

Cardiac specific gene expression of the regulatory myosin light chains

Citation for published version (APA):

Doevendans, P. A. F. M. (1997). *Cardiac specific gene expression of the regulatory myosin light chains*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19971212pd>

Document status and date:

Published: 01/01/1997

DOI:

[10.26481/dis.19971212pd](https://doi.org/10.26481/dis.19971212pd)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In this thesis various aspects of the murine regulatory myosin light chain (MLC-2) genes were investigated. Two cardiac MLC-2 proteins have been identified, one is expressed in ventricular myocytes, while the other isoform is expressed in atrial myocytes. In chapter one a brief introduction into the nomenclature of myosin light chains, the sarcomeric structure and molecular biology in general is provided. Preliminary data that provide the bases for this study are discussed together with an outline of work presented in this thesis.

The complexity of transcription regulation is highlighted in the second chapter. To provide some insight in gene transcription in the cardiovascular system the most important regulating systems are reviewed. In addition, previously identified transcription factors that have been shown to be important for gene transcription in the heart are listed, linked to the role of the various factors for specific contractile protein genes known to date. In chapter 3 the methods to study nucleic acid-transcription factor interaction are reviewed. Molecular biology has developed the tools to study the interaction of nuclear proteins with either DNA or RNA. The interaction can be analyzed at the basal level to identify the sequence of the nucleic acid bases required for binding or in functional assays to determine the role of the various transcription factors in cell culture and in the intact organism. The strategy to study new transcription factors has been applied to clone and characterize mouse SAP49. The human isoform of this protein was previously identified and appeared to be a RNA splice factor. The mSAP49 message exhibits an interesting expression pattern during embryonic development. The highest levels of expression in the heart coincides with a transition in the expression of isoforms of contractile proteins going from a fetal to a more mature phenotype.

The atrial and ventricular light chain proteins have been used to determine the phenotype of cardiac myocytes derived from an *in vitro* embryonic system. The functional studies performed on ion channels, support the value of this *in vitro* system to study early events in cardiogenesis. Furthermore a system was developed for functional ion channel assessment in concert with immunocytochemistry for phenotyping single isolated cardiomyocytes.

A major part of the thesis was aimed at the identification and characterization of the MLC-2a regulatory DNA sequence. To this end a genomic clone encompassing the complete transcribed part of the gene and 2.0 Kb of the 5' flanking region was isolated and sequenced. In addition 700 bp of the 3' flanking region was analyzed (chapter 6). The structure with regard to the intron-exon boundaries

were compared in various species. Furthermore the homology of various MLC proteins at the amino acid level in mouse, rat and man was determined. The homology of the atrial myosin light chain in mouse and man appeared to be very high (95%). Following identification of the 5' flanking region, this DNA fragment was characterized by transfection studies in rat neonatal cardiomyocytes, skeletal myoblasts and myotubes and non muscle cells. Short proximal promoter fragments of 200 and 450 bp proved to mediate high level, cardiac specific expression of the luciferase reporter gene. The longer promoter fragments (> 450 bp) induced lower luciferase expression levels. The transcription initiation site was identified and appeared to contain a conserved DNA element previously named Initiator. Partial and complete deletion of the Initiator site crippled promoter activity. A map of additional conserved *cis* elements was constructed (chapter 7). The influence of hypertrophic stimuli on MLC-2a promoter activity and ventricular endogenous MLC-2a expression is reported in chapter 8. In cultured ventricular rat neonatal cardiomyocytes promoter activity of the MLC-2a gene was studied in response to different serum conditions, endothelin, phenylephrine and estrogen. A marked induction of luciferase activity was measured upon myocyte treatment with neurohumoral factors. Furthermore the endogenous MLC-2a gene is re-expressed in ventricular myocytes in the absence of serum. The expression levels increase upon stimulation with serum, estrogen, endothelin and phenylephrine. In ventricular tissue of patients suffering from idiopathic dilated cardiomyopathy re-expression of the MLC-2a gene was shown both at the RNA and protein level. Under physiologic conditions the MLC-2a gene is silent in ventricular myocytes. Abnormal MLC-2a expression patterns were found in patients with pump failure and in developing mouse embryos deficient for the retinoid-X-receptor α . The retinoid-X-receptor α knock out experiment indicated the potential role of retinoid acid and its receptors in transcription regulation of the MLC-2a gene in ventricular cardiomyocytes. To analyze the potential role of conserved *cis* elements, that can interact with retinoic acid and its receptors, mutations and deletions were created in an element labeled DR-1 in the MLC-2a promoter. The results indicate a role of the retinoic acid responsive element (DR-1) in the down regulation of the MLC-2a gene in ventricular myocytes. In chapter 10 the major findings of this thesis are summarized and placed in perspective. The consequences of this work for our current understanding of MLC-2 expression in the heart are discussed. The limitations of the methods and the work presented is addressed in addition to what is required for further evaluation of the murine MLC-2a gene. Finally speculations on the future applications of the MLC-2a promoter as a tool transgenic and biotherapy experiments are included.

Samenvatting

Het onderwerp van dit proefschrift is de transcriptie regulatie van de cardiale myosine lichte keten (MLK) eiwitten. In het hart worden een boezem en kamer variant van het eiwit onderscheiden. In hoofdstuk 1 wordt de naamgeving van de myosine lichte keten eiwitten uitgelegd. Voorts wordt de structuur van de sarcomeer besproken evenals de basis principes van de moleculaire biologie. De studies die de basis vormen voor dit proefschrift worden aangehaald om de vraagstelling en studie opzet te toelichten. In hoofdstuk 2 worden de verschillende mechanismen van transcriptie regulatie in het hart beschreven. Transcriptie regulatie is een complex samenspel van nucleïnezuur moleculen (DNA/RNA) met kerneiwitten (transcriptie factoren). Behalve een bespreking van regulatie mechanismen worden in dit overzichtsartikel een aantal transcriptie factoren, die in het hart actief zijn besproken. Dit gebeurt aan de hand van genen die coderen voor eiwitten, noodzakelijk voor de opbouw van de sarcomeer en waarvan gegevens over transcriptie regulatie zijn gepubliceerd. Strategie en methoden, die gebruikt worden om nieuwe transcriptie factoren op te sporen en te bestuderen worden in een overzichtsartikel besproken (hoofdstuk 3). Door gebruik te maken van technieken uit de moleculaire biologie is het momenteel mogelijk om de interactie tussen DNA of RNA en transcriptie factoren in detail te bestuderen. De exacte base volgorde vereist voor eiwit binding kan bepaald worden en de functionele consequenties van de eiwit-nucleïnezuur interactie kunnen gemeten worden. Functionele bepalingen kunnen verricht worden op myocyten in kweek, maar ook in levende organismen.

Door gebruik te maken van de technieken besproken in hoofdstuk 3, hebben we een muizen eiwit opgespoord dat sterk verwant is aan het humane eiwit: SAP49. Het humane eiwit speelt een rol bij het verwijderen van intronen tijdens het produceren van messenger RNA (splice factor). Het muizen gen, genoemd mSAP49, wordt in hartweefsel aangetroffen gedurende de embryonale ontwikkeling, juist in een periode waarin bepaalde foetale eiwitten worden vervangen door meer volwassen isovormen van deze eiwitten (chapter 4).

De ontwikkelingen in de moleculaire cardiologie worden afgeremd door het ontbreken van stabiele cardiomyocyt cellijnen. Een potentiële bron van cardiale myocyten wordt gevormd door een *in vitro* systeem van differentiërende embryonale stamcellen. Deze differentiërende stamcellen vormen klontjes van cellen die spontaan contraheren. Uit deze lichaampjes kunnen cellen geïsoleerd worden die veel overeenkomsten hebben met cardiomyocyten. In hoofdstuk 5 is beschreven hoe we deze cellen hebben gekarakteriseerd aan de hand van het expressie patroon van de MLK eiwitten. Deze vorm van phenotypering werd gekoppeld aan functionele studies naar ion stromen. Deze studie heeft aange-

toond dat immunocytochemie en cellulaire electrofysiologie in één cel gecombineerd kan worden.

Een belangrijk deel van het onderzoek was gericht op de transcriptie regulatie van het atriale MLK gen. Hiertoe werd een genomisch DNA fragment geïsoleerd, waarop het complete MLK-2a gen werd aangetroffen. Dit omvat het complete DNA gebruikt tijdens transcriptie en 2000 baseparen aan de voorkant (5'), en 700 baseparen aan de achterkant (3'). De structuur van het gen werd vergeleken met MLK genen van andere diersoorten, waar het de grootte en de lokalisatie van intron en exon overgangen betreft (hoofdstuk 6). Voorts werd de aminozuur volgorde van MLK eiwitten van muis, rat en mens vergeleken. De homologie tussen muis en mens eiwit is 95%. De promotor van het MLK-2a gen (5') werd geanalyseerd door middel van transfectie studies in hart spiercellen, skelet spiercellen en nier cellen. Korte DNA fragmenten van de MLK-2a promotor (200 en 450 baseparen) gekoppeld aan het "reporter" gen luciferase lieten een hoge activiteit zien. De langere promotor fragmenten lieten een duidelijke afname van de activiteit zien (hoofdstuk 7). De plaats op het gen waar de transcriptie begint werd vastgesteld en bleek samen te vallen met een eerder beschreven regulerend DNA element genoemd: "Initiator". Deletie van dit DNA element maakten de promotor inactief. Andere DNA elementen die eerder herkend werden als bindingsplaatsen voor transcriptie factoren worden besproken. In hoofdstuk 8 worden de resultaten getoond van studies naar het effect van hypertrofe stimuli op de MLK-2a promotor en op re-expressie van MLK-2a in kamermyocyten. In neonatale ventriculaire myocyten in kweek komt MLK-2a tot re-expressie, zelfs zonder serum toevoeging. In de aanwezigheid van serum, oestrogenen, endotheline en fenylefrine wordt een duidelijke toename gevonden in het activiteitsniveau van de MLK-2a promotor. Ook werd re-expressie aangetoond van het MLK-2a gen in kamer weefsel van patiënten met een idiopathische gedilateerde cardiomyopathie. Stimulatie studies met de MLK-2a promotor lieten een toegenomen luciferase activiteit zien na behandeling met endotheline, oestrogenen en fenylefrine. In muizen met een defect retinoid X receptor- α gen, is de embryonale ontwikkeling van het hart gestoord. Op het moleculair nivo bleek kamerweefsel langer dan normaal MLK-2a aan te maken. In hoofdstuk 9 is beschreven hoe met behulp van de MLK-2a promotor dit mechanisme verder kan worden bestudeerd. Door een DNA element dat aan retinoïne zuur afhankelijke receptoren kan binden te veranderen of weg te nemen werd aangetoond dat dit element essentieel is voor transcriptie regulatie van het MLK-2a gen in kamerweefsel. In hoofdstuk 10 is getracht de resultaten van dit proefschrift in perspectief te plaatsen, door aan te geven hoe de resultaten geïnterpreteerd kunnen worden. De beperkingen van de gekozen studie opzet en de noodzaak voor aanvullende studies worden hier uiteen gezet. De mogelijke rol voor de promotor van het MLK-2a gen voor de ontwikkeling van diermodellen voor atriale hartziekten en voor biotherapie wordt hier belicht.