI y VD de tres cerdos recién nacidos han sido mezclados en proporciones iguales y, en la reacción de la TR, se han usado 4 mg del ARN mezclado, el oligonucleótido T7-Oligo(dT) y la transcriptasa reversa, SuperScript III

Reverse transcriptase (Invitrogen). Los ADNc procedentes del VI y del VD han sido amplificados simultáneamente por PCR utilizando 230 combinaciones de 10 oligonucleótidos anclados con dos bases a la cola poli(A) y 23 oligonucleótidos arbitrarios, todos purificados por la cromatografía HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (Tabla 4). Como controles negativos se han usado amplificaciones PCR sin molde de ADN (reacciones no-template – NT) y con los ARN totales sin transcripción reversa (reacciones no-RT ARN – N-RT). En cada experimento de DDRT-PCR, se repitió cada amplificación al menos dos veces para comprobar que las diferencias en cuanto a la expresión génica en el VI versus VD son reproducibles. La PCR se realizó, usando la polimerasa, AmpliTaq DNA polymerase (Invitrogen), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial (94°C, 2 min), etapa I (5 ciclos, cada uno de los cuales incluye: 94°C, 30 s; 40°C, 1 min; 72°C, 1 min), etapa II (25 ciclos, cada uno de los cuales incluye: 94°C, 30 s; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min), extensión final (72°C, 10 min), almacenamiento de las muestras a 6°C. Los productos amplificados se han separado en geles de PAAG no desnaturalizantes del 8% con un 10% de glicerol en la cámara “Mini-Protean-III” (Bio-Rad) durante 3 h, utilizando Tris-borato-EDTA (TBE: 130 mM Tris pH, 9.0; 45 mM ácido bórico, 2.5 mM EDTA; Sigma) como tampón de electroforesis. Inmediatamente después, los geles han sido teñidos en una solución de SYBR Green I (1:10000) en tampón TBE y los patrones de bandas han sido visualizados (Fig. 5) en un transiluminador de ultravioleta (UV transiluminator 2000; Bio-Rad). La adquisición de las imágenes y la cuantificación de la intensidad de señales se han estimado por densitometría (VersaDoc 1000) y el software Quantity One (Bio-Rad). Los productos de amplificación regulados diferencialmente se han definido como aquellas bandas que han manifestado una diferencia significativa en la intensidad

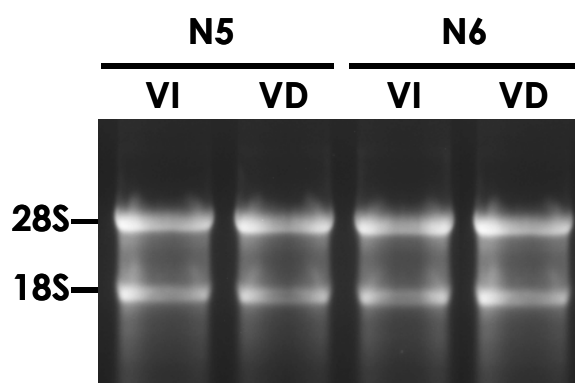


Figura 4. Control de la integridad de los ARN totales aislados del ventrículo izquierdo (VI) y derecho (VD) de cerdos recién nacidos (N5 y N6) . La separación electroforética en el gel de formaldehído-agarosa del 1% teñido con bromuro de etidio no demuestra signos de la degradación de los ARN aislados. La proporción entre la intensidad de la banda de 28S con respecto a la de 18S es de 1.8-2.0 (determinado por densitometría).

de fluorescencia al menos en dos réplicas experimentales (Fig. 5A). Utilizando una hoja de bisturí estéril, se ha recortado un fragmento rectangular de gel correspondiente a una banda individual de interés y el ADN ha sido extraído de los fragmentos de gel mediante una electroelución utilizando D-Tube Electroelution Accesory Kit (Novagen) según el protocolo del fabricante. Después de una centrifugación corta, el eluado se ha transferido a un tubo limpio. El ADN extraído se ha usado directamente como molde para la amplificación PCR con los oligonucleótidos de reamplificación T7 y M13 (véase Tabla 4). Las condiciones de reamplificación han sido similares a las de DDRT-PCR excepto la ejecución de la etapa I a 45°C y de la etapa II a 20 ciclos y 55°C. Después de la reamplificación, se ha realizado una electroforesis analítica en poliacrilamida de cada reacción de PCR para asegurar que se ha amplificado el fragmento del tamaño correcto (Fig. 5B). Posteriormente, los fragmentos de ADNc reamplificados se han separado mediante electroforesis preparativa en geles de agarosa 2%, se han eluído (QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen) y se han clonado en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen). La inserción directa de los productos de PCR en el vector pCRII-TOPO se basa en un procedimiento de clonación TA (Brownstein et al., 1996), y se ha ejecutado siguiendo el protocolo del manual del vector. Se han utilizado 2 µl de la reacción de clonación para transformar bacterias químicamente competentes (*E. coli*, One Shot TOP10; Invitrogen). Los clones bacterianos recombinantes se seleccionaron en placas de agar conteniendo AMP (50 µg/ml) y X-gal (40 µl por placa de un stock a 40 mg/ml). Por cada reacción de clonaje se seleccionaron de las placas 5-7 clones bacterianos de color blanco, se cultivaron en medio líquido durante la noche y se aisló el ADN plasmídico (ADNp); como se describe en el apartado 5. El ADNp ha sido secuenciado por Secugen (Madrid) en ambas direcciones con los oligonucleótidos M13 (-24) y M13 (-20) presentes en el vector flanqueando el sitio de inserción del producto de PCR. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se han comparado con las secuencias almacenadas en las bases de datos del GenBank mediante el algoritmo BLAST. El diseño del trabajo, con relación a la aplicación de la tecnología DDRT-PCR para el análisis transcripcional comparativo del miocardio ventricular porcino, se muestra en la Figura 6 (página 56).

4.3. RT-PCR semicuantitativa

La RT-PCR semicuantitativa se ha ejecutado exactamente como está descrito en (Torrado et al., 2003, 2004). Brevemente, los ADNc obtenidos a partir de los ARN totales procedentes del corazón porcino y humano se han amplificado en el termociclador Biometra II utilizando los oligonucleótidos específicos para los genes de interés (Tabla 5). Los oligonucleótidos para la RT-PCR se han diseñado

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en DDRT-PCR

T7-Oligo(dT)	
	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTT
Oligonucleótidos anclados a la cola poli(A)	
H01	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTGA
H02	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTGC
H03	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTGG
H04	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTGT
H05	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTCA
H06	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTCC
H07	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTCG
H08	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTAA
H09	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTAC
H10	ACGACTCACTATAGGGC TTTTTTTTTTTTAG
Oligonucleótidos arbitrarios (10 mer)	
A01	ACAATTCACACAGGA CGACTCCAAG
A02	ACAATTCACACAGGA GCTAGCATGG
A03	ACAATTCACACAGGA GACCATTGCA
A04	ACAATTCACACAGGA GCTAGCAGAC
A05	ACAATTCACACAGGA ATGGTCGTCT
A06	ACAATTCACACAGGA TACAACGAGG
A07	ACAATTCACACAGGA TGGATTGGTC
A08	ACAATTCACACAGGA TGGTAAAGGG
A09	ACAATTCACACAGGA TAAAGCCTAGC
A10	ACAATTCACACAGGA GATCTCAGAC
A11	ACAATTCACACAGGA ACGCTAGTGT
A12	ACAATTCACACAGGA GTTACTAAGG
A13	ACAATTCACACAGGA GTTGCACCAT
A14	ACAATTCACACAGGA TCCATGACTC
A15	ACAATTCACACAGGA CTTCTACCC
A16	ACAATTCACACAGGA TCGGTCATAG
A17	ACAATTCACACAGGA CTGCTAGGIA
A18	ACAATTCACACAGGA TGATGCTACC
A19	ACAATTCACACAGGA TTTTGGCTCC
A20	ACAATTCACACAGGA TCGATACAGG
A23	ACAATTCACACAGGA TATGGCGCCG
A24	ACAATTCACACAGGA GCTGAACCGG
Oligonucleótidos para reamplificación	
T7	GTAAT ACGACTCACTATAGGGC
M13	AGCGGATA ACAATTCACACAGGA

Cada oligonucleótido anclado tiene una secuencia T7 en el extremo 5' (negrita)
 Cada oligonucleótido arbitrario tiene una secuencia M13 en el extremo 5' (negrita)

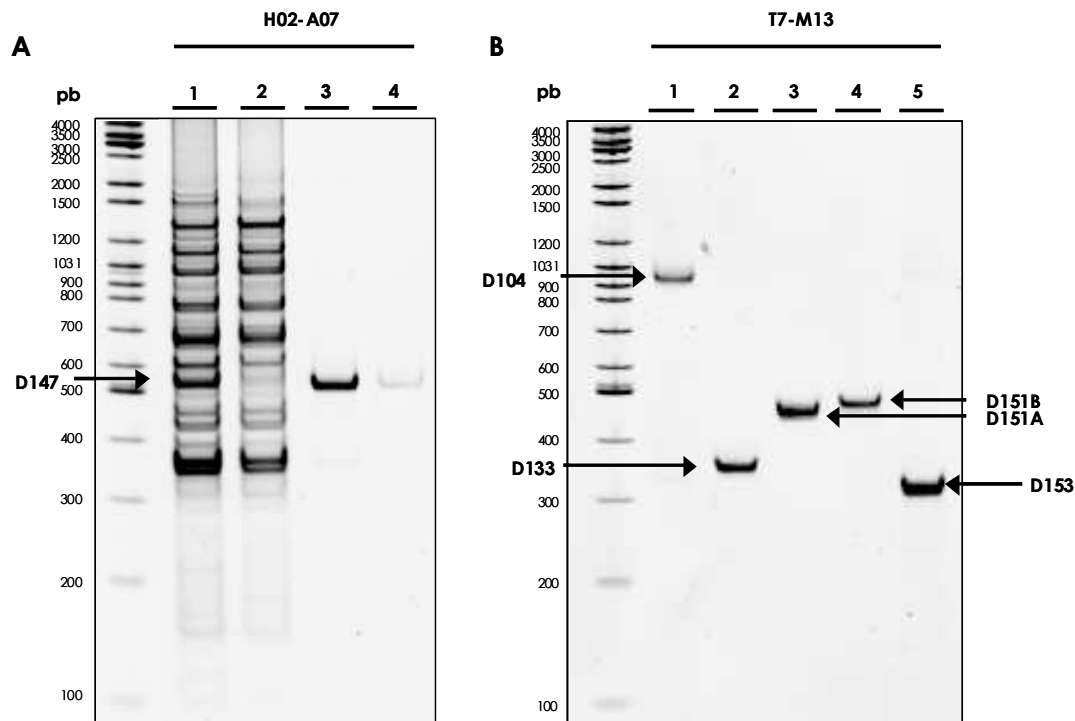


Figura 5. Ejemplos representativos de la aplicación de la técnica de DDRT-PCR para el análisis de la expresión génica diferencial en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos. Geles de PAAG del 8% no desnaturalizantes teñidos con *SYBR Green I*. **A** - identificación de la banda D147 como el transcrito relativamente enriquecido en el VI en comparación con el VD utilizando los oligonucleótidos de amplificación H02-A07. Molde: ADNc del VI (carril 1) y VD (carril 2), dos diluciones del ADN aislado de la banda D147 (carriles 3 y 4). **B** - reamplificación de los ADNc aislados de las bandas con la expresión prevalente en el VI (D104, D133, D151A, D151B y D153) utilizando los oligonucleótidos de reamplificación T7 y M13. 100-4000 - estándares del tamaño de ADN.

teniendo en cuenta los siguientes criterios (Rajeevan et al., 2001): 1) localización en diferentes exones, siempre que sea posible, 2) la temperatura melting ha de estar comprendida entre 64-68°C determinada por el método $Tm(^{\circ}C) = 4x(G+C) + 2x(A+T)$, 3) el análisis BLAST de la secuencia del oligonucleótido debe mostrar su especificidad, especialmente en la región 3', 4) el porcentaje de CG debe estar comprendido entre el 40-60%, 5) la secuencia del oligonucleótido no debe incluir regiones de baja complejidad, y 6) la secuencia no debe incluir más de tres Gs consecutivas. La cantidad de ADNc y el número de ciclos se han variado para cada combinación de oligonucleótidos para asegurar la amplificación dentro de la fase exponencial. En cada caso se promedió la expresión de genes diana normalizada a la expresión de uno de los genes de referencia: (1) el gen codificante de la proteína ribosomal L19 (RPL19) o/y (2) el gen codificante de glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). El transcrito rpl19 se ha seleccionado como un estándar interno preferido, dado que sus niveles de expresión no

presentaron variaciones significativas entre los diferentes tejidos cardíacos de cerdos postnatales normales ni tampoco de cerdos con la insuficiencia cardíaca inducida por Dox (Torrado et al., 2003, 2004). Los genes de referencia se han amplificado simultáneamente con los genes diana en tubos semejantes o en el mismo tubo (PCR multiplex). En cada set-up de PCR, cada variante de amplificación, incluyendo los controles NT y no-RT, se han realizado al menos por duplicado. Los productos de PCR se han visualizado en geles de agarosa del 2% con tinción de bromuro de etidio y la intensidad de las bandas se ha estimado y comparado por densitometría (VersaDoc 1000) y el software Quantity One (Bio-Rad). Finalmente, los productos de amplificación han sido eluidos del gel, clonados y secuenciados para confirmar inequívocamente su identidad.

4.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La cuantificación precisa de los niveles de expresión génica se ha realizado, también mediante la tecnología RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) como está escrito en (Torrado et al., 2006, 2009) utilizando el equipo IQ5 gestionado con el software IQ5 Standard Edition v2.0 (Bio-Rad) y un sistema de detección basado en la estimación de la intensidad de la señal fluorescente de SYBR Green I. Todo el material consumible para qPCR se ha adquirido de Bio-Rad. Las reacciones de qPCR se han realizado en tubos de 0.2 ml ("8-tube strips, CLR") con tapas de transparencia óptica ("optically clear 8-flat cap strips"). El diseño de los oligonucleótidos se han basado en los criterios mencionados en el apartado anterior, salvo que el producto de qPCR ha de tener un tamaño entre 90-130 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos usados en el análisis qPCR se muestran en la Tabla 5. En cada set-up de qPCR se han incluido dos controles negativos: 1) omitiendo el molde de ADNc y 2) sustituyendo el ADNc por el ARN correspondiente sin transcripción reversa (para monitorizar la contaminación del molde por ADN genómico). La especificidad e identidad del producto de PCR generado por cada combinación de oligonucleótidos ha sido verificada mediante: 1) análisis de la curva de disociación (Fig. 7A), 2) análisis electroforético (Fig. 7B) y 3) secuenciación de los productos amplificados. Los niveles de expresión de los genes de interés se han normalizado a la expresión del gen *rpl19* y cuantificado usando el método comparativo de ciclo umbral (threshold cycle, CT). Es decir, en cada muestra/réplica, los valores CT de amplificación del gen de interés se han normalizado con los valores CT de amplificación del estándar interno, *rpl19*. La cuantificación de los niveles de expresión de cada gen de interés se ha basado en los resultados obtenidos al menos en dos repeticiones experimentales, cada una con muestras duplicadas. Bajo nuestras condiciones, las reproducciones técnicas resultaron en una variación inferior al 5%.

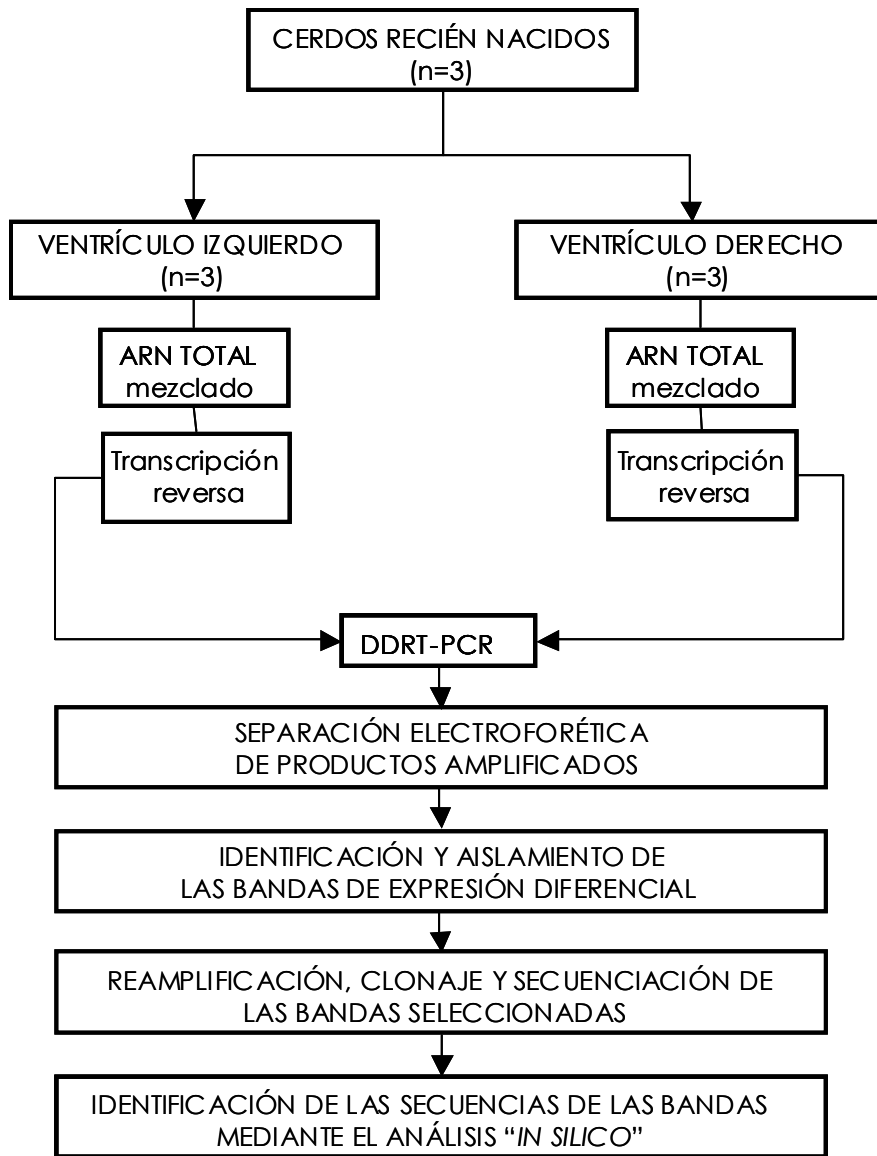


Figura 6. Diseño de la aplicación de la tecnología DDRT-PCR para el análisis transcripcional del miocardio del VI versus VD en cerdos recién nacidos.

4.5. Amplificación rápida de extremos de ADNc

La técnica de la amplificación rápida de extremos de ADNc (Rapid Amplification of cDNA Ends – RACE) se ha usado para la obtención de las secuencias de los extremos 3' y 5' de la secuencia localizada dentro del intrón 8 del gen porcino *ankrd1* (véase el Capítulo 2 de Resultados). Para extender la secuencia al extremo 3' o 5', se realizó RACE empleando el método basado en el uso del SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, las muestras de los ADNc 5'-RACE y ADNc

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en RT-PCR, qPCR y 3´RACE

Oligo	Gen	Especie	Secuencia (5´-3´)	D/R	Aplicación
45	<i>ankrd1</i>	C	ACG CCG TGA GGC TGA ACC GGT A	D	RT-PCR
153	<i>ankrd1</i>	C	ATG ATG GTT CTG AAA GTA GAA GAG	D	RT-PCR
156	<i>ankrd1</i>	C	TAT AAG CGG ACA GCT CTT CAT AG	D	RT-PCR
199	<i>ankrd1</i>	C	GAC TAC CTC AGG CCT GGC TCA	R	RT-PCR
204	<i>ankrd1</i>	C	GAA GAC CTT GAA ATA ATC ATT CAA CT	D	RT-PCR
209	<i>ankrd1</i>	C	TGA TCA GAC TCC TGA TTA CGT AT	D	qPCR
210	<i>ankrd1</i>	C	CCA GTT CAG CAC CAG ATC CAT	R	qPCR
306	<i>ankrd1</i>	C	CCA AGG ACC GAG AAG GAG ATA C	D	RT-PCR, qPCR
307	<i>ankrd1</i>	C	CCT TGC TTG AGC ACT TAC ACA GT	R	qPCR
308	<i>ankrd1</i>	C	CGG GAT AAG TTG CTC AGC AC	D	RT-PCR, qPCR
309	<i>ankrd1</i>	C	CCC AAG GAC ACC AAG CTA CTC	R	qPCR
310	<i>ankrd1</i>	C	ATT CCG TGA TAT GCT TGA ATC CA	D	RT-PCR, qPCR
311	<i>ankrd1</i>	C	GCA GGA GGA GAA ATA CCT TAT C	R	qPCR
312	<i>ankrd1</i>	C	GGG TAT CTC CTT CCT AGA CAA GCA	R	RT-PCR
313	<i>ankrd1</i>	C	CTG TGC TGA GCA ACT GTG AAG TAG	R	RT-PCR
27p	<i>ankrd1</i>	C	TTA ATA GAA GCT GGA GCC CAG	D	RT-PCR
28p	<i>ankrd1</i>	C	GTC AAA TAT TGC TTT GGT TCC AT	R	RT-PCR
326	<i>ankrd1</i>	C	TCT TTT TTC TCA GAA AGT TGC TAT GC	R	qPCR
327	<i>ankrd1</i>	C	TCA AGA ACT GTG CTG GGA AGA C	D	qPCR
314	<i>ankrd1</i>	H	TAA CTT CCT CAG CCC TTG CAC A	R	RT-PCR
315	<i>ankrd1</i>	H	CCA AAG ACA GAG AAG GAG ATA C	D	RT-PCR
316	<i>ankrd1</i>	H	CCG AGA TAA GTT GCT CAG CAC A	D	RT-PCR
317	<i>ankrd1</i>	H	CCT TCC TAG AGA AGC AGA GTC A	R	RT-PCR
27h	<i>ankrd1</i>	H	TTA ATG GAA GCT GGA GCC CAG	D	RT-PCR
28h	<i>ankrd1</i>	H	GTC GAA TAT TGC TTT GGT TCC AT	R	RT-PCR
182	<i>ankrd1</i>	C	AGC AGG GCT CAT GGC TCT GAA TTA TCA GG	D	3´-RACE
183	<i>ankrd1</i>	C	CAT CTT GGA GGG AAC TGG GAA CAA GAC A	D	3´-RACE
289	<i>nppb</i>	C	GGC TGC TAG GAA GTG AAA AGT G	D	RT-PCR
82	<i>nppb</i>	C	GCT CCT GCT CCT GTT CTT GCA	R	qPCR
251	<i>nppb</i>	C	GGT CCA GCA GCT CCT GTA TC	D	qPCR
288	<i>nppb</i>	C	AAG AAC CGT CTT ATA TAC AAC CAC	D	RT-PCR
252	<i>nppb</i>	C	AGT ACC TCC TGA GCA CTG TAT C	D	qPCR
291	<i>nppb</i>	H	AAG CAA ACC CGG ACG CAT CG	R	RT-PCR
84	<i>nppb</i>	H	CTC CTG CTC TTC TTG CAT CTG	R	RT-PCR
286	<i>nppb</i>	H	ATG TTG ACT TTA TTT CAC CGT GGA	D	RT-PCR
287	<i>nppb</i>	H	ATG CCG CCT CAG CAC TGT AAC	D	RT-PCR
64	<i>RPL19</i>	C	CTG CTC AGA AGA TAC CGT GAA T	D	qPCR
206	<i>RPL19</i>	C	GCT TGT GGA TGT GCT CCA TGA	R	qPCR
36	<i>RPL19</i>	H/C	AAC TCC CGT CAG CAG ATC CG	D	RT-PCR
65	<i>RPL19</i>	H/C	CTT GGT CTC TTC CTC CTT GGA	R	RT-PCR
328	<i>U6</i>	C	GTG CTC GCT TCG GCA GCA CA	D	RT-PCR
329	<i>U6</i>	C	CIT CAC GAA TTT GCG TGT CAT C	R	RT-PCR
15	<i>gapdh</i>	C	TCC TGC ACC ACC AAC TGC TTA	D	RT-PCR
16	<i>gapdh</i>	C	GGA CAC GGA AGG CCA TGC CA	R	RT-PCR
239	FLAG vector	-	CAT CGT CAT CCT TGT AGT CGA T	R	RT-PCR
334	<i>mstn</i>	C	GTA CGA TGT CCA GAG AGA TGA CA	D	qPCR
335	<i>mstn</i>	C	CCT TCC ACT TGC ATT AGA AGA TC	R	qPCR
M13(-20)	pCRII-TOPO	-	GTA AAA CGA CGG CCA GT	D	secuenciación vector
M13(-24)	pCRII-TOPO	-	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	R	secuenciación vector
62	pCAL-n-FLAG	-	AGA ATT TCA TAG CCG TCT CAG C	D	secuenciación vector
63	pCAL-n-FLAG	-	TAT GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	R	secuenciación vector
122	pcDNA3.1/myc-His	-	CAC TGC TTA CTG GCT TAT CGA A	D	secuenciación vector
123	pcDNA3.1/myc-His	-	AAC AAC AGA TGG CTG GCA ACT A	R	secuenciación vector
190	p3XFLAG-CMV-14	-	CGT TGA CGC AAA TGG GCG GTA	D	secuenciación vector
191	p3XFLAG-CMV-14	-	AGG GAT GCC ACC CGG GAT CA	R	secuenciación vector

Gen codificante de: ANKRD1 - *ankyrin repeat domain 1 protein*; NPPB - *b-type natriuretic peptide precursor*; RPL19 - proteína ribosomal L19; U6 - *small nuclear RNA*; GAPDH - *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*; MSTN - *miostatin*; C - cerdo; H - humano; D - directo; R - reverso.

3'-RACE se han generado por separado, utilizando en cada caso: 1.0 mg de ARN total aislado del VI de cerdos recién nacidos, la transcriptasa reversa (PowerScript reverse transcriptase) y oligonucleótidos modificados para la incorporación de la secuencia SMART en ambas poblaciones de ADNc. En amplificaciones por PCR se han usado, como el molde, diluciones diferentes de cada población de ADNc 5'-RACE y 3'-RACE, la mezcla de reacción SMART RACE kit universal primer mix A, oligonucleótidos específicos del fragmento del gen porcino *ankrd1* (véase la Tabla 5) y la polimerasa Advantage 2 (Clontech). Los productos de la amplificación se han separado en geles de agarosa, purificado del gel, clonado y secuenciado.

5. Clonación génica molecular

Se ha utilizado la estrategia estándar de clonación génica molecular incluyendo la clonación direccional de ADN generado por RT-PCR en diferentes vectores, la transformación bacteriana con las construcciones resultantes, el aislamiento y análisis de los plásmidos recombinantes (Sambrook, 2001).

5.1. Vectores de expresión y diseño de las construcciones

Se han utilizado los siguientes vectores (Fig. 8): (1) pCAL-n-FLAG (Stratagene). Este vector permite expresar en células procariontas proteínas recombinantes fusionadas (en su extremo N-terminal) a calmodulin binding peptide (CBP) y al epítipo FLAG; (2) pcDNA 3.1/myc-HisB (Invitrogen). Este vector permite expresar en células eucariotas proteínas recombinantes fusionadas (en su extremo C-terminal) al epítipo myc y a 6xHis; (3) p3XFLAG-CMV-14 (Sigma). Este vector permite expresar en células eucariotas proteínas recombinantes fusionadas (en su extremo C-terminal) a 3 epítipos FLAG consecutivos. Las construcciones se han diseñado basándose en una estrategia de clonación direccional de los productos de PCR en los vectores correspondientes mediante el uso de enzimas de restricción diferentes en los extremos 5' y 3'. En el diseño de cada construcción se han seleccionado dos enzimas de restricción presentes en la caja de clonaje múltiple del vector con los siguientes criterios: (1) que no digieran el inserto que se pretende clonar y (2) que permitan una doble digestión de restricción simultánea en el mismo tampón sin disminución de sus actividades. Las secuencias de reconocimiento de ambas enzimas de restricción se han incorporado en los productos de PCR mediante su inclusión en los oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen o el fragmento del gen que se pretende clonar.

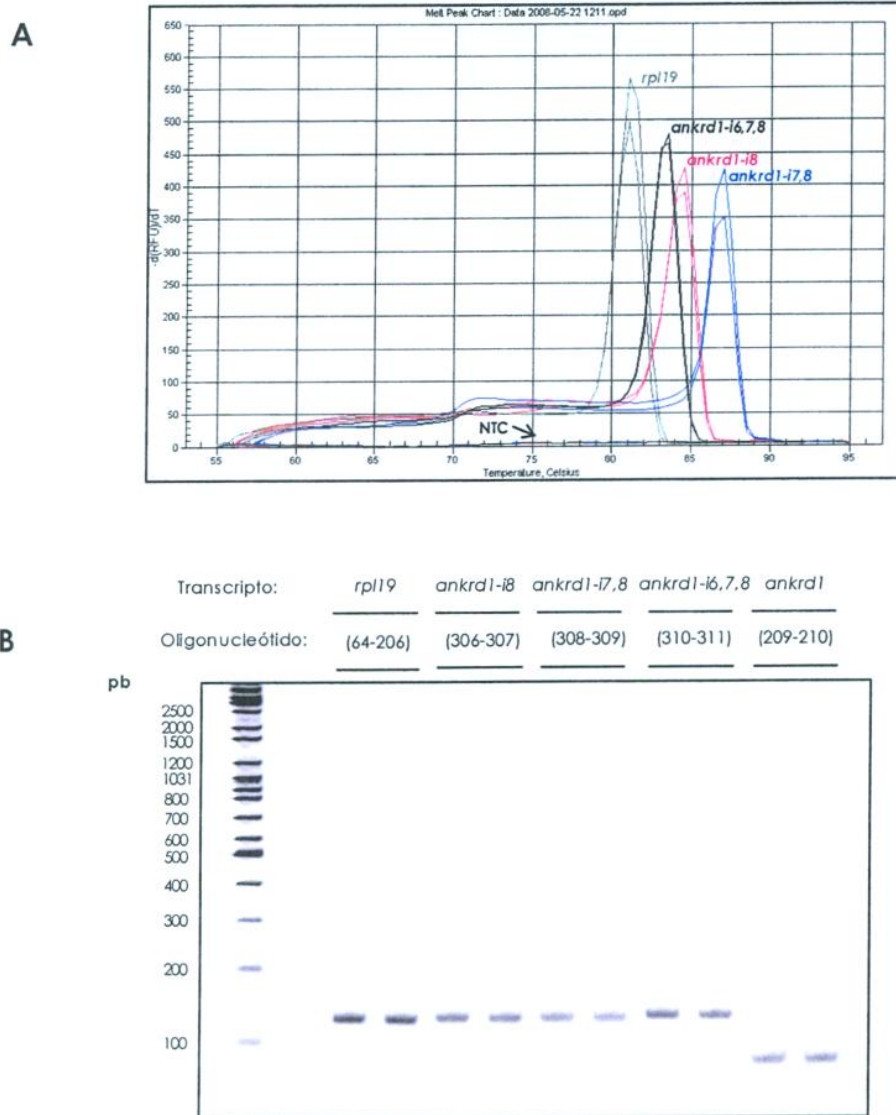


Figura 7. Curvas de disociación (A) y electroforegrama de amplicones (B) obtenidos mediante SYBR Green qPCR. **A** - curvas de disociación para las formas de *splicing* alternativo del gen *ankrd1* que retienen intrones (i); *ankrd1-i8* (rojo), *ankrd1-i7,8* (azul) y *ankrd1-i6,7,8* (negro); estándar interno - *rpl19* (verde). Las curvas de disociación muestran un único pico en las amplificaciones de cada transcripto, lo que indica que en la reacción de qPCR se ha generado un único producto de PCR. **B** - separación de amplicones en el gel de PAAG del 8% teñido con SYBR Green I. Cada combinación de oligonucleótidos indicados genera un único producto del tamaño esperado. NTC- *non template control*. 100-2500- estándares del tamaño del ADN (*GeneRuler DNA ladder mix*; Fermentas), pb.

5.2. Obtención y ligación de los insertos

Mediante RT-PCR se han generado los insertos de ADN necesarios para la construcción de los plásmidos (Tabla 6; página 63). Se realizaron reacciones RT-PCR con el fin de amplificar la región codificante completa (o una parte) de cada

uno de los genes de interés utilizando una polimerasa de ADN de alta fidelidad (PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase; Stratagene). La mezcla de reacción contenía: oligonucleótidos (0.2 mM de cada uno); dNTPs (0.2 mM); tampón de reacción de la PfuUltra 1x y 2.5U PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase. Como molde se empleó ADNc sintetizado a partir de ARN total como se describe en el apartado 4.1. Se ha utilizado el siguiente programa de PCR: 95°C – 2 min (1 ciclo); 95°C – 30 s, 59°C – 30 s, 72°C – 90 s (30 ciclos); 72°C – 10 min (1 ciclo). La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador UNOII (Biometra) o iCycler (BioRad). Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2.0% en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE 1x; Sigma) y bromuro de etidio (0.5 mg/ml). Los geles se visualizaron en el transiluminador UV 2000 (BioRad) y se fotografiaron con el equipo VersaDoc 1000 (BioRad). El tamaño de los insertos se determinó comparándolo con los del marcador de tamaño de fragmentos de ADN, "GeneRuler DNA Ladder Mix" (Fermentas). Los productos de amplificación se han recortado del gel y purificado de la agarosa según el protocolo recomendado por el fabricante de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). El vector (0.5 mg) y el producto de RT-PCR aislado se ha digerido en sendas reacciones de doble digestión, se han separado electroforéticamente en geles de agarosa y se han purificado como ha sido descrito en el apartado anterior. Los productos de PCR, digeridos y purificados, se ligaron a los vectores mediante la Ligasa T4 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Paralelamente a la ligación experimental (vector + inserto) se ha realizado una ligación control negativa (incluyendo en la reacción de ligación solo el vector y no el inserto).

5.3. Transformación bacteriana

Se ha utilizado una alícuota de la reacción de ligación experimental o del control para transformar las células E. coli XL1 Blue supercompetentes (Stratagene). Brevemente, la transformación se ha realizado en tubos Falcon (BD) de 14.0 ml. Se han mezclado los 50.0 ml de células competentes con 0.85 ml de b-mercaptoetanol, se han incubado durante 10 min en hielo y posteriormente se les ha añadido 1.0 ml de la reacción de ligación. Los tubos se han incubado durante exactamente 45 s a 42°C. Inmediatamente después del choque térmico los tubos se han enfriado en hielo durante 2 min. A continuación se ha añadido 450.0 µl de medio SOC (New England BioLabs) y los tubos se han incubado con agitación a 37°C durante 1 h. Finalmente, se sembraron diferentes volúmenes (40.0-400.0 µl) de la reacción de transformación en placas de LB agar (Sigma) suplementado con AMP (50 mg/ml, Sigma) puesto que los plásmidos utilizados proporcionan a las células transformadas resistencia a dicho antibiótico (véase Fig. 8). Las placas se han incubado durante la noche a 37°C. En cada experimento de clonación se

han seleccionado colonias aisladas que han sido propagadas para el aislamiento de ADN plasmídico (ADNp).

5.4. Aislamiento de ADN plasmídico

El aislamiento de ADNp se ha realizado a dos escalas diferentes. A pequeña escala, con el fin de analizar mediante electroforesis y secuenciación las construcciones génicas generadas por clonación. Una vez verificadas, las construcciones se aislaron mediante procedimientos a mayor escala para disponer de ADNp suficiente para experimentos posteriores.

Aislamiento a pequeña escala. En cada variante de clonación se han propagado 10 colonias transformadas, cada una en 10.0 ml de medio LB líquido (Sigma) suplementado con AMP (50.0 mg/ml, Sigma), durante la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se ha generado un stock de glicerol, mezclando una alícuota (250.0 µl) de cada cultivo bacteriano con un volumen igual de glicerol al 50% y se conservó a -80°C. El resto de los cultivos bacterianos se centrifugaron a 4000 g, durante 20 min a 4°C y se purificó el ADNp utilizando las columnas QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) según el protocolo del fabricante. La concentración del ADNp se ha estimado mediante espectrofotometría. En promedio se ha obtenido un rendimiento por columna y por cultivo de 10.0 ml de aproximadamente 10.0 mg de ADNp. La presencia del inserto en el ADN plasmídico se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa frente al control negativo correspondiente (vector vacío; véase Fig. 9, página 65) y, adicionalmente, por la secuenciación de los insertos de 2-3 clones positivos.

Aislamiento a gran escala. Los clones bacterianos portadores de las construcciones génicas verificadas por secuenciación, se propagaron inoculando inicialmente cada uno de los stocks bacterianos de glicerol en 3.0 ml de medio LB líquido suplementado con AMP. Posteriormente los cultivos bacterianos crecidos se han propagado de manera consecutiva en 100.0 y, luego, en 600.0 ml de medio. Las células crecidas en el volumen de 600.0 ml se sedimentaron mediante la centrifugación (4300 g, 40 min, 8°C; Heraeus Multifuge SR) y se ha purificado el ADNp utilizando el "PureLink HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit" (Invitrogen) según el procedimiento descrito por la compañía. En promedio se ha obtenido un rendimiento por columna y por cultivo de 600.0 ml de aproximadamente 1.0 mg de ADNp. Los plásmidos recombinantes purificados se conservaron a -30°C.

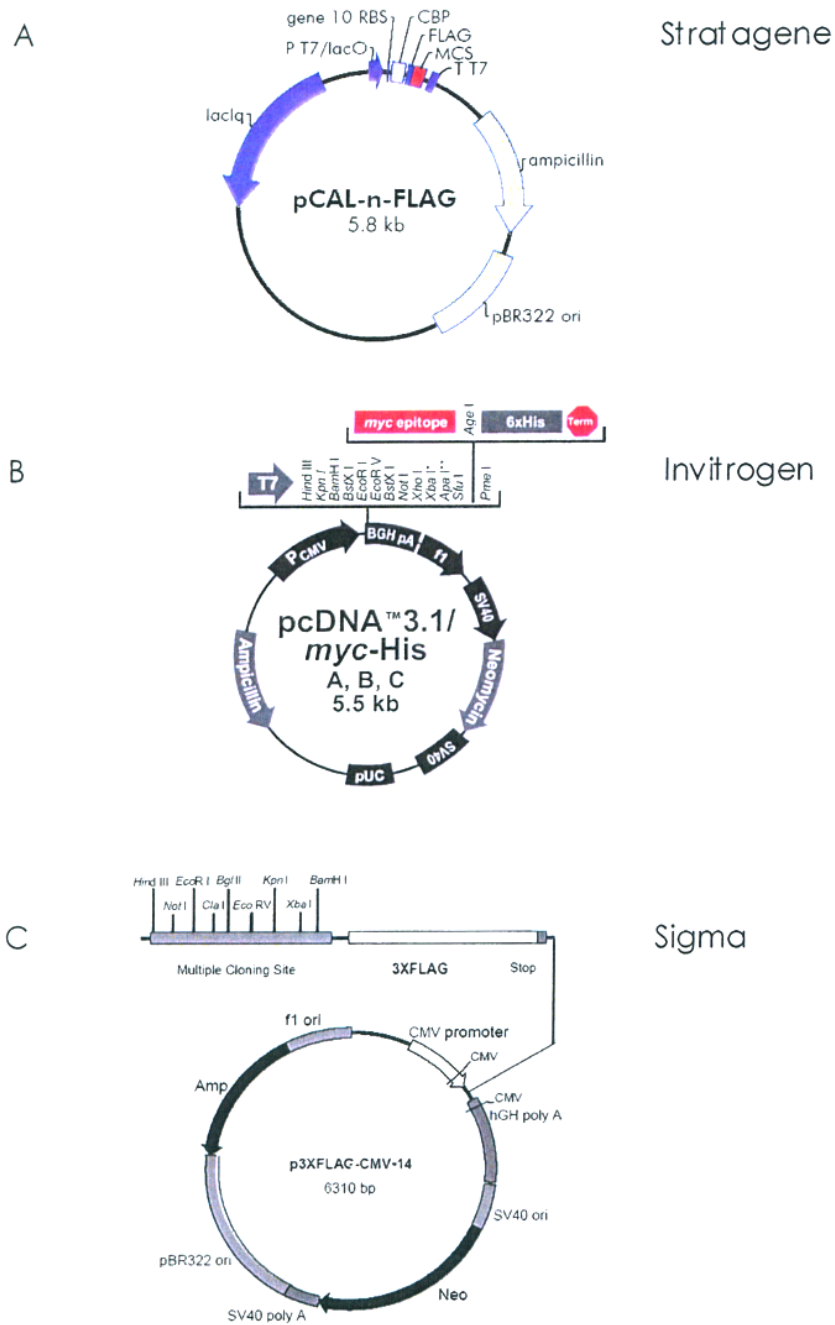


Figura 8. Mapas de los vectores utilizados (según las descripciones de: Stratagene, Invitrogen y Sigma). **A - pCAL-n-FLAG:** permite expresar en células procariontas proteínas recombinantes fusionadas (en su extremo N-terminal) a *calmodulin binding peptide* (CBP) y al epítipo FLAG. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (que permite la selección de vectores en células de *E.coli*). La expresión de la proteína de fusión se induce con IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) que da lugar a la transcripción por parte del promotor T7. **MCS** - sitio de clonaje múltiple (*multiple cloning site*), **T T7** - terminador T7. **B - pcDNA 3.1/myc-His B:** permite expresar en células eucariotas proteínas recombinantes fusionadas (en su extremo C-terminal) al epítipo *myc* y a 6 residuos de histidina (6xHis). El vector dispone del gen de resistencia a neomicina (que permite la selección de transfectantes estables en células de mamíferos) y del gen de resistencia a ampicilina. Presenta el promotor de *Cytomegalovirus* (CMV) humano que permite un alto nivel de eficacia de la expresión de la proteína recombinante y el promotor T7 que permite la expresión de las proteínas de fusión en ensayos de transcripción y traducción *in vitro*. **C - p3XFLAG-CMV-14:** permite expresar en células eucariotas proteínas recombinantes fusionadas (en su extremo C-terminal) a 3 epítipos FLAG consecutivos. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y neomicina. Expresa las proteínas de fusión bajo el control del promotor CMV.

Tabla 6. Vectores de expresión proteica recombinante

Vector	Enzima de restricción	Secuencia de fusión
pCAL-n-FLAG	EcoRI-HindIII	FL-NPPB
pCAL-n-FLAG	EcoRI-HindIII	NPPB/wSP
pCAL-n-FLAG	EcoRI-HindIII	FL-ΔE2-NPPB
pCAL-n-FLAG	EcoRI-HindIII	ΔE2-NPPB/wSP
pCAL-n-FLAG	EcoRI-HindIII	E3/ΔE2-NPPB
pCDNA3.1/myc-HisB	HindIII-EcoRI	FL-NPPB
p3XFLAG-CMV-14	HindIII-EcoRI	FL-NPPB
p3XFLAG-CMV-14	HindIII-EcoRI	FL-ΔE2-NPPB
pCDNA3.1/myc-HisB	EcoRV-NotI	ANKRD1
pCDNA3.1/myc-HisB	EcoRV-NotI	ANKRD1-i8
pCDNA3.1/myc-HisB	EcoRV-NotI	ANKRD1-i7,8
pCDNA3.1/myc-HisB	EcoRV-NotI	ANKRD1-i6,7,8

p - plásmido; CAL - epítipo de *calmodulin binding peptide*; His- histidina; FLAG- epítipo sintético; myc- epítipo localizado dentro de la secuencia EQKLISEEDL del oncogen *c-myc* humano ; CMV- *Cytomegalovirus*; E - exón; I - intrón; BNP - *brain natriuretic peptide*; ΔE2- *skipping* del exón 2 del transcripto primario NPPB; ANKRD1- *ankyrin repeat domain 1 protein*; FL - secuencia codificante completa; wSP - sin el péptido señal (*without signal peptide*).

6. Expresión proteica recombinante en bacterias

Las construcciones génicas generadas y caracterizadas se utilizaron para transformar las células bacterianas (*E. coli*) o las células eucariotas (COS-7).

6.1. Transformación de cepas de *E.coli*

Las construcciones génicas generadas en el vector pCAL-n-FLAG se han utilizado para transformar las siguientes tres cepas de *E.coli*: BL21 (DE3)pLysS (Invitrogen), Rosetta-gami 2 (DE3) (Novagen), y BL21-Gold (DE3) (Stratagene). Estas cepas de *E. coli* presentan diferentes grados de especialización, en cuanto a la expresión proteica recombinante gracias a diversas modificaciones génicas de las células (Tabla 7; página 67). La transformación de estas células se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito por cada uno de los fabricantes y que no difiere significativamente del aplicado a las células *E.coli* XL1 Blue (véase el apartado 5.3). Después del choque térmico se añadieron a los tubos de transformación 450.0 ml de medio SOC (New England Biolabs) precalentado a 37°C y se incubaron los tubos a 37°C durante 1 h con agitación. Finalmente, se sembraron diferentes volúmenes (20.0-100.0 ml) de la reacción de transformación en placas

de LB agar (Sigma) suplementado con los antibióticos correspondientes a cada una de las cepas: 1) células BL21-Gold (DE3): 50.0 mg/ml ampicilina, 2) células BL21 (DE3)pLysS: 50.0 mg/ml ampicilina y 34.0 mg/ml cloranfenicol y 3) células Rosetta-gami 2 (DE3): 50.0 mg/ml ampicilina y 34.0 mg/ml cloranfenicol. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C. La propagación de los clones bacterianos transformados y la inducción de la expresión de proteínas recombinantes se describe a continuación.

6.2. Inducción de la expresión proteica

De cada placa de cultivo se seleccionaron 5 colonias transformadas, y se propagaron cada uno de los clones en 10.0 ml de medio LB (Sigma) suplementado con los antibióticos apropiados, en agitación permanente a 37°C durante la noche. Una alícuota de cada cultivo se ha diluido 20 veces en medio LB líquido y se ha monitorizado el crecimiento celular determinando periódicamente su densidad óptica mediante espectrofotometría a 600 nm (Ultrospec 1000E, Pharmacia Biotech). En la fase exponencial se ha inducido la expresión proteica recombinante añadiendo a cada cultivo 1 mM de isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG; Sigma) seguido por la incubación de los cultivos en agitación vigorosa a 27°C durante 2 h. Las células inducidas se han sedimentado por centrifugación (4300 g, 40 min, 8°C; Heraeus Multifuge SR) y se ha lisado una parte del sedimento bacteriano en el tampón SBL 2X (véase el apartado 3.1.1). Los lisados obtenidos se han sometido a la separación SDS-PAGE seguida por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma) (detección quimioluminiscente; véase el apartado 3.4) utilizando el extracto proteico de bacterias no inducidas como el control negativo. La detección de una banda del tamaño esperado (frente al control) se ha interpretado como la indicación de la expresión proteica recombinante.

6.3. Purificación de proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad

Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando la resina de afinidad, Calmodulin affinity resin (Stratagene) según el siguiente protocolo. El sedimento bacteriano procedente de 500.0 ml de cultivo inducido en fase exponencial se ha homogeneizado utilizando el homogeneizador UltraTurrax T8 (IKA) en 30.0 ml de TBS complementado con inhibidores de proteasas (Roche). El homogenado se ha digerido secuencialmente con Lisozima (1 mg/ml; Sigma) 20 min sobre hielo y con ADNasa (0.01 mg/ml; Sigma) 20 min a temperatura ambiente. Después de la digestión enzimática, al homogenado se le ha añadido: 4 mM DTT, 1 mM acetato de magnesio, 1 mM imidazole y 0.2% Triton X-100

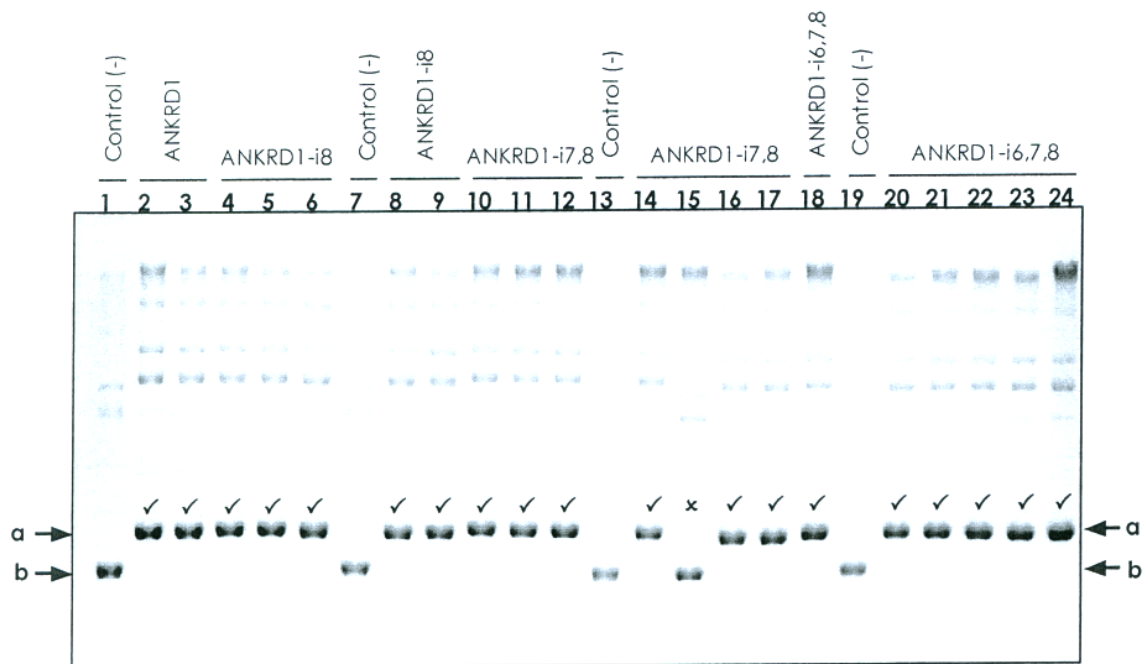


Figura 9. Identificación electroforética de los plásmidos portadores de los insertos generados por clonación (gel de agarosa del 0.8% teñido con bromuro de etidio). En cada carril se han cargado 1.2 μ l del ADNp (procedente de la purificación a pequeña escala, como se describe en el apartado 5.4) en 2.0 μ l del tampón de carga (Invitrogen) y 6.5 μ l de agua ultrapura (volumen final – 10.0 μ l) que se han separado a 75 V durante 3 h. Se capturaron las imágenes de las bandas separadas con el equipo VersaDoc-1000 (Bio-Rad). **a** – clones con los insertos de distintas formas de *splicing* del gen *ankrd1* con retención de intrones (i). **b** – clones sin inserto (el vector pcDNA 3.1/myc-His B vacío; carril 1, 7, 13 y 19). Todos los clones experimentales tienen menor movilidad electroforética que el vector vacío y por lo tanto son positivos, es decir portadores del inserto, con la única excepción del clon 15 que presenta una movilidad igual que el vector vacío. Se han seleccionado dos clones positivos para su posterior análisis mediante secuenciación.

(TX-100). Al pasar 20 min de agitación a temperatura ambiente, se ha centrifugado el homogenado (20000 g, 20 min, 4°C) salvando el sobrenadante. Al sobrenadante se le ha añadido 2 mM CaCl_2 y se ha incubado con la resina, previamente lavada y equilibrada según las recomendaciones del fabricante. Después de dos lavados con el tampón (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 4 mM DTT; 1 mM acetato de magnesio; 1 mM *imidazole*; 2 mM CaCl_2 ; 0.2% TX-100), la resina ha sido trasladada a la columna de elución. Después de tres lavados adicionales de la resina en la columna, las proteínas se han eluido con el tampón: 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 300 mM NaCl; 2 mM EGTA. El eluido se ha alícuotado y conservado a -30°C hasta su análisis posterior.

7. Expresión proteica recombinante en células eucariotas

En los experimentos de expresión proteica recombinante en células eucariotas se ha utilizado la línea celular COS-7 (African green monkey kidney fibroblast cell line; ECACC).

7.1. Cultivo celular

Las alícuotas comerciales de las células COS-7 se han propagado y mantenido en frascos de cultivo celular de 75 cm² (BD Falcon) conteniendo 12.0 ml de medio D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen) complementado con 10% suero bovino fetal (SBF; Invitrogen), mezcla 1x de penicilina-estreptomicina-glutamina (Invitrogen) y 1 mM piruvato sódico (Invitrogen) en un incubador a 37°C y un 5% de CO₂. Las células se han subcultivado a intervalos regulares antes de ser confluyentes utilizando un método estándar de tripsinización.

7.2. Transfección

Las transfecciones celulares se han realizado en placas de cultivo de 12 pocillos (3.8 cm²/pocillo). El día previo a la transfección, se han sembrado 80000 células/pocillo. El número de células se ha determinado utilizando un contador automático (Countess automated cell counter, Invitrogen). El día de la transfección se ha sustituido el medio de cultivo completo por un medio de cultivo sin antibióticos. La transfección celular con los plásmidos portadores de secuencias clonadas, bajo el control del promotor de Cytomegalovirus (CMV), o con el vector vacío se ha llevado a cabo con el agente de transfección Lipofectamine LTX (Invitrogen) y el aditivo destinado a mejorar la eficacia de la transfección, PLUS Reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los complejos entre el ADNp y el agente de transfección, destinados para cada pocillo, se han formado en un tubo Eppendorf conteniendo el ADNp diluido en 200 µl de medio Opti-MEM I Reduced Serum Medium (GIBCO) y Plus Reagent. Se han utilizado diferentes cantidades de ADNp entre 0.2-3.5 µg. Por cada µg de ADNp se ha añadido 1 µl de Plus Reagent. Esta mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente. A continuación se incorporó el reactivo Lipofectamine LTX (1:3, µg:µl respecto al ADNp), se incubó la mezcla final durante 30 min a temperatura ambiente, y se añadieron 200 µl de la reacción a las células en cada pocillo de la placa de cultivo. Después de 48 h de la incubación de las células COS-7 en presencia de los complejos, los extractos de las células transfectadas, así como los medios de cultivo correspondientes, se han analizado por SDS-PAGE seguido por Western blot con

Tabla 7. Cepas de *E.coli* utilizadas

Cepa	Fabricante	Características
BL21 (DE3)pLysS	Invitrogen	Contiene el lisogen λ DE3 portador del gen T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor <i>lac</i> UV5. Portan el plásmido pLysS que le confiere resistencia a CAM.
Rosetta-gami 2 (DE3)	Novagen	Facilita la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en <i>E. coli</i> , son portadoras del plásmido pRARE2 que le confiere resistencia a CAM.
BL21-Gold (DE3)	Stratagene	Proporciona una elevada eficacia de la expresión dado que son deficientes para dos proteasas que podrían degradar las proteínas recombinantes. Son compatibles con los sistemas de expresión proteica que utilizan el promotor T7 ARN polimerasa.

CAM - cloranfenicol.

los anticuerpos relevantes. Del mismo modo las células COS-7 han sido simultáneamente co-transfectadas con plásmidos diferentes (véase Capítulo 3 de Resultados). En algunos experimentos, las células COS-7 transfectadas se han cultivado en el medio D-MEM complementado con inhibidores de la actividad proteolítica (100 μ M Leupeptin o 80 μ M Chloroquine; Sigma) o con 400 ng/ml de los péptidos sintéticos (FL-DE2-NPPB, PLP, KSW; para más detalle véase el Capítulo 3 de Resultados, Fig. 39). El péptido FL-DE2-NPPB porcino ha sido sintetizado por la compañía GenScript, mientras que los péptidos PLP y KSW han sido generados por Davids Biotechnologie. En los experimentos de co-inmunoprecipitación (Elion, Wang, 2004), las células COS-7 han sido co-transfectadas con una construcción fusionada al epítipo myc y otra al epítipo FLAG. Después de 48 h, las células co-transfectadas se han incubado (sobre hielo) en el tampón de lisis (50 mM Tris, pH 8.0; 200 mM NaCl; 1mM EDTA; 1% TX-100, complementado con inhibidores de proteasas), en agitación durante 15-30 min. Las alícuotas (100.0 μ l) de los correspondientes sobrenadantes (20000 g, 20 min, 4°C) han sido incubadas con 30.0 μ l de la suspensión de los gránulos de agarosa anti-FLAG (Sigma) en agitación durante la noche a 4°C. Los gránulos se han lavado con el tampón de lisis y las proteínas se han eluído de la resina por competición con el péptido 3xFLAG según las recomendaciones del fabricante. Los eluados se han separado mediante SDS-PAGE seguido por Western blot con los anticuerpos anti-FLAG o anti-myc (Torrado et al., 2005). En algunos experimentos, las células transfectadas con la construcción de NPPB han sido cultivadas en presencia de péptidos sintéticos que han comprendido la secuencia completa (FL) o secuencias parciales de aminoácidos (aa) de DE2-NPPB porcino, PLP y KSW (véase Capítulo 3 de Resultados; Fig. 39). Las muestras de los péptidos respectivos se han mezclado con el reactivo Transport Protein Delivery (Lonza) antes de ser añadidos al medio de cultivo para una concentración final de 400 ng/ml. Los cambios en el estado de las células

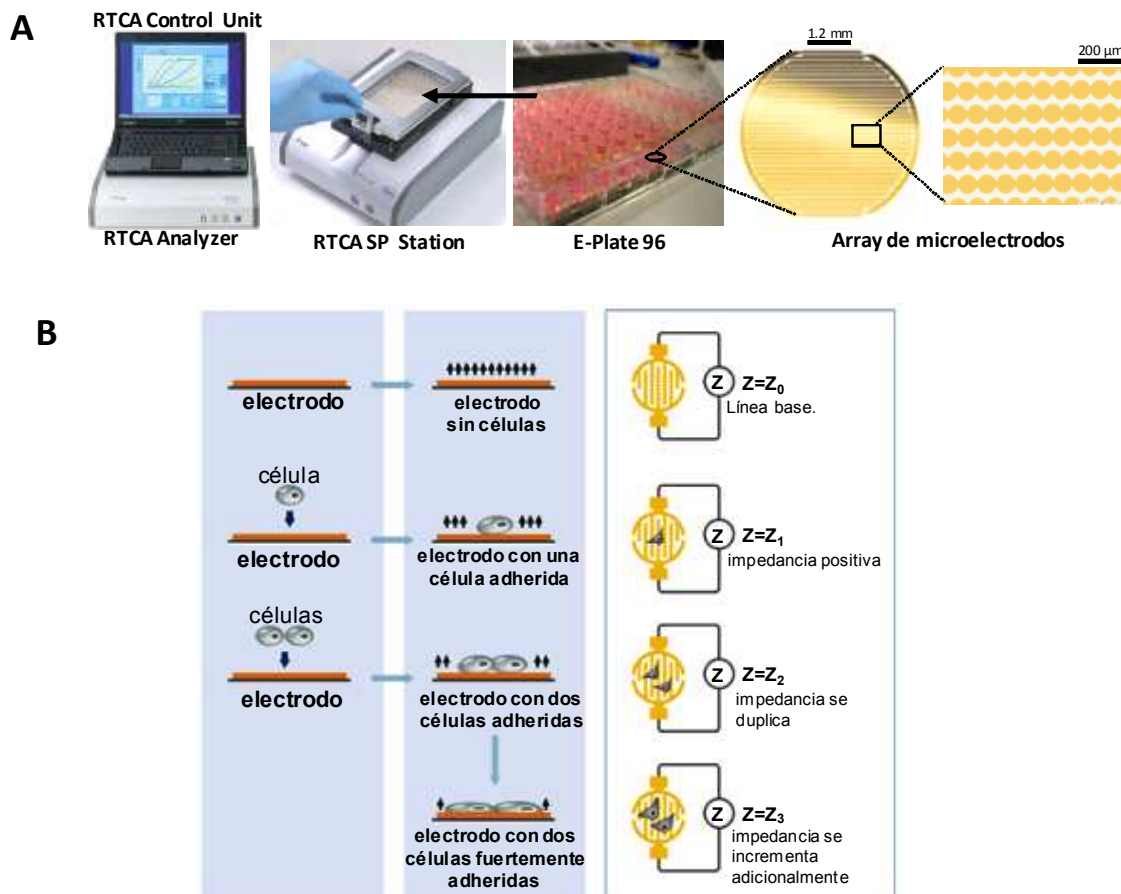


Figura 10. El equipo RTCA SP (A) y esquema del principio de la medición de la impedancia (B) (modificado de: RTCA SP Instrument Operator's Manual, Roche). **A** - El equipo RTCA (*Real-Time Cell Analyzer*) SP (*Single Plate*) consta de los siguientes 4 componentes principales: (1) *RTCA Control Unit*, (2) *RTCA Analyzer*, (3) *RTCA SP Station* y (4) *E-Plate 96*. La esencia del sistema lo constituyen los *arrays* de microelectrodos integrados en el fondo de cada uno de los 96 pocillos de la placa electrónica (*E-Plate*). La *E-Plate* se acopla al *RTCA SP Station* previamente instalado en el interior del incubador. *RTCA SP Station* transmite las señales electrónicas a *RTCA Analyzer*, siendo los datos posteriormente procesados y visualizadas mediante *RTCA Control Unit*. **B** - El equipo detecta y cuantifica de manera no invasiva los cambios en la impedancia (Z) eléctrica de los microelectrodos, es decir la oposición que presenta el circuito al paso de la corriente. Previamente al inicio de cada experimento se determina la línea base de la impedancia, es decir el valor de la impedancia correspondiente al medio de cultivo libre de células (Z_0). Tras la inoculación celular en *E-plate* el valor de la impedancia se incrementará proporcionalmente (Z_2, Z_3) en dependencia de la adhesión y la propagación celular, dado que las células adheridas actúan como aislantes locales sobre el microelectrodo. Adicionalmente otras condiciones celulares incluyendo la viabilidad y morfología celular afectan la impedancia del electrodo. El equipo permite monitorizar continuamente y en tiempo real cada uno de los 96 pocillos de la placa y durante las horas o días previamente definidos. Finalmente el equipo presenta los resultados expresados en el parámetro denominado *Cell Index* (CI), definido como un valor autocalibrado derivado de la relación de impedancias y expresado con la siguiente fórmula $CI = (Z_i - Z_0) / 15$, donde Z_i es la impedancia en un determinado tiempo durante el experimento, y Z_0 es la impedancia al comienzo del experimento. Flechas negras hacia arriba en **B** - señal eléctrica.

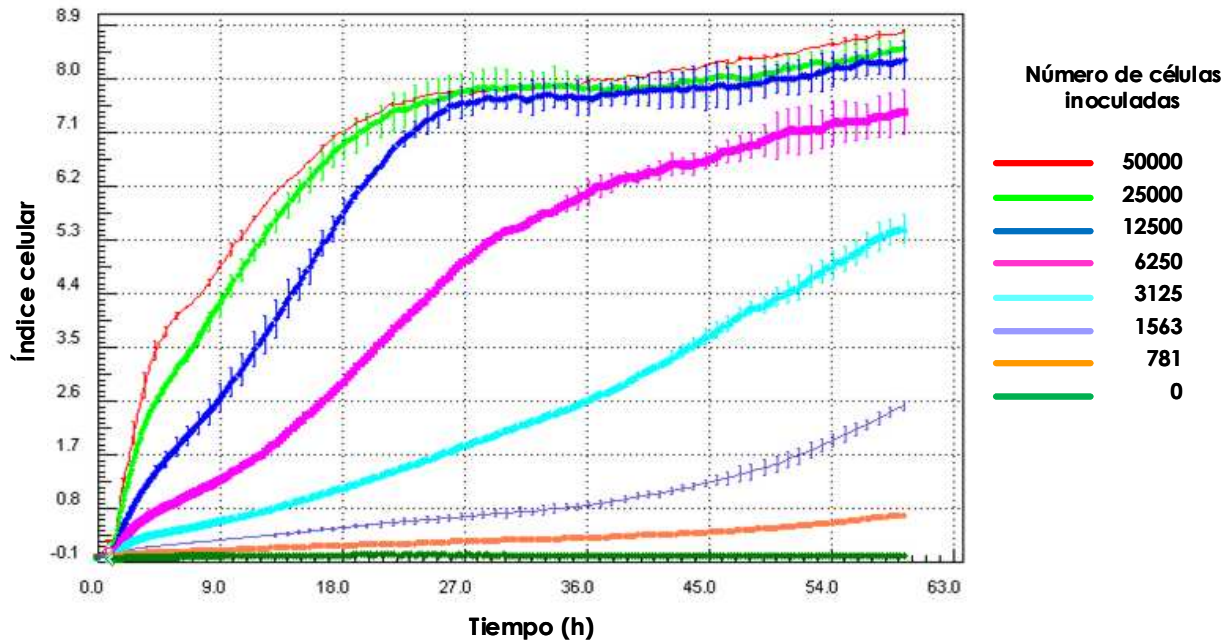


Figura 11. Experimento de titulación celular de COS-7 en el equipo RTCA SP. Células COS-7, en la cantidad indicada, han sido sembradas (por duplicado) en el tiempo 0.0 en una placa electrónica de 96 pocillos (*E-Plate 96*), conteniendo 100 μ l de medio de cultivo D-MEM (suplementado con: 10% SBF; 1x penicilina-estreptomicina-glutamina; 1mM piruvato sódico, Invitrogen). Una vez insertada *E-Plate 96* en *RTCA SP Station* (instalada dentro del incubador), los cultivos se han monitorizado continuamente usando la tecnología de impedancia mediante el equipo RTCA SP durante 60 horas. En el gráfico se muestran los resultados correspondientes a la progresión del índice celular en dependencia del tiempo indicando con barras verticales la desviación típica correspondiente a cada duplicado. Consideramos óptima una curva de progresión del índice celular que a las 24 horas tenga un valor de índice celular de aproximadamente 1/3 de su valor máximo. Con este criterio, las tres primeras curvas (generadas a partir de las mayores densidades celulares) han sido descartadas dado que alcanzan un valor máximo de índice celular a las 24 horas. Las dos últimas curvas (generadas a partir de las menores densidades celulares) han sido descartadas por presentar una progresión excesivamente lenta del índice celular. Finalmente hemos determinado que una inoculación de entre 6000 y 3000 células genera una curva de progresión óptima del índice celular con los criterios anteriormente expuestos.

transfectadas, tales como número, morfología, adhesión o viabilidad celular, se han monitorizado utilizando una plataforma de análisis celular en tiempo real (*RTCA SP Station*, Roche), instalado dentro del incubador, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dado que este equipo es reciente, presentamos los esquemas de sus bloques y comentamos brevemente el principio de la definición de los parámetros celulares (adhesión, propagación y viabilidad celular) con el uso de dicho equipamiento (Fig. 10). Determinar una concentración celular óptima es el primer paso obligatorio para poder analizar la evolución de las variables celulares a lo largo del tiempo experimental previsto. El ejemplo concreto se presenta y comenta en la Figura 11. Después de los experimentos de titulación

celular , se han añadido a cada pocillo de la placa electrónica (E-Plate 96) 100 µl de la suspensión celular apropiada (aproximadamente 4000 células). Después de 24 h de incubación, las células fueron transfectadas por cuadruplicado con los plásmidos portadores de DE2-NPPB, NPPB y los plásmidos control, la placa se ha reinsertado en el Detector RTCA y los cambios en el estado de las células transfectadas se han monitorizado mediante el Analizador RTCA durante los siguientes 2 días de cultivación.

8. Transcripción/traducción in vitro

Se ha utilizado el sistema de transcripción/traducción in vitro derivado del uso del lisado de reticulocitos de conejo (Hurst et al., 1996) y modificado por la compañía "Promega". Las secuencias codificantes de las variantes del *ankrd1* porcino se han amplificado por RT-PCR a partir del ADNc, derivado del VI de los cerdos neonatales, y se han clonado en el vector pcDNA3.1/myc-His B (Invitrogen), según se describe en el apartado 5. Los ADNp resultantes, precipitados y resuspendidos en agua libre de ARNasas se han expresado in vitro utilizando "TnT T7 Quick Coupled in vitro Transcription/Translation (IVTT) System" (Promega) según las recomendaciones del fabricante basadas en la configuración de los genes clonados bajo control del promotor T7. Las reacciones de síntesis IVTT, en presencia de metionina no marcada, se han realizado a 30°C durante 90 min. A continuación, a cada reacción IVTT se ha añadido 1/10 volumen de una solución de inhibidores de proteasas 10x (Roche). Finalmente las muestras se han desnaturalizado añadiendo un volumen igual de SBL 2X e incubándolas a 100°C durante 5 min. Los correspondientes productos proteicos sintetizados se han identificado por Western blot con anticuerpos anti-myc (Sigma).

IV. Resultados

IV. Resultados

Capítulo 1. El análisis transcripcional revela la regionalización de la expresión génica en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos

1.1. Introducción

El corazón porcino neonatal representa un modelo natural para el estudio de la remodelación asimétrica (izquierda versus derecha) del miocardio ventricular a nivel morfológico. Después del nacimiento, los cardiomiocitos de ambos ventrículos empiezan a hipertrofiarse en respuesta a las demandas hemodinámicas postnatales que son distintas de las de la circulación fetal. Particularmente, el ventrículo izquierdo (VI) se expone a una mayor carga de presión en comparación con el ventrículo derecho (VD), que se expone a una relativamente mayor carga de volumen. Como resultado, el VI se somete a una rápida hipertrofia concéntrica, caracterizada por el crecimiento lateral de los cardiomiocitos, mientras que el VD sufre hipertrofia excéntrica asociada con un crecimiento celular longitudinal y una posterior remodelación asociada a la dilatación del VD. La dicotomía entre hipertrofia concéntrica versus excéntrica se ha conocido hace tiempo, pese a lo cual las diferencias transcripcionales entre el VI y el VD en animales recién nacidos son en gran parte desconocidas, pero de especial interés, debido a los diferentes papeles funcionales de los dos ventrículos después del nacimiento. De la bibliografía disponible se pueden extraer indicios de la expresión asimétrica de algunos genes en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos (Torrado et al., 2004; Quaglietta et al., 2008). Sin embargo, los datos no son suficientes para demostrar una regionalización de la expresión génica global en el VI versus VD.

En el presente estudio, nos hemos centrado en el análisis transcripcional a gran escala para comparar las diferencias en los niveles de expresión génica en el VI en comparación con el VD en cerdos recién nacidos. Dado que las plataformas comercializadas de microarrays de ADN porcino están todavía poco desarrolladas, hemos elegido, para el análisis comparativo de la expresión génica, la tecnología de mRNA differential display (DDRT-PCR). A diferencia de los microarrays, DDRT-PCR permite detectar cambios en la expresión génica entre tejidos similares incluyendo los transcritos conocidos y los todavía no caracterizados generados por splicing alternativo (Steinau, Rajeevan, 2009). Esta estrategia nos ha permitido: (1) llevar a cabo una valoración global de genes cuya expresión está predominantemente asociada con el VI o con el VD y (2) destilar la información de la expresión génica global en un discreto conjunto de genes

candidatos cuya expresión está regionalizada en el miocardio ventricular neonatal.

1.2. Resultados

1.2.1. La tecnología DDRT-PCR es suficiente para realizar un perfilado molecular global del miocardio ventricular neonatal

Se ha estimado teóricamente que 20 oligonucleótidos arbitrarios en conjunto con 12 anclados serían suficientes para amplificar la mayor parte de las secuencias de ARNm presentes en las células de mamíferos (Yang, Liang, 2004). En este trabajo, hemos usado 23 oligonucleótidos arbitrarios y 10 anclados a la cola poli(A) (véase la Tabla 4 del Capítulo: Materiales y Métodos), que resultaron

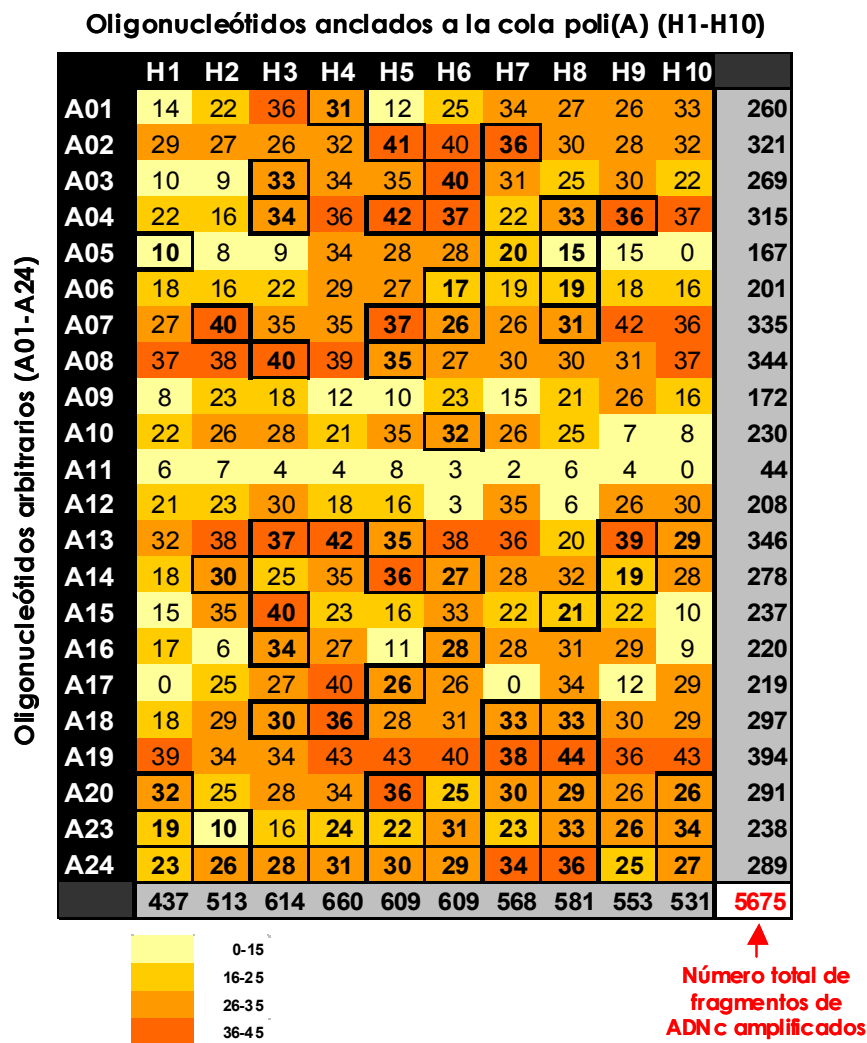


Figura 12. Representación esquemática del número de los fragmentos de ADNc generados por cada combinación de los oligonucleótidos con los ADNc del VI o del VD de cerdos recién nacidos. La escala de colores refleja la eficacia de los oligonucleótidos en cuanto al número de las bandas generadas (0-45). Las combinaciones de los oligonucleótidos que generaron por lo menos una banda de distinta intensidad entre el VI y VD ("bandas de display") están enmarcadas.

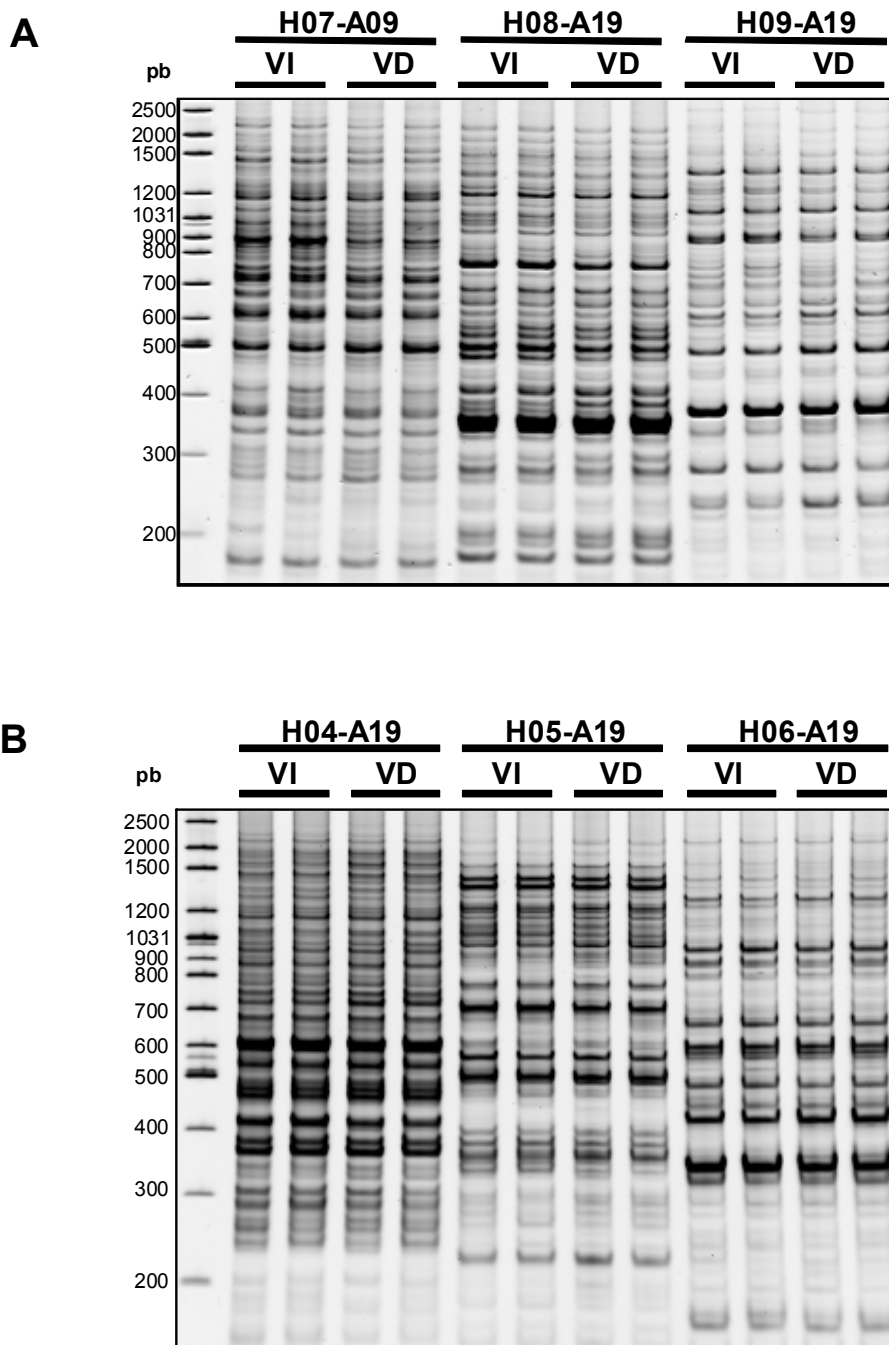


Figura 13. Análisis mediante DDRT-PCR de la expresión génica en los ventrículos izquierdo/derecho (VI/VD) de cerdos recién nacidos. A y B – imágenes representativas de geles con bandas de DDRT-PCR amplificadas con seis combinaciones distintas de oligonucleótidos (H07-A09, H08-A19, H09-A19, H04-A19, H05-A19 y H06-A19). Los patrones de bandas se reproducen eficazmente en cada réplica. Geles PAAG no desnaturalizantes del 8% teñidos con SYBR Green I. 200-2500 pb – estándares de tamaño de ADN (*GeneRuler DNA ladder mix*, Fermentas).

en 230 combinaciones del análisis DDRT-PCR. Se han detectado un total de aproximadamente 5600 fragmentos (Fig. 12) correspondientes a los transcritos presentes tanto en el VI como en el VD de cerdos recién nacidos. Es decir, bajo nuestras condiciones experimentales, no se han detectado diferencias cuantitativas en la expresión génica entre ambos ventrículos. Una muestra representativa de patrones de bandas de DDRT-PCR se ilustra en la Figura 13.

El número promedio de bandas generadas por una combinación de oligonucleótidos es de 26, el mínimo 0 y el máximo 45. Sobre el 70% de los pares de oligonucleótidos producen 20 - 40 bandas (Fig. 14A). El análisis de la distribución por tamaño de las bandas generadas por DDRT-PCR revela una fracción menor de bandas de tamaño reducido (100-300 nt), mientras que los fragmentos con un tamaño desde 300 a 1000 nt, que son preferibles para el posterior clonaje y secuenciación, constituyen más del 60% de todas las bandas amplificadas (Fig. 14B).

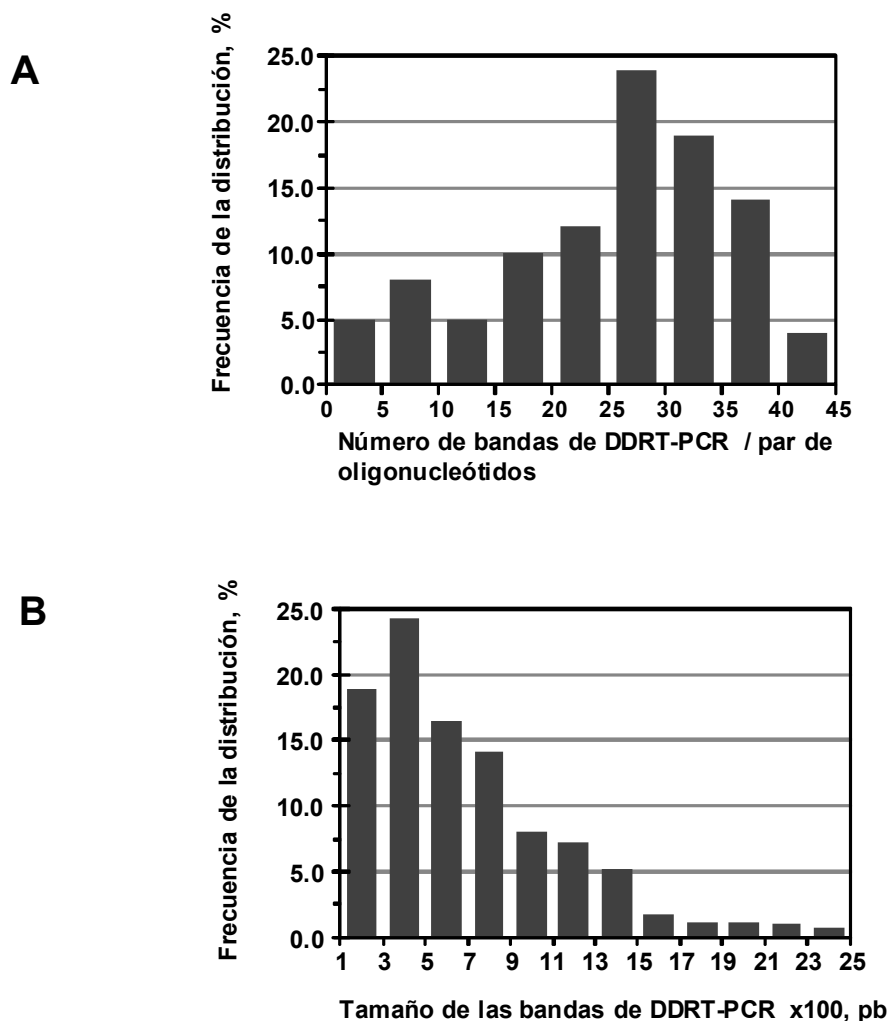


Figura 14. Frecuencias de la distribución del número (A) y tamaño (B) de bandas generadas por DDRT-PCR.

En conjunto, los resultados indicaron que, bajo nuestras condiciones experimentales, los patrones de bandas-transcriptos generados por DDRT-PCR podrían ser suficientes para un análisis comparativo global de la expresión génica en el VI versus VD de cerdos recién nacidos.

1.2.2. El análisis DDRT-PCR identifica los genes que se expresan diferencialmente entre dos ventrículos de cerdos recién nacidos

La comparación simultánea y en paralelo ("side by side") de los ARNm entre el VI y VD del corazón de cerdos recién nacidos ha revelado que la mayoría de los genes (97%) se expresan de un modo similar en ambos ventrículos. De un total de 5600 bandas amplificadas, solo 153 bandas (de 300 a 1000 nt) demostraron las diferencias cualitativas en cuanto a sus niveles de expresión entre ambos ventrículos. De estos, 96 transcriptos están enriquecidos en el VI (Fig. 15), mientras que los restantes 57 son predominantes en el VD (Fig. 16).

Una vez detectados, los fragmentos que demostraron diferencias dobles en su expresión entre los ventrículos (40 bandas) fueron recortados del gel, reamplificados, clonados y secuenciados. La expresión diferencial de estos genes se ha analizado posteriormente mediante qRT-PCR. De este modo, sobre el 80% (32 bandas) de las bandas seleccionadas se ha confirmado que se expresan de un modo diferencial en las dos cámaras ventriculares de los cerdos recién nacidos (Tabla 8).

El análisis bioinformático utilizando el programa BLAST reveló que 6 de 32 fragmentos con expresión diferencial confirmada son potencialmente nuevos transcriptos sin una similitud mínimamente significativa con las secuencias almacenadas en las bases de datos actuales, sugiriendo que pueden corresponder a genes no caracterizadas o corresponder a regiones desconocidas de genes identificados. Las 26 secuencias de ADNc restantes han sido identificadas por comparaciones BLAST como genes relacionados con la modulación de la expresión génica (PTPLAD1, PHB2, CEP290, JMJD1C), regulación del crecimiento celular y diferenciación (MSTN, MAP3K71P2, APOBEC3F), sensibilidad al estrés biomecánico y al ensamblaje miofibrilar (TTN, ANKRD1), contracción muscular (TNNT2, ACTC1, TPM2), remodelaje de la matriz extracelular (ADAMTS3, COL1A2), control del calcio (SLC8A1) y metabolismo energético (ATP5C1, ND6).

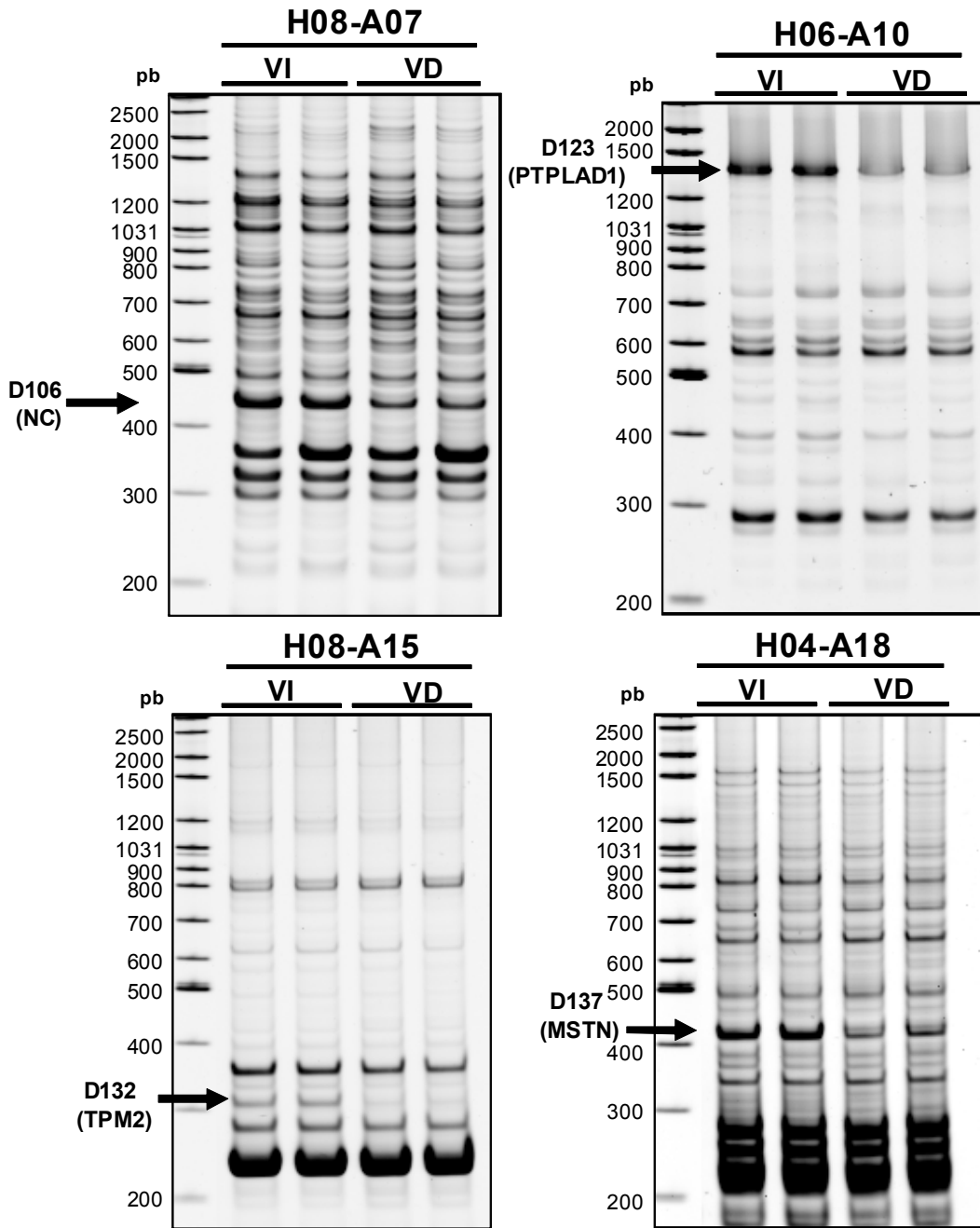


Figura 15. Ejemplos representativos de la expresión génica predominante en el ventrículo izquierdo de cerdos recién nacidos (Geles PAAG no desnaturalizantes del 8% teñidos con SYBR Green I). Flechas – las bandas (D106, D123, D132 y D137) que se corresponden con los transcritos relativamente enriquecidos en el VI. Se muestran los pares de oligonucleótidos usados para las amplificaciones de DDRT-PCR. VI/VD – ventrículo izquierdo/derecho. 200-2500 pb – estándares de los tamaños de ADN (*GeneRuler DNA ladder mix*, Fermentas). **NC** – secuencia no caracterizada; **PTPLAD1** - *protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1*; **TPM2** - *tropomyosin 2* (beta); **MSTN** – *myostatin*. Para más detalles véase la Tabla 8.

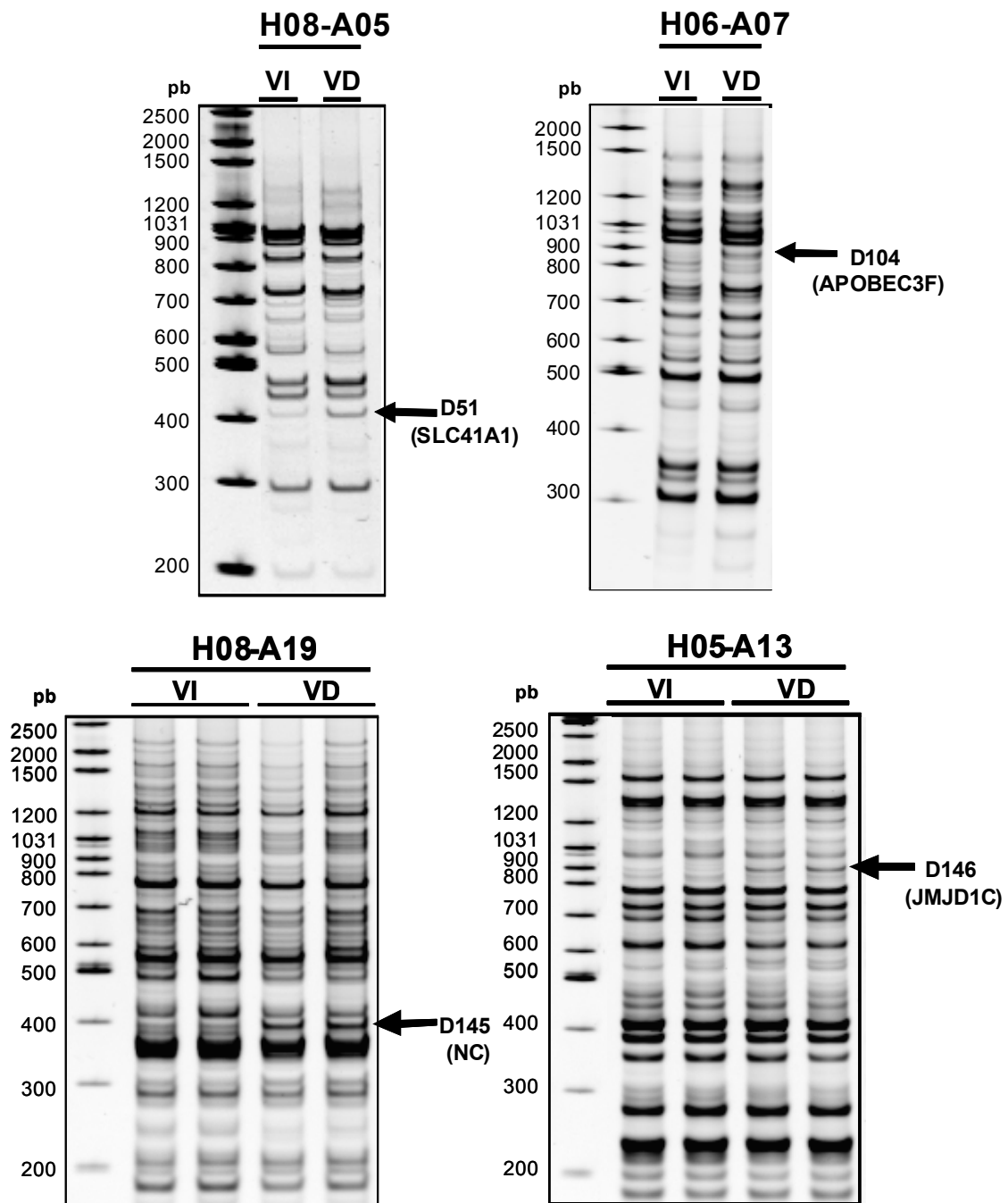


Figura 16. Ejemplos representativos de la expresión génica predominante en el ventrículo derecho de cerdos recién nacidos (Geles PAAG no desnaturalizantes del 8% teñidos con SYBR Green I). Flechas – las bandas (D51, D104, D145 y D146) que se corresponden con los transcritos relativamente enriquecidos en el VD. Se muestran los pares de oligonucleótidos usados para las ampliificaciones de DDRT-PCR. VI/VD – ventrículo izquierdo/derecho. 200-2500 pb – estándares de los tamaños de ADN (*GeneRuler DNA ladder mix*, Fermentas). **NC** – secuencia no caracterizada; **SLC41A1** - *solute carrier family 41, member 1*; **APOBEC3F** - *apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F*; **JMJD1C** - *jumonji domain containing 1C*. Para más detalles véase la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de los transcritos identificados por DDRT-PCR que se up-regulan en el VI/VD de cerdos neonatales

Identificación del Gen									
Nº banda	Tamaño, VI/VD	Tamaño, pb	Cambio en Oligos	Símbolo del gen	Nº acceso GenBank	Coincidencia pares de bases	Especies	Función	
D005	VI	250	H01-A05	2.1 ± 0.3	TTN	AJ560658	98%	<i>S. Scrofa</i>	sistema sensor del estiramiento miofibrilar
D015	VI	500	H03-A04	1.7 ± 0.2	MAP3K7IP2	NM_015093	94%	<i>H. sapiens</i>	proliferación y señalización anti-apoptótica
D024	VI	275	H04-A01	1.5 ± 0.2	TNNT2	AY277394	71%	<i>H. sapiens</i>	regulación de la contracción muscular
D034	VI	450	H06-A03	2.1 ± 0.3	ATP5C1	NM_005174	86%	<i>H. sapiens</i>	síntesis de ATP
D036	VI	400	H06-A04	4.2 ± 0.3	ANKRD1	FJ475066	100%	<i>S. scrofa</i>	intrón 8 de ANKRD1
D046	VI	400	H08-A01	2.0 ± 0.3	ADAMTS3	BC132735	88%	<i>H. sapiens</i>	enzima de degradación de la matriz extracelular
D106	VI	450	H08-A07	2.2 ± 0.4	sin homología	-	-	-	-
D123	VI	1400	H06-A10	4.2 ± 0.2	PTPLAD1	NM_001103316	90%	<i>B. taurus</i>	modulación de la expresión génica
D128A	VI	900	H05-A14	2.3 ± 0.2	SLC8A1	NM_001112802	87%	<i>H. sapiens</i>	control del nivel de calcio
D128B	VI	900	H05-A14	3.2 ± 0.5	CTSH	EU532429	79%	<i>S. scrofa</i>	degradación de proteínas en los lisosomas
D130	VI	800	H06-A14	4.2 ± 0.4	PDE3A	XM_520783	77%	<i>P. troglodytes</i>	hidrólisis de nucleótidos cíclicos
D132	VI	310	H08-A15	5.6 ± 0.4	TPM2	NG_011620	80%	<i>H. sapiens</i>	regulación de la contracción muscular
D133	VI	350	H10-A13	2.1 ± 0.4	SERPINB9	NM_004155	73%	<i>H. sapiens</i>	inactivación de las serin proteasas
D134	VI	200	H08-A18	2.6 ± 0.4	ND6	AY063320	96%	<i>H. sapiens</i>	producción de ATP
D137	VI	415	H04-A18	2.6 ± 0.4	MSTN	AY208121	95%	<i>S. scrofa</i>	regulador negativo del crecimiento muscular
D144	VI	180	H03-A18	4.0 ± 0.2	ACTC1	FM212567	83%	<i>S. scrofa</i>	ensamblaje del aparato contráctil
D147	VI	500	H02-A07	3.7 ± 0.3	INHBA	NM_214028	86%	<i>S. scrofa</i>	remodelaje del miocardio y reparación tisular
D151A	VI	435	H05-A07	2.1 ± 0.3	sin homología	-	-	-	-
D151B	VI	435	H05-A07	1.6 ± 0.2	COL1A2	NG_007405	77%	<i>H. sapiens</i>	formación del colágeno fibrilar
D153	VI	300	H05-A02	1.6 ± 0.3	PHB2	NM_001046198	80%	<i>B. taurus</i>	regulación de la represión transcripcional
D155	VI	930	H10-A23	9.2 ± 0.3	ANKRD1	NM_213922	100%	<i>S. scrofa</i>	sistema sensor del estiramiento miofibrilar
D162	VI	930	H05-A23	4.1 ± 0.5	sin homología	-	-	-	-
D165	VI	1000	H03-A24	2.1 ± 0.4	sin homología	-	-	-	-
D170	VI	360	H06-A21	10.8 ± 0.7	NPPB	NM_213846	100%	<i>S. scrofa</i>	exón 1 y 3 de NPPB**
D006	VD	600	H01-A05	2.5 ± 0.4	sin homología	-	-	-	-
D42B	VD	600	H07-A01	3.1 ± 0.2	CEP290	NM_025114	89%	<i>H. sapiens</i>	activación de la transcripción (vía el factor ATF-4)
D050	VD	450	H08-A04	2.0 ± 0.5	SPTBN1	AB371586	92%	<i>H. sapiens</i>	determinación del tipo celular
D051	VD	400	H08-A05	1.9 ± 0.2	SLC41A1	NM_173854	78%	<i>H. sapiens</i>	transportador de magnesio
D103	VD	350	H06-A12	5.5 ± 0.2	TNMD	XM_001088536	69%	<i>M. mulatta</i>	inhibidor de la angiogénesis
D104	VD	900	H06-A07	2.1 ± 0.3	POBEC3F	FJ042939	83%	<i>S. scrofa</i>	control del crecimiento y del ciclo celular
D145	VD	375	H08-A19	3.3 ± 0.4	sin homología	-	-	-	-
D146	VD	850	H05-A13	1.9 ± 0.2	JMJD1C	NM_032776	91%	<i>H. sapiens</i>	activación transcripcional dependiente de hormonas

*Cambios en los folds determinados por qPCR. **La secuencia de la banda D170 presenta homología con las secuencias del exón 1 y 3 del gen porcino *nppb*.

ACTC1 - actin, alpha, cardiac muscle 1; **ADAMTS3** - ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 3; **ANKRD1** - ankyrin repeat domain 1 (músculo cardíaco); **ANKRD1-i8** - ANKRD1 retaining intron 8; **POBEC3F** - apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F; **ATF-4** - activating transcription factor 4; **ATP5C1** - ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1; **CEP290** - centrosomal protein 290kDa; **COL1A2** - collagen, type I, alpha 2; **CTSH** - cathepsin H; **INHBA** - inhibin, beta A; **JMJD1C** - jumonji domain containing 1C; **MAP3K7IP2** - mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2; **MSTN** - myostatin; **ND6** - mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6; **NPPB** - natriuretic peptide precursor B; **PDE3A** - phosphodiesterase 3A, cGMP-inhibited; **PHB2** - prohibitin 2; **PTPLAD1** - protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1; **SERPINB9** - serpin peptidase inhibitor, clade B (ovoalbumina), member 9; **SLC41A1** - solute carrier family 41, member 1; **SLC8A1** - solute carrier family 8 (intercambiador de sodio/calcio), member 1; **SPTBN1** - spectrin, beta, non-erythrocytic 1; **TNMD** - tenomodulin; **TNNT2** - troponin T type 2 (cardíaca); **TPM2** - tropomyosin 2 (beta); **TTN** - titin. **VI/VD**; ventrículo izquierdo/ventrículo derecho. **pb**; pares de bases.

La Tabla 8 presenta los genes identificados con expresión diferencial entre los dos ventrículos y proporciona detalles del grado de la modulación de la expresión VI/VD dependiente y sus funciones conocidas. De los genes que se expresan diferencialmente, se destaca un número reducido de los transcritos cuyos niveles de la expresión se caracterizan por una diferencia, al menos en 4 veces entre los dos ventrículos (PTPLAD1, TPM2, ACTC1, ANKRD1, ANKRD1-i8, PDE3A, D162, TNMD, D170). Según este criterio, es posible especular que estos genes sean candidatos en el análisis de las manifestaciones moleculares relacionadas con la remodelación hipertrófica del VI (hipertrofia concéntrica) en comparación con el VD (hipertrofia excéntrica).

MSTN (miostatina), con la expresión predominante en el VI de cerdos recién nacidos, también podría ser un candidato interesante, teniendo en cuenta sus papeles en la hipertrofia y proliferación celular. Recientemente, se ha demostrado que MSTN es un potente represor de la proliferación de cardiomiocitos, y que la inactivación condicional del gen *mstn* in vivo resulta en el desarrollo de la hipertrofia excéntrica asociada con un aumento de la sensibilidad de los cardiomiocitos ventriculares a la estimulación beta-adrenérgica (Rodgers et al., 2009; Callis et al., 2009). Nosotros, por lo tanto, examinamos la expresión de este gen en ambos ventrículos en estados avanzados del desarrollo postnatal porcino cuando las diferencias morfológicas entre los distintos patrones de la hipertrofia ventricular se ponen de manifiesto, p.e. en cerdos de 20 días de edad. Si en cerdos recién nacidos el grosor de la pared libre es similar en ambas ventrículos, en cerdos de 20 días de edad, el grosor de la pared libre del VI supera al del VD en, al menos, 2 veces (Fig. 17). El ratio VI/VD de los niveles del ARNm de MSTN encontrado en cerdos recién nacidos (2:1) se cambia significativamente en animales de 20 días (6:1) debido a la up-regulación de *mstn* en el VI de este último grupo, mientras que los niveles de expresión de *mstn* en el VD se mantienen similares en los dos grupos estudiados (Fig. 18). Los resultados indican que en cerdos, en los estadios avanzados del desarrollo postnatal, el proceso de la remodelación hipertrófica del VD (hipertrofia excéntrica) está asociada con el mismo bajo nivel de la expresión de *mstn* que se detecta en el VD al nacimiento. Estos datos son complementarios a los que ya citamos anteriormente y según los cuales la disminución de la expresión de *mstn* favorece al desarrollo de la hipertrofia excéntrica (Rodgers et al., 2009; Callis et al., 2009).

En su conjunto, la comparación de la expresión génica entre el VI y VD de cerdos recién nacidos, cuando las condiciones de la carga hemodinámica entre el VI y VD se cambian dramáticamente en comparación con el período fetal,

permitió identificar genes cuya expresión está diferencialmente regulada entre las dos cámaras ventriculares antes de las manifestaciones morfológicas de la hipertrofia concéntrica (VI) o excéntrica (VD).

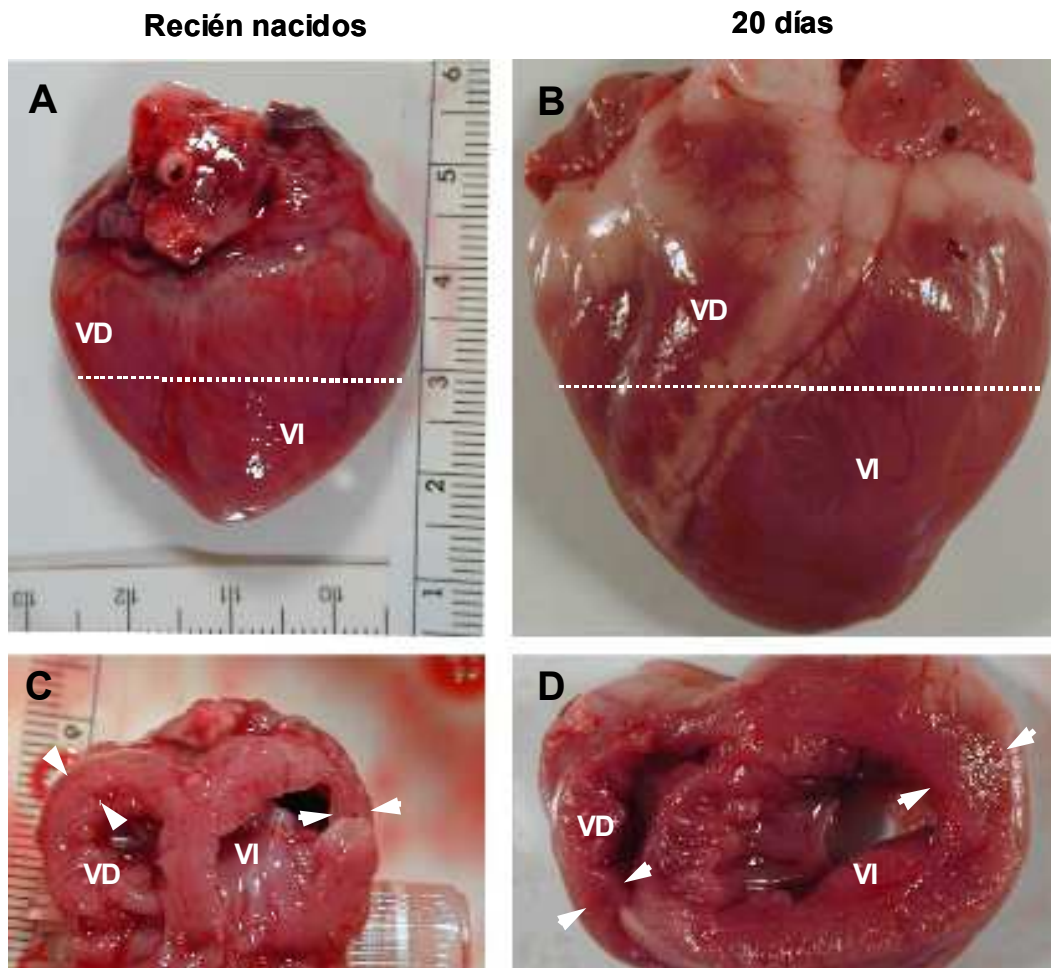


Figura 17. Dimensiones cardíacas (A, B) y secciones transversales del ventrículo izquierdo/derecho (C, D) de cerdos neonatales. A, B – los niveles de las secciones transversales se indican mediante líneas de puntos. **C, D** – los bordes de la pared libre del VI/VD (el grosor de la pared) están marcadas por flechas blancas. VI/VD – ventrículo izquierdo/derecho.

1.3. Comentario: Logros y propuestas

La técnica de DDRT-PCR, que fue desarrollada por primera vez en 1992 (Liang, Pardee, 1992), es todavía el método de preferencia para una comparación de los patrones de expresión génica entre muestras que son muy similares, y a menudo resulta en la identificación de los transcritos no abundantes, raros o de nuevas formas del splicing alternativo (Shen, 2001; Tesfaye et al., 2003; Steinau, Rajeevan, 2009).

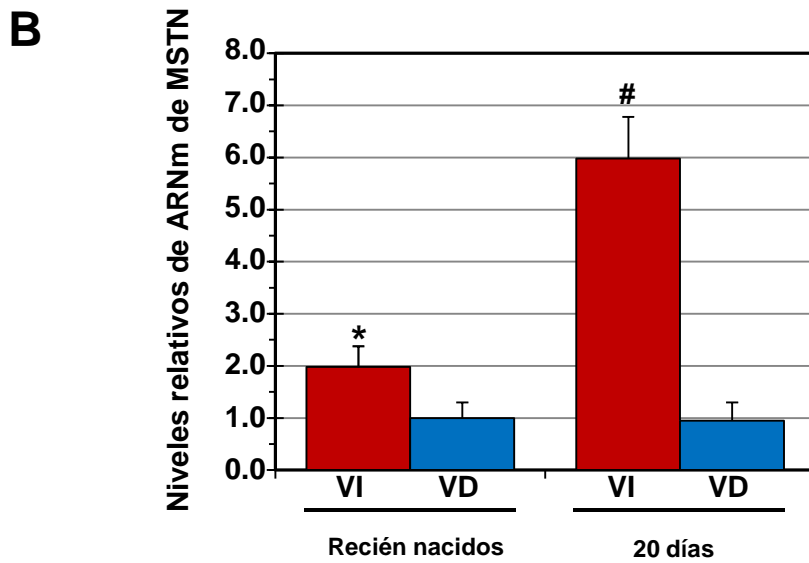
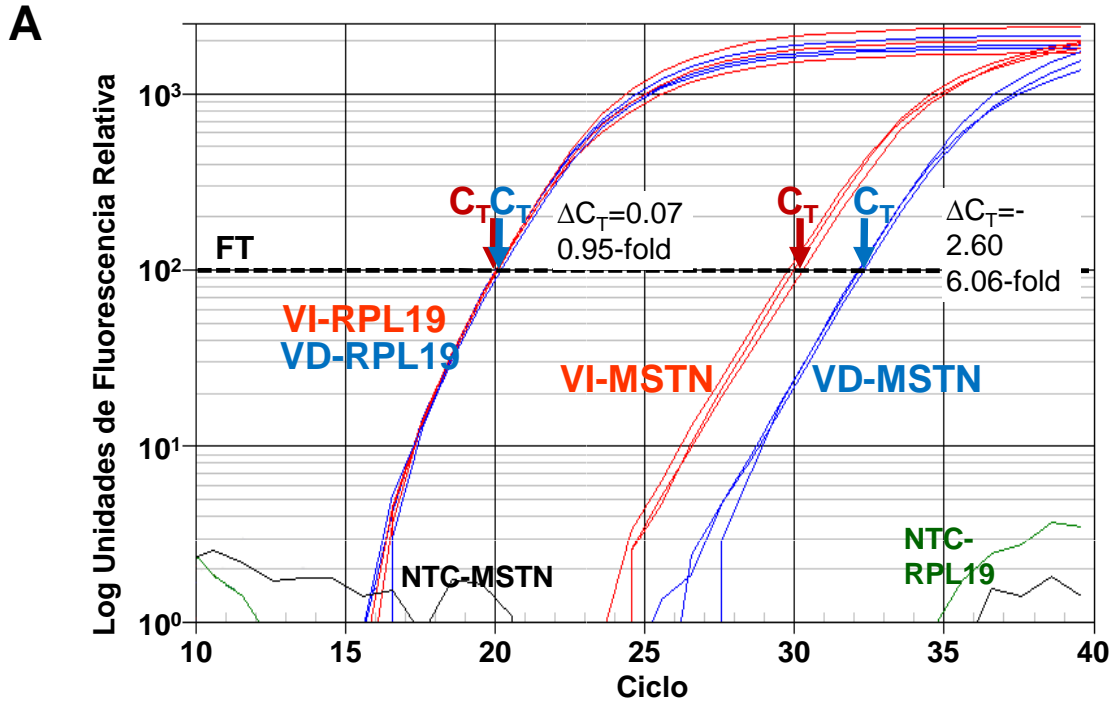


Figura 18. Estimación de los niveles de ARNm de *myostatin* (MSTN) en el VI y VD de cerdos recién nacidos y de 20 días. **A** – Gráfico representativo del análisis qPCR de los niveles de ARNm MSTN (gen diana) y RPL19 (gen de referencia) en el VI (rojo) y VD (azul) de tres corazones de cerdos de 20 días. Flechas – ciclo umbral (CT – *threshold cycle*). FT – umbral de fluorescencia (*fluorescence threshold*). ΔC_T – diferencias en los ciclos umbrales para los genes diana y de referencia. NTC – controles sin *template*. **B** – niveles de ARNm de MSTN en el VI/VD de cerdos recién nacidos y de 20 días. * $p \leq 0.05$, cerdos recién nacidos ($n=3$). # $p \leq 0.05$, cerdos de 20 días ($n=3$). VI/VD- ventrículo izquierdo/ventrículo derecho.

Usando la variante de DDRT-PCR no radiactiva, identificamos los transcritos que muestran diferentes niveles de expresión entre el VI y VD de cerdos recién nacidos. Estas diferencias no se correlacionan ni con el volumen celular de los cardiomiocitos (Beinlich et al., 1995) ni con el grosor de la pared ventricular (véase Fig. 17C), que son prácticamente iguales en ambos ventrículos de los animales recién nacidos. El contenido de los marcadores establecidos de la hipertrofia concéntrica (beta-myosin heavy chain y myosin light chain 2 ventricular) es similar en ambos ventrículos de cerdos recién nacidos (Torrado et al., 2004). Por otra parte, los niveles de expresión del cofactor transcripcional, myocardin, que induce la hipertrofia de los cardiomiocitos ventriculares (Badorff et al., 2005; Xing et al., 2006), son iguales en ambos ventrículos de estos animales (Torrado et al., 2003). Por lo tanto, parece razonable interpretar las diferencias en la expresión génica detectadas en nuestro trabajo como el reflejo de una predisposición molecular diferente del miocardio izquierdo/derecho a los cambios en las cargas hemodinámicas que se producirán poco después del nacimiento, cuando el VI se expone preferiblemente a una sobrecarga de presión (condición que favorece la hipertrofia concéntrica) en comparación con el VD que se expone preferiblemente a una sobrecarga de volumen (condición que favorece la hipertrofia excéntrica).

La gran mayoría de los transcritos que se expresan diferencialmente entre el VI y VD de cerdos recién nacidos corresponden a los genes que no se han identificado previamente como los genes con la expresión asimétrica en el miocardio ventricular, con la excepción de aquellos que codifican para: beta-spectrin (Tabibiazar et al., 2003); ANKRD1 (Torrado et al., 2004); NPPB (Kaufman et al., 2008; Torrado et al., 2004); calcium ATPase, matrix metalloproteinases, type 1 procollagens, y troponin (Chugh, 2003). Adicionalmente, se ha demostrado el enriquecimiento de los transcritos de fibronectina, alpha-myosin heavy chain y transforming growth factor (Boluyt et al., 1994), cytochrome c oxidase e isoformas cardíacas de uncoupling proteins (Zungu et al., 2008) en el VI en comparación con el VD en roedores.

En el presente trabajo, el análisis bioinformático de los 32 ADNc seleccionados reveló al menos dos secuencias que podrían corresponder a las variantes de splicing alternativo de los genes que juegan un papel importante tanto en la hipertrofia como en la insuficiencia cardíaca, en concreto: (1) ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1) y (2) natriuretic peptide precursor B (NPPB). En este sentido, la secuencia de la banda D36 (véase la Tabla 8) es completamente idéntica a la

localizada dentro del intrón 8 del gen porcino *ankrd1* mientras que el fragmento D170 (véase la Tabla 8) presenta homología con las secuencias del exón 1 y 3 (pero no con el exón 2) del gen porcino *nppb*. Por todo ello, sería interesante probar si desarrollando el estudio de estos transcritos parciales pudiésemos identificar y caracterizar nuevas variantes de ANKRD1 y NPPB. Como se demostrará a continuación, los análisis realizados según esta dicotomía experimental resultaron en la identificación, caracterización y análisis de la expresión de nuevas variantes/isoformas de ambos genes bajo diferentes condiciones experimentales.

IV. Resultados

Capítulo 2. ANKRD1/CARP: La retención de intrones genera las variantes nuevas que se expresan en el miocardio normal y patológico

2.1. Introducción

La proteína ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1), también conocida como cardiac ankyrin repeat protein o CARP, pertenece a la familia de muscle ankyrin repeat proteins (MARPs) que incluye, aparte de ANKRD1, proline-rich ankyrin repeat protein (ANKRD2/ARPP) y diabetes related ankyrin repeat polypeptide (ANKRD23/DARP). Todos los miembros de esta familia proteica se caracterizan por: (1) la presencia de cuatro repeticiones del dominio ankyrin en su región C-terminal (véase Fig. 23), (2) la capacidad para interactuar con la proteína filamentosa elástica del tejido muscular, titina, y (3) una doble distribución nuclear y sarcomérica similar en los miocitos del corazón y músculo esquelético (Granzier, Labeit, 2004; Miller et al., 2004; Mikhailov, Torrado, 2008).

Inicialmente, la proteína ANKRD1 ha sido identificada como un co-factor de transcripción implicado en la regulación de la expresión génica cardíaca durante el desarrollo fetal (Zou et al., 1997). Más tarde, *ankrd1* ha sido caracterizado como un gen inducible que se sobre-expresa en el corazón fetal, postnatal y adulto en respuesta a múltiples formas de estrés cardiovascular (Mikhailov, Torrado, 2008). Aunque las funciones de ANKRD1 en el miocardio no están todavía bien delineadas, los resultados experimentales disponibles enfatizan el papel de esta proteína en: (1) la protección de las células cardíacas (Han et al., 2005) y endoteliales microvasculares (Samaras et al., 2007) frente a la apoptosis y (2) la respuesta adaptativa del miocardio ventricular al estrés biomecánico, remodelación hipertrófica y disfunción sarcomérica (Miller et al., 2003; Blais et al., 2005; Mikhailov, Torrado, 2008). Además, *ankrd1* ha sido también identificado como un gen candidato que puede jugar un papel importante en el proceso del desarrollo de la insuficiencia cardíaca congénita (Cinquetti et al., 2008) y de la cardiomiopatía hipertrófica (Arimura et al., 2009), dilatada (Duboscq-Bidot et al., 2009; Moulik et al., 2009) o arritmogénica (Wei et al., 2009).

El gen *ankrd1*, estructurado en 9 exones y los respectivos 8 intrones, está altamente conservado en mamíferos. En la bibliografía disponible no hemos encontrado referencias a las formas de splicing alternativo del ANKRD1, excepto al transcrito maduro sin intrones que codifica un producto proteico con un peso

molecular aparente de 39-40 kDa (Zou et al., 1997; Torrado et al., 2004, 2006). Recientemente, se han publicado los resultados preliminares que permiten suponer que un transcripto de *ankrd1* con retención de intrones se exprese en los cardiomiocitos neonatales de rata en respuesta a una estimulación con endotelina (Cullingford et al., 2008).

Aunque un nivel alto del ARNm del gen *ankrd1*, inducido en el miocardio por el estrés, resulta de una rápida activación de la transcripción del gen (Kanai et al., 2001), existen ciertas indicaciones que permiten suponer que la regulación post-transcripcional podría también jugar un papel importante en el mantenimiento de altos niveles del transcripto y la abundancia de la proteína ANKRD1 en el miocardio estresado (Zolk et al., 2003; Samaras et al., 2007; Witt et al., 2008).

La retención de intrones es uno de los mecanismos de la regulación post-transcripcional de la expresión génica en respuesta a varias condiciones de estrés (Nurmi et al., 2005; Bowman et al., 2006; Yoshida et al., 2006; Fernandes et al., 2007). Así, está demostrado que la presencia de un intrón en un transcripto maduro puede aumentar tanto la expresión génica (Korb et al., 1993; Le Hir et al., 2003; Nott et al., 2003; De Jaco et al., 2005) como la estabilidad del transcripto (Wang et al., 2007; Zhao, Hamilton, 2007).

A continuación, presentamos los resultados de la identificación y caracterización de las variantes de splicing del transcripto primario *ankrd1* no reconocidas previamente, cada una caracterizada por la retención de diferentes intrones en la versión final de los ARNms que se expresan en el miocardio neonatal y adulto en cerdos y humanos tanto en condiciones normales como patológicas. El punto inicial crucial para desarrollar este bloque experimental ha sido la identificación (utilizando la tecnología DDRT-PCR) de un transcripto parcial (es decir, la banda D36, véase la Tabla 8 del Capítulo 1: Resultados) cuya secuencia reveló un alineamiento perfecto con la secuencia localizada dentro del intrón 8 del gen porcino *ankrd1*.

2.2. Resultados

2.2.1. Las variantes del gen *ankrd1* que retienen el intrón 8 se expresan en el corazón porcino neonatal

En el proceso del análisis transcripcional de la regionalización de la expresión génica en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos (véase Capítulo 1: Resultados) hemos detectado, entre otras, cinco bandas relativamente

enriquecidas en los patrones de amplificación del VI en comparación con el VD (bandas DD36, DD155, DD159, DD160 y DD161; Véase Fig. 19A-C). Estos fragmentos fueron reamplificados, clonados y secuenciados; la identificación posterior se llevó a cabo por análisis BLAST. Las secuencias de las bandas DD155, DD160 y DD161 (Fig. 19B-C) demostraron una homología completa con las secuencias del exón 8-9 del transcrito *ankrd1* porcino (Fig. 20A). En la separación electroforética de los productos del DDRT-PCR se ha observado una diferencia en el tamaño (>100 pb) entre los fragmentos DD160 y DD161, aunque se ha usado el mismo par de oligonucleótidos para su amplificación (oligonucleótidos A23-H04; Fig. 19C). El análisis de las secuencias ha revelado que la razón aparente para que el ADNc DD161 esté truncado es la presencia de una cadena de adeninas adicional (localizada 100 pb upstream de la cola poli(A) canónica del transcrito ANKRD1) que permite al oligonucleótido H04 hibridar. En general, estos resultados representan una confirmación adicional de la distribución predominante del transcrito de ANKRD1 sin intrones en el VI de cerdos recién nacidos (Torrado et al., 2004).

Los otros dos fragmentos (las bandas DD36 y DD159; véase Fig. 19A, C), amplificados con el uso de diferentes combinaciones de oligonucleótidos, no mostraron similitudes significativas con las secuencias de algún ARNm completo

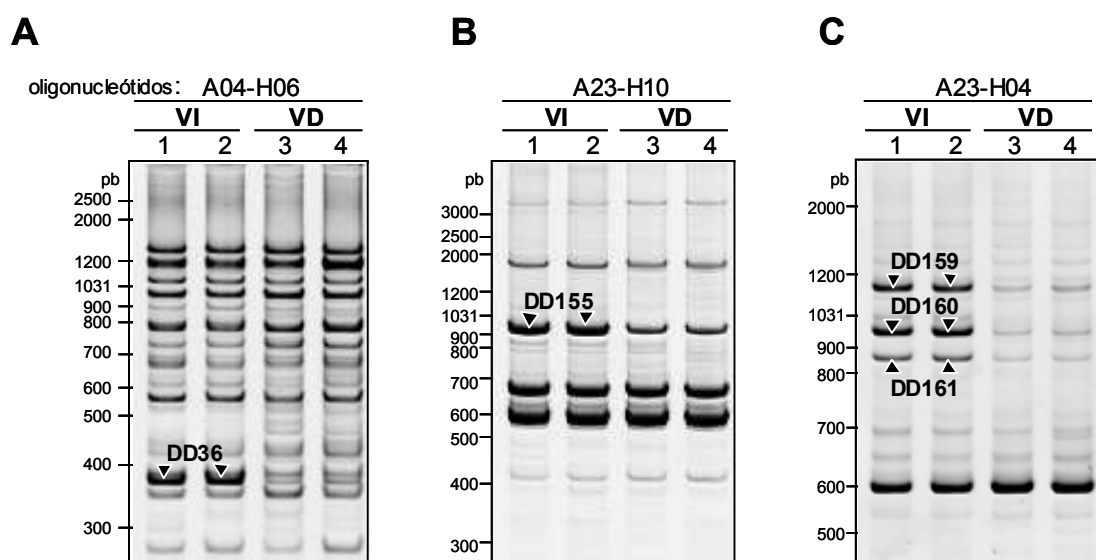


Figura 19. Identificación de las variantes de *splicing* de *ankrd1* porcino. A-C- patrón de bandas representativo en los análisis de DDRT-PCR que muestra los fragmentos de PCR *up*-regulados en el ventrículo izquierdo (VI) en comparación con el ventrículo derecho (VD) de cerdos recién nacidos (las muestras se han cargado por duplicado). Gels de poliacrilamida no desnaturalizantes del 8% teñidos con SYBR Green I. Las flechas negras indican las bandas del *display* que demuestran una expresión predominante en el VI, que han sido reamplificadas, clonadas y secuenciadas. El análisis de las secuencias ha revelado que las 5 bandas corresponden a diferentes transcritos del gen *ankrd1*. En la izquierda- estándares del tamaño del ADN (*GeneRuler DNA ladder mix*; Fermentas).

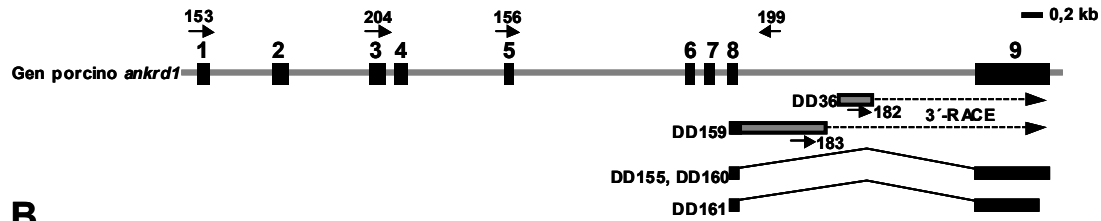
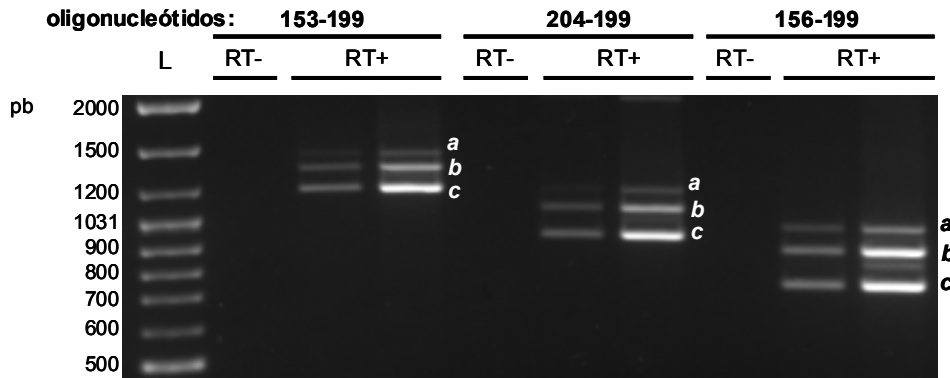
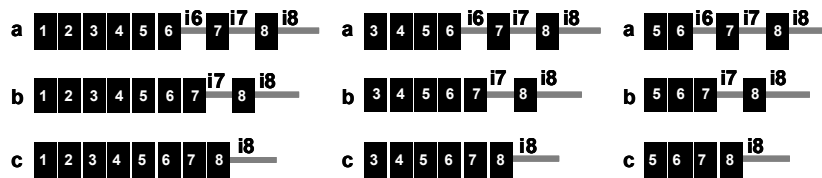
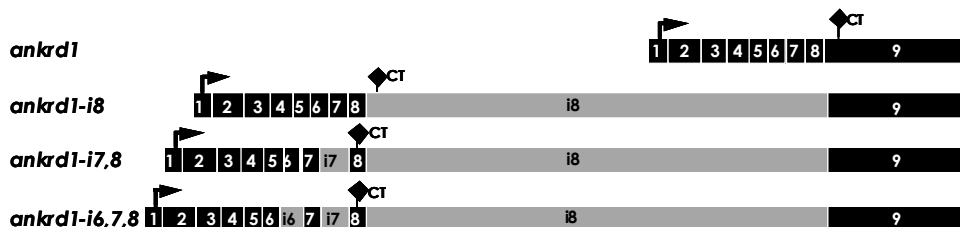
A**B****C****D**

Figura 20. Caracterización de las variantes de *splicing* de *ankrd1* porcino generadas por retención de intrones. **A** - representación esquemática del gen *ankrd1* porcino (GeneID: 396959), fragmentos DD36 y DD159, sus productos de PCR 3'-RACE (flechas con líneas de puntos), y fragmentos DD155, DD160 y DD161 (después del alineamiento de las secuencias de los fragmentos con la del gen *ankrd1* porcino). Los exones están indicados con rectángulos negros numerados y los intrones con líneas horizontales grises. Se muestra la localización aproximada de los oligonucleótidos para el análisis de PCR. **B** - expresión de tres variantes de *splicing* de *ankrd1* (a, b, c) se revela por PCR a partir del ADNc (que se ha sintetizado con un oligo-dT) procedente del VI porcino usando los pares de oligonucleótidos que se indican. Las reacciones se han cargado por duplicado usando diluciones (2x) de ADNc (RT+). RT-: control no-RT. L- tamaño de los estándares de ADN (*GeneRuler DNA ladder mix*; Fermentas). **C** - representación esquemática de la organización estructural de cada uno de los productos de PCR generados por retención de: **(a)** intrones 6, 7 y 8, **(b)** intrones 7 y 8, y **(c)** intrón 8. Los exones e intrones (i) están representados en negro y gris, respectivamente. **D** - estructura proteica de las variantes de *ankrd1* sin intrones y que retienen intrones. CT- codón de terminación.

conocido, pero resultaron completamente idénticos a las secuencias localizadas dentro del intrón 8 del gen *ankrd1* porcino (Fig. 20A), así como, a varias secuencias EST (Fig. 21A). Adicionalmente, la banda DD159 contiene un tramo de secuencia que revela alineamiento perfecto con la secuencia dentro del exón 8 del gen *ankrd1* porcino (véase Fig. 20A). Aunque las secuencias de las bandas DD36 y DD159 se han localizado dentro del intrón 8, no se solapan. La RT-PCR, con el uso de un oligonucleótido directo, que se hibrida en la unión del exón 8/intrón 8 de la secuencia de DD159, y un oligonucleótido reverso, que se hibrida con la secuencia de DD36, resultó en la generación de los amplicones, cada uno de los cuales contiene las secuencias DD159 y DD36 inter-posicionadas por 160 pb (datos no mostrados).

En su conjunto, hemos interpretado estos resultados como una indicación de que varios transcritos del gen *ankrd1*, sin o con intrones, se co-expresan en el

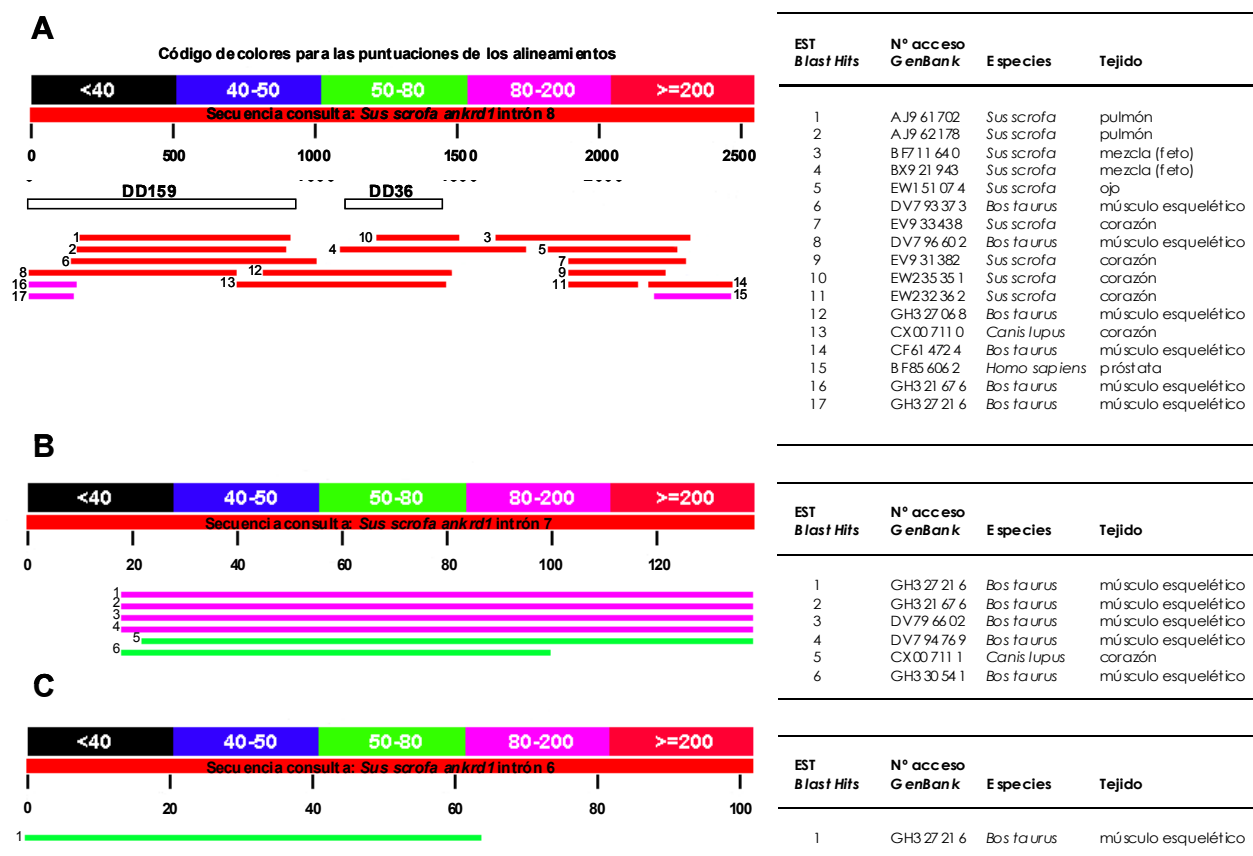


Figura 21. Resultados del análisis BLAST para los intrones 8, 7 y 6 del gen *ankrd1* porcino en la base de datos NCBI EST. Las secuencias del intrón 8 de *ankrd1* porcino (A), del intrón 7 (B) y del intrón 6 (C) fueron usadas como consultas. Para cada consulta se muestran la gráfica con el alineamiento según la puntuación (izquierda) y la tabla con el resumen (derecha). **A** – de los 17 ESTs con similitud a la secuencia del intrón 8 de *ankrd1* porcino, once derivan de ESTs de las librerías de expresión en el corazón y músculo esquelético. Los rectángulos blancos – bandas DD159 y DD36 (véase la Fig. 19). **B** – todos los ESTs con similitud a la secuencia del intrón 7 de *ankrd1* porcino se expresan en los tejidos del corazón y del músculo esquelético. **C** – EST (con una mínima puntuación de alineamiento) con similitud a la secuencia del intrón 6 de *ankrd1* porcino se expresa en el tejido del músculo esquelético.

miocardio ventricular de cerdos recién nacidos, con niveles más altos en el VI en comparación con el VD.

2.2.2. Varias configuraciones de los transcritos de *ankrd1* que retienen el intrón 8 se detectan en el corazón porcino neonatal

Basándose en los resultados de la identificación de las bandas DD36 y DD159 como los transcritos parciales con la homología nucleotídica con el intrón 8 del gen *ankrd1* porcino, aplicamos distintas estrategias para determinar las secuencias correspondientes completas. La amplificación del extremo 3' de la secuencia DD36 (oligonucleótido directo 182) y de la DD159 (oligonucleótido directo 183), mediante PCR para 3'-RACE, resultó en la generación de los amplicones con las secuencias correspondientes a las del intrón 8 y del exón 9, indicando que las bandas DD36 y DD159 sí que pertenecen a los transcritos *ankrd1* que retienen el intrón 8 (véase Fig. 20A). Desafortunadamente, la amplificación del extremo 5' mediante RACE de cada una de estas bandas (usando un oligonucleótido reverso complementario al oligonucleótido directo 182) no fue suficientemente eficaz para el análisis posterior.

Debido a este problema y para extender las secuencias DD36 y DD159 al extremo 5', aplicamos el análisis mediante RT-PCR con el uso de los oligonucleótidos específicos de secuencias internas entre el exón 1, 3 o 5 y el intrón 8 del gen porcino *ankrd1*. Cada combinación de oligonucleótidos, empleados en el análisis del ADNc del VI porcino, amplificó tres productos de PCR de tamaños diferentes (Fig. 20B). Al menos 6 clones plasmídicos correspondientes a cada uno de los productos de PCR clonados han sido secuenciados. El análisis de las secuencias de los productos clonados ha revelado que cada par de oligonucleótidos empleados generó las secuencias idénticas en la dirección 5' (exones), pero divergentes en la dirección 3' (gracias a la retención de distintos intrones) (Fig. 20C). En conjunto, los análisis realizados identificaron tres transcritos *ankrd1* con la retención de: (1) intrón 8 (*ankrd1-i8*), (2) intrones 7 y 8 (*ankrd1-i7,8*), y (3) intrones 6, 7 y 8 (*ankrd1-i6,7,8*). La proporción de los productos de PCR (véase Fig. 20B) sugiere una expresión relativamente más baja del *ankrd1-i6,7,8* si se compara con *ankrd1-i7,8* y *ankrd1-i8*. De forma general, estos resultados indican el suceso natural de la retención de intrones en los transcritos *ankrd1* poliadenilados que se expresan en el miocardio ventricular de cerdos recién nacidos.

Las secuencias de nucleótidos del ARNm de las variantes porcinas *ankrd1-i8*, *ankrd1-i7,8* y *ankrd1-i6,7,8* han sido depositadas en el GenBank con los números de acceso FJ475066, FJ475067 y FJ475068, respectivamente. Las Figuras 20D,

ANKRD1 - 36.1 kDa (GenBank NP_999087)

1 MMVLKVEELV TGKKNNGGDA GEFLPEDFRD GEYEA AVTLE KQEDLKTLP A HFVSLGEEQQW
 61 KIEKEREAE L KKKKLEQRSK LENLEDLEII IQLKRRKKYR KTKVPVVKEP EPEVITEPVD
 121 VPRFLKAALE NKLPVVEKFL SDKNNPDVCD EYKRTALHRA CLEGH LAIVE KLIEAGAQIE
 181 FRDML ESTAI HWASRGGNLD VLKLLLNKGA KISARDKLLS **TALHVAVRTG** **HYECAEHLIA** **e7**
 241 **CEADLNAKDR** **EGDTPLHDAV** **RLNRYKMIRL** **LITYGADLNV** **KNCAGKTPMD** **LVLNWNQNGTK** **e7-e8-e9**
 301 **AIFDSLKENS** **YKASRIATF** **e9**

ANKRD1-i8 - 35.1 kDa (GenBank ACK77369)

1 MMVLKVEELV TGKKNNGGDA GEFLPEDFRD GEYEA AVTLE KQEDLKTLP A HFVSLGEEQQW
 61 KIEKEREAE L KKKKLEQRSK LENLEDLEII IQLKRRKKYR KTKVPVVKEP EPEVITEPVD
 121 VPRFLKAALE NKLPVVEKFL SDKNNPDVCD EYKRTALHRA CLEGH LAIVE KLIEAGAQIE
 181 FRDML ESTAI HWASRGGNLD VLKLLLNKGA KISARDKLLS **TALHVAVRTG** **HYECAEHLIA** **e7**
 241 **CEADLNAKDR** **EGDTPLHDAV** **RLNRYKMIRL** **LITYGADLNV** **KNCVSAQARG** **PSYRLSNEQA** **e7-e8-i8**
 301 **WLTYLKIVF** **i8**

ANKRD1-i7,8 - 34.2 kDa (GenBank ACK77370)

1 MMVLKVEELV TGKKNNGGDA GEFLPEDFRD GEYEA AVTLE KQEDLKTLP A HFVSLGEEQQW
 61 KIEKEREAE L KKKKLEQRSK LENLEDLEII IQLKRRKKYR KTKVPVVKEP EPEVITEPVD
 121 VPRFLKAALE NKLPVVEKFL SDKNNPDVCD EYKRTALHRA CLEGH LAIVE KLIEAGAQIE
 181 FRDML ESTAI HWASRGGNLD VLKLLLNKGA KISARDKLLS **TALHVAVRTG** **HYECAEHLIA** **e7**
 241 **CEADLNAKDR** **VSSLVSLGGLL** **KLHSPFMWNP** **CPSRAPLQVP** **LAGLRPTLAP** **SLCLSRKEIP** **i7-e8**
 301 **PCTTP** **e8**

ANKRD1-i6,7,8 - 37.7 kDa (GenBank ACK77371)

1 MMVLKVEELV TGKKNNGGDA GEFLPEDFRD GEYEA AVTLE KQEDLKTLP A HFVSLGEEQQW
 61 KIEKEREAE L KKKKLEQRSK LENLEDLEII IQLKRRKKYR KTKVPVVKEP EPEVITEPVD
 121 VPRFLKAALE NKLPVVEKFL SDKNNPDVCD EYKRTALHRA CLEGH LAIVE KLIEAGAQIE
 181 FRDML ESTAI HWASRGGNLD VLKLLLNKGA KISARDK**VFL** **LLPPSFSSLP** **LRTCLGVWAG** **i6**
 241 **LWGSAGSSTS** **QLLSTALHVA** **VRTGHYCAE** **HLIACEADLN** **AKDRVSSLVS** **LGLLKLHSPF** **i6-e7-i7**
 301 **MNNPCPSRAP** **LQVPLAGLRP** **TLAPSLCLSR** **KEIPPCTTP** **i7-e8**

Figura 22. Secuencias de aminoácidos de las isoformas de ANKRD1 porcino que retienen intrones.

Las secuencias que derivan de los intrones se muestran en rojo, mientras que las secuencias adyacentes del exón 7, 8 y 9 se muestran en azul. Se indican también los valores de peso molecular deducido (kDa). Se indica entre paréntesis el número de acceso al GenBank.

22 y 23 muestran las isoformas proteicas deducidas de las secuencias generadas por splicing alternativo. La variante *ankrd1-i8* contiene un codón de terminación (CT) dentro de la secuencia del intrón 8 en la posición 81. Esta variante de splicing produciría una proteína truncada (sin los aminoácidos codificados por el exón 9) y con 26 aminoácidos (aa) adicionales codificados por la región 5' del intrón 8. En la variante *ankrd1-i7,8*, se deduce que la retención del intrón 7 produzca un cambio en el marco de lectura generando un CT dentro de la secuencia del exón 8. El producto proteico correspondiente incluiría una región codificada por el intrón 7 pero perdería la parte codificada por el exón 8, intrón 8 y exón 9. Parece ser que, del mismo modo, la isoforma *ankrd1-i6,7,8*, a pesar de la retención del intrón 6, tendría un CT en el exón 8 debido a la retención del intrón 7. Al respecto, hay que subrayar que por sí mismo, la retención del intrón 6 no genera cambio del marco de lectura canónica ni introduce un codón de terminación prematuro (CTP) en esta variante. Las variantes *ankrd1-i8*, *ankrd1-i7,8*, y *ankrd1-i6,7,8* supuestamente codifican para proteínas de 309, 305 y 339 aa con un peso molecular deducido de 35.1, 34.2 y 37.7 kDa, respectivamente. Estos valores de peso molecular deducidos

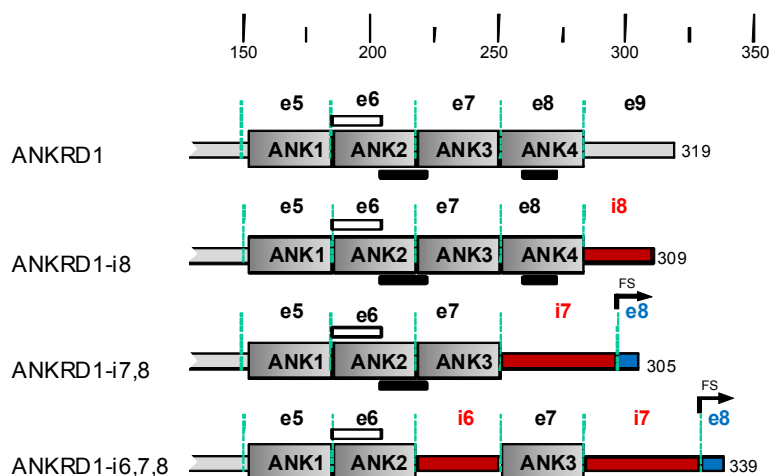


Figura 23. Estructura C-terminal de las isoformas ANKRD1 sin intrones y que retienen intrones. Los exones (e) e intrones (i), así como los dominios proteicos correspondientes codificados, están marcados en gris y rojo, respectivamente. Los dominios con repeticiones de ankirinas (ANK) han sido localizados usando el algoritmo *ScanProsite* (Sigrist *et al.*, 2010). Se muestran las regiones de unión con titina (rectángulos blancos horizontales) y de unión con calsecuestrina-2 (rectángulos negros horizontales) (Mikhailov, Torrado, 2008). FS – posición del cambio de marco de lectura (*frame shift*). En el ANKRD1-i7,8 y ANKRD1-i6,7,8, la retención del intrón 7 produciría un cambio de marco de lectura del exón 8 (azul). En ambas isoformas ANKRD1-i7,8 y ANKRD1-i6,7,8, la retención del intrón 7 o de los intrones 6 y 7, respectivamente, resultaría en la modificación del extremo C-terminal por medio de la eliminación del ANK4 que, a su vez, podría afectar a las interacciones de estas isoformas con la calsecuestrina-2 cardíaca.

son similares al de la isoforma de ANKRD1 porcina codificada por el transcripto sin retención de intrones (36.1 kDa) (Fig. 22).

Así, los resultados del análisis de las tres variantes de splicing de *ankrd1* identificadas en el VI de cerdos recién nacidos nos permiten predecir que estos transcriptos, si efectivamente se traducen, producirían proteínas con segmentos C-terminales modificados (Fig. 23).

2.2.3. Los transcriptos *ankrd1* con intrones retenidos se traducen eficazmente en ensayos de expresión proteica in vitro e in vivo

Con el objetivo de probar si los transcriptos *ankrd1* que retienen intrones están funcionalmente intactos preservando la capacidad de sintetizar proteínas, se han diseñado cuatro correspondientes construcciones codificantes fusionadas al epítipo myc (Fig. 24A) y se han expresado in vitro en el sistema IVTT (Promega) libre de células (véase Materiales y Métodos) analizando posteriormente los productos sintetizados mediante separaciones SDS-PAGE seguidas por inmuno-identificación Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-myc y los anticuerpos policlonales contra la región N-terminal del ANKRD1 porcino.

Con el uso de estos dos tipos de anticuerpos se obtuvieron los resultados iguales. Es decir, cada una de las construcciones expresadas generó un único producto proteico de tamaño similar: *ankrd1* sin intrones (44 kDa), *ankrd1-i8* (44 kDa), *ankrd1-i7,8* (43 kDa) y *ankrd1-i6,7,8* (44 kDa) (Fig. 24B). Aquí merece subrayar que, por ser similares en cuanto a su tamaño, las proteínas expresadas serían probablemente indistinguibles unas de otras en ensayos de Western blot con extractos proteicos del tejido cardíaco.

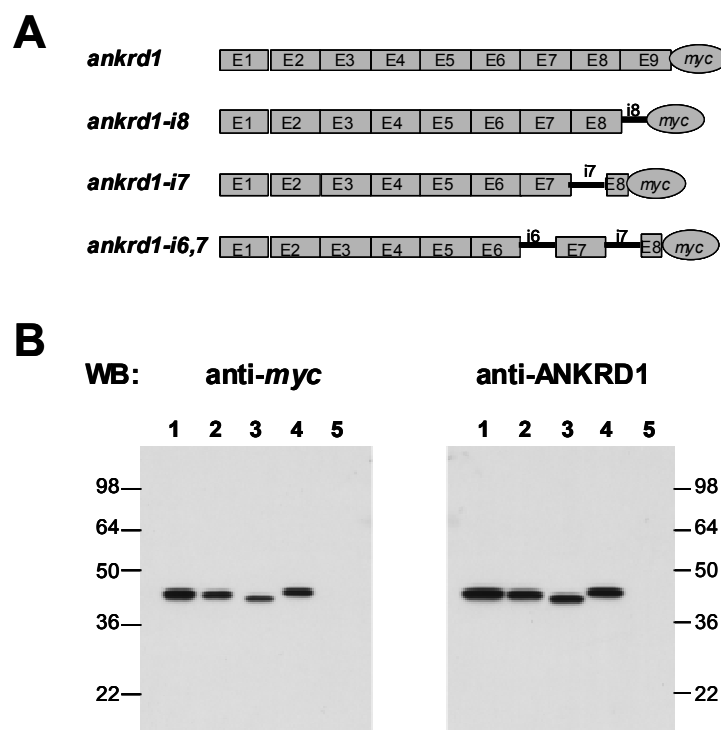


Figura 24. Expresión de las construcciones de *ankrd1* sin intrones y que retienen intrones en ensayos de expresión libres de células (IVTT). **A** - representación esquemática de las construcciones *ankrd1* con el epítipo *myc* que contienen varias configuraciones de retención de los intrones 6-8. Los exones (E) están indicados con rectángulos grises y los intrones (i) con líneas horizontales negras. **B** - detección por Western blot (WB) de las proteínas recombinantes expresadas en sistemas libres de células (IVTT) con anticuerpos anti-*myc* (panel izquierdo) o anti-ANKRD1 (panel derecho). Las construcciones expresadas : *ankrd1* (carril 1), *ankrd1-i8* (carril 2), *ankrd1-i7* (carril 3), y *ankrd1-i6,7* (carril 4). Carril 5- control IVTT. 22-98: valores de PM, kDa.

La funcionalidad de los transcritos *ankrd1* estudiados ha sido confirmada en ensayos de transfección de las células COS-7 con las mismas construcciones. Similarmente, los lisados de las células transfectadas se han procesado por Western blot con anticuerpos anti-*myc* y anti-ANKRD1 (Fig. 25A). En ambas variantes de la inmuno-detección se han observado en las membranas Western blot la presencia de los productos proteicos correspondientes, cada uno de los cuales migra en SDS-PAGE como una banda de peso molecular aparente de 44 kDa (Fig. 25A).

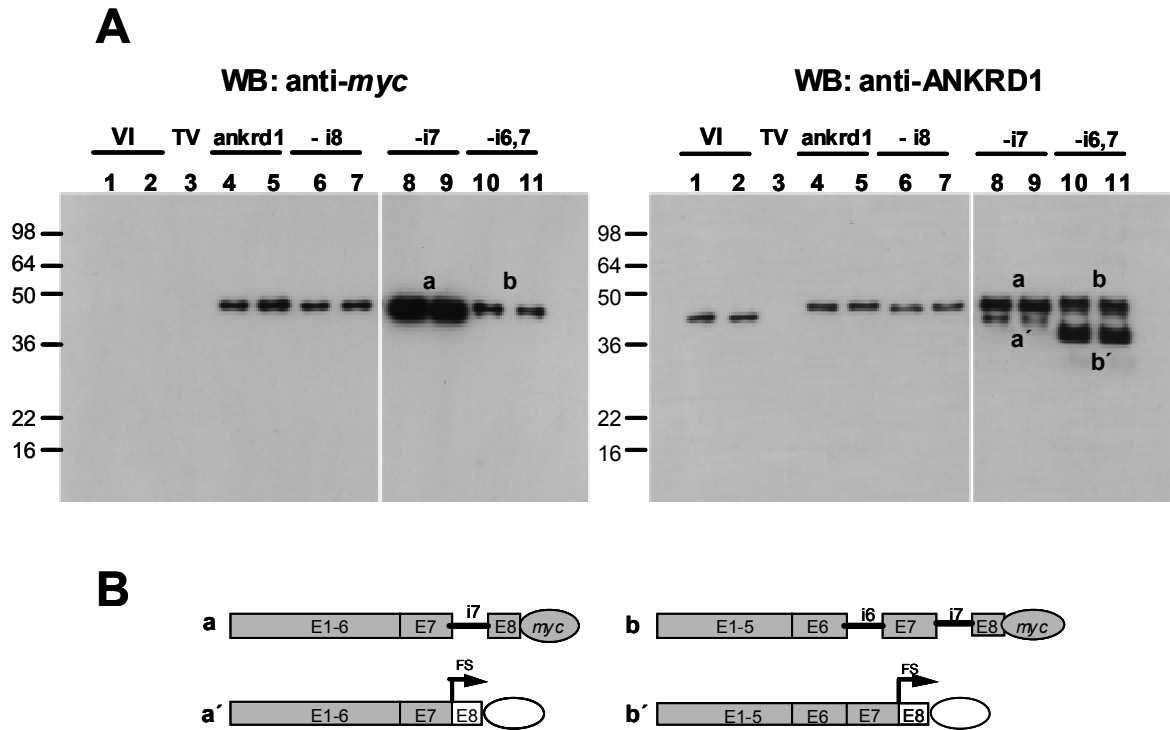


Figura 25. Expresión de las construcciones de *ankrd1* sin intrones y que retienen intrones en ensayos basados en células COS-7. **A** - lisados de células COS-7 transfectadas con construcciones *ankrd1* con el epítipo *myc* después de una electroforesis e inmunoblot (WB) con anticuerpos anti-*myc* (panel de la izquierda) y anti-ANKRD1 (panel de la derecha). VI - extracto del VI de cerdos recién nacidos. Se presentan los resultados de la carga proteica por duplicado. TV - células transfectadas únicamente con el vector. Tanto las variantes constitutivas (**a**, **b**) como las variantes alternativas (**a'**, **b'**) generadas por el *splicing* del intrón 7 o de los intrones 6 y 7 de *ankrd1-i7* o *ankrd1-i6,7*, se detectaron con los anticuerpos anti-ANKRD1. **B** - interpretación esquemática de los resultados de WB. **a**, **b**- la traducción de las construcciones *ankrd1-i7* y *ankrd1-i6,7* resulta en una lectura correcta de la secuencia *myc*. **a'**, **b'**- la eliminación del intrón 7 de *ankrd1-i7* o de los intrones 6 y 7 de *ankrd1-i6,7* (vía *splicing* en células COS-7) produce un cambio en el marco de lectura original (FS - *frame shift*) dentro de la región 5' del exón 8 que resulta en una lectura aberrante de la secuencia *myc* (óvalo blanco). Véase el texto para más detalle.

Adicionalmente, el uso de los anticuerpos anti-ANKRD1 ha permitido detectar unas isoformas de ANKRD1 generadas por el *splicing* parcial del intrón 7 o de los intrones 6 y 7 de los transcritos *ankrd1-i7* y *ankrd1-i6,7*, respectivamente (Fig. 25A, panel derecho, carriles 8-11). Los anticuerpos anti-*myc* no detectan estos productos proteicos adicionales debido a que la eliminación del intrón 7 de los transcritos *ankrd1-i7* y *ankrd1-i6,7* (vía *splicing* en las células COS-7) produce un cambio en el marco de lectura dentro de la región 5' del exón 8 que, en su lugar, resulta en una traducción aberrante de la secuencia *myc* (véase Fig. 25B).

En conjunto, los datos de los ensayos de expresión *in vitro* indicaron una probabilidad de que las variantes *ankrd1* con intrones retenidos se pueden expresar en el miocardio. Sin embargo, está demostrado, por otra parte, que los transcritos portadores de intrones se retienen y se degradan en el núcleo previniendo así la expresión proteica. Consecuentemente, para probar si los transcritos *ankrd1* que contienen intrones se exportan al citoplasma, hemos analizado su distribución en el ARN citoplasmático versus el ARN total celular aislado de la suspensión de cardiomiocitos procedentes del VI de cerdos de 6 días de edad. Cada experimento de RT-PCR se ha llevado a cabo a partir de dos aislamientos individuales de los ARN. Como se muestra en la Figura 26, los transcritos *ankrd1* que retienen intrones se detectan tanto en el ARN citoplasmático como en el total celular. En el ARN citoplasmático, los niveles de transcritos *ankrd1* que contienen intrones son 2-3 veces inferiores en comparación con sus niveles en el ARN total. En este sentido, la relación entre los niveles del transcritos *ankrd1* sin intrones en el ARN citoplasmático/ARN total demuestra una proporción casi idéntica. La posibilidad de contaminación del ARN citoplasmático por el ARN nuclear se ha controlado mediante las amplificaciones del transcritos nuclear U6 (Mansilla et al., 2005). Aunque estos resultados sugieren que cada transcritos *ankrd1* que retiene intrones puede sintetizar el producto proteico, no detectamos las múltiples isoformas proteicas relevantes en las membranas Western blot derivadas del VI y tratadas con anticuerpos anti-ANKRD1 (véase Fig. 25A, panel derecho, carriles 1 y 2). Como se ha mencionado anteriormente, los tamaños proteicos similares de las diferentes formas ANKRD1 podrían generar una única señal de Western blot. Esto podría ser también la consecuencia de la escasa abundancia de las variantes de *ankrd1* con intrones y/o su rápida degradación en tejidos cardíacos.

2.2.4. Los transcritos *ankrd1* con intrones retenidos manifiestan una distribución asimétrica (izquierda versus derecha) en el corazón porcino neonatal

En cerdos neonatales la expresión cardíaca del gen *ankrd1*, a nivel del ARNm y de la proteína se caracterizan por una distribución asimétrica (izquierda versus derecha) en el miocardio tanto de las aurículas como de los ventrículos (Torrado et al., 2004, 2006). Nos hemos planteado analizar si la expresión de las variantes de *ankrd1* que retienen intrones también se regulan de un modo similar en distintas cámaras cardíacas. El análisis se ha ejecutado mediante qPCR con las combinaciones de oligonucleótidos específicas para la amplificación selectiva de cada una de las variantes de *ankrd1* identificadas (Fig. 27). En las amplificaciones control, los niveles del ARNm *ankrd1* sin intrones son 10 veces mayores en el VI en comparación con el VD siendo también 1.6 veces mayor en la aurícula izquierda (AI) en comparación con la aurícula derecha (AD). En el corazón de cerdos

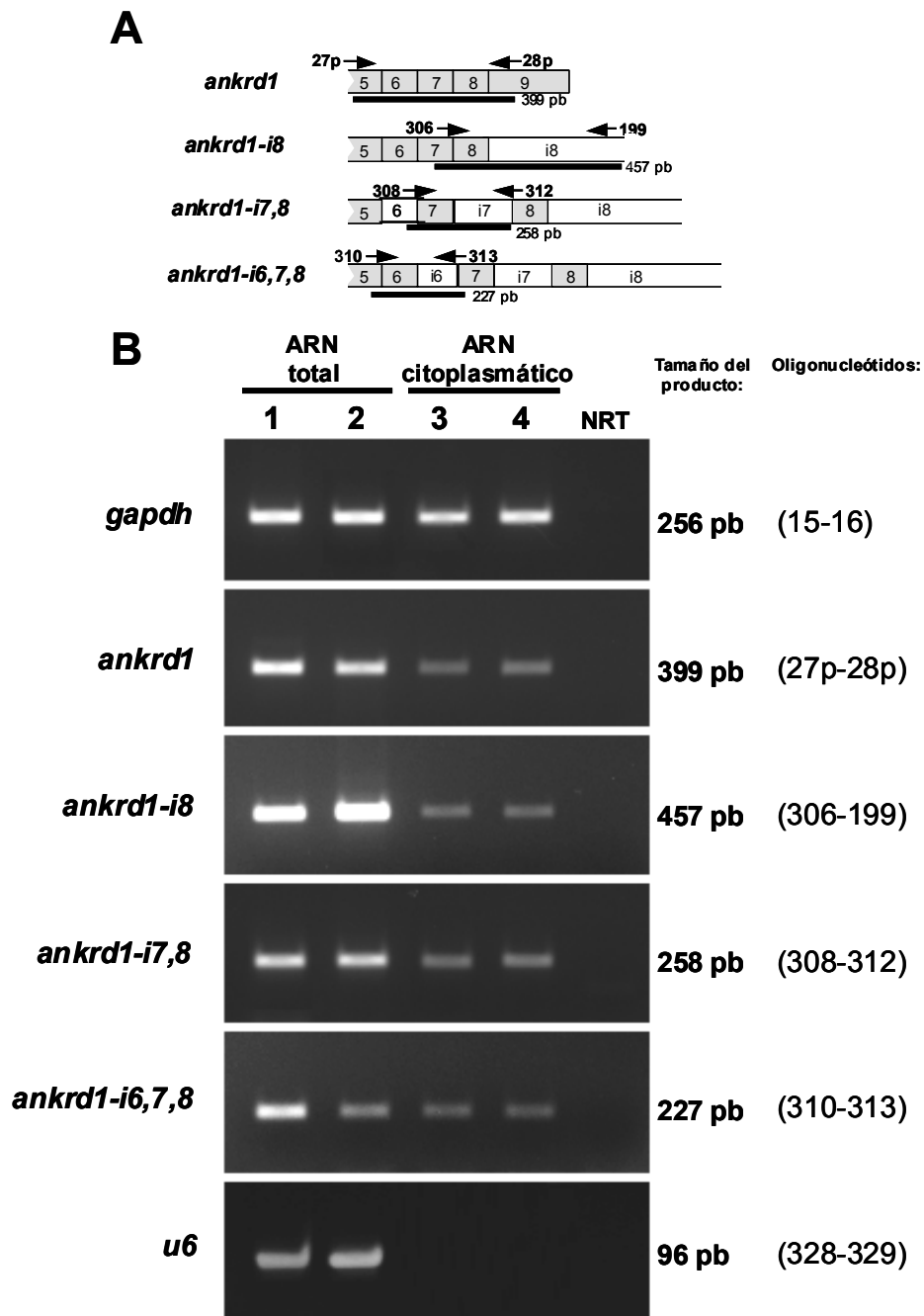


Figura 26. Los ARNm de *ankrd1* que retienen intrones están presentes en el citoplasma de los cardiomiocitos de cerdos neonatales. A - representación esquemática de las secuencias de *ankrd1* porcino sin intrones y que retienen intrones usadas para el diseño de los oligonucleótidos. Los exones y los intrones están indicados con rectángulos grises y blancos, respectivamente. Se muestra la localización aproximada de los oligonucleótidos para el análisis RT-PCR (para las secuencias de los oligonucleótidos véase la tabla 5 de "Materiales y Métodos"). El tamaño esperado de los productos de PCR correspondientes se muestra con líneas negras. **B** - expresión de las variantes *ankrd1* sin y con intrones retenidos se ha revelado por RT-PCR del ARN total y citoplasmático de cardiomiocitos aislados del VI. Las reacciones se han cargado por duplicado. El transcripto *gapdh* se detecta en ambos ARN estudiados mientras que el transcripto *u6* nuclear no se detecta en el ARN citoplasmático. Los productos de PCR han sido clonados y secuenciados para confirmar que se corresponden con los transcriptos *ankrd1* que retienen intrones.

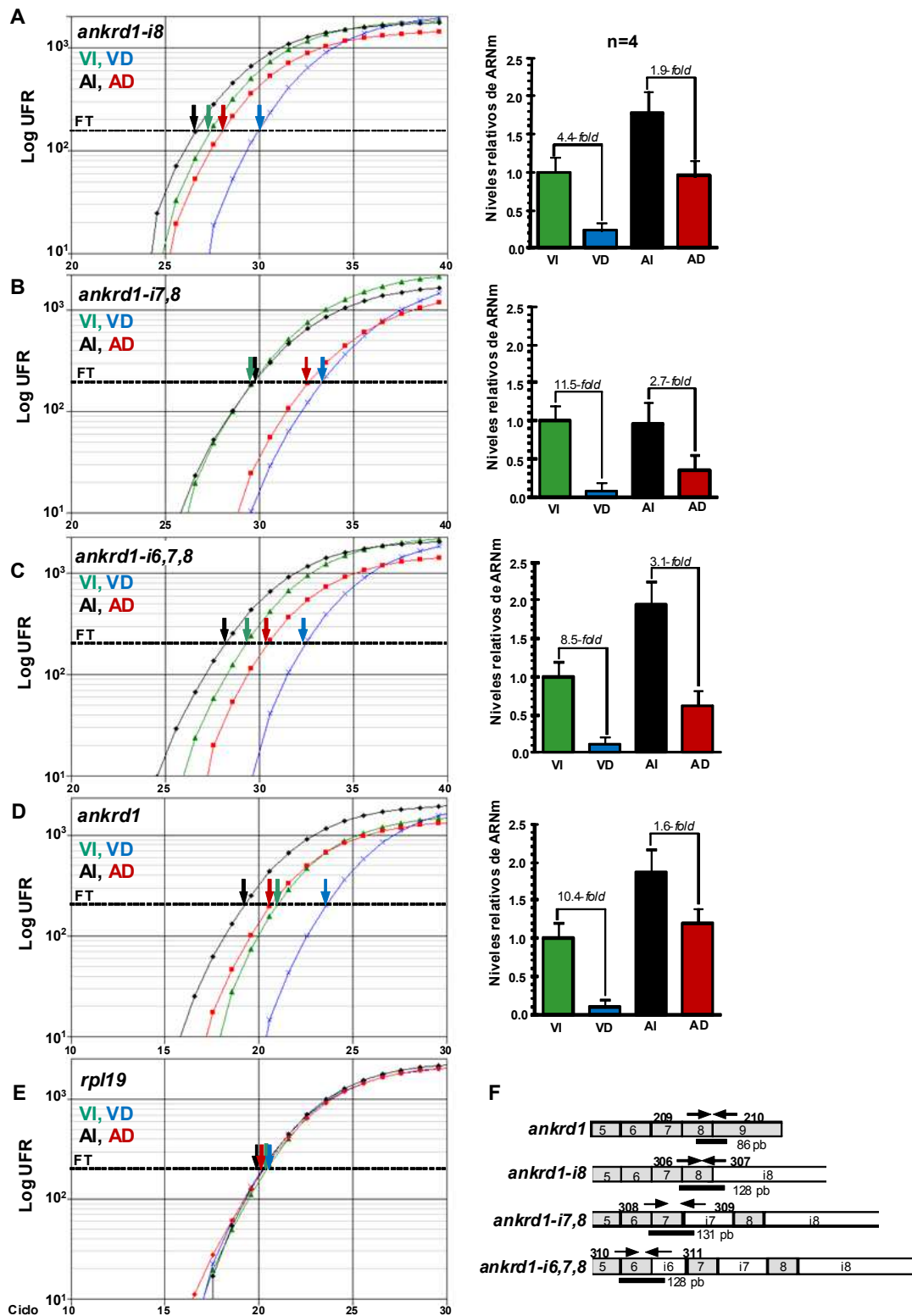


Figura 27. Expresión izquierda predominante de los transcritos de *ankrd1* que retienen intrones en el corazón de cerdos recién nacidos. A-D- curvas representativas de la amplificación por qPCR de los niveles de ARNm de *ankrd1* sin intrones y que retienen intrones en el VI (verde), VD (azul), AI (negra), y AD (roja). **E** - niveles del *rpl19* (transcripto de referencia). Flechas - ciclo umbral (C_T - *threshold cycle*). FT - umbral de fluorescencia (*fluorescence threshold*). UFR- unidades de fluorescencia relativas. A la derecha - niveles promedios correspondientes. **F** - representación esquemática de las secuencias de *ankrd1* porcino sin y con intrones retenidos usadas para el diseño de los oligonucleótidos. Los exones e intrones están indicados con rectángulos grises y blancos, respectivamente. Se muestra la localización aproximada de los oligonucleótidos para el análisis qPCR (para las secuencias de los oligonucleótidos véase la tabla 5 de "Materiales y Métodos").

recién nacidos, las variantes *ankrd1* con intrones retenidos muestran patrones de expresión muy similares aunque en caso del *ankrd1-i8*, las diferencias en su expresión entre el VI y el VD son menos prominentes en comparación con el transcripto sin intrones (Fig. 27A-D).

Los datos indican una probable co-regulación (regulación positiva) de la expresión de los transcriptos *ankrd1* (sin o con intrones) en cada cámara cardíaca de cerdos neonatales.

2.2.5. Los transcriptos *ankrd1* con intrones se up-regulan en el miocardio ventricular en el modelo porcino de insuficiencia cardíaca

Ankrd1 ha sido identificado como un gen que está up-regulado en el miocardio ventricular en animales modelo y en pacientes con insuficiencia cardíaca (IC) de diversa etiología (revisado en: Mikhailov, Torrado, 2008). Utilizando nuestro modelo de la IC diastólica (ICD) provocada en cerdos neonatales por inyecciones del agente cardio-tóxico, Doxorubicin (Dox; véase “Materiales y Métodos”), se han cuantificado con precisión los niveles de cada variante de splicing alternativo de *ankrd1* en el VI de cerdos con la ICD (inyectados con Dox) frente a los inyectados con PBS (animales control) (Fig. 28). El nivel de la expresión del

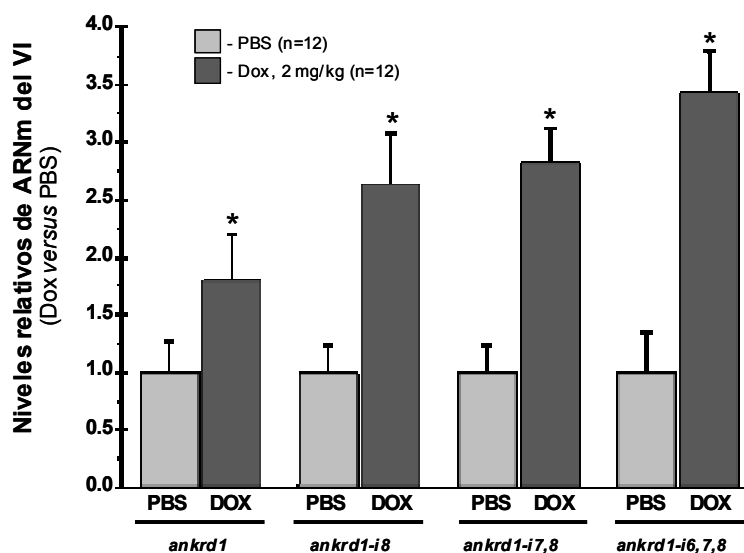


Figura 28. Las variantes de *ankrd1* que retienen intrones están co-upreguladas con el transcripto regular en el miocardio de cerdos neonatales con la ICD. Análisis qPCR de los niveles de ARNm de *ankrd1* sin y con intrones retenidos en el miocardio del VI de cerdos neonatales inyectados con Dox en comparación con los inyectados con PBS, usando los pares de oligonucleótidos que se indican en la Figura 27. * $p \leq 0.05$, para cada transcripto, Dox versus PBS.

transcripto *ankrd1* regular (sin intrones retenidos) ha estado aumentado coincidentemente 1.8 veces en el miocardio alterado en comparación con el control. De un modo similar, los transcriptos *ankrd1* que retienen intrones estuvieron up-regulados en el miocardio de animales con la ICD, pero cada uno en un grado mayor que en el caso del ARNm de *ankrd1* sin intrones retenidos.

Estos datos ponen en evidencia que la ICD experimental resulta en una expresión significativamente aumentada en el VI no sólo del transcripto *ankrd1* sin intrones (lo que es un hecho bien establecido y probado antes; véase Torrado et al., 2004, 2006), sino también de las variantes de *ankrd1* que retienen intrones. Estos resultados los interpretamos como una indicación más de una co-regulación de la expresión de las variantes *ankrd1*, especulando que, en respuesta al estrés cardíaco, ANKRD1 podría regular positivamente la expresión de sus ARNs que contienen intrones.

2.2.6. En el miocardio de cerdos neonatales, la expresión forzada del *ankrd1* sin intrones produce la up-regulación de sus transcriptos que retienen intrones

Debido a la similitud de los patrones de expresión de los ARNms de *ankrd1* en el corazón de cerdos neonatales normales y con la ICD, hemos examinado si la expresión forzada de la construcción de *ankrd1* sin intrones en el VI porcino podría influir sobre los patrones de expresión de sus variantes endógenas con intrones retenidos.

Según el protocolo de la transfección génica del miocardio porcino in vivo (véase el apartado 1.1 de “Materiales y Métodos”), los plásmidos portadores de la construcción de la secuencia codificante del *ankrd1* porcino sin intrones (8 animales) o el vector vacío (4 animales) se han inyectado en los sitios diana de la pared libre (PL) del VI de cerdos neonatales de 6 días (Fig. 29A). Dos días después de la transfección, se han sacrificado los animales, se han extraído los corazones y se ha analizado la expresión del transgen *ankrd1* en la pared libre del VI mediante RT-PCR y Western blot. La expresión de la construcción *ankrd1* recombinante se ha detectado en todos los animales experimentales tanto al nivel del transcripto (Fig. 29B) como al nivel proteico (Fig. 30A). En el miocardio transfectado (en concreto, en las regiones 2 y 6; véase la Fig. 29), los niveles endógenos del ARNm de *ankrd1* sin intrones no mostraron cambios significativos, mientras que la expresión de las variantes de *ankrd1* que retienen intrones se ha aumentado marcadamente en comparación con el control (Fig. 29C).

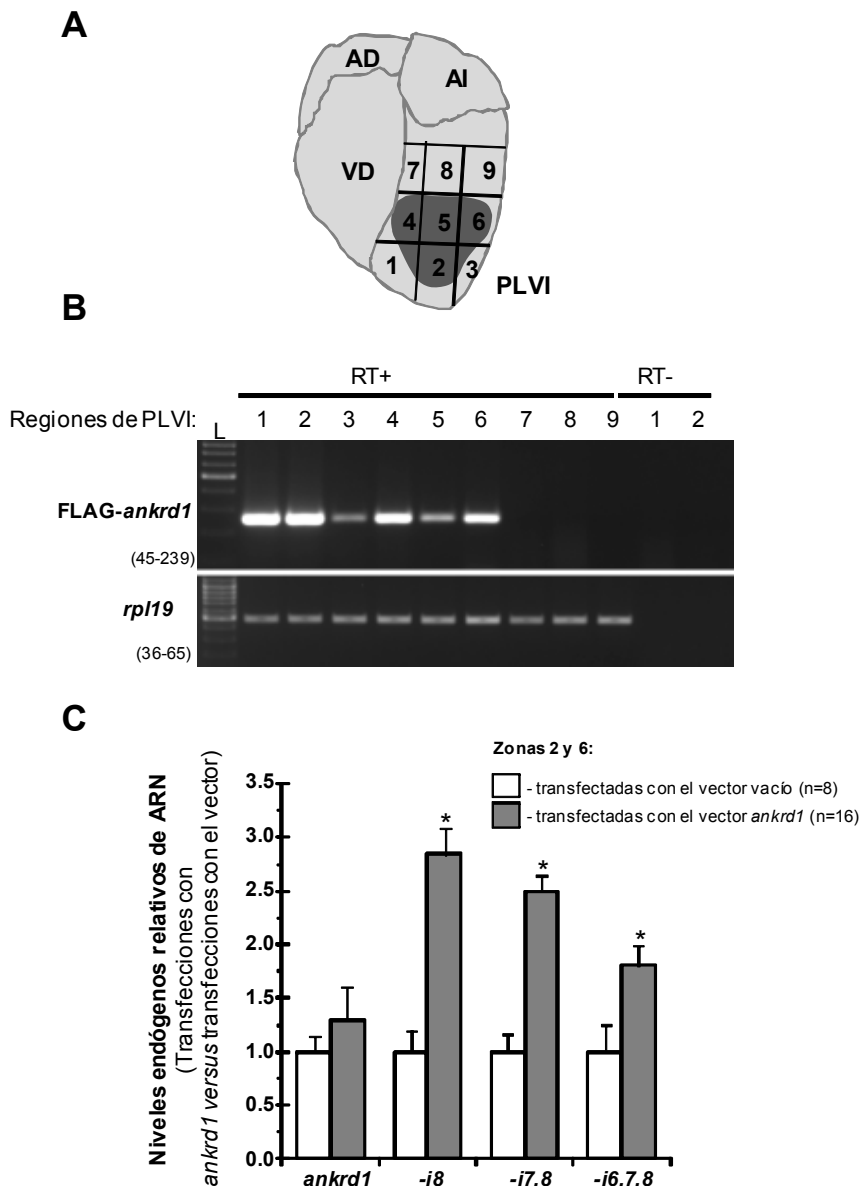


Figura 29. La expresión forzada *in vivo* de *ankrd1* regular recombinante produce la up-regulación de los transcritos endógenos *ankrd1* que retienen intrones en el miocardio de cerdos neonatales transfectados. **A** - representación esquemática de la pared libre del VI (PLVI) transfectada con *ankrd1* (en gris oscuro, posiciones de las inyecciones) que se ha diseccionado en nueve fragmentos (1-9) 2 días después de la transfección. **B** - análisis representativo de RT-PCR semicuantitativa de los niveles del transcrito *ankrd1* con el epítipo FLAG en nueve fragmentos de PLVI (después de la normalización de los moldes de ADNc a la expresión de *rpl19*). RT-: no-RT. El primer carril de la izquierda (L) - *GeneRuler DNA ladder mix* (Fermentas). Los oligonucleótidos se muestran entre paréntesis. Un oligonucleótido 239 discriminatorio deriva de la secuencia del vector FLAG (véase la Tabla 5 de "Materiales y Métodos"). **C** - niveles endógenos de las variantes del *ankrd1* en el miocardio transfectado. Se han usado las combinaciones de oligonucleótidos que se indican en la Figura 27 para la amplificación de los transcritos *ankrd1* que retienen intrones. Los transcritos endógenos *ankrd1* sin intrones fueron selectivamente amplificados usando un oligonucleótido directo 327 y un oligonucleótido reverso 326 localizado en el 3'-UTR de *ankrd1* porcino (véase la Tabla 5 de "Materiales y Métodos"). * $p \leq 0.05$, para cada transcrito, transfección con *ankrd1* versus transfección con el vector.

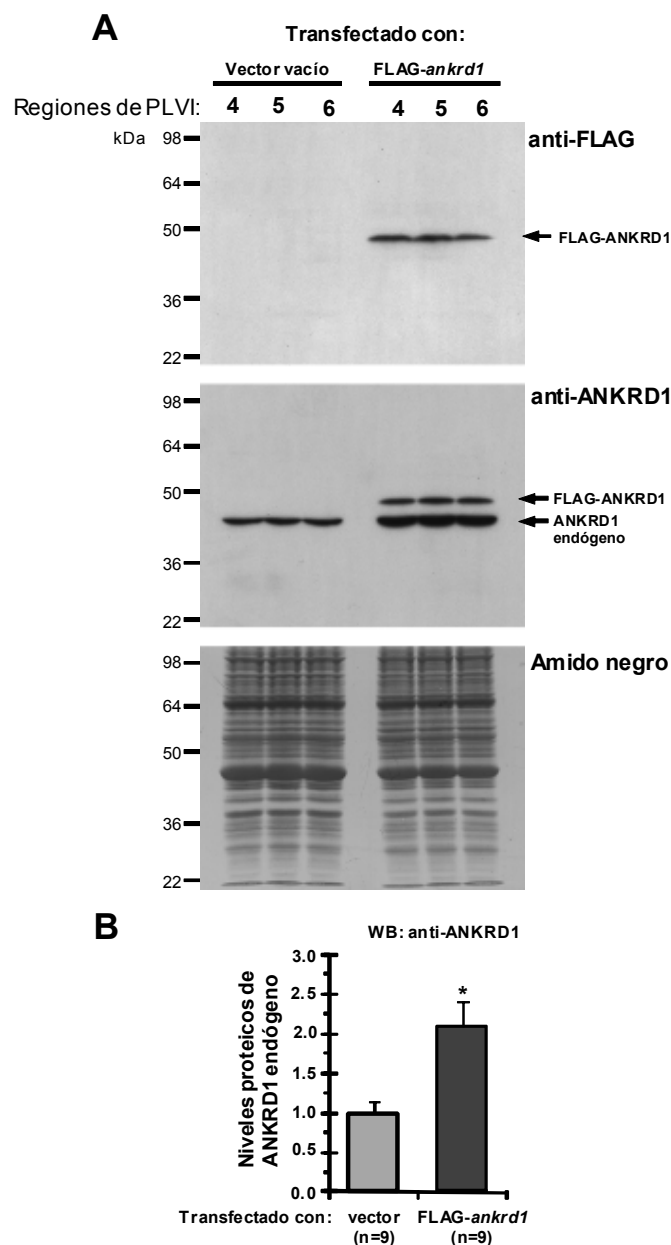


Figura 30. La expresión forzada *in vivo* de *ankrd1* regular recombinante resulta en el aumento de la proteína ANKRD1 endógena en el miocardio porcino transfectado. A - réplicas representativas de *Western blot* de extractos proteicos totales de las zonas 4, 5 y 6 de la pared libre del VI inyectadas con el vector vacío (mitad izquierda de las membranas) o FLAG-*ankrd1* (mitad derecha de las membranas) probadas con anticuerpos anti-FLAG/anti-ANKRD1 o teñidas con Amido negro (control de la carga proteica). **B** - niveles relativos de ANKRD1 endógeno estimados por *Western blot* en la pared libre del VI transfectada con el vector vacío versus FLAG-*ankrd1*. kDa - marcadores de peso molecular. * $p \leq 0.05$.

Es importante anotar que el examen histológico del miocardio transfectado no reveló signos de inflamación en las regiones de las inyecciones. En todos los animales transfectados con FLAG-*ankrd1*, los valores de la presión ventricular sistólica y diastólica eran similares a los de cerdos inyectados intramiocardialmente con el vector vacío.

Así, suponemos que la up-regulación de la expresión de las variantes de *ankrd1* con intrones retenidos en el miocardio transfectado con el vector *ankrd1* se asocia, mayormente, con la expresión forzada del ANKRD1 regular recombinante pero no con algunos factores adicionales tales como traumatización o inflamación del tejido cardíaco.

El paso siguiente consistió en analizar si la up-regulación de las variantes de *ankrd1* afecta a los niveles proteicos de ANKRD1 endógeno en el miocardio transfectado. Con este fin, se ha estudiado (mediante Western blot) el nivel de la proteína ANKRD1 endógena en las muestras del miocardio transfectado con *ankrd1* recombinante frente al miocardio transfectado con el vector vacío. Los resultados del análisis demuestran un incremento de aproximadamente 2 veces en los niveles de proteína ANKRD1 endógena en las regiones transfectadas con el *ankrd1* recombinante en comparación con el control (Fig. 30B).

En conjunto, los resultados obtenidos revelaron que la expresión forzada del *ankrd1* regular puede afectar positivamente la expresión endógena de las variantes de *ankrd1* con intrones retenidos que, a su vez, se asocia con el enriquecimiento del producto proteico ANKRD1 endógeno en el miocardio transfectado.

2.2.7. Los ortólogos de las variantes porcinas de *ankrd1* con intrones se detectan en el corazón humano

Debido a que nuestros resultados demostraron que la expresión de las variantes *ankrd1* (sin y con intrones) se regula conjuntamente en cada una de las cámaras del corazón porcino neonatal (véase Fig. 27), se ha de comprobar si también ocurren patrones similares de expresión en el miocardio postnatal humano. Para examinar esta posibilidad, primero hemos comprobado si es posible detectar las variantes de *ankrd1* que retienen intrones en el miocardio neonatal humano. De hecho, los ortólogos de las variantes *ankrd1*-i8 y *ankrd1*-i7,8 porcinas se han detectado (mediante RT-PCR) en el miocardio ventricular humano (Fig. 31A,B,D). Sin embargo, y a pesar de todos los intentos, no amplificamos ningún transcripto similar al *ankrd1*-i6,7,8 porcino en muestras cardíacas humanas. En corazones de neonatos humanos, el transcripto *ankrd1* regular (sin intrones retenidos) es más abundante en el VI en comparación con el VD. De un modo parecido, los transcriptos *ankrd1*-i8 y *ankrd1*-i7,8 mostraron también una tendencia hacia un enriquecimiento de 1.5 veces en el VI sobre el VD (Fig. 31B,C).

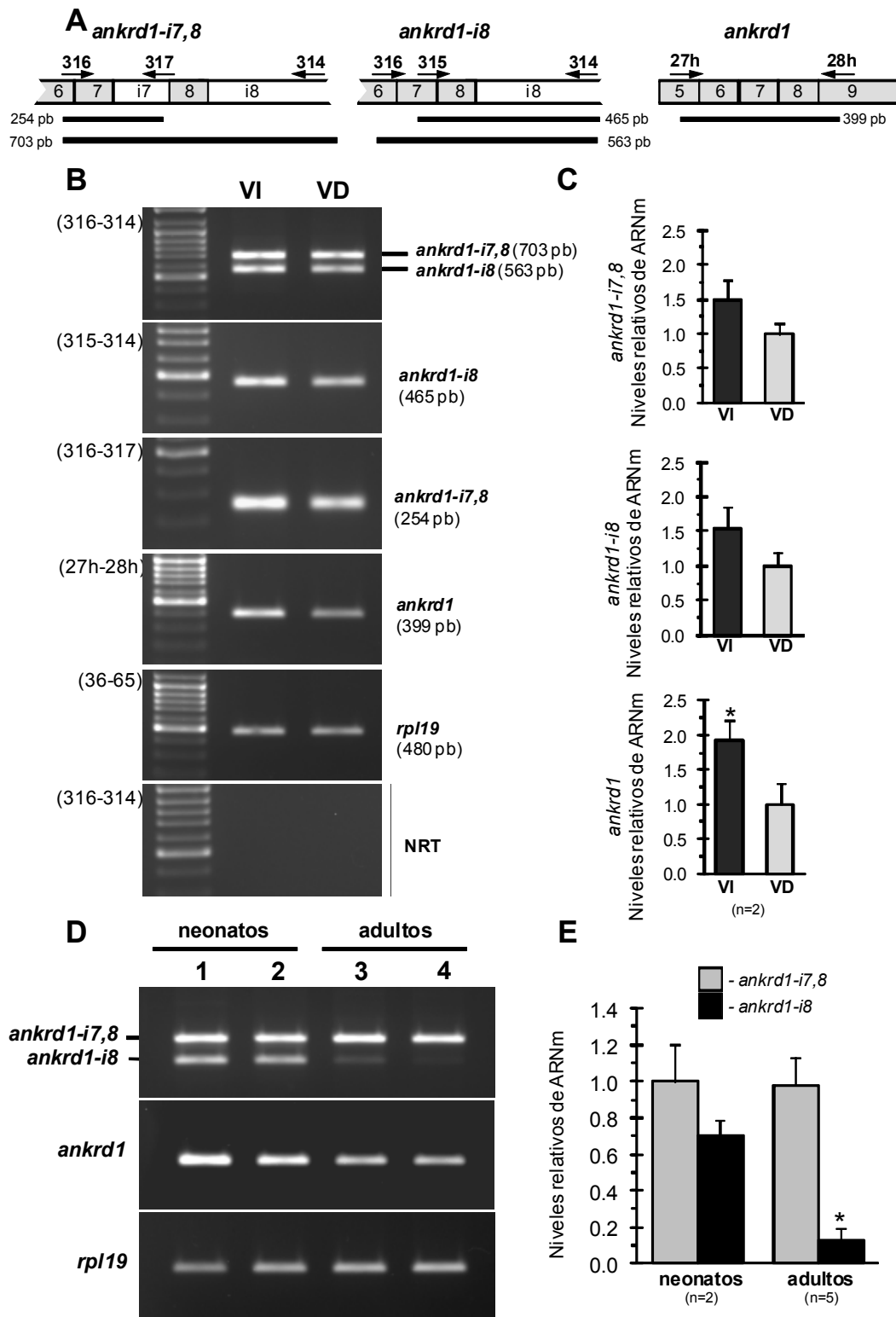


Figura 31. Los transcritos *ankrd1* con intrones se detectan en el corazón humano de neonatos y adultos. **A-** representación esquemática de las secuencias de *ankrd1* humano sin intrones y que retienen intrones usadas para el diseño de los oligonucleótidos. Niveles de ARNm representativos (**B**) y cálculo promedio relativo (**C**) estimados por RT-PCR semicuantitativa para los transcritos *ankrd1* y *rpl19* en muestras de VI/VD de neonatos de 8 semanas. En la izquierda - *GeneRuler DNA ladder mix* (Fermentas). Niveles de ARNm representativos (**D**) y cálculo promedio relativo (**E**) estimados por RT-PCR semicuantitativa para las variantes de *ankrd1* y *rpl19* en el miocardio del VI de neonatos versus adultos. Carril 1 - 8 semanas; carril 2 - 1 año; carril 3 - 42 años; carril 4 - 43 años. * $p \leq 0.05$.

Adicionalmente, comparamos los niveles de las variantes de *ankrd1* (con o sin intrones) en muestras del miocardio ventricular entre neonatos y adultos humanos. En el tejido cardíaco neonatal la variante *ankrd1-i8* se expresa a niveles mayores en comparación con el corazón adulto sugiriendo que su expresión se disminuye con la edad. Los niveles de expresión del transcripto *ankrd1* sin intrones mostraron la misma tendencia, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

2.3. Comentario: Logros y propuestas

Los resultados presentados muestran eventos del splicing alternativo por retención de intrones en el transcripto primario del gen *ankrd1* porcino y humano. En el corazón porcino se detectan cuatro transcriptos *ankrd1*, tres de los cuales retienen intrones: (1) *ankrd1* que contiene los intrones 6, 7 y 8 (*ankrd1-i6,7,8*), (2) *ankrd1* que contiene los intrones 7 y 8 (*ankrd1-i7,8*), y (3) *ankrd1* que sólo retiene el intrón 8 (*ankrd1-i8*). Merece subrayar una vez más que estas tres nuevas variantes de splicing de *ankrd1* se han identificado desarrollando y profundizando en los hallazgos experimentales de nuestro análisis DDRT-PCR de los transcriptos que se expresan diferencialmente entre el VI y VD de los cerdos neonatales (véase el Capítulo 1 de Resultados). En el corazón humano, se han detectado dos ortólogos de las variantes *ankrd1* porcinas que retienen el intrón 8 (*ankrd1-i8*) y los intrones 7 y 8 (*ankrd1-i7,8*).

Es ampliamente aceptado que la retención de intrones restringe la exportación de los transcriptos correspondientes al citoplasma y los hace dianas para la degradación mediante el proceso de nonsense-mediated mRNA decay (NMD), particularmente si los transcriptos contienen CT prematuros (Blencowe, 2006; Lareau et al., 2007). Hemos empleado una variedad de ensayos para demostrar que los transcriptos *ankrd1* con intrones retenidos son funcionalmente intactos y capaces de sintetizar los productos proteicos relevantes en sistemas de expresión *in vitro* (véase Fig. 24B). Además, hemos presentado los datos que indican que, en los cardiomiocitos *in vivo*, los transcriptos *ankrd1* que retienen intrones se exportan al citoplasma y, por lo tanto, se escapan, por lo menos parcialmente, de la degradación vía NMD.

¿Hasta qué punto los transcriptos *ankrd1* generados por splicing alternativo podrían ser funcionalmente significativos? Nuestros resultados derivados de la monitorización de los niveles cardíacos de estas variantes de *ankrd1* en distintas situaciones experimentales *in vivo* permiten un acercamiento a esta pregunta.

En primer lugar, los transcritos *ankrd1* sin o con intrones se co-expresan de un modo similar en el corazón neonatal porcino y humano con una cierta prevalencia de su expresión en el miocardio izquierdo. Es decir, la expresión cardíaca de estos transcritos demuestra una cierta regionalización, siendo los niveles más altos en el VI y AI en neonatos porcinos y humanos, asociada probablemente con diferentes tipos de estrés biomecánico en el miocardio izquierdo versus derecho. En segundo lugar, las variantes de *ankrd1* se up-regulan similarmente en el miocardio ventricular en animales con la ICD experimental. Debido a que la proteína se produce más rápidamente a partir de los ARNm preexistentes que a partir de la activación de la transcripción del gen, es concebible que la acumulación de los transcritos *ankrd1* que retienen intrones, permita a las células cardíacas responder rápidamente al estrés produciendo la proteína ANKRD1 en cantidades necesarias. Finalmente y en esta línea, la expresión forzada en el miocardio del vector *ankrd1* sin intrones resulta en la up-regulación de las variantes *ankrd1* que retienen intrones (pero no del transcrito regular endógeno) que, a su vez, se asocia con el enriquecimiento de la proteína endógena ANKRD1 en el miocardio transfectado (ver Fig. 30A,B). Este fenómeno supone que la inducción de la expresión del *ankrd1* sin intrones podría provocar una up-regulación de sus variantes con intrones retenidos, resultando en un aumento de los niveles de la proteína ANKRD1 en los cardiomiocitos.

IV. Resultados

Capítulo 3. NPPB/BNP: Una nueva variante generada por el skipping del exón 2 se sobre-expresa en el miocardio ventricular estresado in vivo y atenúa la producción y la secreción de BNP in vitro

3.1. Introducción

El péptido natriurético tipo B (BNP), originalmente identificado en el cerebro porcino (Sudoh et al., 1988), se produce predominantemente en el corazón como una pre-proteína denominada natriuretic peptide precursor B (NPPB), que se secreta como pro-proteína BNP y se procesa por una endopeptidasa dando lugar al péptido N-terminal (NT) y al péptido biológicamente activo C-terminal (CT) también conocido como BNP (Vanderheyden et al., 2004). Los datos disponibles sugieren que la actividad biológica del proBNP es menor que la del BNP-CT (Liang et al., 2007); la función del NT-BNP no está aún determinada (Mair, 2008). Estudios fisiológicos han revelado una correlación positiva entre el tamaño y la presión sistólica/diastólica del ventrículo izquierdo (VI) y las concentraciones del BNP en el plasma sanguíneo, sugiriendo que la carga hemodinámica tanto de presión como de volumen afecta a la liberación de BNP del tejido cardíaco (Tokola et al., 2001; Hall, 2004).

Es bien reconocido que los niveles elevados de BNP en la circulación tienen un valor pronóstico de riesgo e implicaciones terapéuticas en varias patologías cardiovasculares, especialmente en casos de la insuficiencia (fallo cardíaco) sistólica severa (Nakayama, 2005; Burke, Cotts, 2007; Zakynthinos, 2008). Recientemente, se ha demostrado que la disfunción diastólica ventricular también contribuye a los niveles elevados de BNP en el plasma de pacientes, convirtiéndolo así en un marcador para monitorizar la progresión del fallo cardíaco diastólico (FCD) (Nousiainen, 2002; Iwanaga et al., 2006; Stolker, Rich, 2007; Grewal et al., 2008a, b). Además de actuar como una hormona en la circulación, BNP se caracteriza por acciones autocrinas y paracrinas dentro del corazón, tales como anti-fibróticas, anti-proliferativas y citoprotectoras (D´Souza et al., 2004; Nishikimi et al., 2006) contribuyendo a la recuperación del miocardio del daño cardíaco. Así, en el modelo de ratón de cardiomiopatía dilatada se ha demostrado que el BNP disminuye el grado de la remodelación cardíaca patológica y la frecuencia de la muerte súbita (Yasuno et al., 2009).

En mamíferos, los genes NPPB caracterizados están compuestos por tres exones separados por dos intrones (LaPointe, 2005). Está suficientemente

justificado que la activación del promotor del gen NPPB, mediante estímulos fisiológicos o patológicos, resulta en la producción rápida del péptido (Mair, 2008). De hecho, el promotor del gen NPPB contiene múltiples elementos-cis que son las dianas moleculares de estímulos clínicamente relevantes que, por diferentes vías de señalización, regulan la expresión del gen NPPB (LaPointe, 2005; Burke, Cotts, 2007; Zakynthinos et al., 2008). El estímulo principal para la síntesis y secreción de BNP es el estrés biomecánico de los cardiomiocitos provocado por sobrecarga de presión o volumen sanguíneo, o por incremento de la presión de llenado del corazón (Pikkarainen et al., 2003; Vanderheyden et al., 2004; Iwanaga et al., 2006; Frank et al., 2008). Debido al hecho de que la expresión del gen NPPB se induce rápidamente por los factores de transcripción presentes en el corazón (incluyendo GATA4, NKX2.5 y MEF-2; véase LaPointe, 2005; Majalahti et al., 2007; Mair, 2008), el posible control post-transcripcional de la expresión de BNP ha sido en gran parte ignorado aunque existen evidencias de que la regulación post-transcripcional puede también jugar un papel importante en la producción y secreción de BNP (Suo et al., 2002; Tenhunen et al., 2005).

En mamíferos, el splicing alternativo es un mecanismo de regulación post-transcripcional de la expresión de aproximadamente la mitad de todos los genes (Sultan et al., 2008). Recientemente, la variante del transcrito NPPB, generado por la retención del intrón 2, y su producto proteico correspondiente se han identificado en las muestras del miocardio de pacientes con insuficiencia cardíaca severa (Pan et al., 2009). En el modelo canino de fallo cardíaco, esta isoforma de BNP no manifiesta efectos hipotensivos característicos para la isoforma BNP sin intrones retenidos, pero incrementa la tasa renal de filtración (Pan et al., 2009).

Como ha sido mencionado en el Capítulo 1, la secuencia de uno de los transcritos predominantemente up-regulados en el ventrículo izquierdo de cerdos recién nacidos demostró una homología completa con las secuencias localizadas dentro del exón 1 y exón 3 (pero no con la del exón 2) del transcrito del gen porcino de NPPB (véase el Capítulo 1; Tabla 8). En el trabajo presente, hemos caracterizado este transcrito como una nueva variante de splicing alternativo de NPPB porcino resultante del skipping del exón 2 (denominada como DE2-NPPB) aportando las evidencias de que: (1) in vivo, la expresión del DE2-NPPB se up-regula significativamente en el miocardio porcino y humano en la insuficiencia cardíaca y (2) la proteína DE2-NPPB inhibe la producción y secreción de NPPB regular en experimentos de co-transfección celular in vitro.

3.2. Resultados

3.2.1. El skipping del exón 2 genera una nueva variante de NPPB que se expresa asimétricamente en el corazón de cerdos recién nacidos

Inicialmente, con el objetivo de comprobar si la variante $\Delta E2$ -NPPB se detecta y se expresa en el corazón de cerdos recién nacidos, ejecutamos el análisis correspondiente mediante RT-PCR con los oligonucleótidos complementarios a las secuencias del exón 1 (oligonucleótido 289) y del exón 3 (oligonucleótido 288)

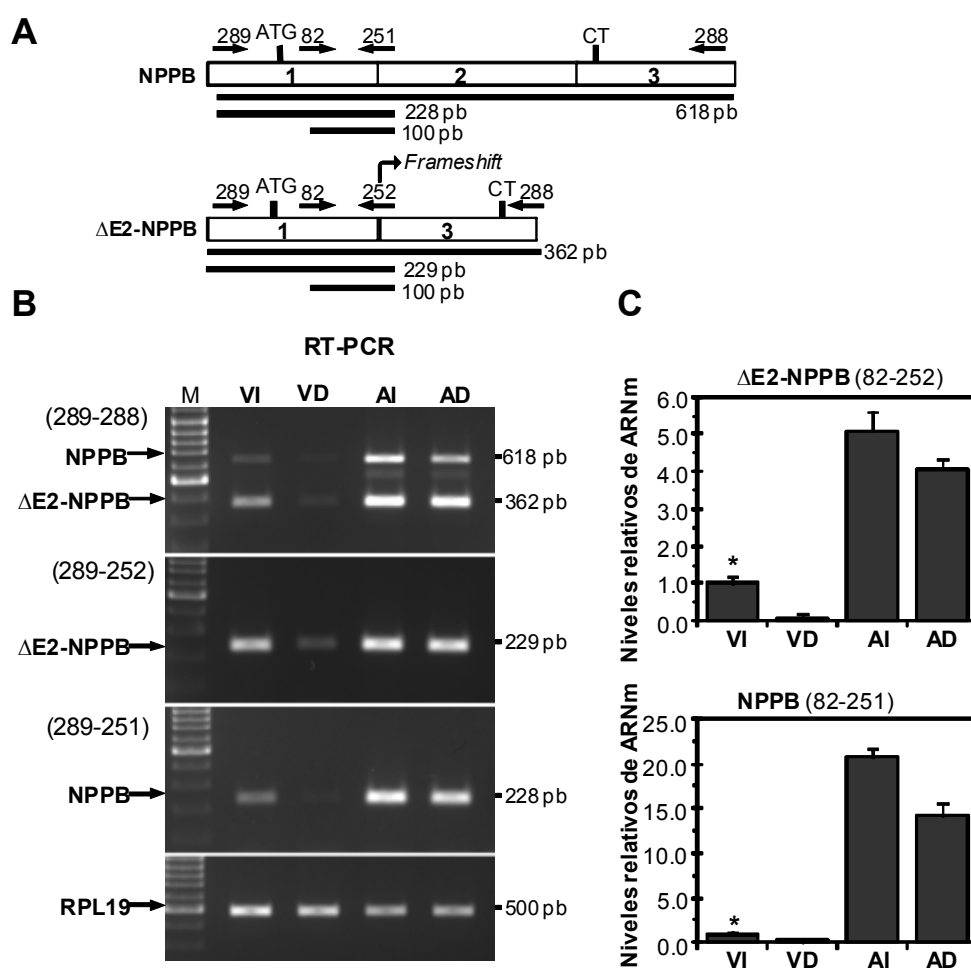


Figura 32. Identificación, caracterización y expresión de una nueva variante de NPPB generada por el skipping del exón 2 ($\Delta E2$ -NPPB) en el corazón de cerdos recién nacidos. A - representaciones esquemáticas de las secuencias de NPPB porcino regular (n° acc. NM_213846) y de NPPB con el skipping del exón 2 ($\Delta E2$ -NPPB) usadas para el diseño de los oligonucleótidos. 1-3 - exones. ATG - codón de inicio. CT - codón de terminación. Se indica la localización aproximada de los oligonucleótidos para los análisis por RT-PCR y qPCR. Líneas negras gruesas - tamaño esperado de los amplicones correspondientes. B y C - expresión del ARNm de $\Delta E2$ -NPPB y NPPB en las cuatro cámaras cardíacas de los cerdos recién nacidos según lo revelado por RT-PCR y qPCR, respectivamente (los oligonucleótidos utilizados se indican entre paréntesis). VI/VD - ventrículo izquierdo/derecho. AI/AD - aurícula izquierda/derecha. M - GeneRuler DNA ladder mix (Fermentas). * $p \leq 0.05$ respecto al VD.

del gen porcino NPPB (Fig. 32A). En cada cámara cardiaca de cerdos recién nacidos, se han detectado dos productos de PCR amplificados de tamaño distinto (Fig. 32B). Su posterior clonación y secuenciación revelaron que el fragmento de 618 pb corresponde a la secuencia continua de nucleótidos del exón 1, 2 y 3 del gen NPPB, mientras que la banda de 362 pb corresponde a la secuencia del exón 1 y 3 con una "escisión" precisa del exón 2 (es decir, el *skipping* del exón 2) (Fig. 32A). Por esta razón, el ADNc completo de esta variante de NPPB, incluyendo la secuencia codificante del péptido señal, se ha denominado como $\Delta E2$ -NPPB. Tanto el transcripto $\Delta E2$ -NPPB como el NPPB mostraron una distribución asimétrica similar en el corazón de cerdos recién nacidos, siendo más abundante en las aurículas que en los ventrículos y en el ventrículo/aurícula izquierda comparados con el ventrículo/aurícula derecha (Fig. 32C). $\Delta E2$ -NPPB no es un transcripto que tiene una escasa presentación en el miocardio porcino neonatal. Es importante destacar que en el miocardio procedente de las 4 cámaras cardíacas, el transcripto $\Delta E2$ -NPPB es, hasta 2 veces, más abundante que el transcripto regular correspondiente al NPPB (Fig. 32B; panel superior).

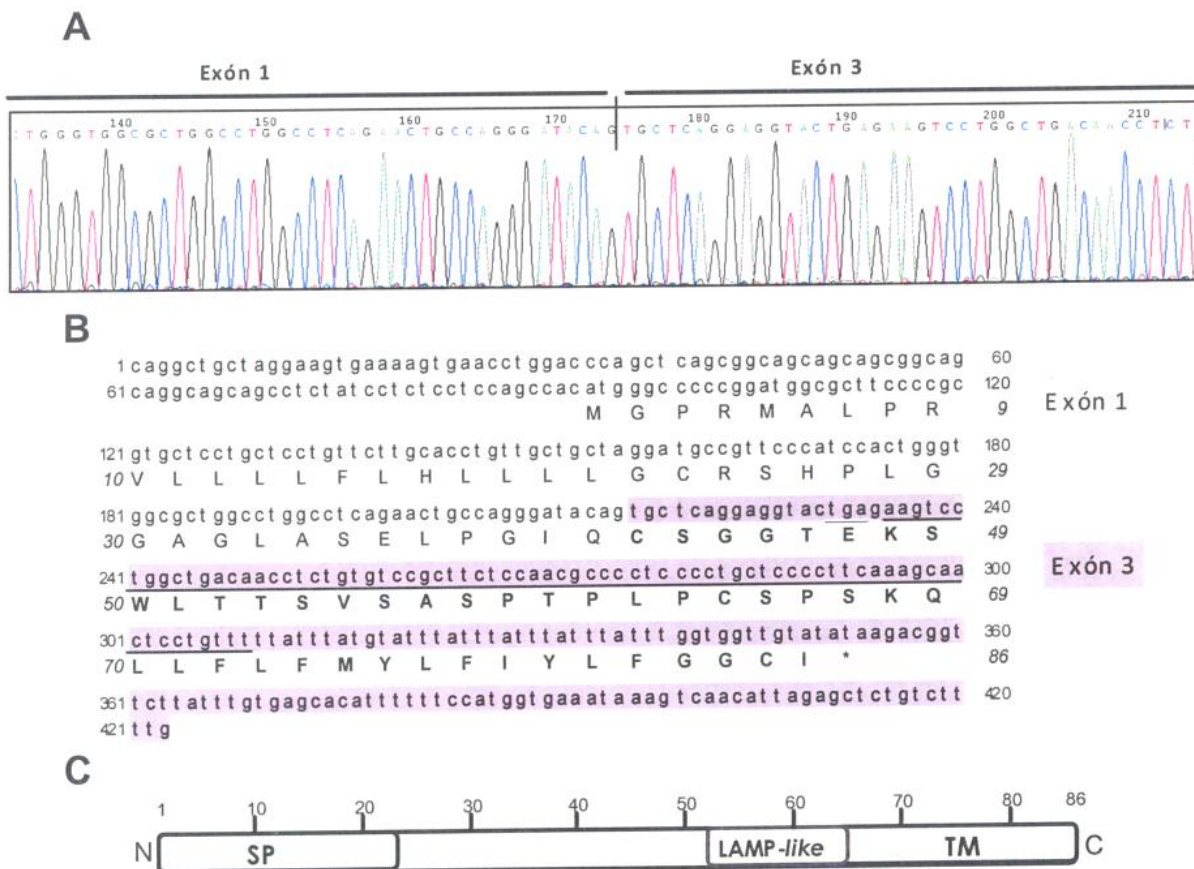


Figura 33. Secuencias de nucleótidos/aminoácidos de $\Delta E2$ -NPPB y dominios identificados en la estructura primaria de la proteína. A – resultados de la secuenciación automática del ADN de $\Delta E2$ -NPPB. **B** – secuencias de los nucleótidos y aminoácidos (letras mayúsculas) de $\Delta E2$ -NPPB. La secuencia codificante del exón 3 está marcada en gris. Se muestra subrayada la secuencia de los aminoácidos 48-61 (KSW) y 61-72 (PLP) utilizados para sintetizar los péptidos correspondientes. **C** – dominios identificados en la estructura primaria de la proteína $\Delta E2$ -NPPB. Los dominios LAMP-like y transmembrana (TM) se han mapeado utilizando los algoritmos CDD (Marchler-Bauer *et al.*, 2009) y ConPred II (Arai *et al.*, 2004), respectivamente. SP – péptido señal.

La Figura 33 muestra las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la variante DE2-NPPB porcina. El análisis traduccional informático predice que el skipping del exón 2 causaría un cambio en el marco de lectura (desde el inicio del exón 3) produciendo un péptido no sólo sin la secuencia de aminoácidos (aa) correspondiente al exón 2, sino incorporando 40 aa adicionales a la traducción del exón 3, en comparación con NPPB regular. El análisis bioinformático de la secuencia de aa de DE2-NPPB porcino predice las siguientes características: (1) un peso molecular de 9.2 kDa, (2) un punto isoeléctrico de 8.9, (3) un péptido señal (aa 1-23), (4) un dominio putativo LAMP (aa 52-66) parecido al de la familia proteica Lamp (lysosome-associated membrane proteins), y (5) un dominio transmembrana (aa 65-85). La mitad C-terminal de la secuencia proteica de DE2-NPPB también contiene tres residuos cisteína para formar puentes di-sulfuro internos que se requieren para un "LAMP fold" clásico (David et al., 2007).

En conjunto, los resultados permiten predecir que la variante DE2-NPPB detectada en el corazón de cerdos recién nacidos, podría producir, si se traduce eficazmente, una nueva, y previamente no reconocida, isoforma de NPPB.

3.2.2. El transcripto DE2-NPPB se traduce eficazmente en sistemas celulares de expresión proteica

La secuencia codificante completa (FL – full length), con o sin el péptido señal, y la secuencia codificante solo del exón 3 del DE2-NPPB porcino, así como, la secuencia codificante de FL-NPPB porcino (con el péptido señal) se han clonado en el vector procariota pCAL-n-FLAG y expresado en *E. coli* (Fig. 34A). Las proteínas previamente purificadas por cromatografía de afinidad (en una columna de gránulos de agarosa Calmodulin affinity resin; véase "Materiales y Métodos"; Apartado 6.3) se han analizado por SDS-PAGE seguido por Western blot con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG o con los anticuerpos policlonales denominados anti-PLP (Fig. 34B). Los anticuerpos anti-PLP generados contra el péptido sintético (aa 61-72 de DE2-NPPB porcino) reconocen el péptido codificado por el exón 3 pero no reconocen ni FL-DE2-NPPB ni FL-NPPB (Fig. 34B). Basándonos en los resultados del análisis inmunoblot, concluimos que el peso/tamaño molecular (PM) aparente de las proteínas expresadas es similar a los valores de su PM deducido. Además, los resultados revelaron que la elevada producción del péptido codificado por el exón 3 de DE2-BNP en *E. coli* podría resultar en su dimerización. Así, la co-electroforesis de este péptido en presencia y ausencia de DTT demostró la formación de los dímeros en la ausencia de agentes reductores (Fig. 34C). El fenómeno de dimerización de este péptido podría probablemente estar asociado con la presencia de tres residuos cisteína en su secuencia.

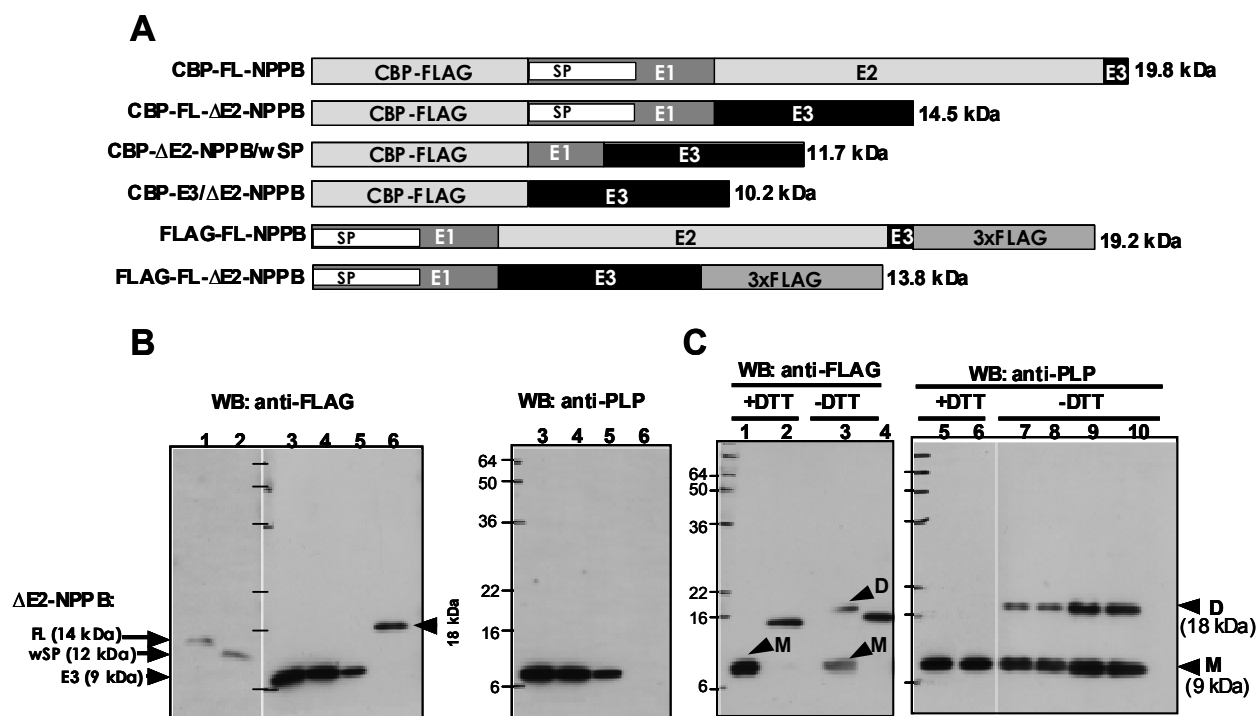


Figura 34. Análisis de la expresión proteica de $\Delta E2$ -NPPB porcino en ensayos basados en *E. coli*. **A** – representación esquemática de las construcciones con los epítomos CBP-FLAG que portan varias configuraciones de NPPB porcino y $\Delta E2$ -NPPB. Las secuencias que codifican para el exón 3 (E3) y para el péptido señal (SP) se marcan con rectángulos negros y blancos, respectivamente. wSP – sin el péptido señal (*without signal peptide*). Se indican los valores teóricos de PM (kDa). **B** – detección mediante *Western blot* (WB) de las construcciones expresadas con los anticuerpos anti-FLAG (panel izquierdo) o anti-PLP (panel derecho). Construcciones expresadas: FL- $\Delta E2$ -NPPB (carril 1), FL- $\Delta E2$ -NPPB/wSP (carril 2), E3/ $\Delta E2$ -NPPB (carriles 3-5) y FL-NPPB (carril 6). Se indican los valores del PM (kDa). **C** – la proteína codificada por el E3 de $\Delta E2$ -NPPB porcino (E3/ $\Delta E2$ -NPPB en **A**) se ha sometido a electroforesis en presencia (+DTT, carriles 1, 2, 5 y 6) o ausencia (-DTT, carriles 3, 4, 7-10) de agentes reductores y al análisis inmunoblot con los anticuerpos anti-FLAG (panel izquierdo, carriles 1 y 3; E3/ $\Delta E2$ -NPPB; carriles 2 y 4; NPPB) o anti-PLP (panel derecho, carriles 5-10: E3/ $\Delta E2$ -NPPB). M y D – monómeros y dímeros, respectivamente.

Otra confirmación de que la variante $\Delta E2$ -NPPB porcina se traduce eficazmente en el producto proteico correspondiente se ha obtenido mediante la transfección de la línea celular de mamíferos, COS-7. Con este fin, hemos generado un vector de expresión del FL- $\Delta E2$ -NPPB fusionado a 3 epítomos FLAG consecutivos bajo el promotor de CMV. El vector de expresión de FLAG-FL-NPPB se ha usado en paralelo como un control de referencia. La transfección transitoria de la construcción FL- $\Delta E2$ -NPPB en las células COS-7 resultó en la producción de la proteína correspondiente estable y fácilmente detectable (mediante *Western blot*) en las células transfectadas (Fig. 35A).

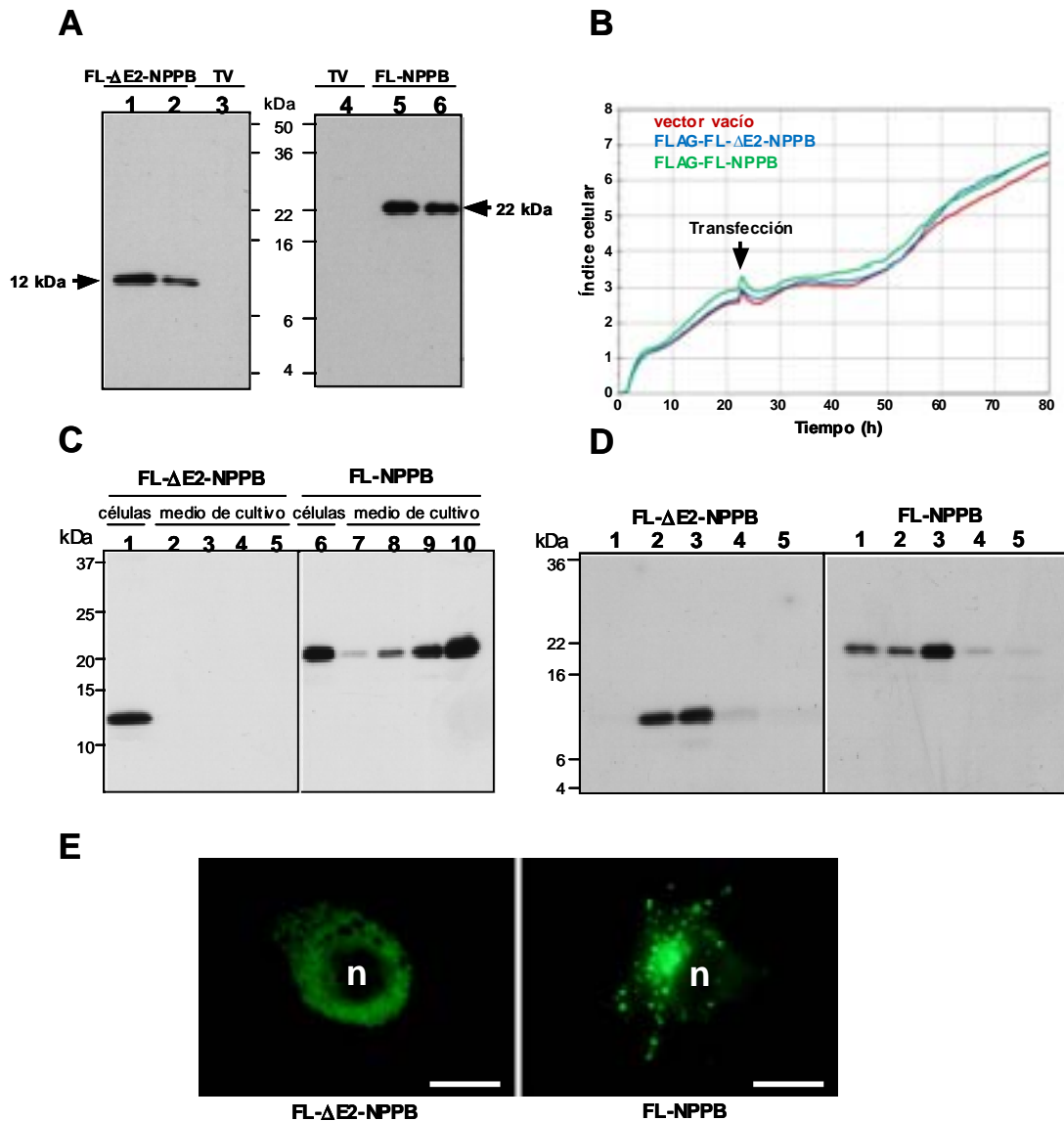


Figura 35. Análisis de la expresión proteica de ΔE2-NPPB porcino en ensayos basados en células COS-7. A – células COS-7 transfectadas con las construcciones FL-ΔE2-NPPB con el epítipo FLAG (panel izquierdo; carriles 1, 2) o FL-NPPB (panel derecho; carriles 5, 6) sometidas al análisis inmunoblot con el anticuerpo anti-FLAG. TV – células transfectadas sólo con el vector (carriles 3 y 4). **B** – referencias de los datos del escaneo en tiempo real de los índices de las células COS-7 mediante RTCA SP (número de células, adhesión y viabilidad) antes, en el momento y después de la transfección. **C** – células COS-7 transfectadas con las construcciones FLAG-FL-ΔE2-NPPB (panel izquierdo) o FLAG-FL-NPPB (panel derecho): extractos celulares libres de medio (carriles 1 y 6), concentrado libre de células (carriles 2 y 7) y muestras de medio de cultivo concentrado: 2 veces (carriles 3, 8), 4 veces (carriles 4, 9) y 12 veces (carriles 5, 10) sometidas al análisis inmunoblot con el anticuerpo anti-FLAG. Valores de PM, kDa. **D** – células COS-7 transfectadas con las construcciones FLAG-FL-ΔE2-NPPB (panel izquierdo) o FLAG-FL-NPPB (panel derecho) se han lavado y posteriormente extraído usando el *ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit* (Calbiochem). Carril 1 – medio libre de células. Carril 2 – fracción citosólica, carril 3 – fracción de membranas, carril 4 – fracción nuclear, carril 5 – fracción del citoesqueleto. Detección inmunoblot con el anticuerpo anti-FLAG. **E** – detección inmunofluorescente de las proteínas expresadas FLAG-FL-ΔE2-NPPB (panel izquierdo) o FLAG-FL-NPPB (panel derecho) en las células COS-7 transfectadas respectivamente usando el anticuerpo anti-FLAG marcado con FITC. n – núcleo. Barra – 50 μm.

Este producto proteico recombinante de PM de 12 kDa es similar en tamaño a la misma proteína (de 14 kDa) sintetizada en *E. coli* y purificada por cromatografía de afinidad (véase la Fig. 34B). La expresión de la construcción FL-NPPB en células COS-7, por el contrario, resultó en la producción de una proteína de 22 kDa (Fig. 35A), aunque la misma construcción expresada en *E. coli* generó el producto proteico de 18 kDa (véase Fig. 34B). La diferencia en los valores del PM entre la proteína FL-NPPB expresada en *E. coli* versus células COS-7 podría estar condicionada por modificaciones post-traduccionales en el contexto celular de COS-7. En este sentido, NPPB humano expresado en células de ovario de hamster migra, en SDS-PAGE, como una banda de 25 kDa; su PM se reduce a los 12 kDa después del tratamiento de la proteína con enzimas de desglicosilación (Schellenberger et al., 2006).

Las células COS-7 transfectadas con DE2-NPPB no manifestaron diferencias aparentes en su viabilidad, tasa de replicación o fenotipo en comparación con las células transfectadas con FL-NPPB o con el vector vacío (véase Fig. 35B). Aunque se han detectado niveles similares de FL-DE2-NPPB y FL-NPPB en extractos totales de células COS-7 transfectadas respectivamente, solo FL-NPPB se ha detectado en el medio de cultivo (Fig. 35C) demostrando así que FL-DE2-NPPB, por el contrario a FL-NPPB, no se secreta o se secreta de un modo insignificante. Cabe destacar que las diferencias en la secreción entre FL-DE2-NPPB y FL-NPPB no están relacionadas con el péptido señal, que ambas proteínas tienen en común.

La predicción de los dominios putativos LAMP-like y trans-membrana en DE2-NPPB (véase la Fig. 33C) supone que esta proteína, expresada y procesada endógenamente, podría asociarse con las membranas subcelulares. Para examinar y comparar la distribución subcelular de DE2-NPPB versus NPPB, las células COS-7 transfectadas respectivamente, han sido sometidas a la extracción secuencial (véase "Materiales y Métodos", Apartado 3.1.2) con reactivos que permiten la solubilización de proteínas según su localización subcelular. Las fracciones proteicas resultantes, así como el correspondiente medio condicional, se han analizado mediante separaciones SDS-PAGE seguido por Western blot con anticuerpos anti-FLAG. Tal y como era previsible, DE2-NPPB no se ha detectado, mientras que NPPB sí se ha detectado en el medio de cultivo de las células COS-7 respectivamente transfectadas (Fig. 35D). Los resultados de la extracción posterior de las células transfectadas revelaron que una proporción significativa de ambas proteínas sintetizadas (DE2-NPPB y NPPB) se liberan de las células en el tampón (véase Fig. 35D; carril 3) que solubiliza los compuestos de las membranas celulares, sin afectar a la integridad proteica del núcleo y del citoesqueleto. Unos niveles similares de enriquecimiento de DE2-NPPB, aunque de menor grado, se

detectado en la fracción citosólica de las células transfectadas. Por el contrario, los niveles citosólicos de FL-NPPB fueron significativamente menores, probablemente debido a su secreción al medio. Sólo se han detectado trazas de DE2-NPPB en las fracciones proteicas del núcleo y del citoesqueleto; los niveles relativos de NPPB en estas fracciones fueron ligeramente mayores.

En su conjunto, los resultados sugieren que, aunque ambas proteínas recombinantes se expresan y acumulan en las células COS-7, DE2-NPPB, a diferencia de NPPB, no se secreta al medio de cultivo.

Para obtener más información referente a la localización intracelular de DE2-NPPB versus NPPB, hemos utilizado la detección inmunocitoquímica de estas proteínas fusionadas a los epítomos FLAG en células COS-7 respectivamente transfectadas con el uso de los anticuerpos anti-FLAG marcados con fluoresceína. DE2-NPPB está enriquecido principalmente en gránulos agrupados en la región peri-nuclear de las células transfectadas, sugiriendo que esta proteína podría estar asociada, al menos parcialmente, con los endo/lisosomas convencionales. No se ha detectado una señal inmunofluorescente en la membrana plasmática de las células COS-7 transfectadas con DE2-NPPB. El patrón de distribución de NPPB, por el contrario, se ha caracterizado por la presencia de numerosas vesículas fluorescentes a lo largo del citoplasma (Fig. 35E). Este patrón de distribución punteado es característico de las proteínas secretadas. Cabe subrayar, en este sentido, que los resultados de nuestro análisis bioinformático de las secuencias de DE2-NPPB y NPPB (mediante el algoritmo pTARGET) resultaron en predicciones altamente fiables de la localización lisosomal y de la secreción, respectivamente.

Concluyendo, los resultados de distintas series experimentales sugieren firmemente que el transcrito DE2-NPPB podría generar una isoforma proteica estable in vivo. Aunque tanto la isoforma DE2-NPPB como la NPPB se detectan en el citoplasma de células COS-7 transfectadas, DE2-NPPB, a diferencia de NPPB, no se secreta al medio y muestra un patrón de distribución intracelular distinto del NPPB.

3.2.3. La expresión de DE2-NPPB se down-regula en el miocardio porcino durante el desarrollo postnatal

Hemos comparado los niveles de la variante DE2-NPPB en las cuatro cámaras cardíacas de cerdos recién nacidos y de 30 días utilizando qPCR (Fig. 36). Los niveles cardíacos de DE2-NPPB se reducen significativamente a los 30 días de edad comparándolos con los animales recién nacidos, pero el grado de

disminución de la expresión de DE2-NPPB es diferente en cada cámara cardíaca. En los animales de 30 días, la máxima reducción de los niveles del transcripto DE2-NPPB se ha observado en el VD (reducción de 21.6 veces), acompañada por una down-regulación, aunque menos llamativa, en el VI (12.7 veces). Por el contrario, en la AD y AI de estos cerdos neonatales, la disminución en los niveles del transcripto DE2-NPPB ha sido significativamente menor (disminución de 5.6 y 1.7 veces, respectivamente) comparándola con los ventrículos.

Los resultados indican que, dentro de las primeras 4 semanas de la vida postnatal, el crecimiento rápido del miocardio está asociado con la down-regulación de la expresión cardíaca de DE2-NPPB, más significativa en los ventrículos que en las aurículas y en las cámaras cardíacas derechas que en las izquierdas.

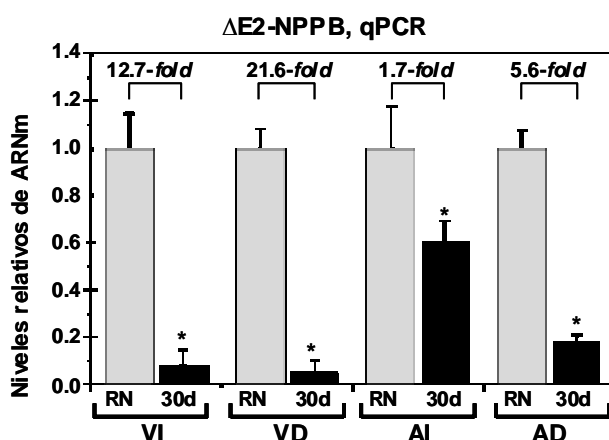


Figura 36. Niveles cardíacos del ARNm de ΔE2-NPPB en el desarrollo postnatal porcino. Niveles de ARNm de ΔE2-NPPB en las cámaras cardíacas de cerdos recién nacidos (RN, n=6) versus cerdos de 30 días (30 d, n=6). VI/VD – ventrículo izquierdo/derecho. AI/AD – aurícula izquierda/derecha. * p≤0.05.

3.2.4. La expresión de DE2-NPPB se re-activa en el modelo porcino de insuficiencia cardíaca diastólica

Los niveles elevados de NPPB en el plasma son indicativos de la disfunción diastólica severa (Grewal et al., 2008a,b). En el presente trabajo, se ha inducido la insuficiencia cardíaca diastólica (ICD) experimental en cerdos postnatales de 6 días de edad mediante una única inyección de Dox. Veinticuatro días más tarde, los animales desarrollaron una disfunción diastólica severa bi-ventricular que culminaba en una congestión pulmonar (véase también: Torrado et al., 2006).

Hemos cuantificado (mediante qPCR) los niveles relativos del transcripto $\Delta E2-NPPB$ en el miocardio del VI y VD de los cerdos control (inyectados con PBS) y experimentales (inyectados con Dox) (Fig. 37A-C). En cerdos de 30 días con la ICD, los niveles del ARNm $\Delta E2-NPPB$ estuvieron significativamente aumentados en ambos ventrículos estando mucho más up-regulados en el VD (incremento de 38.8 veces) que en el VI (incremento de 9.4 veces) en comparación con los cerdos control. El incremento del ARNm $\Delta E2-NPPB$ en el VD y VI en la ICD versus control no ha superado los valores de 6.3 y 5.1, respectivamente (datos no mostrados). A este respecto, sugerimos que la variante $\Delta E2-NPPB$ podría ser superior a $\Delta E2-NPPB$ como un marcador molecular intra-cardíaco de la ICD experimental.

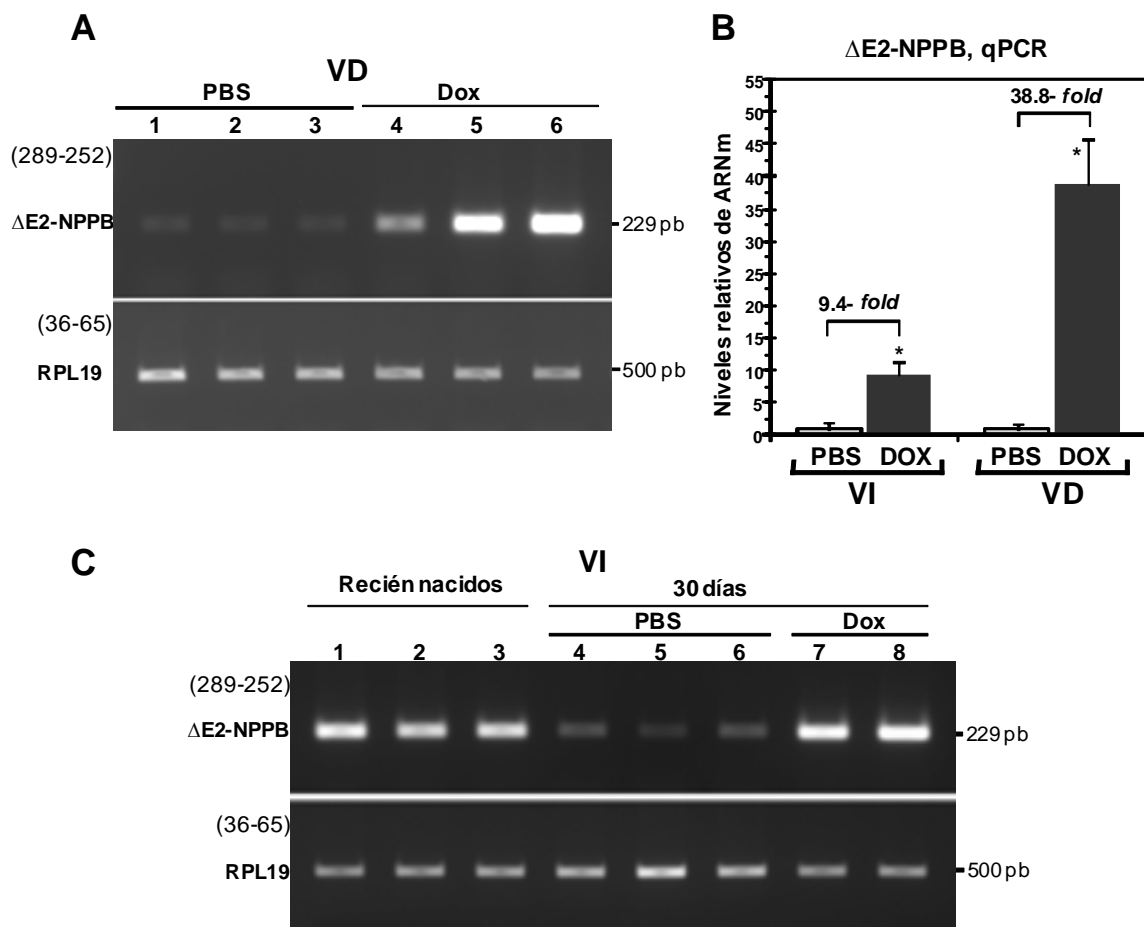


Figura 37. Niveles cardíacos del ARNm de $\Delta E2-NPPB$ en la ICD experimental. **A** – RT-PCR semicuantitativa representativa para los transcriptos $\Delta E2-NPPB$ (diana) y RPL19 (referencia) en el miocardio del VD de cerdos de 30 días inyectados con Dox (n=3) versus PBS (n=3). Los pares de oligonucleótidos utilizados se indican entre paréntesis. **B** – niveles promedio de ARNm de $\Delta E2-NPPB$ en el VI/VD en cerdos inyectados con Dox (n=12) versus PBS (n=12) estimado por el análisis qPCR. * $p \leq 0.05$. **C** – RT-PCR semicuantitativa de los niveles del transcripto $\Delta E2-NPPB$ en el VI de cerdos recién nacidos (n=3) y de cerdos de 30 días inyectados con PBS (control; n=3) o Dox (condiciones de la ICD; n=2).

Además, la comparación de los niveles del transcrito DE2-NPPB en el VI/VD (por RT-PCR semicuantitativa) en cerdos recién nacidos versus de 30 días normales y con la ICD revela que en el miocardio ventricular la expresión de DE2-NPPB, down-regulada después del nacimiento, se reactiva en la ICD alcanzando niveles similares a los observados en los animales recién nacidos (Fig. 37C).

3.2.5. DE2-NPPB atenúa la acumulación y la secreción de NPPB en ensayos celulares in vitro

Debido a que las variantes DE2-NPPB y NPPB se co-expresan en el miocardio porcino normal y se co-upregulan en el miocardio en la ICD experimental, sería interesante estudiar posibles consecuencias de esta co-regulación, y, particularmente, en determinar si la isoforma no secretada DE2-NPPB podría influir sobre las tasas de acumulación/secreción de la isoforma proteica NPPB en las células que co-expresarían ambas isoformas. Con el fin de testar esta posibilidad, co-transfectamos simultáneamente las células COS-7 con: (1) una concentración constante de un plásmido portador del FL-NPPB fusionado al epítopo myc, (2) concentraciones crecientes de un plásmido portador del FL-DE2-NPPB fusionado al epítopo FLAG, y (3) concentraciones decrecientes del vector vacío para normalizar la concentración total de ADN plasmídico en diferentes co-transfecciones (así, cada lote de células transfectadas podría recibir la misma cantidad de ADN plasmídico total).

Las células COS-7 transfectadas con los diferentes plásmidos se han analizado por Western blot y RT-PCR. La figura 38A muestra la detección de la expresión proteica de NPPB y de DE2-NPPB en las células co-transfectadas. Como esperábamos, ambas proteínas se pueden detectar en las células transfectadas. La observación más sorprendente fue, a pesar de que ambas proteínas se detectaron en las células, la inhibición dramática de la acumulación de myc-NPPB (Fig. 38A, panel superior, carriles 4-6) en presencia de cantidades crecientes del plásmido FLAG-DE2-NPPB, lo que no se ha observado en las células co-transfectadas con el plásmido myc-NPPB y el vector vacío (Fig. 38A, panel superior, carril 1) o con el plásmido que expresa la proteína no relevante (Fig. 38C, panel superior, carriles 2-6) donde se detectaron cantidades similares de la isoforma proteica NPPB. Es importante subrayar que la inhibición de la acumulación de NPPB dentro de las células transfectadas se ha asociado con su secreción reducida al medio de cultivo (Fig. 38A, paneles inferiores).

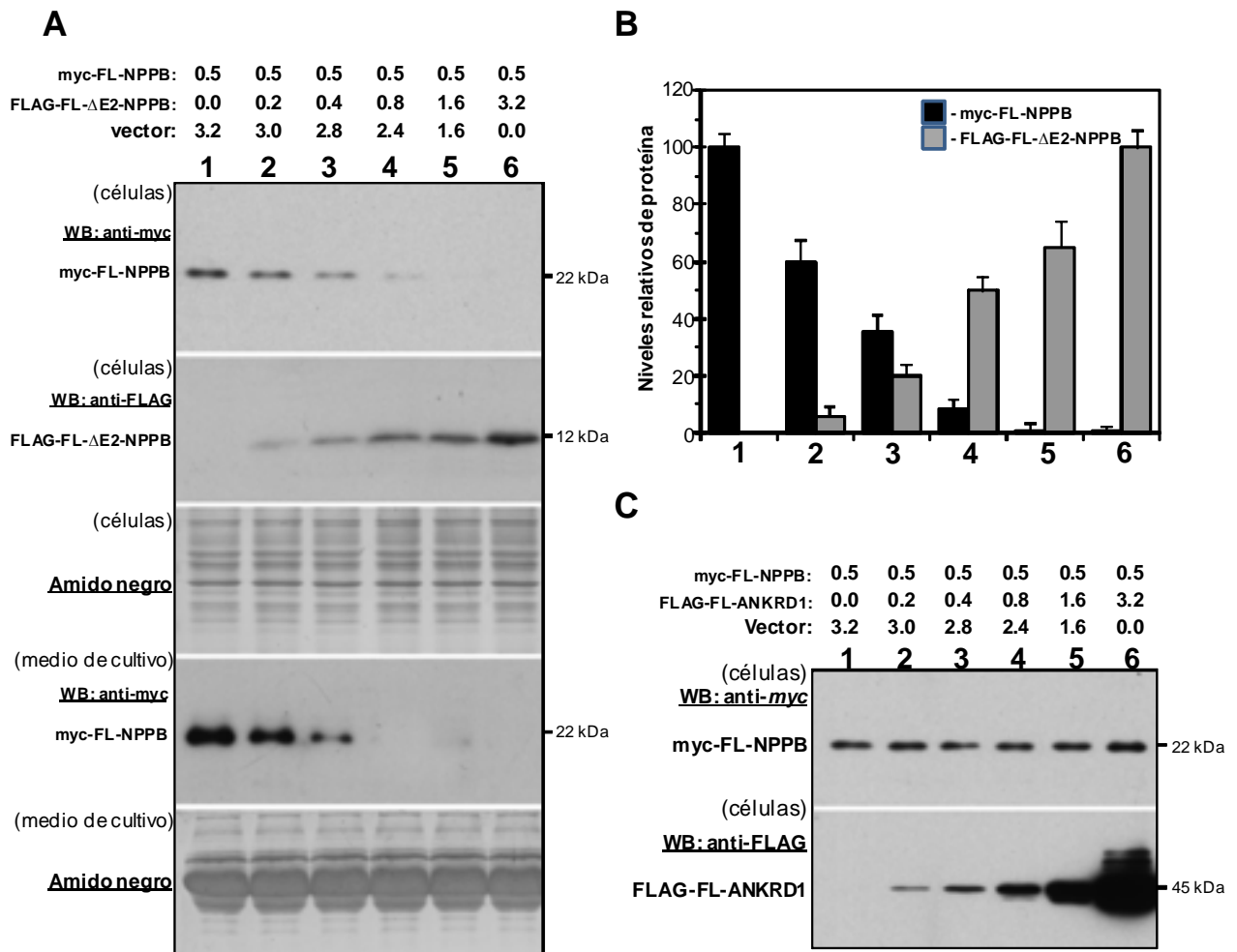


Figura 38. La proteína Δ E2-NPPB afecta la producción y secreción del precursor NPPB según lo revelado por los ensayos de co-transfección celular. **A** – lisados (células) totales proteicos y medio libre de células (medio de cultivo) procedente de las células COS-7 co-transfectadas con myc-FL-NPPB, FLAG-FL- Δ E2-NPPB y el vector vacío que fueron sometidos a electroforesis e inmunoblot (WB) con anticuerpos anti-myc o anti-FLAG. Se muestran los valores de PM (kDa) de las bandas detectadas. **B** – relación inversa entre la expresión proteica de NPPB y de Δ E2-NPPB en células COS-7 co-transfectadas. Los datos promedio de cuatro replicados de cada combinación de co-transfección (carriles 1-6 como se indica en **A**). **C** – lisados (células) totales proteicos de las células COS-7 co-transfectadas con myc-FL-NPPB, FLAG-FL-ANKRD1 (control) y el vector vacío fueron sometidos a electroforesis e inmunoblot (WB) con anticuerpos anti-myc o anti-FLAG. Se muestran los valores de PM (kDa) de las bandas detectadas.

La figura 38B muestra los resultados de cuatro repeticiones de esta serie experimental demostrando que la inhibición de la acumulación de NPPB por Δ E2-NPPB en células COS-7 co-transfectadas es dosis dependiente. Es decir que el grado de la inhibición de la acumulación de la isoforma NPPB es directamente proporcional al aumento de los niveles de la isoforma Δ E2-NPPB.

Un posible efecto inespecífico de la isoforma DE2-NPPB sobre la producción de la isoforma NPPB se ha estudiado en experimentos de co-transfección usando el vector myc-NPPB en combinación con el plásmido portador de ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1) fusionado al epítipo FLAG. En las células COS-7 respectivamente co-transfectadas, los niveles del producto proteico myc-NPPB permanecieron inalterados a pesar de la co-expresión del FLAG-ANKRD1 a niveles extremadamente altos (Fig. 38C, compárense los carriles 1-3 con los carriles 4-6). En las co-transfecciones DE2-NPPB/NPPB, los niveles de ARNm de NPPB (determinados por RT-PCR) no estuvieron afectados, descartando un posible efecto de la expresión de DE2-NPPB sobre la funcionalidad del promotor CMV. La co-inmunoprecipitación no detectó la interacción entre las isoformas DE2-NPPB y NPPB co-expresadas en las células COS-7 (datos no mostrados).

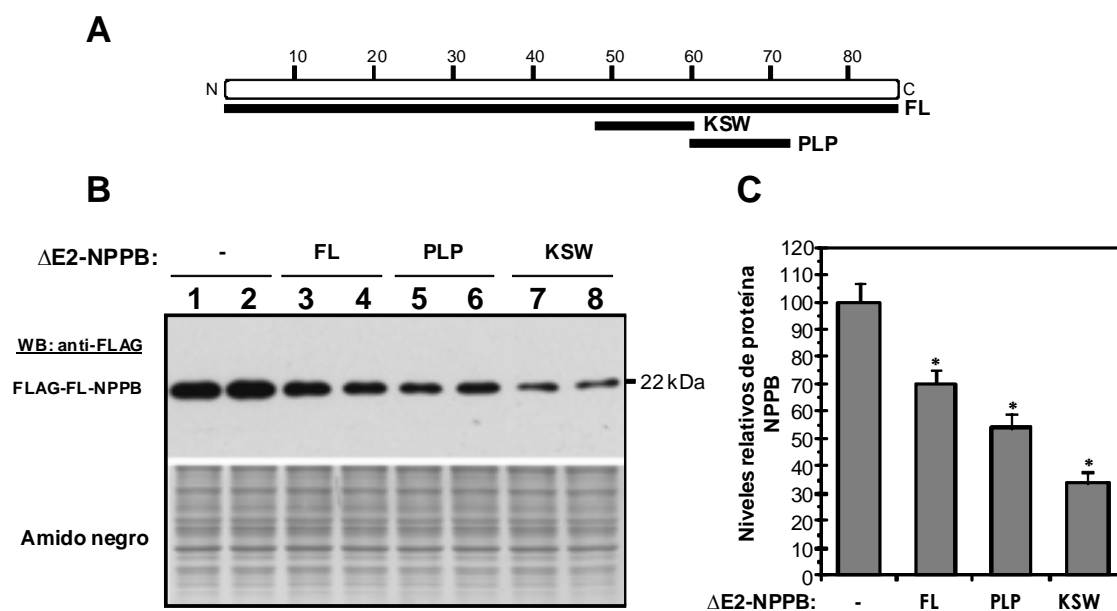


Figura 39. La acumulación de la proteína NPPB se inhibe en las células transfectadas en presencia de los péptidos ΔE2-NPPB sintetizados *in vitro* en el medio de cultivo. **A** – mapeo esquemático de los péptidos ΔE2-NPPB sintetizados *in vitro* (FL - full length; KSW, PLP) sobre la secuencia proteica completa de ΔE2-NPPB. **B** – membranas tratadas con anticuerpos anti-FLAG (WB; panel superior) y teñidas posteriormente con Amido negro (carga proteica; panel inferior). Las células COS-7 transfectadas con el vector FLAG-FL-NPPB se han cultivado en medio complementado con: vehículo de transfección proteica (carriles 1, 2), FL-ΔE2-NPPB (carriles 3, 4), PLP-ΔE2-NPPB (carriles 5, 6) o KSW-ΔE2-NPPB (carriles 7, 8). 22 kDa - PM de FLAG-FL-NPPB. **C** – efecto promedio (n=3) de la inhibición de la acumulación de la proteína NPPB en las células cultivadas en presencia de los péptidos ΔE2-NPPB en el medio de cultivo. * p≤0.05. La secuencia de aa de los péptidos KSW- y PLP-ΔE2-NPPB se muestra en la Figura 33 (página 112).

El siguiente paso era comprobar si la adición de la proteína DE2-NPPB exógena podría afectar a la síntesis y acumulación de NPPB en las células transfectadas. Con este fin, hemos monitorizado los niveles de expresión del plásmido FLAG-NPPB (mediante Western blot) en las células COS-7 respectivamente transfectadas y cultivadas en presencia de FL-DE2-NPPB sintético o de sus péptidos (PLP y KSW) en el medio (Fig. 39A). A las concentraciones aplicadas, todos los péptidos sintéticos inhibieron la acumulación de la proteína FLAG-NPPB recombinante en las células transfectadas (Fig. 39B), siendo el efecto inhibitorio del péptido KSW-DE2-NPPB máximo (Fig. 39B, C) y comparable con el grado de la inhibición de la acumulación de NPPB en las co-transfecciones con el plásmido DE2-NPPB (véase la Fig. 38B, posición 3). Esto último sugiere que la actividad inhibitoria de la isoforma DE2-NPPB sobre la expresión de la isoforma NPPB regular se determina por los residuos localizados dentro de la secuencia de DE2-NPPB codificada por el exón 3 (véase Fig. 33B).

En conjunto, los resultados de los ensayos de co-transfección celular sugieren que: (1) la isoforma DE2-NPPB podría desempeñar un papel negativo en la regulación post-transcripcional de NPPB y (2) el nivel de la expresión proteica de DE2-NPPB podría ser un factor limitante en cuanto a los niveles de la acumulación y secreción del NPPB en los cardiomiocitos.

3.2.6. Las variantes de NPPB generadas por el skipping de exones se detectan en el miocardio humano normal y cardiomiopático

Debido a que nuestros resultados en el modelo porcino indican que la expresión de la variante DE2-NPPB está significativamente reactivada en la ICD experimental (véase la Fig. 37), nos pareció lógico comprobar si también eso ocurre en el miocardio humano con la insuficiencia cardíaca. Para examinar esta posibilidad, primero estudiamos la presencia de las variantes de NPPB generadas por el skipping de exones en las muestras cardíacas procedentes de un paciente de 8 semanas de edad. Se han detectado (mediante RT-PCR) dos variantes generadas por el skipping de exones de NPPB en el miocardio humano: uno similar al DE2-NPPB porcino con el skipping del exón 2 (denominado DE2 humano NPPB o DE2-hNPPB) y el otro transcrito con el skipping parcial del exón 1 y el skipping completo del exón 2 denominado pDE1/DE2-hNPPB (Fig. 40A-B). De acuerdo con el análisis bioinformático de las secuencias correspondientes, el DE2-hNPPB es un ortólogo de la variante porcina DE2-NPPB mientras que la variante pDE1/DE2-hNPPB representa un transcrito sin un marco de lectura identificable. En corazones humanos postnatales, ambos transcritos, DE2-hNPPB y pDE1/DE2-hNPPB, se han detectado a unos niveles más abundantes en las aurículas que en los ventrículos (Fig. 40B).

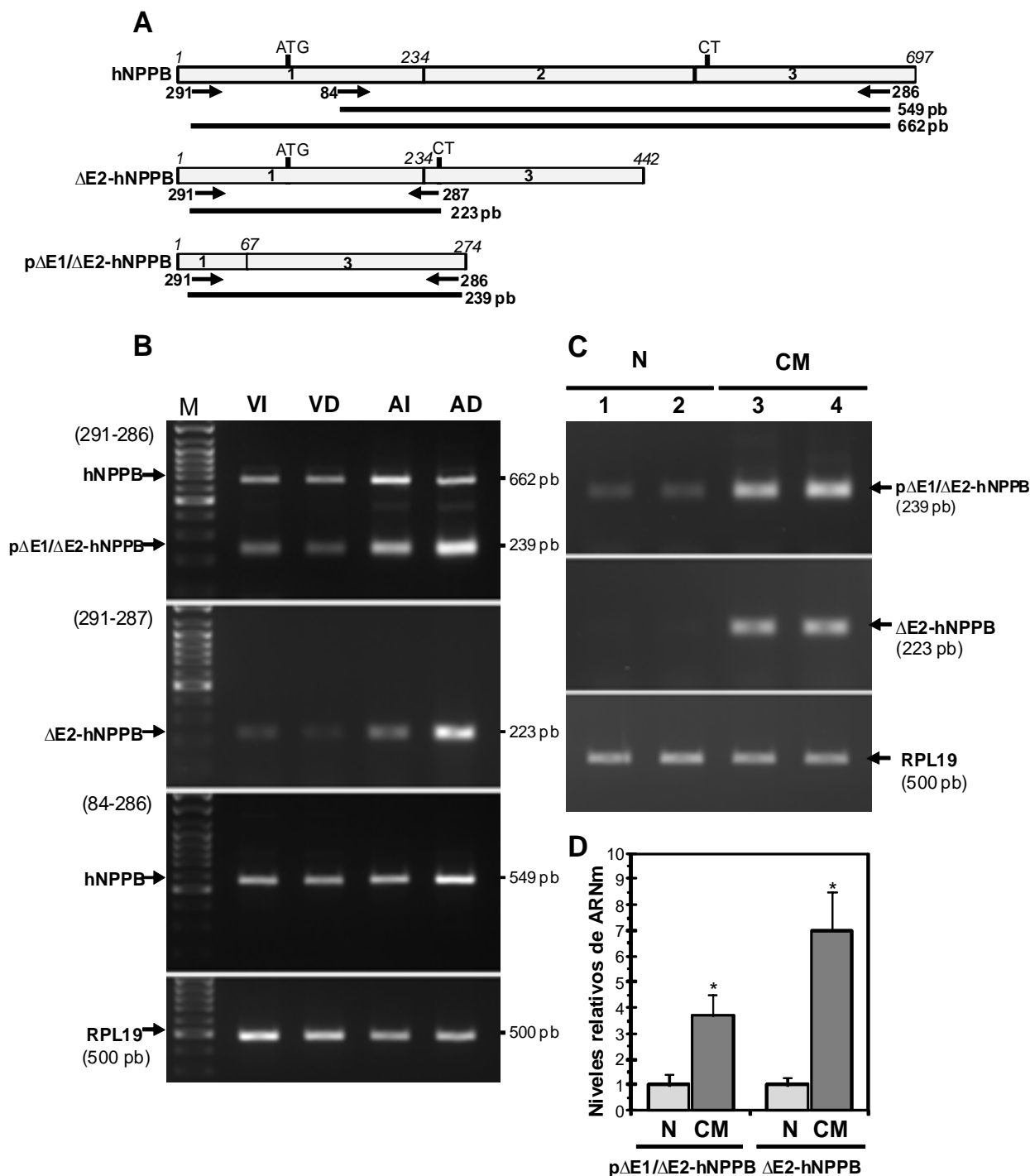


Figura 40. Identificación y expresión de las variantes de NPPB generadas por el skipping de exones en el miocardio humano. **A** - representaciones esquemáticas de NPPB humano (h) regular (nº acc.: NM_002521) y secuencias de NPPB generadas por el skipping de exones usadas para el diseño de los oligonucleótidos. 1-3 - exones. ATG y CT- codones de inicio y de terminación, respectivamente. Se indica la localización aproximada de los oligonucleótidos para el análisis RT-PCR. Líneas negras gruesas - tamaño esperado de los amplicones correspondientes. **B** - RT-PCR semicuantitativa de hNPPB, pΔE1/ΔE2-hNPPB, ΔE2-hNPPB y RPL19 en cuatro cámaras del corazón humano de 8 semanas postnatales. Entre paréntesis - oligonucleótidos utilizados. VI/AI - ventrículo/aurícula izquierda; VD/AD - ventrículo/aurícula derecha; M - GeneRuler DNA ladder mix (Fermentas). **C** - RT-PCR semicuantitativa para los transcritos diana (pΔE1/ΔE2-hNPPB y ΔE2-hNPPB) y el transcripto de referencia (RPL19) en muestras del ventrículo izquierdo (VI) normal (N) versus cardiomiopático (CM) en el corazón humano adulto. Se muestra el tamaño de los amplicones correspondientes. **D** - niveles promedio del ARNm de pΔE1/ΔE2-hNPPB y ΔE2-hNPPB en las muestras del VI normal (n=5) versus cardiomiopático (n=5). *p<0.05.

En general, este patrón de expresión, mayor en las aurículas que en los ventrículos, es comparable con el de la variante DE2-NPPB en los corazones de cerdos recién nacidos (véase la Fig. 32C). También hemos comparado la expresión de las variantes de skipping de exones del NPPB humano en las muestras de ARN procedentes de miocardio humano adulto normal y cardiomiopático (Fig. 40C). El nivel de expresión de los dos transcritos NPPB generados por skipping de exones está significativamente up-regulado en las muestras del VI de corazones explantados en comparación con las procedentes de los corazones de los donantes (Fig. 40D).

Los datos demuestran que las variantes NPPB generadas por el skipping de exones se expresan en el miocardio humano postnatal y adulto y se up-regulan en la fase final de la insuficiencia cardíaca debida a la cardiomiopatía dilatada (CMD). Así, la up-regulación de las variantes NPPB generadas por el skipping de exones asociada a la insuficiencia cardíaca es similar tanto en la CMD humana como en el modelo porcino de la ICD.

3.3. Comentario: Logros y propuestas

En el presente estudio, hemos identificado y caracterizado una nueva variante de ARNm de NPPB que se expresa en el corazón postnatal porcino y humano. El punto de partida para desarrollar este trabajo ha sido la identificación (mediante DDRT-PCR) de un transcrito “fragmentado” (véase el Capítulo 1; Tabla 8, banda D170) predominantemente enriquecido en el ventrículo izquierdo de cerdos recién nacidos cuya secuencia tenía una homología completa con las secuencias localizadas dentro del exón 1 y exón 3 del transcrito primario del gen porcino de NPPB. Hemos denominado esta nueva variante, que corresponde al transcrito NPPB sin exón 2, como DE2-NPPB. Aunque la variante DE2-NPPB no tiene todavía un papel definido con respecto a la fisiología y función del miocardio, nuestros datos representan un primer acercamiento a este aspecto utilizando los ensayos modelo in vitro e in vivo.

El transcrito DE2-NPPB porcino se expresa, pero generando una nueva isoforma proteica que tiene 40 aa adicionales en su extremo CT en comparación con la isoforma NPPB codificada por los tres exones (véase la Fig. 32A y 33B). Esto significa que si la traducción ocurre, esta variante no procedería a formar la estructura clásica de “anillo” característica de NPPB regular. Es posible que DE2-NPPB tiene funciones únicas que se determinan por su estructura. Por ejemplo, DE2-NPPB, a diferencia de la isoforma NPPB regular, puede estar asociada con la membrana lisosomal debido a que tiene dominios LAMP-like y transmembrana característicos de proteínas asociadas a la membrana lisosomal (Hunziker, Geuze,

1996; Eskelinen et al., 2003). Adicionalmente, la pérdida del exón 2 causa un cambio de marco de lectura generando una secuencia codificante previamente no reconocida con homología restringida únicamente a la secuencia del exón 1 de NPPB porcino. La isoforma DE2-NPPB se expresa en células pero, a diferencia de NPPB, se detecta sólo en el citoplasma de las células transfectadas, indicando que la deleción del exón 2 afecta a su secreción al medio de cultivo. La diferencia en la retención/secreción de estas dos variantes de splicing de NPPB en células COS-7 transfectadas podría estar asociada con diferencias en su tráfico/localización intracelular (véase la Fig. 35E).

Hemos encontrado que tanto DE2-NPPB como NPPB se co-expresan en el miocardio normal y se co-upregulan en el miocardio porcino en el modelo de la ICD (véase la Fig. 37). La siguiente pregunta que planteamos era si la co-regulación de la expresión cardíaca de las dos variantes NPPB, una secretada (NPPB) y la otra no (DE2-NPPB), tiene un significado funcional. Para responder a esta pregunta, hemos co-transfectado simultáneamente las células COS-7 con los plásmidos DE2-NPPB y NPPB en distintas proporciones. Bajo estas condiciones experimentales, los niveles proteicos de NPPB se disminuyeron en una proporción inversa a la cantidad creciente de DE2-NPPB (véase Fig. 38B), indicando que la inhibición de la acumulación/secreción de la proteína NPPB, mediada por DE2-NPPB, es dosis-dependiente. Estos efectos inhibidores se observaron en los experimentos de incubación de las células COS-7 transfectadas únicamente con el plásmido NPPB en la presencia de los péptidos sintéticos DE2-NPPB en el medio de cultivo. Se debe subrayar que la inhibición de la acumulación/secreción de la proteína NPPB en presencia del producto(s) proteico(s) DE2-NPPB no está relacionada con una disminución de los niveles del ARNm de NPPB en células COS-7 transfectadas. Así, el fenómeno de la inhibición de la acumulación de la proteína NPPB en presencia del producto proteico DE2-NPPB podría estar condicionado por una traducibilidad reducida del NPPB o bien por una inestabilidad elevada del polipéptido NPPB. Referente a la última posibilidad, hemos observado que la disminución de los niveles proteicos de NPPB inducida por DE2-NPPB podría ser recuperada parcialmente (hasta un 20-40%) cultivando las células COS-7 co-transfectadas en el medio suplementado con inhibidores de proteasas tales como Leupeptin o Chloroquine (datos no mostrados).

Nuestros datos indican que DE2-NPPB y NPPB porcinas son proteínas con distintas propiedades moleculares, localización celular y dinámica de retención/secreción. Como tal, se podría esperar que estas isoformas de NPPB podrían tener los papeles moleculares no complementarios en lo que respecta a uno con el otro.

Contrariamente, nuestros datos de los ensayos celulares apoyan otro modelo en el cual DE2-NPPB regula la producción de NPPB al nivel post-transcripcional, sugiriendo la existencia de un mecanismo negativo (negative feedback loop) de la regulación de la producción de la isoforma NPPB regular por DE2-NPPB. Teniendo en cuenta que estas isoformas proteicas no interaccionan físicamente la una con la otra, es razonable suponer que DE2-NPPB podría afectar a la tasa de producción/acumulación de NPPB indirectamente.

V. Discusión

V. Discusión

Los resultados de cada fase experimental del presente proyecto han sido discutidos de un modo puntual concreto en los comentarios a los correspondientes capítulos. En este apartado se presenta una interpretación general de los resultados y las sugerencias y especulaciones derivadas del trabajo en su conjunto.

La hipertrofia cardíaca constituye una de las principales formas de respuesta del cardiomiocito a estímulos biomecánicos en términos de normalización de los parámetros cardio-dinámicos afectados. Esta acción compensatoria, sin embargo, se ve en algún momento sobrepasada por el estrés continuo (Perrino et al., 2006), lo que da lugar al cuadro de la insuficiencia cardíaca (IC), que causa una gran morbilidad y mortalidad (Mudd, Kass, 2008). Desde un punto de vista fenotípico morfológico se distinguen dos formas de la hipertrofia cardíaca, una concéntrica, secundaria a la sobrecarga de presión y caracterizada por el ensamblaje en paralelo de sarcómeros con aumento del diámetro transversal del cardiomiocito, y otra excéntrica, debida a la sobrecarga de volumen, caracterizada por la adición lineal de sarcómeros en serie con un crecimiento longitudinal del cardiomiocito.

Aunque ambos tipos del remodelado hipertrófico tienen importantes consecuencias para la organización estructural y la función de ambos ventrículos (tanto en la salud como en la enfermedad cardíaca), la predisposición molecular del miocardio al remodelado hipertrófico (concéntrico o excéntrico), sigue siendo, a pesar de unos intentos (Kaufman et al., 2008), un campo de especulaciones. Los antecedentes al presente trabajo realizados por nuestro (Torrado et al., 2004, 2006) y otros grupos (Quaglietta et al., 2008) de investigación indicaban que el corazón de cerdos recién nacidos podría ser utilizado como un modelo natural para el estudio de la predisposición molecular del miocardio ventricular a distintos tipos del remodelado hipertrófico postnatal.

En la circulación prenatal, la carga de presión es igual entre ambos ventrículos porcinos lo que resulta en un grado similar de la hipertrofia ventricular (Beinlich et al., 1995). Esta situación hemodinámica se cambia brevemente después del nacimiento cuando el VI se expone a más alta carga hemodinámica sistémica en comparación con el VD, con un rápido remodelado concéntrico (VI) versus excéntrico (VD) (Torrado et al., 2004). Así, suponemos que el estudio transcripcional comparativo del VI versus VD del corazón porcino perinatal podría conducirnos a la identificación de las diferencias regionales en la expresión génica previas al desarrollo de los signos morfológicos del remodelado hipertrófico concéntrico/excéntrico del miocardio ventricular. Es decir, este trabajo se ha basado en la hipótesis de que el miocardio perinatal se caracteriza por una

predisposición molecular compartimentalizada (VI versus VD) a distintos tipos del remodelado hipertrófico postnatal.

Consecuentemente a este escenario, la ejecución de nuestro trabajo se ha articulado en las siguientes fases interconectadas (Fig. 41): (1) el análisis comparativo no preconicionado de la expresión génica en el VI versus el VD de cerdos recién nacidos, (2) la identificación de los transcritos diferencialmente enriquecidos en el VI o VD, (3) selección de nuevos transcritos (no caracterizados) con la expresión predominante en el VI versus VD, que, a la vez, sea cardio-restringida y (4) la identificación y caracterización molecular y funcional de estos transcritos (previamente no anotados) tanto en ensayos celulares como en el modelo porcino y en pacientes con la IC.

En este apartado se articularán los resultados en relación con dos aspectos generales que se engloban en la hipótesis del trabajo, es decir: (1) la predisposición molecular del miocardio ventricular a distintos tipos del remodelado hipertrófico revelada en animales modelo y (2) la expresión regionalizada de las nuevas variantes de los genes marcadores de la hipertrofia y daño cardíaco (ANKRD1 y BNP) en el miocardio ventricular normal y patológico.

5.1. La expresión génica regionalizada en el miocardio perinatal supone una predisposición molecular a distintos tipos del remodelado hipertrófico postnatal

Los mecanismos que dan lugar a diferencias transcripcionales en el VI/VD en el corazón perinatal son prácticamente desconocidos, pero de especial interés (Kelly *et al.*, 2003), debido a los diferentes papeles funcionales que cada ventrículo manifiesta después del nacimiento. Así, nuestra atención ha sido dirigida a los tejidos diana (VI y VD) de cerdos recién nacidos y al análisis de los patrones moleculares que podrían pre-existir en el miocardio ventricular antes de su remodelado regionalizado postnatal, concéntrico (VI) o excéntrico (VD). Por primera vez se ha conseguido (mediante la aplicación de la técnica DDRT-PCR) demostrar que sí existen diferencias cuantitativas en la expresión génica entre el VI y el VD de cerdos recién nacidos, como el reflejo de una predisposición molecular diferencial del miocardio ventricular a distintos tipos del remodelado hipertrófico postnatal (Torrado *et al.*, 2010).

Nuestro estudio identifica las diferencias transcripcionales entre el VI y VD del neonato porcino unas horas después de nacer. Es muy probable que las diferencias detectadas estén pre-condicionadas, por lo menos parcialmente, por los mecanismos que regulan la compartimentalización miocárdica durante el desarrollo embrionario y fetal. Hoy está bien documentado que factores de transcripción que determinan la compartimentalización cardíaca, incluyendo

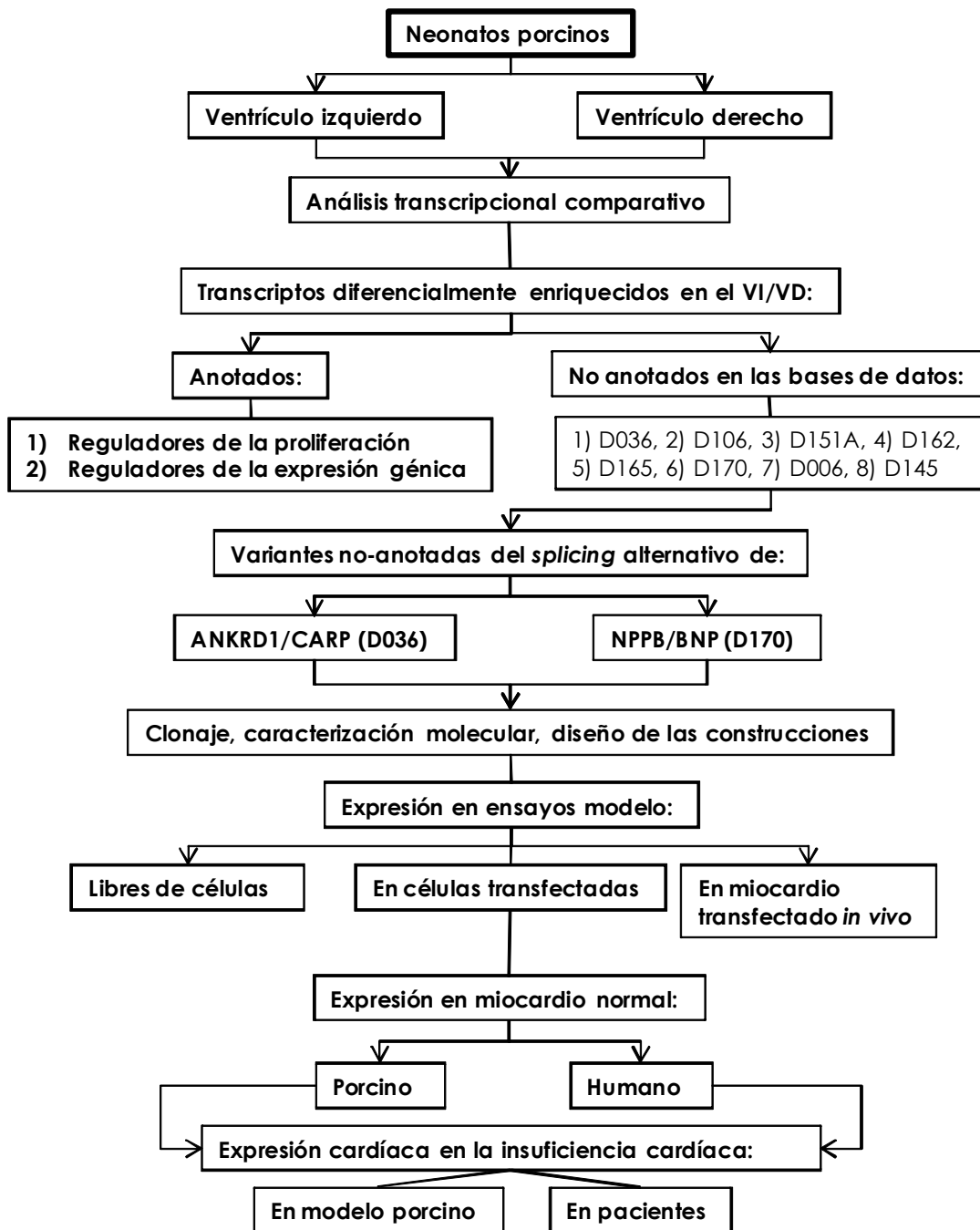


Figura 41. Representación esquemática simplificada de las fases y ramificaciones del presente trabajo. VD/VI- ventrículo izquierdo/ventrículo derecho; D- bandas de *differential display*; ANKRD1- *ankyrin repeat domain 1*; NPPB- *natriuretic peptide precursor B*.

Hand1/eHAND, *Hand2/dHAND* y *Tbx5*, se expresan asimétricamente en el miocardio ventricular fetal del ratón, con diferencias muy significativas entre ambos ventrículos (revisado en: Bruneau *et al.*, 2001; Akazawa, Komuro, 2003). En este sentido, los resultados previos de nuestro grupo demuestran (Torrado *et al.*, 2004) que *Hand1/eHAND* y *Hand2/dHAND* se expresan a niveles similares en ambos ventrículos de cerdos recién nacidos, sugiriendo que estos factores no están directamente involucrados en la regulación de la expresión génica diferencial entre el VI y VD porcino después del nacimiento, en contraste con su expresión compartimentalizada en el miocardio ventricular del ratón.

Recientemente ha sido demostrado que el otro factor de transcripción, *serum response factor* (SRF), juega un papel importante en la determinación del tipo de remodelado hipertrófico del miocardio ventricular postnatal. La inactivación mosaica de SRF en el VI del ratón adulto provoca la hipertrofia excéntrica de los miocitos SRF⁻, mientras que los cardiomiocitos SRF⁺ sufren el remodelado hipertrófico concéntrico (Gary-Bobo *et al.*, 2008). Las funciones de SRF en el miocardio se determinan, en gran medida, por la co-expresión de su co-factor, *myocardin* (*Myocd*) (revisado en: Pipes *et al.*, 2006; Parmacek, 2007). El co-factor de transcripción, *Myocd*, en su lugar, provoca el remodelado hipertrófico concéntrico de los cardiomiocitos murinos neonatales *in vitro* (Badorff *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2006). Sin embargo, *myocd* se expresa a niveles iguales en ambos ventrículos del corazón de cerdos recién nacidos (Torrado *et al.*, 2003).

El factor *Tbx5* (uno de los factores de transcripción de la familia *T-box*), que tiene papeles importantes en el desarrollo y la morfogénesis del corazón, se expresa en el VI pero no en el VD en embriones/fetos del ratón y la inactivación de *Tbx5* resulta en una severa hipoplasia del VI mientras que el desarrollo del VD no se afecta (Bruneau *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta estos resultados, nos parece oportuno suponer que *Tbx5* podría estar involucrado en la regulación de la expresión diferencial (izquierda/derecha) en el miocardio fetal tardío y neonatal en cerdos. La aprobación experimental de esta sugerencia se plantea en nuestro grupo, dentro de un futuro proyecto que complementará el actual y en el que se analizará la expresión ventricular izquierda/derecha de factores de transcripción en mamíferos inferiores y mamíferos superiores.

En este trabajo, entre los genes cuyos niveles de expresión son diferentes entre el VI y el VD, destaca una pequeña cohorte de los posibles candidatos que podrían estar relacionados con la regulación de los procesos de la hipertrofia concéntrica *versus* excéntrica (véase Tabla 8; Capítulo 1 de Resultados). A este respecto hemos demostrado, por primera vez, que los reguladores del crecimiento de las células musculares (*MAP3K7IP2*, *MSTN*, *PHB2*, *APOBEC3F*) y de la expresión génica (*PTPLAD1*, *JMJD1C*, *CEP290*) se expresan predominantemente en el

VI de cerdos recién nacidos. Utilizando MSTN como un gen modelo, demostramos que su expresión predominante en el VI de cerdos recién nacidos se mantiene durante el desarrollo postnatal (véase Fig. 18; Capítulo 1 de Resultados) cuando el VI sufre un rápido y significativo remodelado hipertrófico concéntrico. Comentando por adelantado, la expresión predominante de las nuevas variantes de *splicing* alternativo de ANKRD1/CARP (véase el Capítulo 2 de Resultados) y NPPB/BNP (véase el Capítulo 3 de Resultados) en el VI de cerdos recién nacidos también se mantiene en el corazón de cerdos de 30 días de la vida postnatal. Adicionalmente, en ratas jóvenes, el desarrollo de la hipertrofia concéntrica forzada del VI (inducida experimentalmente por sobrecarga de presión) está asociada con la *up*-regulación de la expresión de los factores de la proliferación celular y de los factores de transducción de señal (Gallego-Delgado *et al.*, 2009). En conjunto, interpretamos esos datos como un reflejo a nivel molecular de las distintas propiedades intrínsecas del VI y VD (Modesti *et al.*, 2004) para responder a la sobrecarga de presión y de volumen, respectivamente. Aunque se supone la existencia de las diferencias intrínsecas entre los cardiomiocitos del VI y del VD, sus fundamentos se esperan que sean muy complejos a nivel molecular ya que la diversidad y la variabilidad de mecanismos moleculares implicados sería *a priori* enorme, incluyendo los fenómenos relacionados con la memoria celular molecular (Kelly *et al.*, 2003).

Los hallazgos derivados de nuestro trabajo podrían ser relevantes para el estudio del remodelado ventricular patológico dado que la IC, provocada por distintos insultos, resulta en una modulación de la expresión génica ventricular compartimentalizada. En el modelo de infarto de rata, se ha observado (en el miocardio no infartado) una disminución de la expresión génica más llamativa en el VD en comparación con el VI (Chugh *et al.*, 2003). En el modelo porcino de la IC cardio-tóxica hemos demostrado que el patrón normal asimétrico (VI *versus* VD) de la distribución de ANKRD1 (del transcripto y de la proteína) está completamente suprimido en la fase terminal de la IC; la mejora del funcionamiento cardíaco resulta en la restauración de la expresión asimétrica de ANKRD1 en el miocardio ventricular porcino (Torrado *et al.*, 2004). En el modelo porcino de sobrecarga de volumen, los niveles de expresión de los factores pro-hipertróficos, *angiotensinogen* y *prepro-endothelin*, resultaron significativamente *down*-regulados en el VD mientras que permanecieron sin cambios en el VI (Modesti *et al.*, 2004). En el modelo murino de sobrecarga de presión bi-ventricular, más de 10 transcriptos mostraron una *down*-regulación significativa en el VD, pero no en el VI, incluyendo tres genes de la ruta de señalización *Wnt*, y genes de las rutas apoptóticas (Urashima *et al.*, 2008). En ratas jóvenes, la hipoxia crónica resulta en el cambio de la expresión predominante de *cytochrome c oxidase* en el VI hacia

su expresión predominante en el VD (Zungu *et al.*, 2008). Aunque los datos mencionados son correlativos y no permiten explorar las relaciones “causa-efecto” en cada experimento concreto, es evidente que la IC afecta la regionalización de la expresión génica en el miocardio ventricular.

De un modo general, hemos identificado un conjunto de genes con expresión divergente en el VI en comparación con el VD en cerdos neonatales. Según nuestro conocimiento, esta es la primera caracterización de perfiles de la expresión génica a gran escala en el miocardio neonatal temprano en mamíferos. Su fiabilidad está apoyada por la confirmación de los resultados por qPCR y por el reconocimiento de que unos de los genes que se expresan diferencialmente en el miocardio ventricular neonatal normal son los genes cuya expresión se altera significativamente en el remodelado patológico y la IC severa.

Además de los resultados relevantes a la regionalización de la expresión génica en el miocardio ventricular porcino, surgió otro dato importante y es que dentro de los transcritos diferencialmente enriquecidos en el VI o VD hemos detectado al menos 6 transcritos todavía no anotados (véase Tabla 8; Capítulo 1 de Resultados). Dos de ellos, D036 y D170, mostraron una homología secuencial con distintas regiones de los transcritos primarios del gen *ankrd1* y *nppb*, respectivamente. A consecuencia de estos resultados, surgieron (como una “bifurcación” experimental de este proyecto) ensayos similares de identificación, caracterización y análisis molecular/funcional de nuevas variantes/isoformas de ANKRD1/CARP y NPPB/BNP motivando una serie de reflexiones e interrogantes que se exponen a continuación.

5.2. Posible relevancia funcional de la expresión de las nuevas variantes de ANKRD1 y NPPB en el miocardio normal y patológico

A lo largo de la ejecución de nuestro trabajo, hemos identificado y determinado la expresión de los ARNm de ANKRD1/CARP y NPPB/BNP (dos marcadores establecidos de la hipertrofia y daño cardíaco) como variantes de *splicing* alternativo. La expresión de las variantes de *splicing* alternativo de *ankrd1* y *nppb* está modulada por el tipo de la hipertrofia ventricular (los niveles más altos en el VI en comparación con el VD) y por el estrés/daño cardíaco (una significativa *up*-regulación en la IC). Este apartado pondrá de manifiesto las características más llamativas de la expresión de estas variantes, resaltando aquellas observaciones más significativas establecidas en nuestros modelos celulares y animales, y en pacientes con la IC severa.

5.2.1. Variantes/isoformas de ANKRD1/CARP

Aunque existieron indicios indirectos previos (Yang *et al.*, 2005; Cullingford *et al.*, 2008), nuestros resultados que demuestran los sucesos del *splicing* alternativo del transcripto primario del gen *ankrd1* (véase Capítulo 2 de Resultados; Torrado *et al.*, 2009) en el miocardio son, hasta la fecha, las únicas aportaciones directas al tema. En el corazón porcino neonatal, el gen *ankrd1* se expresa como cuatro variantes, tres de las cuales retienen intrones. En el corazón humano (neonatal y adulto) se han detectado dos ortólogos de las variantes de *ankrd1* porcino con intrones retenidos.

Hemos presentado los datos que indican que, en los cardiomiocitos *in vivo*, los transcriptos *ankrd1* con intrones retenidos se exportan al citoplasma y, por lo tanto, se escapan de su degradación mediante la ruta de *nonsense mediated decay* (NMD) aunque esta opción no está del todo descartada. Existen hipótesis contradictorias sobre el papel del acoplamiento del *splicing* alternativo y NMD en la regulación de la expresión génica (Lareau *et al.*, 2007). Como se ha sugerido inicialmente, NMD activado por eventos de *splicing* alternativo puede representar un mecanismo de *down*-regulación de la expresión de un gen en un tejido concreto (Alonso, 2005). Sin embargo, las observaciones posteriores demostraron que la mayoría de transcriptos generados por *splicing* alternativo se detectan de un modo uniforme y a niveles poco abundantes en muchos tejidos de mamíferos, independientemente de la activación de NMD (Pan *et al.*, 2006).

Nuestro trabajo aporta nuevos datos relevantes a este enigmático aspecto. Los transcriptos *ankrd1* sin y con intrones se co-expresan constitutivamente en el corazón porcino y humano y se *up*-regulan de un modo similar en el miocardio en la IC, sugiriendo que la población de los ARNm del gen *ankrd1* no es homogénea en los cardiomiocitos, pero está compuesta por un cierto número de transcriptos diferentes, con la regulación positiva similar de su expresión tanto en la salud como en la enfermedad cardíaca. Con esto último, en todos los ensayos realizados, el mayor nivel de los transcriptos *ankrd1* que retienen intrones se ha asociado siempre con el mayor contenido de la proteína ANKRD1 (estimado mediante *Western blot*) en el miocardio. Entonces podemos suponer que la expresión de las variantes de *splicing* alternativo de *ankrd1* con intrones retenidos resultaría en un aumento del producto proteico ANKRD1 en los cardiomiocitos. Parece razonable interpretar, a este respecto, los resultados de este bloque de nuestro trabajo en el contexto de la regulación post-transcripcional positiva de la expresión del gen *ankrd1* en el miocardio ventricular. De todos modos, la *up*-regulación de la expresión endógena de las variantes de *ankrd1* con intrones retenidos (inducida por transfección del VI *in vivo* con el vector *ankrd1* sin intrones) resultó

en un aumento de la proteína ANKRD1 endógena aunque los niveles endógenos del ARNm regular de *ankrd1* no demostraron cambios significativos en el miocardio transfectado (véase Fig. 29 y 30; Capítulo 2 de Resultados).

Inicialmente, la *up*-regulación de la expresión del gen *ankrd1* en el miocardio ventricular ha sido interpretado como un factor desfavorable en cuanto a la expresión génica cardíaca (Zolk *et al.*, 2002) debido a que en los ensayos celulares ANKRD1 inhibía la actividad de los promotores de unos genes que se expresan en el miocardio (Zou *et al.*, 1997; Jeyaseelan *et al.*, 1997). Sin embargo, un *knockout* total de *ankrd1* en ratones no provocó cambios fenotípicos detectables (Barash *et al.*, 2007), sugiriendo que ANKRD1 no es crucial para la regulación de la expresión génica cardíaca *in vivo*, como ha sido propuesto en el pasado (Zolk *et al.*, 2002, 2003).

Recientemente se puso de manifiesto que la expresión aumentada del gen *ankrd1* puede representar una respuesta adaptativa del miocardio al estrés tanto durante el desarrollo fetal como en la vida postnatal (Mikhailov, Torrado, 2008; Qiu *et al.*, 2010). Esta hipótesis se apoya en varios argumentos, entre los que destacan los siguientes: (1) la acumulación de proteínas con dominios *ankyrin* (Miles *et al.*, 2005), incluyendo ANKRD1 (Scurr *et al.*, 2008), favorece a la supervivencia celular, (2) la expresión forzada del gen *ankrd1* en los cardiomiocitos fetales de rata (Han *et al.*, 2005) y células endoteliales microvasculares de humanos (Samaras *et al.*, 2007) aumenta la resistencia celular a la apoptosis, (3) en el modelo de isquemia cardíaca en rata, la *down*-regulación de la expresión de *ankrd1* en el miocardio se asocia con el incremento de la muerte apoptótica celular (Lee *et al.*, 2009) y (4) la proteína ANKRD1 interacciona físicamente con las proteínas involucradas en las respuestas del miocardio al estrés (Mikhailov, Torrado, 2008). Todavía no está probado si la expresión de las variantes de *ankrd1* identificadas y caracterizadas en nuestro estudio podría tener implicaciones anti-apoptóticas parecidas a las del transcripto *ankrd1* regular (sin intrones retenidos). Sin embargo, nuestros resultados preliminares indican que la expresión forzada de las variantes *ankrd1* porcinas (sin y con intrones retenidos) en células COS-7 resulta en una disminución similar de los niveles de la caspasa-3 activa en comparación con las células transfectadas con el vector vacío (datos no mostrados).

Como se ha comentado anteriormente, la traducción de los transcritos *ankrd1* con intrones retenidos podría generar las isoformas proteicas modificadas en su extremo C-terminal (véase Fig. 20D, 22 y 23; Capítulo 2 de Resultados). Los estudios de las interacciones entre la proteína ANKRD1 y otras proteínas miocárdicas se han enfocado en el uso de la proteína ANKRD1 regular o de sus dominios N- o C-terminal (Zou *et al.*, 1997; Torrado *et al.*, 2004, 2005; Witt *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2008). Los resultados del presente trabajo sugieren que las

nuevas isoformas de ANKRD1 podrían detectarse en los cardiomiocitos, lo que requeriría un análisis más detallado de su posible interferencia en las interacciones entre la proteína ANKRD1 y otras proteínas del cardiomiocito. Por ejemplo, la isoforma ANKRD1-i8 retendría todos los motivos conservados *ankyrin* que son importantes para las interacciones de ANKRD1 regular con la proteína gigante miofibrilar, *titin* (Miller *et al.*, 2003) y con la proteína cardíaca, *calsequestrin-2* (Torrado *et al.*, 2005), mientras que las isoformas ANKRD1-i7,8 y ANKRD1-i6,7,8 perderían el cuarto motivo *ankyrin* (véase Fig. 23) que podría afectar a sus interacciones con la proteína miofibrilar, *myopaladin* (Bang *et al.*, 2001). La importancia de este aspecto se justifica también por los resultados de los análisis genéticos del gen *ankrd1* en pacientes con distintas formas de la cardiomiopatía. Recientemente se ha identificado el gen *ankrd1* como un nuevo gen asociado con la cardiomiopatía dilatada familiar en humanos y se ha demostrado que las mutaciones en el gen afectan negativamente a las funciones e interacciones de las proteínas ANKRD1 mutadas en ensayos celulares (Duboscq-Bidot *et al.*, 2009; Moulik *et al.*, 2009). Por otra parte, tres mutaciones *missense* de *ankrd1* han sido identificadas en pacientes con la cardiomiopatía hipertrófica. El análisis funcional celular reveló que, sorprendentemente, las mutaciones favorecen a las interacciones ANKRD1 - *titin* (Arimura *et al.*, 2009).

Recientemente se ha generado un notorio interés hacia estudios de la expresión del gen *ankrd1* en el músculo cardíaco (Zagorski *et al.*, 2008; Witt *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2010) y esquelético (Laure *et al.*, 2009; Lehti *et al.*, 2009; Ponsuksili *et al.*, 2009). Por ello y desde el punto de vista metodológico, merece anotar que en los análisis de RT-PCR cuantitativa el uso de los oligonucleótidos que hibridan con la secuencia codificada por los primeros seis exones del gen *ankrd1* generaría un producto de PCR común para los transcriptos *ankrd1* sin y con intrones. También, hay que tener en cuenta que los anticuerpos anti-ANKRD1 (tanto los comerciales como los generados en el laboratorio) están dirigidos contra su parte N-terminal que es igual en las isoformas ANKRD1 caracterizadas y, por lo tanto, los anticuerpos no permitirían discriminar la distribución de las distintas isoformas de ANKRD1 al nivel subcelular y/o histológico.

Concluyendo, los resultados de este bloque de nuestro trabajo demuestran que múltiples isoformas de ANKRD1 pueden detectarse dentro de los cardiomiocitos en cerdos y en humanos. Los transcriptos *ankrd1* que retienen intrones están significativamente *up*-regulados en el modelo porcino de la IC y, por lo tanto, la relevancia del gen *ankrd1* a la patogénesis de la IC en humanos (Zolk *et al.*, 2002; Mikhailov, Torrado, 2008; Wei *et al.*, 2009; Duboscq-Bidot *et al.*, 2009; Moulik *et al.*, 2009; Arimura *et al.*, 2009) requeriría el análisis de su patrón de *splicing* en muestras cardíacas de pacientes.

5.2.2. Variantes/isoformas de NPPB/BNP

En el campo cardiovascular, el gen *nppb* se encuentra entre los genes más estudiados en cuanto a su organización estructural, regulación de su expresión, así como a la producción, secreción y metabolismo de su producto proteico. Sin embargo, solo en el año 2009 se han publicado las primeras evidencias de que en el miocardio se expresa una isoforma de NPPB generada por el *splicing* alternativo (por retención de intrones). El nivel de esta isoforma se aumenta en el miocardio ventricular en la IC experimental; el producto proteico correspondiente no manifiesta las propiedades vaso-dilatorias del BNP regular sino que favorece a la filtración renal (Pan *et al.*, 2009).

Nuestro trabajo representa la segunda evidencia de los eventos del *splicing* alternativo del *nppb* pero caracterizados no por la retención de intrones sino por el *skipping* de exones. Nuestros resultados indican que la isoforma NPPB regular y su variante/isoforma sin exón 2 (denominada $\Delta E2$ -NPPB) son proteínas con distintas características estructurales, localización/distribución subcelular y dinámica de la retención/secreción. El resultado más llamativo de este bloque de nuestro trabajo es una serie de indicaciones de que la variante/isoforma $\Delta E2$ -NPPB puede desempeñar un papel importante en la regulación post-transcripcional de la producción/secreción de la isoforma NPPB regular (sin *skipping* de exones).

En su conjunto, hemos proporcionado tres nuevas observaciones relevantes para la regulación de la expresión cardíaca del gen *nppb* bajo condiciones fisiológicas y patológicas: (1) el miocardio normal porcino y humano manifiesta *splicing* alternativo del ARNm primario del gen *nppb*, basado en el *skipping* de exones, (2) los niveles intracelulares y la secreción de NPPB están negativamente regulados por sus variantes generadas por el *skipping* de exones al nivel post-transcripcional, y (3) las variantes de NPPB generadas por el *skipping* de exones están *up*-reguladas en el miocardio en la IC tanto en el modelo porcino de ICD como en pacientes en la fase final de la CMD.

Los mecanismos post-transcripcionales, que controlan la producción intracardíaca y la secreción de NPPB, están todavía poco definidos. La disminución de la concentración intracelular de calcio y de proteínas dependientes de calcio, como calcineurina (Tavi *et al.*, 2004) y calcio-calmodulina quinasa II (Ronkainen *et al.*, 2007), resulta en la inhibición de la producción/secreción de la proteína NPPB. Adicionalmente, el bloqueo de los canales de calcio de la membrana plasmática reduce significativamente la secreción de NPPB por los cardiomiocitos normales e hipertrofiados (Nader *et al.*, 2008). El presente estudio define una nueva vía de control post-transcripcional de la expresión y la secreción de la proteína NPPB que está mediada por su variante de *splicing*

alternativo $\Delta E2$ -NPPB. Nuestros datos, obtenidos en los ensayos celulares *in vitro*, demuestran que la inducción de la expresión de $\Delta E2$ -NPPB impide la producción y secreción de la proteína NPPB por las células co-transfectadas. En la actualidad, y como una hipótesis de trabajo, creemos que la producción desequilibrada de la variante/isoforma $\Delta E2$ -NPPB *in vivo* puede contribuir a la disminución de los niveles del precursor NPPB en el miocardio que, a su vez, podría afectar a la secreción de NPPB a la circulación.

Hemos demostrado que las variantes alternativas del transcripto primario del gen *nppb*, generadas por el *skipping* de exones, se expresan no solo en cerdos sino también en el miocardio humano normal y se *up*-regulan en el miocardio humano en la IC severa. En humanos, el *skipping* de exones en el transcripto *nppb* resulta en la generación de una variante sin un marco de lectura identificable por los análisis bioinformáticos (denominada p $\Delta E1/\Delta E2$ -hNPPB) mientras que la otra variante (denominada $\Delta E2$ -hNPPB) es predecible que tenga un codón de terminación prematuro (véase la Fig. 40; Capítulo 3 de Resultados). Formalmente, los ARNm de esas características son susceptibles a la ruta de degradación por NMD (McGlinchy, Smith, 2008). Sin embargo, hay evidencias de que los transcriptos portadores de los codones de terminación prematuros pueden escapar del NMD, resultando en la síntesis de proteínas truncadas con un efecto negativo dominante sobre la expresión de un gen correspondiente (revisado en: Bashyam, 2009). Esta interpretación de la posible influencia negativa de la variante $\Delta E2$ -hNPPB sobre la expresión de la variante regular del gen *nppb* humano es formalmente coherente con los efectos inhibitorios de la isoforma $\Delta E2$ -NPPB porcina sobre la producción y la secreción de la proteína NPPB regular establecidos en nuestros ensayos de co-transfección celular.

El tema de la participación de las variantes de *nppb* (generadas por el *skipping* de exones) en la regulación post-transcripcional negativa de la producción del precursor proteico NPPB es una investigación en curso y relevante dado que tendría importantes implicaciones en la investigación cardiovascular básica y aplicada dado de que la interrupción del estado de equilibrio adaptativo entre las variantes de NPPB en el miocardio por el estrés podría ser uno de los determinantes de la progresión del miocardio afectado hacia la disfunción contráctil e IC. Teniendo en cuenta que, en humanos, la IC se interpreta como un estado de la deficiencia del péptido BNP activo en la circulación (Chen, 2007), la regulación negativa de la producción/secreción del precursor proteico NPPB por sus variantes del *splicing* alternativo podría resultar de especial relevancia en estudios de los niveles de esta hormona cardíaca en diversas situaciones experimentales y pre-clínicas.

5.3. Sinopsis

Nuestro análisis de la expresión génica a gran escala (mediante el uso de la tecnología *mRNA differential display*) del miocardio ventricular en neonatos porcinos ha permitido establecer, por primera vez, los patrones distintivos de la expresión génica entre dos ventrículos antes del desarrollo de los signos estructurales del remodelado hipertrófico postnatal, concéntrico (VI) o excéntrico (VD). Las diferencias regionales más llamativas se han detectado en la expresión de un grupo reducido de los genes reguladores de la proliferación celular y expresión génica. Esto es la primera, y por ahora la única, aportación molecular experimental a una supuesta predisposición del VI y VD neonatal al remodelado concéntrico y excéntrico, respectivamente. Por otra parte, también cabe destacar la detección de las nuevas variantes del *splicing* alternativo en el gen *ankrd1* y *nppb* (los genes marcadores de la hipertrofia y daño cardíaco). La expresión relativamente elevada de estas nuevas variantes está asociada con el remodelado hipertrófico concéntrico normal y, en su lugar, con el remodelado patológico en la insuficiencia cardíaca en el modelo porcino y en pacientes.

En términos de la genómica funcional cardiovascular, se han publicado una serie de artículos dedicados a la identificación y análisis funcional de las variantes del *splicing* alternativo de algunos transcritos cardio-enriquecidos destacando que las múltiples variantes/isoformas correspondientes no solo son estructuralmente distintas sino también podrían tener las funciones opuestas en el músculo cardíaco (revisado en: Margulies *et al.*, 2009). En este sentido, nuestros resultados de la identificación, el análisis de expresión y la caracterización funcional de las nuevas variantes de *ankrd1* y *nppb*, generadas por distintos tipos del *splicing* alternativo (retención de intrones o *skipping* de exones), puede considerarse como una premisa prometedora para estudios de la regulación post-transcripcional de la expresión de estos dos genes en varias patologías cardiovasculares. Finalmente, y en sentido más amplio, nuestro trabajo demuestra que la diversidad de transcritos generados por *splicing* alternativo está siendo reconocida en la actualidad, incluso en el caso de los genes tan bien estudiados como son los que codifican ANKRD1 y NPPB.

VI. Conclusiones

VI. Conclusiones

1. El análisis transcripcional comparativo del miocardio ventricular izquierdo (VI) *versus* derecho (VD) en neonatos porcinos establece los patrones distintivos de la expresión génica entre dos ventrículos antes del remodelado hipertrófico postnatal concéntrico (VI) o excéntrico (VD). Las diferencias regionales más llamativas se restringen a la expresión diferencial de un grupo reducido de los genes que incluye reguladores de la proliferación celular y de la expresión génica.
2. Dentro de los transcritos diferencialmente enriquecidos en el VI de neonatos porcinos se detectan dos, como fragmentos todavía no anotados en bases de datos, los cuales mostraron una homología secuencial con distintas regiones de los transcritos primarios del gen *ankrd1* o del gen *nppb* (dos genes marcadores de la hipertrofia concéntrica y del daño cardíaco).
3. La clonación de estos dos fragmentos y su análisis posterior molecular/funcional ha resultado en la identificación y caracterización de las nuevas variantes de transcritos de *ankrd1* y *nppb* generadas por distintos tipos del *splicing* alternativo (retención de intrones o *skipping* de exones, respectivamente).
4. En el corazón porcino neonatal, el gen *ankrd1* se expresa como cuatro variantes, tres de las cuales se caracterizan por la distinta combinación de los intrones retenidos. En el corazón humano (neonatal y adulto) se detectan dos ortólogos de las variantes del *ankrd1* porcino con intrones retenidos.
5. Los transcritos de *ankrd1* con intrones retenidos son funcionalmente intactos y capaces de sintetizar los productos proteicos relevantes en sistemas de expresión *in vitro*. En distintas condiciones *in vivo*, las variantes *ankrd1*: (a) se exportan al citoplasma de cardiomiocitos porcinos; (b) se co-expresan en el corazón neonatal porcino y humano con una prevalencia de su expresión en el miocardio izquierdo y (c) se *up*-regulan, conjuntamente con el transcripto *ankrd1* regular (sin intrones retenidos), en el modelo porcino de la insuficiencia cardíaca.

6. En experimentos modelo *in vivo*, la expresión forzada del vector de *ankrd1* regular en el miocardio porcino resulta en una *up*-regulación de la expresión endógena de sus variantes con intrones retenidos (pero no del transcrito endógeno regular) que se acompaña por un incremento del producto proteico ANKRD1 en el miocardio transfectado.
7. El miocardio normal porcino y humano manifiesta *splicing* alternativo del ARNm primario del gen *nppb*, basado en el *skipping* de exones. Las variantes de *nppb* correspondientes: (a) se expresan en sistemas celulares modelo *in vitro*, (b) se co-expresan en el corazón neonatal porcino y humano con una prevalencia de su expresión en el miocardio izquierdo y (c) se *up*-regulan, conjuntamente con el transcrito *nppb* regular (sin el *skipping* de exones), en el miocardio ventricular tanto en el modelo porcino como en pacientes con la insuficiencia cardíaca.
8. En los ensayos de co-transfección celular *in vitro*, los niveles intracelulares y la secreción de la pre-proteína NPPB están negativamente regulados por la co-expresión proteica de su variante con el *skipping* del exón 2 ($\Delta E2$ -NPPB). La actividad inhibitoria de la isoforma $\Delta E2$ -NPPB sobre la expresión de la isoforma NPPB regular se determina por los residuos localizados dentro de la secuencia de $\Delta E2$ -NPPB codificada por el exón 3.
9. Nuestros resultados de la identificación, el análisis de la expresión y la caracterización funcional de las nuevas variantes de *ankrd1* y *nppb*, generadas por distintos tipos de *splicing* alternativo (retención de intrones o *skipping* de exones), puede considerarse como una premisa prometedora para estudios de la regulación post-transcripcional de la expresión de estos dos genes en varias patologías cardiovasculares.

VII. Bibliografía

VII. Bibliografía

- Aihara, Y., Kurabayashi, M., Saito, Y., Ohyama, Y., Tanaka, T., Takeda, S., Tomaru, K., Sekiguchi, K., Arai, M., Nakamura, T., Nagai, R.** (2000). Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension* **36**: 48-53.
- Akazawa, H., Komuro, I.** (2003). Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* **92**: 1079-1088.
- Alonso, C.R.** (2005). Nonsense-mediated RNA decay: a molecular system micromanaging individual gene activities and suppressing genomic noise. *Bioessays* **27**: 463-466.
- Arai, M., Mitsuke, H., Ikeda, M., Xia, J.X., Kikuchi, T., Satake, M., Shimizu, T.** (2004). ConPred II: a consensus prediction method for obtaining transmembrane topology models with high reliability. *Nucleic Acids Res.* **32**: W390-W393.
- Arimura, T., Bos, J.M., Sato, A., Kubo, T., Okamoto, H., Nishi, H., Harada, H., Koga, Y., Moulik, M., Doi, Y.L., Towbin, J.A., Ackerman, M.J., Kimura, A.** (2009). Cardiac ankyrin repeat protein gene (ANKRD1) mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**: 334-342.
- Badorff, C., Seeger, F.H., Zeiher, A.M., Dimmeler, S.** (2005). Glycogen synthase kinase 3beta inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation. *Circ. Res.* **97**: 645-654.
- Bakay, M., Zhao, P., Chen, J., Hoffman, E.P.** (2002). A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul. Disord.* **12 (Suppl. 1)**: S125-S141.
- Bang, M.L., Mudry, R.E., McElhinny, A.S., Trombitás, K., Geach, A.J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C.C., Labeit, S.** (2001). Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J. Cell Biol.* **153**: 413-427.
- Barash, I.A., Bang, M.L., Mathew, L., Greaser, M.L., Chen, J., Lieber, R.L.** (2007). Structural and regulatory roles of muscle ankyrin repeat protein family in skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**: C218-C227.

- Bashyam, M.D.** (2009). Nonsense-mediated decay: linking a basic cellular process to human disease. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **9**: 299-303.
- Baumeister, A., Arber, S., Caroni, P.** (1997). Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J. Cell Biol.* **139**: 1231-1242.
- Beinlich, C.J., Rissinger, C.J., Morgan, H.E.** (1995). Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **27**: 273-281.
- Blais, A., Tsikitis, M., Acosta-Alvear, D., Sarna, R., Kluger, Y., Dynlacht, B.D.** (2005). An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev.* **19**: 553-569.
- Blencowe, B.J.** (2006). Alternative splicing: new insights from global analyses. *Cell* **126**: 37-47.
- Boengler, K., Pipp, F., Fernandez, B., Ziegelhoeffer, T., Schaper, W., Deindl, E.** (2003). Arteriogenesis is associated with an induction of the cardiac ankyrin repeat protein (carp). *Cardiovasc. Res.* **59**: 573-581.
- Boluyt, M.O., O'Neill, L., Meredith, A.L., Bing, O.H., Brooks, W.W., Conrad, C.H., Crow, M.T., Lakatta, E.G.** (1994). Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ. Res.* **75**: 23-32.
- Bowman, T.V., McCooey, A.J., Merchant, A.A., Ramos, C.A., Fonseca, P., Poindexter, A., Bradfute, S.B., Oliveira, D.M., Green, R., Zheng, Y., Jackson, K.A., Chambers, S.M., McKinney-Freeman, S.L., Norwood, K.G., Darlington, G., Gunaratne, P.H., Steffen, D., Goodell, M.A.** (2006). Differential mRNA processing in hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **24**: 662-670.
- Brooks, W.W., Bing, O.H., Blaustein, A.S., Allen, P.D.** (1987). Comparison of contractile state and myosin isozymes of rat right and left ventricular myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **19**: 433-440.
- Brownstein, M.J., Carpten, J.D., Smith, J.R.** (1996). Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* **20**: 1004-1006, 1008-1010.
- Bruneau, B.G., Bao, Z.Z., Fatkin, D., Xavier-Neto, J., Georgakopoulos, D., Maguire, C.T.,**

- Berul, C.I., Kass, D.A., Kuroski-de Bold, M.L., de Bold, A.J., Conner, D.A., Rosenthal, N., Cepko, C.L., Seidman, C.E., Seidman, J.G.** (2001). Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 1730-1736.
- Buckingham, M., Bajard, L., Daubas, P., Esner, M., Lagha, M., Relaix, F., Rocancourt, D.** (2006). Myogenic progenitor cells in the mouse embryo are marked by the expression of *Pax3/7* genes that regulate their survival and myogenic potential. *Anat. Embryol.* **211 (Suppl. 1)**: 51-56.
- Buckingham, M., Meilhac, S., Zaffran, S.** (2005). Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* **6**: 826-835.
- Burke, M.A., Cotts, W.G.** (2007). Interpretation of B-type natriuretic peptide in cardiac disease and other comorbid conditions. *Heart Fail. Rev.* **12**: 23-36.
- Burrell, J.H., Boyn, A.M., Kumarasamy, V., Hsieh, A., Head, S.I., Lumbers, E.R.** (2003). Growth and maturation of cardiac myocytes in fetal sheep in the second half of gestation. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **274**: 952-961.
- Cai, C.L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P.H., Pfaff, S.L., Chen, J., Evans, S.** (2003). *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev. Cell* **5**: 877-889.
- Callis, T.E., Pandya, K., Seok, H.Y., Tang, R.H., Tatsuguchi, M., Huang, Z.P., Chen, J.F., Deng, Z., Jun, B., SÚmate, J., Willis, M.S., Selzman, C.H., Wang, D.Z.** (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J. Clin. Invest.* **119**: 2772-2786.
- Carreño, J.E., Apablaza, F., Ocaranza, M.P., Jalil, J.E.** (2006). Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. *Rev. Esp. Cardiol.* **59**: 473-486.
- Casey, W.M., Brodie, T., Ion, L., Ni, H., Jordan, H.L., Cariello, N.F.** (2008). Correlation analysis of gene expression and clinical chemistry to identify biomarkers of skeletal myopathy in mice treated with PPAR agonist GW610742X. *Biomarkers* **13**: 364-376.
- Champetier, S., Bojmehrani, A., Beaudoin, J., Lachance, D., Plante, E., Roussel, E., Couet, J., Arsenault, M.** (2009). Gene profiling of left ventricle eccentric hypertrophy in aortic regurgitation in rats: rationale for targeting the beta-adrenergic and renin-angiotensin systems. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**: H669-H677.

- Chen, H.H.** (2007). Heart failure: a state of brain natriuretic peptide deficiency or resistance or both!. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**: 1089-1091.
- Christoffels, V.M., Burch, J.B., Moorman, A.F.** (2004). Architectural plan for the heart: early patterning and delineation of the chambers and the nodes. *Trends Cardiovasc. Med.* **14**: 301-307.
- Christoffels, V.M., Habets, P.E., Franco, D., Campione, M., de Jong, F., Lamers, W.H., Bao, Z.Z., Palmer, S., Biben, C., Harvey, R.P., Moorman, A.F.** (2000). Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev. Biol.* **223**: 266-278.
- Chu, W., Burns, D.K., Swerlick, R.A., Presky, D.H.** (1995). Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 10236-10245.
- Chugh, S.S., Whitesel, S., Turner, M., Roberts, C.T.Jr., Nagalla, S.R.** (2003). Genetic basis for chamber-specific ventricular phenotypes in the rat infarct model. *Cardiovasc. Res.* **57**: 477-485.
- Cinquetti, R., Badi, I., Campione, M., Bortoletto, E., Chiesa, G., Parolini, C., Camesasca, C., Russo, A., Taramelli, R., Acquati, F.** (2008). Transcriptional deregulation and a missense mutation define ANKRD1 as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return. *Hum. Mutat.* **29**: 468-474.
- Crick, S.J., Sheppard, M.N., Ho, S.Y., Gebstein, L., Anderson, R.H.** (1998). Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *J. Anat.* **193**: 105-119.
- Cserjesi, P., Brown, D., Lyons, G.E., Olson, E.N.** (1995). Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev. Biol.* **170**: 664-678.
- Cullingford, T.E., Markou, T., Fuller, S.J., Giraldo, A., Pikkarainen, S., Zoumpoulidou, G., Alsafi, A., Ekere, C., Kemp, T.J., Dennis, J.L., Game, L., Sugden, P.H., Clerk, A.** (2008). Temporal regulation of expression of immediate early and second phase transcripts by endothelin-1 in cardiomyocytes. *Genome Biol.* **9**: R32.
- David, A., Tiveron, M.C., Defays, A., Beclin, C., Camosseto, V., Gatti, E., Cremer, H., Pierre, P.** (2007). BAD-LAMP defines a subset of early endocytic organelles in subpopulations of cortical projection neurons. *J. Cell Sci.* **120**: 353-365.

- De Castro, M. del P., Acosta, L., Domínguez, J.N., Aránega, A., Franco, D.** (2003). Molecular diversity of the developing and adult myocardium: implications for tissue targeting. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* **3**: 227-239.
- De Jaco, A., Camp, S., Taylor, P.** (2005). Influence of the 5' intron in the control of acetylcholinesterase gene expression during myogenesis. *Chem. Biol. Interact.* **157-158**: 372-373.
- Delorme, B., Dahl, E., Jarry-Guichard, T., Briand, J.P., Willecke, K., Gros, D., Théveniau-Ruissy, M.** (1997). Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. *Circ. Res.* **81**: 423-437.
- Dixon, J.A., Spinale, F.G.** (2009). Large animal models of heart failure: a critical link in the translation of basic science to clinical practice. *Circ. Heart Fail.* **2**: 262-271.
- Dong, X.J., Guan, H.P., Zhang, Q.D., Yerle, M., Liu, B.** (2007). Mapping of porcine ANKRD1, ANKRD2, ANKRD23, VGLL2 and VGLL4 using somatic cell and radiation hybrid panels. *Anim. Genet.* **38**: 424-425.
- D'Souza, S.P., Davis, M., Baxter, G.F.** (2004). Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol. Ther.* **101**: 113-129.
- Duboscq-Bidoł, L., Charron, P., Ruppert, V., Fauchier, L., Richter, A., Tavazzi, L., Arbustini, E., Wichter, T., Maisch, B., Komajda, M., Isnard, R., Villard, E.** (2009). Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* **30**: 2128-2136.
- Dunwoodie, S.L.** (2007). Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction, lineage specification and chamber formation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**: 54-66.
- Elion, E.A., Wang, Y.** (2004). Making protein immunoprecipitates. *Methods Mol. Biol.* **284**: 1-14.
- Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saffig, P.** (2003). At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13**: 137-145.
- Fernandes, J.M., MacKenzie, M.G., Kinghorn, J.R., Johnston, I.A.** (2007). FoxK1 splice

variants show developmental stage-specific plasticity of expression with temperature in the tiger pufferfish. *J. Exp. Biol.* **210**: 3461-3472.

Franco, D., Domínguez, J., de Castro, M. del P., Aránega, A. (2002). Regulation of myocardial gene expression during heart development. *Rev. Esp. Cardiol.* **55**: 167-184.

Frank, D., Jun, C., Brors, B., Hanselmann, C., Lude, M., Katus, H.A., Frey, N. (2008). Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension* **51**: 309-318.

Gallego-Delgado, J., Connolly, S.B., Lázaro, A., Sadlier, D., Kieran, N.E., Sugrue, D.D., Doran, P., Brady, H.R., Osende, J., Egido, J. (2009). Transcriptome of hypertension-induced left ventricular hypertrophy and its regression by antihypertensive therapies. *Hypertens. Res.* **32**: 347-357.

Gary-Bobo, G., Parlakian, A., Escoubet, B., Franco, C.A., Clément, S., Bruneval, P., Tuil, D., Daegelen, D., Paulin, D., Li, Z., Mericskay, M. (2008). Mosaic inactivation of the serum response factor gene in the myocardium induces focal lesions and heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **10**: 635-645.

Granzier, H.L., Labeit, S. (2004). The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ. Res.* **94**: 284-295.

Grewal, J., McKelvie, R., Lonn, E., Tait, P., Carlsson, J., Gianni, M., Jarnert, C., Persson, H. (2008). BNP and NT-proBNP predict echocardiographic severity of diastolic dysfunction. *Eur. J. Heart Fail.* **10**: 252-259.

Grewal, J., McKelvie, R.S., Persson, H., Tait, P., Carlsson, J., Swedberg, K., Ostergren, J., Lonn, E. (2008). Usefulness of N-terminal pro-brain natriuretic Peptide and brain natriuretic peptide to predict cardiovascular outcomes in patients with heart failure and preserved left ventricular ejection fraction. *Am. J. Cardiol.* **102**: 733-737.

Guyton, A.C., Hall, J.E. (2006). *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders.

Hall, C. (2004). Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur. J. Heart Fail.* **6**: 257-260.

Han, X.J., Chae, J.K., Lee, M.J., You, K.R., Lee, B.H., Kim, D.G. (2005). Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in hypoxia-induced apoptosis of H9c2 cells. *J. Biol. Chem.* **280**: 23122-23129.

Hayashi, C., Ono, Y., Doi, N., Kitamura, F., Tagami, M., Mineki, R., Arai, T., Taguchi, H., Yanagida, M., Hirner, S., Labeit, D., Labeit, S., Sorimachi, H. (2008). Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin N2A region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **283**: 14801-14814.

Heineke, J., Molkenin, J.D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol.* **7**: 589-600.

Hilfiker-Kleiner, D., Landmesser, U., Drexler, H. (2006). Molecular Mechanisms in Heart Failure. Focus on Cardiac Hypertrophy, Inflammation, Angiogenesis, and Apoptosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**: 56-66.

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

Houweling, A.C., van Borren, M.M., Moorman, A.F., Christoffels, V.M. (2005). Expression and regulation of the atrial natriuretic factor encoding gene Nppa during development and disease. *Cardiovasc. Res.* **67**: 583-593.

Hunziker, W., Geuze, H.J. (1996). Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays* **18**: 379-389.

Hurst, R., Maffitt, M., Murray, E., Kappelman, J., Xu, Q.Y., Mendez, J., Butler, B., Ryan, A., Beckler, G.S. (1996). The TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System. *Promega Notes* **58**: 8-11.

Huttenbach, Y., Ostrowski, M.L., Thaller, D., Kim, H.S. (2001). Cell proliferation in the growing human heart: MIB-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy. *Cardiovasc. Pathol.* **10**: 119-123.

Iwanaga, Y., Nishi, I., Furuichi, S., Noguchi, T., Sase, K., Kihara, Y., Goto, Y., Nonogi, H. (2006). B-type natriuretic peptide strongly reflects diastolic wall stress in patients with chronic heart failure: comparison between systolic and diastolic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **47**: 742-748.

- Jeyaseelan, R., Poizat, C., Baker, R.K., Abdishoo, S., Isterabadi, L.B., Lyons, G.E., Kedes, L.** (1997). A novel cardiac-restricted target for doxorubicin. CARP, a nuclear modulator of gene expression in cardiac progenitor cells and cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* **272**: 22800-22808.
- Jonker, S.S., Zhang, L., Louey, S., Giraud, G.D., Thornburg, K.L., Faber, J.J.** (2007). Myocyte enlargement, differentiation, and proliferation kinetics in the fetal sheep heart. *J. Appl. Physiol.* **102**: 1130-1142.
- Kanai, H., Tanaka, T., Aihara, Y., Takeda, S., Kawabata, M., Miyazono, K., Nagai, R., Kurabayashi, M.** (2001). Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **88**: 30-36.
- Katz, A.M.** (2001). Crossovers between functional and proliferative signaling: key to understanding the pathophysiology and management of heart failure. *J. Cell. Mol. Med.* **5**: 125-131.
- Kaufman, B.D., Desai, M., Reddy, S., Osorio, J.C., Chen, J.M., Mosca, R.S., Ferrante, A.W., Mital, S.** (2008). Genomic profiling of left and right ventricular hypertrophy in congenital heart disease. *J. Card. Fail.* **14**: 760-767.
- Kelly, R., Alonso, S., Tajbakhsh, S., Cossu, G., Buckingham, M.** (1995). Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J. Cell Biol.* **129**: 383-396.
- Kelly, R.G., Lemonnier, M., Zaffran, S., Munk, A., Buckingham, M.E.** (2003). Cell history determines the maintenance of transcriptional differences between left and right ventricular cardiomyocytes in the developing mouse heart. *J. Cell Sci.* **116**: 5005-5013.
- Kokame, K., Kato, H., Miyata, T.** (1998). Nonradioactive differential display cloning of genes induced by homocysteine in vascular endothelial cells. *Methods* **16**: 434-443.
- Korb, M., Ke, Y., Johnson, L.F.** (1993). Stimulation of gene expression by introns: conversion of an inhibitory intron to a stimulatory intron by alteration of the splice donor sequence. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5901-5908.

- Kuo, H., Chen, J., Ruiz-Lozano, P., Zou, Y., Nemer, M., Chien, K.R.** (1999). Control of segmental expression of the cardiac-restricted ankyrin repeat protein gene by distinct regulatory pathways in murine cardiogenesis. *Development* **126**: 4223-4234.
- LaPointe, M.C.** (2005). Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* **26**: 944-956.
- Lareau, L.F., Brooks, A.N., Soergel, D.A., Meng, Q., Brenner, S.E.** (2007). The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. *Adv. Exp. Med. Biol.* **623**: 190-211.
- Laure, L., Suel, L., Roudaut, C., Bourg, N., Ouali, A., Bartoli, M., Richard, I., Danièle, N.** (2009). Cardiac ankyrin repeat protein is a marker of skeletal muscle pathological remodelling. *FEBS J.* **276**: 669-684.
- Lee, M.J., Kwak, Y.K., You, K.R., Lee, B.H., Kim, D.G.** (2009). Involvement of GADD153 and cardiac ankyrin repeat protein in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Exp. Mol. Med.* **41**: 243-252.
- Le Hir, H., Nott, A., Moore, M.J.** (2003). How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 215-220.
- Lehti, M., Kivelä, R., Komi, P., Komulainen, J., Kainulainen, H., Kyröläinen, H.** (2009). Effects of fatiguing jumping exercise on mRNA expression of titin-complex proteins and calpains. *J. Appl. Physiol.* **106**: 1419-1424.
- Lemmens, K., Segers, V.F., Demolder, M., Michiels, M., Van Cauwelaert, P., De Keulenaer, G.W.** (2007). Endogenous inhibitors of hypertrophy in concentric versus eccentric hypertrophy. *Eur. J. Heart Fail.* **9**: 352-356.
- Liang, F., O'Rear, J., Schellenberger, U., Tai, L., Lasecki, M., Schreiner, G.F., Apple, F.S., Maisel, A.S., Pollitt, N.S., Protter, A.A.** (2007). Evidence for functional heterogeneity of circulating B-type natriuretic peptide. *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**: 1071-1078.
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971.
- Lyons, G.E., Mühlebach, S., Moser, A., Masood, R., Paterson, B.M., Buckingham, M.E., Perriard, J.C.** (1991). Developmental regulation of creatine kinase gene expression

by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle. *Development* **113**: 1017-1029.

Mair, J. (2008). Biochemistry of B-type natriuretic peptide—where are we now?. *Clin. Chem. Lab. Med.* **46**: 1507-1514.

Majalahti, T., Suo-Palosaari, M., Sarman, B., Hautala, N., Pikkarainen, S., Tokola, H., Vuolteenaho, O., Wang, J., Paradis, P., Nemer, M., Ruskoaho, H. (2007). Cardiac BNP gene activation by angiotensin II in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* **273**: 59-67.

Mansilla, A., López-Sánchez, C., de la Rosa, E.J., García-Martínez, V., Martínez-Salas, E., de Pablo, F., Hernández-Sánchez, C. (2005). Developmental regulation of a proinsulin messenger RNA generated by intron retention. *EMBO Rep.* **6**: 1182-1187.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chistas, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Bryant, S.H. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* **37**: D205-D210.

Margulies, K.B., Bednarik, D.P., Dries, D.L. (2009). Genomics, transcriptional profiling, and heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**: 1752-1759.

McFadden, D.G., Barbosa, A.C., Richardson, J.A., Schneider, M.D., Srivastava, D., Olson, E.N. (2005). The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development* **132**: 189-201.

McGlincy, N.J., Smith, C.W. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?. *Trends Biochem. Sci.* **33**: 385-393.

Mihl, C., Dassen, W.R., Kuipers, H. (2008). Cardiac remodelling: concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Neth. Heart J.* **16**: 129-133.

Mikhailov, A., Pásaro, E. (1994). Análisis inmunoquímico. Bases y técnicas. Universidad de A Coruña.

- Mikhailov, A.T., Torrado, M.** (2008). The enigmatic role of the ankyrin repeat domain 1 gene in heart development and disease. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 811-821.
- Miles, M.C., Janket, M.L., Wheeler, E.D., Chattopadhyay, A., Majumder, B., Dericco, J., Schafer, E.A., Ayyavoo, V.** (2005). Molecular and functional characterization of a novel splice variant of ANKHD1 that lacks the KH domain and its role in cell survival and apoptosis. *FEBS J.* **272**: 4091-4102.
- Miller, M.K., Bang, M.L., Witt, C.C., Labeit, D., Trombitas, C., Watanabe, K., Granzier, H., McElhinny, A.S., Gregorio, C.C., Labeit, S.** (2003). The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J. Mol. Biol.* **333**: 951-964.
- Miller, M.K., Granzier, H., Ehler, E., Gregorio, C.C.** (2004). The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol.* **14**: 119-126.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B., Rigoutsos, I.** (2006). A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* **126**: 1203-1217.
- Modesti, P.A., Vanni, S., Bertolozzi, I., Cecioni, I., Lumachi, C., Perna, A.M., Boddi, M., Gensini, G.F.** (2004). Different growth factor activation in the right and left ventricles in experimental volume overload. *Hypertension* **43**: 101-108.
- Moorman, A.F., Christoffels, V.M.** (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol. Rev.* **83**: 1223-1267.
- Moretti, A., Lam, J., Evans, S.M., Laugwitz, K.L.** (2007). Biology of Isl1+ cardiac progenitor cells in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 674-682.
- Morgan, H.E., Beinlich, C.J.** (1997). Rapid cardiac growth—mechanical, neural and endocrine dependence. *Jpn. Circ. J.* **61**: 645-649.
- Moulik, M., Vatta, M., Witt, S.H., Arola, A.M., Murphy, R.T., McKenna, W.J., Boriek, A.M., Oka, K., Labeit, S., Bowles, N.E., Arimura, T., Kimura, A., Towbin, J.A.** (2009). ANKRD1, the gene encoding cardiac ankyrin repeat protein, is a novel dilated cardiomyopathy gene. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**: 325-333.
- Mudd, J.O., Kass, D.A.** (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* **451**: 919-928.

- Muñoz-Chápuli, R., Pérez-Pomares, J.M.** (2010). Cardiogenesis: An Embriological Perspective. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* **3**: 37-48.
- Nader, L., Smayra, V., Jebara, V., Bois, P., Potreau, D., Fares, N.** (2008). Brain natriuretic peptide secretion in adult rat heart muscle cells: the role of calcium channels. *Arch. Cardiovasc. Dis.* **101**: 459-463.
- Nakada, C., Oka, A., Nonaka, I., Sato, K., Mori, S., Ito, H., Moriyama, M.** (2003). Cardiac ankyrin repeat protein is preferentially induced in atrophic myofibers of congenital myopathy and spinal muscular atrophy. *Pathol. Int.* **53**: 653-658.
- Nakayama, T.** (2005). The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. *Endocr. J.* **52**: 11-21.
- Niederkofler, E.E., Kiernan, U.A., O'Rear, J., Menon, S., Saghir, S., Protter, A.A., Nelson, R.W., Schellenberger, U.** (2008). Detection of endogenous B-type natriuretic peptide at very low concentrations in patients with heart failure. *Circ. Heart Fail.* **1**: 258-264.
- Nishikimi, T., Maeda, N., Matsuoka, H.** (2006). The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovasc. Res.* **69**: 318-328.
- Nott, A., Meislin, S.H., Moore, M.J.** (2003). A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA* **9**: 607-617.
- Nousiainen, T., Vanninen, E., Jantunen, E., Puustinen, J., Remes, J., Rantala, A., Vuolteenaho, O., Hartikainen, J.** (2002). Natriuretic peptides during the development of doxorubicin-induced left ventricular diastolic dysfunction. *J. Intern. Med.* **251**: 228-234.
- Nurmi, J.T., Puolakkainen, P.A., Rautonen, N.E.** (2005). Intron 1 retaining cyclooxygenase 1 splice variant is induced by osmotic stress in human intestinal epithelial cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **73**: 343-350.
- Olson, E.N.** (2004). A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat. Med.* **10**: 467-474.
- Osinska, H.E., Lemanski, L.F.** (1993). Immunofluorescent studies on Z-line-associated protein in cultured cardiomyocytes from neonatal hamsters. *Cell Tissue Res.* **271**: 59-67.

- Pan, Q., Saltzman, A.L., Kim, Y.K., Misquitta, C., Shai, O., Maquat, L.E., Frey, B.J., Blencowe, B.J.** (2006). Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes Dev.* **20**: 153-158.
- Pan, S., Chen, H.H., Dickey, D.M., Boerrigter, G., Lee, C., Kleppe, L.S., may, J.L., Lerman, A., Redfield, M.M., Potter, L.R., Burnett, J.C.Jr., Simari, R.D.** (2009). Biodesign of a renal-protective peptide based on alternative splicing of B-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 11282-11287.
- Parmacek, M.S.** (2007). Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circ. Res.* **100**: 633-644.
- Pérez-Pomares, J.M., González-Rosa, J.M., Muñoz-Chápuli, R.** (2009). Building the vertebrate heart. An evolutionary approach to cardiac development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**: 1427-1443.
- Perrino, C., Naga Prasad, S.V., Mao, L., Noma, T., Yan, Z., Kim, H.S., Smithies, O., Rockman, H.A.** (2006). Intermittent pressure overload triggers hypertrophy-independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J. Clin. Invest.* **116**: 1547-1560.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Majalahti-Palviainen, T., Kerkela, R., Hautala, N., Bhalla, S.S., Charron, F., Nemer, M., Vuolteenaho, O., Ruskoaho, H.** (2003). GATA-4 is a nuclear mediator of mechanical stretch-activated hypertrophic program. *J. Biol. Chem.* **278**: 23807-23816.
- Pipes, G.C., Creemers, E.E., Olson, E.N.** (2006). The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes Dev.* **20**: 1545-1556.
- Ponsuksili, S., Murani, E., Phatsara, C., Schwerin, M., Schellander, K., Wimmers, K.** (2009). Porcine muscle sensory attributes associate with major changes in gene networks involving CAPZB, ANKRD1, and CTBP2. *Funct. Integr. Genomics* **9**: 455-471.
- Qiu, Z., Cang, Y., Goff, S.P.** (2010). c-Abl tyrosine kinase regulates cardiac growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 1136-1141.
- Quaglietta, D., Belanger, M.P., Wittnich, C.** (2008). Ventricle-specific metabolic differences in the newborn piglet myocardium in vivo and during arrested global ischemia. *Pediatr. Res. Biol.* **63**: 15-19.

- Rajeevan, M.S., Ranamukhaarachchi, D.G., Vernon, S.D., Unger, E.R.** (2001). Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* **25**: 443-451.
- Reini, S.A., Wood, C.E., Keller-Wood, M.** (2009). The ontogeny of genes related to ovine fetal cardiac growth. *Gene Expr. Patterns* **9**: 122-128.
- Riley, P.R., Gertsenstein, M., Dawson, K., Cross, J.C.** (2000). Early exclusion of hand1-deficient cells from distinct regions of the left ventricular myocardium in chimeric mouse embryos. *Dev. Biol.* **227**: 156-168.
- Rodgers, B.D., Interlichia, J.P., Garikipati, D.K., Mamidi, R., Chandra, M., Nelson, O.L., Murry, C.E., Santana, L.F.** (2009). Myostatin represses physiological hypertrophy of the heart and excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* **587**: 4873-4886.
- Ronkainen, J.J., Vuolteenaho, O., Tavi, P.** (2007). Calcium-calmodulin kinase II is the common factor in calcium-dependent cardiac expression and secretion of A- and B-type natriuretic peptides. *Endocrinology* **148**: 2815-2820.
- Samaras, S.E., Shi, Y., Davidson, J.M.** (2007). Novel actions of cardiac ankyrin repeat protein. *Int. Congr. Ser.* **1302**: 53-64.
- Sambrook, J., Russell, D.** (2001). *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schellenberger, U., O'Rear, J., Guzzetta, A., Jue, R.A., Protter, A.A., Pollitt, N.S.** (2006). The precursor to B-type natriuretic peptide is an O-linked glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **451**: 160-166.
- Scurr, L.L., Guminski, A.D., Chiew, Y.E., Balleine, R.L., Sharma, R., Lei, Y., Pryor, K., Wain, G.V., Brand, A., Byth, K., Kennedy, C., Rizos, H., Harnett, P.R., DeFazio, A.** (2008). Ankyrin repeat domain 1, ANKRD1, a novel determinant of cisplatin sensitivity expressed in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**: 6924-6932.
- Sheehy, S.P., Huang, S., Parker, K.K.** (2009). Time-warped comparison of gene expression in adaptive and maladaptive cardiac hypertrophy. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2**: 116-124.
- Shen, M.M.** (2001). Identification of differentially expressed genes in mouse development using differential display and in situ hybridization. *Methods* **24**: 15-27.

- Shi, Y., Reitmaier, B., Regenbogen, J., Slowey, R.M., Opalenik, S.R., Wolf, E., Goppelt, A., Davidson, J.M.** (2005). CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is up-regulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue. *Am. J. Pathol.* **166**: 303-312.
- Sigrist, C.J., Cerutti, L., de Castro, E., Langendijk-Genevaux, P.S., Bulliard, V., Bairoch, A., Hulo, N.** (2010). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* **38**: D161-D166.
- Srivastava, D., Olson, E.N.** (1997). Knowing in your heart what's right. *Trends Cell Biol.* **7**: 447-453.
- Stam, F.J., MacGillavry, H.D., Armstrong, N.J., de Gunst, M.C., Zhang, Y., van Kesteren, R.E., Smit, A.B., Verhaagen, J.** (2007). Identification of candidate transcriptional modulators involved in successful regeneration after nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* **25**: 3629-3637.
- Steinau, M., Rajeevan, M.S.** (2009). RNA profiling in peripheral blood cells by fluorescent differential display PCR. *Methods Mol. Biol.* **496**: 211-222.
- Stennard, F.A., Harvey, R.P.** (2005). T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development* **132**: 4897-4910.
- Stolker, J.M., Rich, M.W.** (2007). The combination of B-type natriuretic peptide and C-reactive protein provides incremental prognostic value among older patients referred for cardiac catheterization. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* **16**: 229-235.
- Sudoh, T., Kangawa, K., Minamino, N., Matsuo, H.** (1988). A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* **332**: 78-81.
- Sultan, M., Schulz, M.H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., Schmidt, D., O'Keeffe, S., Haas, S., Vingron, M., Lehrach, H., Yaspo, M.L.** (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **321**: 956-960.
- Suo, M., Hautala, N., Foldes, G., Szokodi, I., Toth, M., Leskinen, H., Uusimaa, P., Vuolteenaho, O., Nemer, M., Ruskoaho, H.** (2002). Posttranscriptional control of BNP gene expression in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* **39**:

Tabibiazar, R., Wagner, R.A., Liao, A., Quertermous, T. (2003). Transcriptional profiling of the heart reveals chamber-specific gene expression patterns. *Circ. Res.* **93**: 1193-1201.

Tavi, P., Pikkarainen, S., Ronkainen, J., Niemela, P., Ilves, M., Weckstrom, M., Vuolteenaho, O., Bruton, J., Westerblad, H., Ruskoaho, H. (2004). Pacing-induced calcineurin activation controls cardiac Ca²⁺ signalling and gene expression. *J. Physiol.* **554**: 309-320.

Tenhunen, O., Szokodi, I., Ruskoaho, H. (2005). Posttranscriptional activation of BNP gene expression in response to increased left ventricular wall stress: role of calcineurin and PKC. *Regul. Pept.* **128**: 187-190.

Tesfaye, D., Ponsuksili, S., Wimmers, K., Gilles, M., Schellander, K. (2003). Identification and quantification of differentially expressed transcripts in in vitro-produced bovine preimplantation stage embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **66**: 105-114.

Thum, T., Borlak, J. (2000). Gene expression in distinct regions of the heart. *Lancet* **355**: 979-983.

Thum, T., Galuppo, P., Wolf, C., Fiedler, J., Kneitz, S., van Laake, L.W., Doevendans, P.A., Mummery, C.L., Borlak, J., Haverich, A., Gross, C., Engelhardt, S., Ertl, G., Bauersachs, J. (2007). MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* **116**: 258-267.

Tokola, H., Hautala, N., Marttila, M., Magga, J., Pikkarainen, S., Kerkelä, R., Vuolteenaho, O., Ruskoaho, H. (2001). Mechanical load-induced alterations in B-type natriuretic peptide gene expression. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 646-653.

Torrado, M., Centeno, A., López, A., Mikhailov, A.T. (2009). In vivo forced expression of myocardin in ventricular myocardium transiently impairs systolic performance in early neonatal pig heart. *Int. J. Dev. Biol.* **53**: 1457-1467.

Torrado, M., Iglesias, R., Centeno, A., Mikhailov, A.T. (2008). A novel alternative spliced variant of the brain natriuretic peptide gene is superior to BNP as a molecular marker of ventricular dysfunction. *Eur. J. Heart Fail. (Suppl. 7)*: 109.

- Torrado, M., Iglesias, R., Nespereira, B., Centeno, A., López, E., Mikhailov, A.T.** (2009). Intron retention generates ANKRD1 splice variants that are co-regulated with the main transcript in normal and failing myocardium. *Gene* **440**: 28-41.
- Torrado, M., Iglesias, R., Nespereira, B., Mikhailov, A.T.** (2010). Identification of candidate genes potentially relevant to chamber-specific remodeling in postnatal ventricular myocardium. *J. Biomed. Biotechnol.* Volume 2010, Article ID 603159, 10 pages. Doi: 10.1155/2010/603159.
- Torrado, M., López, E., Centeno, A., Castro-Beiras, A., Mikhailov, A.T.** (2004). Left-right asymmetric ventricular expression of CARP in the piglet heart: regional response to experimental heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **6**: 161-172.
- Torrado, M., López, E., Centeno, A., Medrano, C., Castro-Beiras, A., Mikhailov, A.T.** (2003). Myocardin mRNA is augmented in the failing myocardium: expression profiling in the porcine model and human dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* **81**: 566-577.
- Torrado, M., Nespereira, B., Bouzamayor, Y., Centeno, A., López, E., Mikhailov, A.T.** (2006). Differential atrial versus ventricular ANKRD1 gene expression is oppositely regulated at diastolic heart failure. *FEBS Lett.* **580**: 4182-4187.
- Torrado, M., Nespereira, B., López, E., Centeno, A., Castro-Beiras, Mikhailov, A.T.** (2005). ANKRD1 specifically binds CASQ2 in heart extracts and both proteins are co-enriched in piglet cardiac Purkinje cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **38**: 353-365.
- Tsuda, T., Majumder, K., Linask, K.K.** (1998). Differential expression of flectin in the extracellular matrix and left-right asymmetry in mouse embryonic heart during looping stages. *Dev. Genet.* **23**: 203-214.
- Urashima, T., Zhao, M., Wagner, R., Fajardo, G., Farahani, S., Quertermous, T., Bernstein, D.** (2008). Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**: H1351-H1368.
- Vanderheyden, M., Bartunek, J., Goethals, M.** (2004). Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. *Eur. J. Heart Fail.* **6**: 261-268.
- Vanderheyden, M., Goethals, M., Verstreken, S., De Bruyne, B., Muller, K., Van Schuerbeeck, E., Bartunek, J.** (2004). Wall stress modulates brain natriuretic peptide production in pressure overload cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**: 2349-2354.

- Vikstrom, K.L., Bohlmeyer, T., Factor, S.M., Leinwand, L.A.** (1998). Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis. *Circ. Res.* **82**: 773-778.
- Walker, L.A., Buttrick, P.M.** (2009). The right ventricle: biologic insights and response to disease. *Curr. Cardiol. Rev.* **5**: 22-28.
- Wang, H.F., Feng, L., Niu, D.K.** (2007). Relationship between mRNA stability and intron presence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**: 203-208.
- Wei, Y.J., Cui, C.J., Huang, Y.X., Zhang, X.L., Zhang, H., Hu, S.S.** (2009). Upregulated expression of cardiac ankyrin repeat protein in human failing hearts due to arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur. J. Heart Fail.* **11**: 559-566.
- Witt, S.H., Labeit, D., Granzier, H., Labeit, S., Witt, C.C.** (2005). Dimerization of the cardiac ankyrin protein CARP: implications for MARP titin-based signaling. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **26**: 401-408.
- Witt, C.C., Witt, S.H., Lerche, S., Labeit, D., Back, W., Labeit, S.** (2008). Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J.* **27**: 350-360.
- Xing, W., Zhang, T.C., Cao, D., Wang, Z., Antos, C.L., Li, S., Wang, Y., Olson, E.N., Wang, D.Z.** (2006). Myocardin induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* **98**: 1089-1097.
- Yang, S., Liang, P.** (2004). Global analysis of gene expression by differential display: a mathematical model. *Mol. Biotechnol.* **27**: 197-208.
- Yang, W., Zhang, Y., Ma, G., Zhao, X., Chen, Y., Zhu, D.** (2005). Identification of gene expression modifications in myostatin-stimulated myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**: 660-666.
- Yasuno, S., Usami, S., Kuwahara, K., Nakanishi, M., Arai, Y., Kinoshita, H., Nakagawa, Y., Fujiwara, M., Murakami, M., Ueshima, K., Harada, M., Nakao, K.** (2009). Endogenous cardiac natriuretic peptides protect the heart in a mouse model of dilated cardiomyopathy and sudden death. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **296**: H1804-H1810.
- Yoshida, H., Nadanaka, S., Sato, R., Mori, K.** (2006). XBP1 is critical to protect cells from endoplasmic reticulum stress: evidence from Site-2 protease-deficient Chinese

hamster ovary cells. *Cell Struct. Funct.* **31**: 117-125.

Zagorski, J., Sanapareddy, N., Gellar, M.A., Kline, J.A., Watts, J.A. (2008). Transcriptional profile of right ventricular tissue during acute pulmonary embolism in rats. *Physiol. Genomics* **34**: 101-111.

Zakynthinos, E., Kiropoulos, T., Gourgoulianis, K., Filippatos, G. (2008). Diagnostic and prognostic impact of brain natriuretic peptide in cardiac and noncardiac diseases. *Heart Lung* **37**: 275-285.

Zammit, P.S., Kelly, R.G., Franco, D., Brown, N., Moorman, A.F., Buckingham, M.E. (2000). Suppression of atrial myosin gene expression occurs independently in the left and right ventricles of the developing mouse heart. *Dev. Dyn.* **217**: 75-85.

Zeller, R., Bloch, K.D., Williams, B.S., Arceci, R.J., Seidman, C.E. (1987). Localized expression of the atrial natriuretic factor gene during cardiac embryogenesis. *Genes Dev.* **1**: 693-698.

Zhao, C., Hamilton, T. (2007). Introns regulate the rate of unstable mRNA decay. *J. Biol. Chem.* **282**: 20230-20237.

Zolk, O., Frohme, M., Maurer, A., Kluxen, F.W., Hentsch, B., Zubakov, D., Hoheisel, J.D., Zucker, I.H., Pepe, S., Eschenhagen, T. (2002). Cardiac ankyrin repeat protein, a negative regulator of cardiac gene expression, is augmented in human heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 1377-1382.

Zolk, O., Marx, M., Jäckel, E., El-Armouche, A., Eschenhagen, T. (2003). Beta-adrenergic stimulation induces cardiac ankyrin repeat protein expression: involvement of protein kinase A and calmodulin-dependent kinase. *Cardiovasc. Res.* **59**: 563-572.

Zou, Y., Evans, S., Chen, J., Kuo, H.C., Harvey, R.P., Chien, K.R. (1997). CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development* **124**: 793-804.

Zungu, M., Young, M.E., Stanley, W.C., Essop, M.F. (2008). Expression of mitochondrial regulatory genes parallels respiratory capacity and contractile function in a rat model of hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* **318**: 175-181.

