

La toxicidad del ARN en la distrofia muscular miotónica induce la expresión del gen NKX2-5

Ramesh S Yadava^{1,6}, Carla D Frenzel-McCardell¹, Qing Yu¹, Varadamurthy Srinivasan¹, Amy L Tucker², Jack Puymirat³, Charles A Thornton⁴, Owen W Prall⁵, Richard P Harvey⁵ & Mani S Mahadevan^{1,6}

La distrofia muscular miotónica (DMI) es la enfermedad neuromuscular hereditaria más común en adultos y es considerada el primer ejemplo de enfermedad causado por un ARN tóxico. Usando el modelo de ARN de un ratón transgénico reversible en DMI, tenemos la evidencia de que la DMI está relacionada con la expresión inducida de NKX2-5. La expresión transgénica da como resultado defectos en la conducción cardíaca, expresión aumentada del factor de transcripción cardíaco-específico NKX2-5 y profundas alteraciones de la conexina 40 y la conexina 43.

Notablemente, la sobreexpresión del DMPK 3' UTR mRNA en músculo esquelético de ratón también indujo la activación de la transcripción del Nkx2-5 y sus objetivos (de los genes sobre los que actúa)

En músculo humano, estos cambios fueron específicos para la DMI y no estaban presentes en otras distrofias musculares

Los efectos en el NKX2-5 y sus objetivos en cascada (los genes que se activan en cascada) fueron revertidos silenciando la expresión del ARN tóxico

Además. Usando ratones Nkx2-5+/-, demostramos que el Nkx2-5 es el primer modificador genético del ARN tóxico asociado a la DMI en el corazón

La DMI, un desorden autosómico dominante localizado en el cromosoma 19 q, es la enfermedad neuromuscular hereditaria más común en adultos, con una incidencia de 1: 8000 globalmente. Los rasgos comunes de esta enfermedad en adultos incluyen miotonía, pérdida progresiva de músculo esquelético, anomalías en la conducción cardíaca, disfunción del músculo liso, hipersomnolencia, cataratas, atrofia testicular, calvicie frontal y resistencia a la insulina.

La DMI es causada por una expansión de un triplete (CTG)_n que se repite en el 3' UTR del gen que codifica la DM protein-quinasa (DMPK) desde un rango normal (n ¼ 5 a B30) a unos mayores como de varias miles de repeticiones (n ¼ 50 a 42,000)

Los individuos con DMI son proclives a anomalías en la conducción cardíaca, con cerca del 60%- 70% de posibilidades de desarrollar problemas importantes que a menudo desembocan en una muerte repentina

Estas perturbaciones características en la conducción cardíaca consisten sobre todo en bloqueos sinoatriales y atrioventriculares con distintos grados de severidad, que producen latidos lentos e irregulares, y a menudo se acompañan de fibrosis, infiltración adiposa y atrofia del sistema de conducción y del miocardio

Como la mutación responsable de la DMI recae en una región no-codificante de la DMPK, varios mecanismos patogénicos han sido propuestos (revisados en ref.4), pero los datos obtenidos sugieren que los DMPK mRNAs

Mutantes tienen un papel importante en muchos fenotipos de la DMI. La mutación de la DMI se da en un mRNA que está aislado en el núcleo. La DM2, otro casi idéntico desorden clínico, es causado por la expansión de una secuencia (CCTG)_n en el primer intrón de ZNF9 y también se da en inclusiones ribonucleares

Este descubrimiento da más crédito a la hipótesis del ARN tóxico para la patogénesis de la DM, donde el transcrito mutante altera la función de los factores de empalme del ARN, miembros primordiales de la familia

de las proteínas de empalme del ARN como los factores muscleblind-like(MBNL) y CUG-BP y ETR-3-like (CELF), ya sea por separado como formando parte de las inclusiones ribonucleares (como la MBNL1) o por incrementarse su expresión (como en la CUG-BP1) Esas proteínas son factores de empalme del ARN, y si se alteran sus niveles funcionales en tejidos adultos da como resultado la unión aberrante y la reversión a los patrones de empalme embrionarios para varios mRNAs objetivo que normalmente se regulaban bajo antagonismo mutuo de MBNL1 y CUG-BP1 (ref. 12).

Los mecanismos subyacentes en los defectos en la conducción cardíaca en la DMI se desconocen.

Minuciosos análisis de tejidos de individuos con DM no han sido realizados debido a las dificultades inherentes de la obtención de tejido cardíaco procedente de donantes vivos

Los análisis de las escasas muestras disponibles de autopsia también se ve complicada por el hecho de que los individuos normalmente tuvieron un largo historial de enfermedades y comorbilidades asociadas que podrían resultar como efectos secundarios. Basándonos en los modelos en ratones, la haploinsuficiencia de DMPK ha sido postulada como un mecanismo patogénico potencial

Sin embargo, con el descubrimiento de la mutación causante de la DM2 y el postulado de un mecanismo común, la atención se centra ahora en la patogénesis por ARN tóxico. Varios casos de empalmes aberrantes que provocan una reversión hacia los patrones de unión embrionarios, han sido identificados en corazones de individuos con DMI, pero su relación con la patología de la DMI no está clara

Recientemente hemos desarrollado un modelo inducible en ratón de ARN tóxico en la DMI en el que hemos demostrado claramente la naturaleza reversible del ARNm tóxico DMPK 3' UTR. Estas cadenas (llamadas 5-313 y 5-336) expresan una proteína verde fluorescente (GFP) combinada con el

Quebec City, Quebec G1V 4G2, Canada. 4Department of Neurology, University of Rochester, Rochester, New York 14642, USA. 5The Victor Chang Cardiac Research Institute, Darlinghurst, New South Wales 2010, Australia. 6These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to M.S.M. (mahadevan@virginia.edu).

Received 23 July; accepted 26 September; published online 16 December 2007; doi:10.1038/ng.2007.28

1Department of Pathology and 2Department of Medicine, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22908, USA. 3Human Genetics Research Unit, Laval University,

DMPK 3' UTR (llamado GFP-DMPK 3' UTR) bajo el control de un promotor DMPK tetraciclina-inducible humano. Notablemente, bajo inducción, los ratones sobreexpresan un ARNm DMPK 3' UTR normal con solo (CUG)₅ y no tienen aparentes inclusiones ribonucleares o evidencias de los defectos descritos en el ensamblaje de ARN en el corazón.

Rápidamente desarrolla miotonía (el principal rasgo de la DM) y bloqueo cardíaco progresivo (Fig. 1 a), una combinación de fenotipos que solo se observa en individuos con DM. Este modelo representa la primera demostración clara de que el ARN tóxico da lugar a anomalías en la conducción cardíaca.

Entonces exploramos la base molecular de este fenómeno y describimos como esto llevó al imprevisto descubrimiento de la expresión inducida del NKX2-5 en músculo cardíaco y esquelético y describe la identificación del NKX2-5 como un modificador genético de la cardiotoxicidad causada por el DMPK 3' UTR mRNA.

RESULTADOS

La conexina 40 y 43 son afectadas por el ARN tóxico

La conducción cardíaca normal está mediada por la propagación ordenada de impulsos eléctricos desde un cardiomiocito al siguiente. Las proteínas conexas son componentes esenciales de las uniones gap que se requieren para esta propagación, y su importancia en el desarrollo cardíaco y en los defectos de conducción ha sido sostenido por varios modelos en ratones. Las deficiencias en conexina 43 (CX43) y conexina 40 (CX40) dan lugar a fallos en la conducción cardíaca. En ratones adultos, CX43 es expresada por los cardiomiocitos de todo el miocardio. La expresión de CX40 se restringe al atrio y al sistema de conducción cardíaco (el haz de His, sus dos ramas y las fibras de Purkinje) regiones que son claves para el tipo de anomalías vistas en individuos con DM1 y en nuestros ratones transgénicos.

Usando los ratones transgénicos 5-313, evaluamos la expresión de CX40 y CX43 en el corazón mediante inmunohistoquímica fluorescente. Los ratones tratados con Doxyciclina (a los que nos referiremos a partir de ahora como ratones inducidos) que tenían defectos en la conducción cardíaca mostraban reducción de la CX40 en el haz de His, en sus ramas y en las fibras de Purkinje del subendocardio, comparados con la expresión de CX40 en ratones sin tratar (a los que llamaremos ratones no inducidos) (Fig. 1b).

La CX40 en los vasos sanguíneos del corazón o del atrio no parecían ser afectados. La CX43 también parecía mostrar una reducción generalizada en el miocardio

ventricular, especialmente en los ratones más afectados (Fig. 1c).

Confirmamos reducciones en la CX43 por protein-blotting y RT-PCR cuantitativa (Fig. 1c). La expresión de CX43 disminuyó rápidamente comenzando 5 días después de la inducción transgénica, correspondiente a los cambios en la conducción cardíaca.

NKX2-5 está inducido por un ARN tóxico en el corazón

El factor de transcripción cardíaco NKX2-5 se cree que es un factor clave en la regulación de la expresión de la conexina y en el mantenimiento de la conducción cardíaca normal. NKX2-5 es un miembro de la familia NK homeobox; actúa como un específico activador transcripcional o represor e interactúa con otros factores de transcripción como GATA4, TBX5 and SRF19. NKX2-5 se expresa predominantemente en tejido cardíaco desde el desarrollo embrionario inicial hasta la edad adulta. En los seres humanos, mutaciones dominantes en NKX2-5 causan bloqueo del corazón, que van desde intervalos PR prolongados (bloqueo primer grado) a completo (bloqueo de tercer grado), exactamente igual que los efectos cardíacos observados en nuestros ratones. Además, según antecedentes genéticos, algunos heterocigotos Nkx2-5^{-/-} ratones desarrollan intervalos PR prolongados (una medida de la velocidad de conducción cardíaca desde el nódulo sinoauricular al ventrículo) y los ratones transgénicos sobreexpresan un NKX2-5 mutante (con cambio en el aminoácido I183P) desarrollan bloqueo progresivo del corazón y demuestran regulación decreciente sustancial de CX40 y CX43 (ref. 23,24). Por lo tanto, presumimos que la expresión de NKX2-5 se redujo en los corazones de ratones inducidos. La microscopía con inmunofluorescencia mostró que NKX2-5 fue expresado en cardiomiocitos (según la evaluación por doble detección de distrofina y NKX2.5; Complementario Fig. 1 Online). Nos sorprendió, sin embargo, encontrar que en promedio, los ratones inducidos habían significativamente más núcleos con NKX2-5 detectable, en comparación con los ratones no inducidos (306 ± 70 versus 185 ± 50, P < 0.002; Fig. 2a), aunque no hubo diferencias cardíacas evidentes en tamaño, peso o morfología. En el 5-313 ratones heterocigotos para el locus GFP-DMPK 3' UTR

Figura 1 Anomalías de la conducción cardíaca.

(a), anomalías en el ECG de ratones transgénicos inducidos. Se muestran ondas P (auricular) y R (ventricular).

* Indica que faltan las ondas R en el bloqueo de segundo grado. Nota la ausencia de ondas P en el bloqueo cardíaco completo de ejemplo.

(b) Inmunohistoquímica una sección transversal de los corazones de ratón, mostrando CX43 (verde), CX40 (rojo) y CX40 / CX43 coexpresión (naranja). Note el adelgazamiento de CX40 y la pérdida de coloración en el sistema de conducción (fibras de Purkinje), de ratones inducidos.

(c) expresión ventricular de CX43 es menor en miocardio de ratones inducidos que en no inducidos, como se detecta por inmunohistoquímica

(IHC), RT-PCR (media ± SD) y protein-blotting.

Números sobre los cuadros en protein-blot representan el número de días de inducción transgénica. Los números a continuación se representan la expresión de CX43 relativa en comparación con los ratones de tipo salvaje. A continuación los números de día 6-17 representan la media de las muestras.

GAPDH se incluyó como un control de carga

...transgen (en lo sucesivo denominado '5-313 heterocigotos») co-expresando un alelo Nkx2-5LACZ, no encontramos ninguna diferencia en el número de núcleos expresando b-galactosidasa entre ratones inducidos y no inducidos (205 ± 37 versus 192 ± 13 , respectivamente; $P \frac{1}{4} 0.24$), lo que sugiere que el mayor número de núcleos NKX2-5 demostrado por inmunohistoquímica son debido a una mayor expresión más que un aumento en el número de cardiomiocitos. RT-PCR cuantitativos (Fig. 2a) y la inmunotransferencia del ARN mostró un aumento correspondiente de la expresión de Nkx2-5 mRNA en los corazones de los ratones que expresan el transgen lo que sugiere que la DMPK 3' UTR mRNA puede regular al alza o desinhibir la transcripción de Nkx2-5. Estos efectos sobre Nkx2-5, Gia5 (Cx40) y Gial1 (Cx43) probablemente no se debieron a los defectos alternativos de empalme, sino a que cada uno de ellos compuesto por sólo dos exones

El ARN tóxico en el músculo esquelético induce la expresión de NKX2-5

Durante el desarrollo embrionario, NKX2-5 es expresada principalmente en el corazón y escasamente en unos pocos tejidos extracardíacos, incluyendo tejidos faríngeos y laríngeos, hígado, bazo, estómago, músculos occipitales y lengua. La expresión en tejidos extracardíacos no es evidente en tejidos adultos. Concretamente, no hay pruebas de la expresión de Nkx2-5 en el músculo esquelético o en mioblastos. Sin embargo, un reciente estudio

Sugirió que podría ser baja la expresión de NKX2-5 en C2C12 mioblastos esqueléticos de ratón y que la sobreexpresión de NKX2-5 en esas células daría como resultado defectos en la diferenciación miogénica, un fenotipo visto en un cultivo celular modelos de DMPK 3' UTR mRNA tóxico y en mioblastos de DMI

Esto nos ha llevado a considerar la posibilidad de que la expresión inducida de NKX2-5 en el músculo esquelético de ratones transgénicos expresan el tóxico ARN. Ensayos con Inmunofluorescencia para NKX2-5 en el músculo esquelético de ratones que sobreexpresan la GFP-DMPK 3' UTR mostró fuertes manchas de NKX2-5 en mionúcleos (Fig. 3A). Hemos observado Nkx2-5 mRNA (detectados por RT-PCR; no aparecen los datos) y proteína NKX2-5 sólo en el músculo esquelético de ratones que expresan los tóxicos ARN (Fig. 3b).

No hemos observado expresión de mRNA Nkx2-5 o proteína NKX2-5 en los músculos esqueléticos de tipo salvaje o en ratones no inducidos, mdx ratones (un ratón modelo de distrofia muscular de Duchenne) o ratones que sobreexpresen GFP29 (datos no mostrados). El efecto sobre Nkx2-5 parecía ser específico, al no detectar expresión inducida en el análisis micromatriz, RT-PCR o inmunohistoquímica de Tbx5, Tbx20 Gata4 en el músculo esquelético de ratones que expresan el tóxico ARN (datos no mostrado).

Los objetivos en cascada de NKX2-5 se ven afectados

Para evaluar la importancia biológica de la expresión inducida de Nkx2-5 en músculo cardíaco y esquelético, se evaluó la expresión de los genes objetivo de NKX2-5 por RT-PCR en ratones no inducidos e inducidos 5-313 y 5-336. En tejido cardíaco inducido procedente de ratones 5-313 además de los efectos sobre Gial1 (Fig. 1c), nos encontramos mayor expresión de Nppb (péptido natriurético cerebral, también conocido como Bnp) y Ankrd1 (ankryin- repito proteína cardíaca, anteriormente conocida como Carp) y menor expresión de Gia5 (Fig. 4a). En el músculo esquelético de ratones inducidos 5-313, hemos encontrado expresión inducida de Nppb, Ankrd1 y del receptor adenosina A1 (Adora1) (Fig. 4b).

En el músculo esquelético de ratones inducidos 5-336, hemos observado incluso mayor expresión de estos objetivos: la expresión de Nppb aumentó 645 veces ($P \frac{1}{4} 0.01$), la expresión de Ankrd1 aumentó 116 veces ($P \frac{1}{4} 0.007$) y la del Adora1 aumentó 13 veces ($P \frac{1}{4} 0.01$). La expresión del mRNA Nppa (péptido atrial natriurético, también conocido como Anp) fue alrededor de nueve veces superior en los ratones inducidos 5-313, aunque esto no alcanzó significación estadística ($P \frac{1}{4} 0.09$), y era ratones 24 veces mayor en inducida 5-336 ($P \frac{1}{4} 0.003$)

Expresión de Nppa y Nppb, que son objetivos transcripcionales bien caracterizados de NKX2-5 y son altamente expresados en cardiomiocitos, fue apenas detectable, si en todos, en el músculo esquelético de FVB ratones salvajes, ratones que sobreexpresan GFP y mdx ratones (datos no mostrados). La protein-transferencia (protein blotting) para la expresión de CARP en el músculo esquelético

Figura 2 : La expresión de NKX2-5 es inducida por el ARN tóxico en el corazón.

(a) Inmunohistoquímica para NKX2-5 en el miocardio ventricular demuestra que los ratones transgénicos inducidos tienen núcleos con NKX2-5 más detectables, que los ratones no inducidos (que se muestra gráficamente en la inferior izquierda del panel, con una media \pm s.d.; $\frac{1}{4} P 0,002$). RT-PCR demuestra que la expresión de ARNm Nkx2-5 en el corazón también es mayor en los ratones inducidos (panel derecho inferior, con una media \pm s.d.; $\frac{1}{4} P 0,03$). (b) ARN blotting confirmó los resultados de RT-PCR (los números por debajo de la mancha se refieren a nivel de expresión en relación con ratones no inducidos). GAPDH se utilizó como control de carga.

Figura 3: NKX2-5 es inducida ectópicamente en el músculo esquelético. (a) expresión del Transgen

inducida en ratones. Las manchas de DAPI marcan los núcleos; LA expresión de GFP indica la expresión del transgén. Inmunohistoquímica para NKX2-5

(rojo) indica que no hay ninguna expresión en mionúcleos esquelético no inducidos pero aumentó notablemente la expresión en los músculos de los ratones inducidos.

(b) Protein-blotting NKX2-5 en el músculo esquelético. GAPDH se utilizó como un control de carga

...confirmó los resultados de la RT-PCR (Fig. 4c). Además, expresión de CX43 se redujo en el músculo Esquelético de ratones inducidos (Fig. 4c).

NKX2-5 es suficiente para afectar sus objetivos en mioblastos

NKX2-5 es conocido por interactuar con un número de socios a afectar sus objetivos. Para probar directamente si la sobreexpresión de NKX2-5 fue suficiente para afectar a sus subordinados objetivos en el mioblastos esqueléticos, hemos utilizado la sobreexpresión transitoria de Nkx2-5 en C2C12 mioblastos de ratón. Este resultado depende de la dosis de estimulación de Nppa y Nppb (Fig. 5), considerando que ambos sólo se expresan normalmente en el corazón en adultos.

NKX2-5 esta inducido en DMI

Para evaluar la potencial relevancia clínica de este hallazgo, hemos realizado marcaje por inmunofluorescencia de NKX2-5 en muestras de músculo esquelético humano. El musculo normal no tenía NKX2-5 detectable, comparando con el músculo esquelético de un individuo adulto con DMI incipiente mostraba una clara expresión de NKX2-5 en mionúcleos (Fig. 6A). Hemos confirmado estos resultados por proteína-blotting (Fig. 6b) y por RT-PCR (Fig. 6c).

Hemos analizado muestras de músculo esquelético de cinco diferentes individuos con DMI, siete controles sin distrofia muscular y cuatro individuos con otras enfermedades musculares (tres con distrofia muscular de Duchenne y uno con miopatía X-vinculado) y se comprobó que la expresión de NKX2-5 era específica a los músculos de los individuos con DMI. Aunque hemos tenido un número limitado de muestras, la expresión NKX2-5 parecía ser dos veces más alto en los corazones de los individuos con DMI respecto a los corazones de los individuos sin DMI (Fig. 6b). Hemos observado expresión de objetivos subordinados cardíaco-específicos de NKX2-5 (NPPA, NPPB) en extractos de ARN total de músculos esqueléticos de individuos con DMI (Fig. 6c).

Estos efectos sobre NKX2-5, NPPA y NPPB estuvieron presentes sólo en los músculos de los individuos con DMI y no en individuos con otras distrofias musculares o en los controles sin distrofia muscular (Fig. 6c). Así, la inducción de NKX2-5 y sus efectos en cascada posteriores en el músculo esquelético no son una respuesta inespecífica al estrés a cambios miopáticos; en cambio, parecen ser una respuesta concreta a los DMPK mRNA mutantes

Silenciar los ARN tóxicos invierte los efectos de la inducción de NKX2-5

Hemos encontrado que el ARN tóxico y las anomalías en la conducción cardíaca son reversibles en muchos de los ratones inducidos al silenciar la expresión del transgen retirando la doxicilina. Estos ratones se denominan « ratones revertidos». Nos pareció sorprendente que la expresión de CX40 fue restaurado en el haz de His y las fibras de Purkinje de los ratones revertidos (Fig. 7A). RT-PCR mostró la restauración de la expresión de Gia5 mRNA (Fig. 4a). Proteín – blotting y RT-PCR mostró restablecimiento de expresión de la CX43 en tejidos cardíacos (Fig. 7b) y en los músculos esqueléticos (Fig. 4c). En el corazón, el número de núcleos con NKX2-5 positivo

(Fig. 7c) y con expresión de Nkx2-5 mRNA ha vuelto a los niveles encontrados en ratones no inducidos, según la evaluación de ARN blotting (inmunotransferencia) (Fig. 2b) y RT-PCR (Fig. 7 C). Se observaron resultados

similares para NKX2-5 en el músculo esquelético por inmunofluorescencia y proteína-blotting (fig. 7d). Ninguno de los ratones revertidos mostró expresión de Nkx2-5 ARNm en ningún músculo esquelético, evaluados por RT-PCR (datos no mostrados). Los efectos sobre los genes diana de NKX2-5 también se invirtió en músculo tanto esqueléticos como cardíaco (Fig. 4a-c).

NKX2-5 es un modificador genético de cardiotoxicidad

Si el ARN induce expresión del NKX2-5 tóxico, y esto tiene un papel en los fenotipos DMI, la reducción de la expresión de NKX2-5 podría dar lugar a la modulación de esos fenotipos.

Lamentablemente, los ratones NKX2-5-nulo mueren durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, los ratones Nkx2-5 heterocigotos (Nkx2-5LacZ / +) son viables y el desarrollo de poco o ningún fenotipo en un fondo genético FVB. Por lo tanto, criados ratones Nkx2-5LacZ / + con ratones 5-313 homocigotos para el locus GFP-DMPK 3' UTR transgen r (en lo sucesivo denominado « ratones homocigóticos 5-313 "). La progenie resultante fueron Nkx2-5LacZ / + 5-313 heterocigotos (n ¼ 29) o Nkx2-5 + / + 5-313 heterocigotos (n ¼ 25). Tras el destete, aproximadamente a las 4 semanas de edad, se realizó electromiogramas (EMGs) y electrocardiogramas (ECG). Ninguno de los ratones tenía miotonía. El promedio de los intervalos PR para los dos grupos fueron 0,029 y 0,031 s s, respectivamente, y sólo los heterocigotos Nkx2-5 + / + 5-313 tuvieron un intervalo PR de 0,04 s. No hubo diferencia estadística en los intervalos PR entre los dos grupos (P¼ 0,08).

Posteriormente, se indujo la expresión de la GFP-DMPK 3' UTR transgen con doxicilina y luego realizó EMGs y ECG sobre una base semanal. No nos sorprendió encontrar que todos los ratones desarrollaron miotonía en 3 semanas, ya que la miotonía, como ha sido previamente demostrado, es el resultado de defectos del proceso de empalme del Clcn-1 mRNA. Sin embargo, la haploinsuficiencia de Nkx2-5 tenido un claro efecto cardioprotector (Fig. 8). 2 semanas después de la inducción de la producción de ARN tóxicos, la media de intervalo PR

Figura 4: NKX2 los objetivos-5 se ven afectados por la inducción de la expresión del transgén

(a) RT-PCR en tiempo real para Nppb, Ankrd1 y Gia5 ARNm en los corazones de ratones transgénicos 5-313, en relación con ratones no inducidos 5-313 (media ± s.d.). (b) RT-PCR en tiempo real para Nppb, Ankrd1 y Adora1 mRNA en el músculo esquelético de ratones transgénicos 5-313, en relación con ratones no inducidos 5-313 (media ± s.d.). Nótese la reversión hacia los niveles normales con el silenciamiento del transgén. (c). Protein blot de los objetivos en cascada en extractos de músculo esquelético que demuestran que la expresión del CARP es inducido y CX43 es regulado a la baja por ARN tóxico, y se restauran los niveles normales en ratones revertido. Líneas 1-2: ratones no inducidos; 3-5: ratones inducidos; 6-8: ratones revertidos. GAPDH se utilizó como control de carga.

Figura 5: NKX2-5 es suficiente para activar los objetivos transcriptionales en mioblastos esqueléticos. RT-PCR de los ensayos de transfección transitoria demuestra que la expresión de Nkx2-5 en C2C12 mioblastos esqueléticos es suficiente para dirigir la expresión dosis-dependiente de los objetivos cardíaco-específicos en cascada Nppa y Nppb. b-actina es un control de carga. Carril izquierdo es un control negativo (sin plásmido).

para los dos grupos fueron 0,029 y 0,031 s, respectivamente, y sólo en heterocigotos Nkx2-5 + / + 5-313 tuvieron un intervalo PR de 0,04 s. No hubo diferencia estadística en los intervalos PR entre los dos grupos ($\frac{1}{4}$ P 0,08). Posteriormente, se indujo la expresión del transgen GFP-DMPK 3' UTR con doxiciclina y luego realizó EMGs y ECG sobre una base semanal. No nos sorprendió encontrar que todos los ratones habían desarrollado miotonía en 3 semanas, ya que la miotonía ha sido previamente demostrado que es el resultado de los defectos en el proceso de empalme del Clcn-1 mRNA. Sin embargo, la haploinsuficiencia de Nkx2-5 tenía un claro efecto cardioprotector (Fig. 8). 2 semanas después de la inducción de la producción de ARN tóxicos, la media de los intervalos PR en heterocigotos Nkx2-5 + / + 5-313 fue 0,041 s, con 15 de 25 ratones que tengan intervalos de PR $\geq 0,04$ s (rango, 0,04-0,0575 s), mientras que la media en el intervalo de los heterocigotos PR Nkx2-5LacZ / + 5-313 fue 0,034 s, con sólo 3 de 29 ratones que tengan intervalos PR $\geq 0,04$ s (dos tenían un intervalo de $\geq 0,04$ s, y uno tenía un intervalo de 0,045 s). Esta diferencia fue

estadísticamente significativa ($P \leq 0,00003$). Los efectos cardioprotectores de la haploinsuficiencia Nkx2-5 esta correlacionada con la reducción de expresión de Nkx2-5 ARNm y proteínas NKX2-5 (Fig. 8 B, c). A la publicación de este artículo, las diferencias persisten después 3 meses de la inducción. Además, los experimentos preliminares usando ratones 5-336 mostraron las mismas tendencias (datos no mostrados). Cabe destacar que, en 5-313 ratones homocigotos, la haploinsuficiencia de Nkx2-5 no tenía un efecto protector, todos los ratones desarrollaron miotonía y bloqueo cardíaco completo en 2 semanas, independientemente de su genotipo Nkx2-5. Los ratones homocigotos 5-313 produjeron mucho más ARN tóxicos y concomitantemente mostraron un fenotipo más severo que los ratones heterocigotos 5-313, un resultado que puede ser análogo a los efectos de dosis repetidas observados en personas con DM1. El efecto protector de la reducción de NKX2-5 fue abrumador en estos ratones y es coherente con el concepto de Nkx2-5 como un modificador de la toxicidad del ARN.

Figura 6: NKX2-5 se expresa en el tejido muscular de las personas con DM1. (

a) Tinción DAPI para los mionúcleos e inmunohistoquímica para NKX2-5 en el músculo esquelético de los individuos con o sin DM1. La expresión de NKX2-5 está presente en los músculos de las personas con DM1 (vease tinción nuclear verde). (b) Protein-blotting de extractos de proteínas del músculo que muestra NKX2-5 en tejido de las personas con DM1 (columnas 1-4) pero no en el músculo normal (columnas 5, 6), en personas con distrofia muscular de Duchenne (columna 7), o en los músculos de individuos con miopatía ligada al cromosoma X (carril 8). Carril 9: control positivo (corazón humano normal). GAPDH se utilizó como una carga control. La expresión de NKX2-5 parece más alta en los corazones de las personas con DM1 que en los corazones de las personas sin DM1. (c) RT-PCR muestra que la expresión de NKX2-5 y de sus objetivos NPPA y NPPB es específico de los músculos de las personas con DM1. GAPDH se utilizó como control de carga. MD=distrofia muscular.

Figura 7: Reversión de ARN tóxico y cambios moleculares.

(a) Expresión CX40 (rojo) se reduce en el sistema de conducción cardíaca de los ratones inducido, pero vuelve a niveles más normales en ratones revertidos. Insets muestran diferencias en la expresión CX40 (rojo) y CX43 (verde) en miocardio ventricular de inducidos y no inducidos.

(b) del panel superior:
El protein blot muestra que la expresión de la proteína CX43 es restaurada en el corazón de ratones revertidos. Carriles 1-3: no ratones inducidos; 4-6: ratones inducidos; 7-9: ratones revertidos. Números de los carriles indican expresión relativa. Panel inferior: RT-PCR muestra que Gial la expresión de (Cx43) ARNm se restaura en los ratones revertidos. (c) Ratones revertidos tienen expresión normal de Nkx2-5 en los músculos cardíacos, como se muestra por un número de núcleos y por RT-PCR. (d) NKX2-5 en el músculo esquelético es indetectable por inmunohistoquímica (panel superior) o por proteínas secante (panel inferior) en ratones revertidos. Carriles 1-2: ratones no inducidos; 3-5: ratones inducida; 6-8: ratones revertidos. GAPDH se utilizó como control de carga. Gráficos en B y C muestran media \pm s.d.

Figura 8: La haploinsuficiencia de Nkx2-5 protege contra defectos de la conducción cardiaca provocados por DMPK 3 ϵ UTR ARNm.

(a) Intervalos PR en heterocigotos Nkx2-5 + / +

5-313 aumento mucho más que en heterocigotos Nkx2-5LacZ / + 5-313 después de la inducción con DMPK 3 ϵ UTR ARNm tóxico (media \pm sd).

* Indica que los intervalos PR no son significativamente diferentes antes de la inducción con doxiciclina

($\frac{1}{2}$ P 0,08). ** Indica que los intervalos PR son significativamente diferente después de la inducción con doxiciclina (P $\frac{1}{4}$ 0,00003).

(b) RT-PCR confirma que la expresión de Nkx2-5 mRNA es mucho menor en corazón de heterocigotos Nkx2-5LacZ / + 5-313 que en corazones de heterocigotos Nkx2-5 + / + 5-313 (media \pm s.d.).

(c) Protein-blot representativo que demuestra que mancha NKX2 expresión-5 es menor en corazones de heterocigotos Nkx2-5LacZ / + 5-313 que en corazones de heterocigotos Nkx2-5 + / + 5-313 (+/- indica ratones Nkx2-5LacZ / +). Números bajo las manchas muestran la expresión relativa de NKX2-5 en comparación con expresión en heterocigotos Nkx2-5 + / + 5-313 no inducidos. Extracto de Músculo esquelético (sk.m.) no inducido fue utilizado como un control negativo para NKX2-5. Al menos cinco ratones fueron analizados para cada grupo de RT-PCR y protein-blotting. Dox, doxiciclina

DISCUSIÓN

NKX2-5, el RNA tóxico y defectos de la conducción cardiaca

¿Cuál es la importancia potencial de estos hallazgos? Es evidente que las perturbaciones en el delicado equilibrio de la expresión NKX2-5 tienen deletéreos efectos sobre el corazón. La sobreexpresión de NKX2-5 y sus consiguientes efectos en CX40 y CX43 proporcionan un mecanismo molecular plausible para los defectos en la conducción cardiaca DM1. Basándonos en los prevalentes datos en seres humanos y los modelos de ratón, se había predicho que la expresión de NKX2-5 podía ser disminuido en los corazones de los ratones que expresan los ARN tóxicos. En cambio, se observó una mayor expresión de NKX2-5. Aunque los aumentos de compensación en NKX2-5 ya se han demostrado en modelos animales con hipertrofia cardiaca inducida, no se conoce ningún trastorno hereditario humano asociado con la sobreexpresión de NKX2-5.

Sin embargo, los datos sugieren que la sobreexpresión de NKX2-5 tiene efectos nocivos. En los seres humanos, la trisomía de región distal del cromosoma 5q (donde el gen NKX2 reside) ha sido descubierto como fuente de graves defectos congénitos del corazón, lo que sugiere que la sobreexpresión de NKX2-5 durante el desarrollo embrionario humano es deletéreo. Cabe destacar que, en nuestra investigación, los experimentos preliminares examinan los aspectos de desarrollo de toxicidad en el ARN de nuestros ratones, hemos observado importantes muerte neonatal y edema generalizado (datos no mostrados). Además, un grupo ha informado de que han sido incapaces de generar ratones transgénicos viables que sobreexpresaran NKX2-5 bajo el control de un promotor de b-miosina de cadena pesada (MHC) debido a diversos defectos del corazón y retardo de crecimiento durante desarrollo embrionario. Sin embargo, otros han generado ratones transgénicos que sobreexpresan NKX2-5 bajo el control de un promotor de a-MHC que actúa principalmente en el corazón postnatal. Estos ratones desarrollan rápida y progresivamente defectos de la conducción cardiaca y mueren de los 2 a 4 meses de edad. Estos fenotipos son muy similares a nuestras observaciones en modelo de ratón inducible para el ARN tóxico y para personas con DM1. Deficiencias en CX43 y CX40 provocan claramente defectos en la conducción cardiaca. Basado en datos del análisis del promotor de Gia5 (Cx40), Gia5 ha sido identificado como un objetivo de los NKX2-5 (Ref. 32,33). Sin embargo, datos recientes de ratones Nkx2-5 + / - y de un ratón con una carencia de NKX2-5 en los ventrículos cardiacos han demostrado que las deficiencias en NKX2-5 no tienen efectos importantes en CX40 de los cardiomiocitos. En otro estudio, ratones transgénicos que sobreexpresan un NKX2-5 mutante (I183P) desarrollaron bloqueo cardiaco progresivo en las semanas posteriores al nacimiento y demostraron regulación decreciente de CX40 y CX43 (Ref. 23,24). Esta mutación se pensaba que era dominante negativa. Sin embargo, los autores señalan que el gen Nkx2-5 endógeno es regulado al alza, en especial en los corazones posnatales, lo que sugiere un potencial para una ganancia de función de los alelos endógenos. En un estudio de seguimiento, que

comprobaron y demostraron que la sobreexpresión de de NKX2-5 (I183P) en cardiomiocitos adultos no afecta a la expresión de Gia5 o Gial y, en ratones transgénicos, da lugar a un inicio tardío (41 años de edad) de las anomalías leves en la conducción cardiaca. Sin embargo, en ratones transgénicos, los autores encontraron que los de tipo salvaje que sobreexpresaban NKX2-5 padecen un rápido y progresivo bloqueo del corazón en cuestión de semanas después de su nacimiento y hasta un profundo regulación decreciente de CX40 y CX43 en el corazón. Este efecto sobre CX40 y CX43 en ratones que sobreexpresan NKX2-5 fue confirmada por sobreexpresión de NKX2-5 en cardiomiocitos aislados de adultos, pero el mecanismo molecular preciso para ello es un tanto desconocido. Así pues, hay pruebas claras de modelos de ratón y experimentos de cultivo celular de que la sobreexpresión de NKX2-5 es suficiente para causar los efectos que vemos en nuestro modelo de ARN tóxico en ratón.

Consecuencias de la inducción de NKX2-5 en músculo esquelético con DM1

NKX2-5, BNP y ANP son normalmente consideradas proteínas específicas cardiacas, de las que no hay datos sobre que se expresen en músculo esquelético de adulto, y son comúnmente utilizados como marcadores cardiacos específicos. Por lo tanto, nos vimos sorprendidos por la clara y coherente expresión de estos genes en el músculo esquelético de los individuos con DM1. En el músculo esquelético, la expresión inducida de NKX2-5 parece específica de DM1 y por lo tanto puede ser clínicamente útil en el diagnóstico y un potencial marcador. NKX2-5 en el músculo esquelético parece tener efectos transcripcionales sobre los genes diana en nuestro modelo de ratón (Fig. 4b, c), en mioblastos esqueléticos (Fig. 5) y en los músculos de personas con DM1 (Fig. 7). Proteínas, como BNP y ANP que sólo se induce en los músculos DM1 puede resultar útil para los marcadores para monitorizar el estado de la enfermedad y la respuesta terapéutica. De particular significación clínica, BNP elevados en suero se utiliza con mucha frecuencia como un marcador altamente específico para la sobrecarga de volumen cardiaco (por ejemplo, en insuficiencia cardiaca congestiva), pero habida cuenta de nuestros resultados en los músculos de personas con DM1, este puede que sea necesario reconsiderarlo. La expresión de NKX2-5 en el músculo esquelético también puede tener consecuencias patológicas. La disminución de la expresión en CX43 esquelético los músculos de ratones inducidos pueden ser pertinentes para los defectos de regeneración muscular observados en DM1. Estudios en mioblastos y en modelos de ratones en los que se elimina la Gial tejido-específica condicional han puesto de relieve la importancia de la sobreexpresión de NKX2-5 directamente en el músculo esquelético usando un ratón modelo. Aunque la sobreexpresión de NKX2-5 en el ratón o músculo esquelético humano y sus efectos todavía no se ha evaluado directamente, aumento de NKX2-5 expresión en mioblastos claramente tiene efectos adversos

en la diferenciación miogénica. En particular, los importes de MyoD y miogenina, factores miogénicos clave de transcripción necesarios para la correcta diferenciación, se redujo por sobreexpresión de NKX2-5 - exactamente el mismo resultado que en un cultivo celular de mioblastos modelo de ARN tóxico y mioblastos en DM1.

Nuevos mecanismos patogénicos de ARN de toxicidad

Nuestros estudios demuestran un mecanismo no descrito previamente de ARN tóxico en DM1, llamado, expresión inducida de NKX2-5. Esto amplía la forma de actuar del ARN tóxico en DM1 más allá de los defectos de empalme del ARN y podrá dar explicaciones de los efectos patogénicos no representados por los empalmes fallidos de ARN. Además, los resultados de ratones Nkx2-5-haploinsuficientes muestra una clara evidencia genética de como NKX2-5 actúa como un modificador de ARN tóxico en el corazón. Es evidente que la transcripción de NKX2-5 es inducida por la DMPK 3' UTR ARNm. Los elementos transcripcionales que dirigen la expresión de Nkx2-5 tienen tanto áreas potenciadoras y represoras que responden en tiempo y forma específicas de cada tejido a diversos factores, como proteínas Smad, BMP, GATA-4 y tal vez el NKX2-5 mismo. Incluso después de 10 años de extensa investigación, el complicado control transcripcional de Nkx2-5 no se entiende bien. Sin embargo, esto representa ahora un objetivo asequible para comprender las rutas que conectan los ARN tóxicos y sus efectos en cascada

MÉTODOS

Ratones transgénicos. Transgenes y caracterización fenotípica de transgénicos ratones se describen en otros lugares. Se utilizaron dos líneas transgénicas en un fondo genético FvB (5-336 y 5-313) en este estudio. Resultados utilizando ratones 5-336 similares a las de los ratones 5-313. Ambas líneas expresan la GFP-DMPK 3' UTR transgen bajo el control de un promotor humano sensible a la tetraciclina DMPK. Debido a la inherente inestabilidad del transgen, los ratones 5-336 desarrollaron distrofia miotónica sin inducción del transgen que progresó rápidamente con anomalías de la conducción y la muerte por encima de los de inducción de transgen. El 5-313 ratones no son "tan inestables" y son normales antes de la inducción del transgen. Todos los experimentos en este documento han utilizado esta línea, salvo indicación de lo contrario. La expresión del transgen fue inducida con 0,2% (peso / vol) de doxiciclina en agua potable. La generación y caracterización de Nkx2-5LacZ / + ratones se describe en otros artículos.

ECG y EMGs. Protocolos detallados para EMGs se describen en otros artículos. Ratones fueron anestesiados con valium intraperitoneal (5 mg por kg de peso corporal) y ketamina (100-150 mg por kg de peso corporal) y se mantuvieron en la lámpara de calentamiento durante todo el procedimiento. Tres ECG dirigidos se realizaron con un BioAmp / Powerlab de ADInstruments; los datos fueron recogidos en un equipo para posterior análisis. Ratones revivieron en unos 30-40 min, sin complicaciones. Todos los protocolos fueron aprobados por los comités pertinentes de cuidado y uso de los animales

Inmunohistoquímica y tinción b-galactosidasa. La microscopía se realizó con un microscopio invertido con fluorescencia Olympus IX 50, las imágenes fueron capturadas con una cámara CCD y se presentaron con Photoshop 5.5. Los tejidos fueron recolectados en isopentano y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Preparamos secciones de criostato de 6 mm en serie de corazones y se evaluó hasta 20 secciones sagitales a través del septum interventricular y región nodal atrioventricular de cada ratón para asegurar que el sistema de conducción cardíaca se visualiza de manera adecuada. Se muestran las imágenes más representativas. Las secciones de Criostato de los músculos esqueléticos se han preparado de manera similar. Para la cuantificación de NKX2-5

en el corazón, que capturó diez campos visuales del miocardio ventricular por cámara CCD para cada ratón y contó núcleos NKX2-5-positivo. Se analizaron por lo menos seis ratones por cada grupo (no inducidos, inducidos y revertidos). Se realizaron experimentos similares utilizando tejidos cardíacos de heterocigotos Nkx2-5LacZ / + 5-313 con manchas de b-galactosidasa. T-Test homoscedásticos de dos colas fueron utilizados para determinar su significación estadística. Los protocolos para la fijación de tejidos e inmunohistoquímica se describen en otras fuentes. Hemos utilizado anticuerpos específicos para las siguientes proteínas: CX43 (Sigma, C6219, 1:1000), CX40 (Santa Cruz, SC20466, 1:200), NKX2-5 (para los tejidos del ratón: Santa Cruz, SC8697, 1:200; para tejidos humanos: Santa Cruz, SC14033, 1:200) y distrofina (Santa Cruz, SC7461). Secundaria de anticuerpos fueron molecular Sondas (1:400).

Análisis de ARN. El ARN total fue extraído de tejidos recogidos en isopentano y se criogenizaron en nitrógeno líquido. Para el blotting (o inmunotransferencia) de ARN se separaron 5-10 mg del total de ARN en geles 1% glicol y fueron probados con Nkx2-5 o Gapdh utilizando procedimientos estándar. Por RT-PCR, todos los RNAs fueron tratados con ADNasa I (Ambion) y se verificó por PCR para b-actina para asegurar que no estaban contaminadas con ADN antes de su posterior análisis. RT-PCR a tiempo real se realizó utilizando el BioRad iCycler y kits BioRad utilizando el protocolo del fabricante, con detección por tinte SYBRGreen. Secuencias del Primer y las condiciones de la PCR puede consultarse en los Métodos suplementarios on-line. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, y los resultados se normalizaron a los resultados de ratones no inducidos. Por lo menos se analizaron cinco ratones para cada grupo y el ARN objetivo. T-Test homoscedásticos de dos colas fueron utilizados para determinar su significación estadística. Todos los resultados se expresan en relación con los ratones no inducidos 5-313 con valores de p para la comparación (por ejemplo, no inducidos frente inducido o inducido versus revertido). Todos los datos se presentan gráficamente como media \pm s.d.

Proteína blotting. Se utilizaron protocolos normalizados para preparar extractos de proteínas totales de tejidos congelados en buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, de oxicolato sodio 0.5%, 0.1% SDS) e inhibidor de la proteasa (Roche). Se utilizó 50-100 mg de proteína total para detectar NKX2-5 en extractos de músculo y corazón humanos utilizando una dilución 1:500 de anticuerpos a NKX2-5 (anti-NKX2-5) (SC14033). Para los extractos de corazón de ratón, anti-NKX2-5 (Santa Cruz, SC8697 se utilizó en una dilución de 1:500, con blots incubados durante 2 h en PBS con 5% (peso / vol) de leche. Para detectar el NKX2-5 de ratón y CARP, 100 mg de extractos de músculo esquelético fueron incubadas durante la noche a 4 °C en PBS con un 5% de la leche, con una dilución de 1:1000 anti-NKX2-5 monoclonales (Abnova, clon 1E4-G5) o una dilución 1:500 de anti-CARP (de Santa Cruz, SC30181), respectivamente. Para detectar CX43, blots de proteínas de 20 mg de extractos de corazón se incubaron durante 1 h con anti - CX43 (1:8,000 dilución) en PBS con 3% de BSA. Blot de proteínas de 100 mg de extractos de músculo esquelético se incubaron durante 2 h con anti-CX43 (dilución 1:1000) en PBS con 5% de BSA. Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH), detectados con anti-GAPDH (Ambion, 4300), se utilizó como control de carga. Los blots fueron escaneados, y la expresión de la proteína relativa se cuantificó utilizando ImageQuant 5.1.

C2C12 transfecciones. Mioblastos C2C12 se cultivaron en condiciones normales y transfectada con 2 o 4 mg de pcDNA3.1-HisC-Nkx2-5 (la Nkx2-5 ORF) o 4 mg de pcDNA3.1 (Invitrogen) y con 0,2 mg de Pmax-GFP (Amaxa) como monitor de transfección. Las células fueron transfectadas utilizando el kit Nucleofector (Amaxa) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (usando solución V y programa T20). La eficiencia de Transfección fue de más del 80% -90%. Células fueron recolectadas de 24 horas más tarde y su ARN extraído. Los experimentos de Transfección se repitieron al menos tres veces. Nota: La información está disponible en el sitio web de Nature Genetics.