



ALISSON CAMPOS CARDOSO

Regulação do Fator de Transcrição MEF2C pela
Quinase de Adesão Focal:
Implicações na Homeostase dos Cardiomiócitos

*Regulation of Transcription Factor MEF2C
by Focal Adhesion Kinase:
Implications in the Homeostasis of Cardiomyocytes*

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

ALISSON CAMPOS CARDOSO

Regulação do Fator de Transcrição MEF2C
pela Quinase de Adesão Focal:
Implicações na Homeostase dos Cardiomiócitos

Orientador (a) / Supervisor: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

*Regulation of Transcription Factor MEF2C
by Focal Adhesion Kinase:
Implications in the Homeostasis of Cardiomyocytes*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção de título de Doutor em Ciências.

*Doctorate thesis presented to the Medical Pathophysiology
Postgraduation Programm of the Faculty of Medical Sciences of the State
University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Sciences.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDO PELO ALUNO ALISSON CAMPOS
CARDOSO E ORIENTADO PELO PROF. DR. KLEBER
GOMES FRANCHINI.

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C179r **Cardoso, Alisson Campos, 1983-
Regulação do fator de transcrição MEF2C pela
quinase de adesão focal : implicações na homeostase
dos cardiomiócitos / Alisson Campos Cardoso. --
Campinas, SP : [s.n.], 2012.**

**Orientador: Kleber Gomes Franchini.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.**

**1. Desdiferenciação celular. 2. Interação proteína-
proteína. 3. Miócito cardíaco. I. Franchini, Kleber
Gomes, 1961-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.**

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Regulation of transcription factor MEF2C by focal adhesion kinase : implications in the homeostasis of cardiomyocytes.

Palavras-chave em inglês:

Cell dedifferentiation

Protein-protein interaction

Cardiac myocyte

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Kleber Gomes Franchini [Orientador]

Alicia Juliana Kowaltowski

Fabio Trindade Maranhao Costa

Mario Jose Abdalla Saad

José Xavier Neto

Data da defesa: 24-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

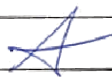
Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Alisson Campos Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Mario Jose Abdalla Saad



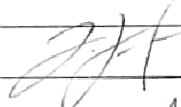
Professor (a) Doutor (a) Fabio Trindade Maranhao Costa



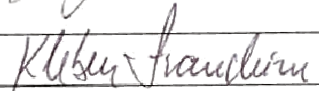
Professor (a) Doutor (a) Alicia Juliana Kowaltowski



Professor (a) Doutor (a) José Xavier Neto



Professor (a) Doutor (a) Kleber Gomes Franchini



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/08/2012

Agradeço:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini, pelas oportunidades e participação ativa e direta no desenvolvimento deste trabalho. Pelo ensinamento científico e por confiar sempre na minha capacidade de desenvolver um projeto sob sua orientação, meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Dr. Fábio Gozzo e a Mariana Fioramonte pelo auxílio nos experimentos de espectrometria de massas.

À Prof.^a Dra. Íris Torriani e ao Dr. Júlio César da Silva pelo auxílio na técnica de SAXs.

Ao Dr. André Ambrósio que tanto me auxiliou na purificação e estabilidade das proteínas recombinantes.

Ao Dr. Paulo Sérgio Oliveira e ao Rodrigo Vargas pela dinâmica molecular

Ao Dr. Márcio Bajgelman e a Anna Carolina Carvalho pelas produções lentivirais

À Dra. Ana Carolina Figueira pelo auxílio nos experimentos de anisotropia de fluorescência

Aos amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular, do Laboratório Nacional de Biociências e de vários outros laboratórios em que realizei meu trabalho pelas inúmeras contribuições na realização deste estudo.

Ao Silvio Consonni pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão, não medindo esforços para a obtenção das imagens, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

Especialmente a minha esposa Ana Helena Macedo Pereira, pelo apoio incondicional sempre. Você sem dúvida foi a pessoa mais importante no desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus pais (Wilmar e Marileide) e aos meus irmãos (Adriano e Alessandro) pela educação, pelo amor, por compreender que a distância de casa é necessária para o meu crescimento profissional.

Ao meu padrinho e toda família Valentino: Edson, Dilma, Guilherme, Caio e Henrique, sou imensamente grato por todo carinho e acolhimento dado a mim.

Aos meus tios (Wanderley e Graça) e ao meu primo César Augusto, por me apoiarem e valorizarem tanto minha carreira.

Aos membros da banca examinadora: Dra. Alicia Juliana Kowaltowski; Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa; Dr. José Xavier Neto; Dr. Mário José Abdalla Saad.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) e ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

À Unicamp

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

À FAPESP, pela concessão da bolsa.

*“Eu não procuro saber as respostas,
procuro compreender as perguntas.”*

Confúcio

Durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal, os miócitos cardíacos perdem a capacidade de proliferação, sendo o crescimento adicional do coração decorrente de hipertrofia e não hiperplasia dos miócitos cardíacos. No entanto, em situações de estresse os miócitos cardíacos diferenciados podem apresentar desdiferenciação e reestabelecimento do ciclo celular. Os mecanismos envolvidos nesse fenômeno são ainda pouco compreendidos. No presente estudo, demonstramos que a ativação do fator de transcrição MEF2C (*Myocyte Enhancer Factor 2-C*) tem papel crítico no processo de desdiferenciação de miócitos cardíacos. Essa conclusão foi obtida por meio de experimentos de ganho de função pela superexpressão de MEF2C em miócitos ventriculares de ratos neonatos em cultura (MVRNs). Demonstramos que a superexpressão de MEF2C em MVRNs induziu a desdiferenciação e a ativação de mecanismos envolvidos na progressão do ciclo celular. Esses resultados foram obtidos por meio de experimentos de microarranjo de DNA, PCR em tempo real, *western blotting* e análise do fenótipo celular por microscopias de luz, confocal e eletrônica de transmissão. Esses fenômenos foram atenuados pela superexpressão da quinase de adesão focal (FAK), uma proteína que reconhecidamente exerce efeitos pró-hipertróficos em miócitos cardíacos adultos. Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a interação direta entre o fator de transcrição MEF2C e a FAK. Estudos com base em ensaios de reação cruzada associada à espectrometria de massas, dinâmica molecular, espalhamento de raios-X a baixos ângulos e mutação sítio dirigida, demonstraram que as hélices 1 e 4 do domínio FAT da FAK interagem diretamente com o domínio de ligação ao DNA do dímero de MEF2C. Estudos de afinidade e de gel *shift* demonstraram que a porção FAT da FAK desloca a interação MEF2C/DNA *in vitro*. Ensaios de gene repórter demonstraram que a FAK, mediada pela região C-terminal, diminui a atividade transcricional de MEF2C em células C2C12. O conjunto de dados demonstra que a ativação do fator de transcrição MEF2C em MVRNs induz a desdiferenciação e ativação de mecanismos de progressão do ciclo celular e que a FAK impede esses efeitos através da interação inibitória no domínio de ligação de MEF2C ao DNA.

Palavras chave: Desdiferenciação Celular; Interação Proteína-Proteína; Miócito Cardíaco.

During the first days of postnatal development, cardiac myocytes lose their ability to proliferate, and the further growth of the heart is due to hypertrophy and not hyperplasia of cardiac myocytes. However, in response to stress, cardiac myocytes may have dedifferentiation and re-establishment of the cell cycle. The mechanisms involved in this phenomenon are still poorly understood. In the present study, we demonstrated that activation of the transcription factor MEF2C (myocyte enhancer factor 2-C) plays a critical role in the process of dedifferentiation of cardiac myocytes. This conclusion was obtained by gain-of-function experiments through overexpressing MEF2C in neonatal rat ventricular myocytes in culture (NRVMs). We also showed that overexpression of MEF2C in NRVMs induced the dedifferentiation and activation of mechanisms involved on cell cycle progression. These results were obtained by DNA microarray experiments, real time PCR, western blotting and cell phenotype analysis by light microscopy, confocal and electronic transmission. These effects were attenuated by overexpression of focal adhesion kinase (FAK) protein known to exert pro-hypertrophic effects on adult cardiac myocytes. In vivo and in vitro experiments demonstrated the direct interaction between the transcription factor MEF2C and FAK. A model based on crosslinking technology coupled with mass spectrometry, small angle X-ray scattering and the site directed mutation analyses indicated that alpha-helices 1 and 4 of FAK FAT domain interacts directly with the DNA binding domain of MEF2C dimer. Affinity studies and gel shift assay demonstrated that the FAK FAT domain displaces the MEF2C/DNA interaction in vitro. Reporter gene assays demonstrated that FAK, mediated by the C-terminal region, decreases the transcriptional activity of MEF2C in C2C12 cells. The data set shows that the activation of the transcription factor MEF2C in MVRNs induces dedifferentiation and activation of cell cycle progression and that FAK prevents these effects by inhibitory interaction with DNA binding domain of MEF2C.

Keywords: Cell Dedifferentiation; Protein-protein interaction; Cardiac Myocyte

	<i>Pág.</i>
1 – Introdução.....	01
1.1 Biologia do Miócito Cardíaco: Aspéctos Fisiológicos e Patológicos....	03
1.2 Fatores de Transcrição MEF2.....	12
1.2.1 Considerações Gerais.....	12
1.2.2 Regulação da Atividade de MEF2.....	15
1.2.3 Efeitos da Ativação de MEF2 no Coração.....	18
1.3 Quinase de Adesão Focal (FAK).....	22
1.3.1 Estrutura.....	22
1.3.2 Mecanismos de Ativação da FAK.....	27
1.3.3 Controle da Atividade da FAK.....	28
1.3.4 Efeitos da Ativação da FAK no Coração	29
1.3.5 Distribuição Subcelular da FAK.....	32
2 – Objetivo.....	35
3 – Material e Métodos.....	39
3.1 Material.....	41
3.2 Cultura de Células.....	43
3.3 Extrato Protéico de Células.....	44
3.4 Western Blotting.....	45
3.5 Transfecção de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura.	46

3.6 Cultura de células – C2C12	47
3.7 Transfecção das células C2C12	48
3.8 Microscopia Confocal	49
3.9 Proteínas recombinantes.....	50
3.10 Ensaio de precipitação (<i>Pulldown assay</i>)	60
3.11. Reação de ligação cruzada acoplado à espectrometria de massas (CXMS).....	61
3.12. Análise por espectrometria de massas	64
3.13 Anisotropia de Fluorescência	66
3.14 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	69
3.15 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)	70
3.16 Modelagem <i>ab initio</i> e de corpo-rígido a partir dos dados de SAXS.	71
3.17 Mutagênese Sítio-Dirigida	72
3.18 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e estudos de desenovelamento.....	74
3.19 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou gel shift).....	75
3.19.1 Marcação da sonda de DNA.....	75

3.19.2 Reação de ligação e eletroforese do complexo DNA/Proteína	76
3.20 Ensaio com gene repórter.	76
3.21 PCR em tempo real para detecção quantitativa de mRNAs.....	78
3.22 Microscopia eletrônica de transmissão.....	79
3.23 Partículas Adenovirais e Lentivirais.....	81
3.24 Dinâmica Molecular.....	82
3.25 Microarranjo de DNA.....	83
3.26 Análise Estatística.....	84
4 – Resultados.....	85
4.1 Natureza da interação entre o fator de transcrição MEF2C e a quinase de adesão focal FAK	87
4.1.1 Ensaio de reação cruzada (CXMS).....	91
4.1.2 Espalhamento de raio X a baixo ângulo.....	99
4.1.3 Mutações sítio dirigidas.....	105
4.2. Influência da interação entre FAT e MEF2 na capacidade de MEF2 ligar-se ao DNA.	114
4.3. Influência da interação entre FAT e MEF2 na capacidade de MEF2 ativar a transcrição em cultura de células C2C12.	118
4.4. Avaliação da expressão de MEF2C por PCR em tempo real e WB em cultura de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C.....	122
4.5. Análise por microarranjo de DNA da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos.	124

4.6. Validação de genes diferencialmente expressos a partir dos resultados de microarranjo de DNA.	131
4.7. Avaliação do fenótipo de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C por meio de microscopia de luz, confocal e eletrônica de transmissão	134
4.7.1 Microscopia de Luz (H&E).....	134
4.7.2 Microscopia Confocal.....	136
4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	137
4.8. Avaliação da interação MEF2C/FAK na expressão proteica de genes diferencialmente expressos nos ensaios de microarranjo de DNA e no fenótipo de miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C.....	139
4.8.1 Expressão Protéica.....	139
4.8.2 Microscopia eletrônica de transmissão.....	143
5 – Discussão.....	145
5.1 Caracterização da interação MEF2C/FAK	147
5.2 Avaliação gênica e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos	155
5.3 Efeitos da interação entre MEF2C e FAK na homeostase de miócitos cardíacos.....	161
6 – Conclusão.....	167
7 – Referência Bibliográfica.....	173
8 – Apêndice I.....	199
9 – Apêndice II.....	203

1- INTRODUÇÃO

1.1. Biologia do Miócito Cardíaco: Aspectos fisiológicos e patológicos

Durante as fases iniciais do desenvolvimento do coração em mamíferos, os miócitos cardíacos crescem tanto por hiperplasia (aumento no número de células) quanto por hipertrofia (aumento no tamanho da célula), resultando em um aumento global na massa do coração (CLAYCOMB, 1992). No entanto, nos primeiros dias após o nascimento, os miócitos cardíacos reduzem drasticamente sua capacidade proliferativa. A diminuição da capacidade proliferativa dos miócitos cardíacos de ratos ocorre entre o terceiro e quarto dia pós-natal, cessando completamente por volta do 17º dia (LI et al., 1996). Todo aumento subsequente no tamanho do coração ocorre, portanto, por hipertrofia (CLAYCOMB, 1992). A incapacidade dos miócitos cardíacos adultos de proliferarem é atribuída a um bloqueio dos mecanismos que controlam o ciclo celular. Sendo assim, a maioria dos miócitos adultos encontra-se nas fases G_0 ou G_1 do ciclo celular, o que é consistente com a diferenciação terminal destas células (CAPASSO et al., 1992).

A quiescência do ciclo celular é determinada por uma diminuição coordenada de reguladores positivos do ciclo celular, como Ciclina A, Ciclina E, quinases dependentes de ciclina (Cdk1 e Cdk2) e por um aumento de inibidores do ciclo celular, como inibidores de quinases dependentes de ciclina p21 e p27 e da proteína do Retinoblastoma (Rb) (WALSH et al., 1997).

Estudos que avaliaram a proliferação em miócitos cardíacos de rato em desenvolvimento determinaram que a síntese de DNA ocorre em duas fases distintas (SOONPAA et al., 1996). A primeira fase ocorre durante a vida intrauterina com 12 dias de vida, na qual observam-se cariocinese e citocinese, resultando no aumento no número dos miócitos cardíacos. A segunda fase ocorre no início do período neonatal, atingindo o pico nos dias 4-6 pós-natal. Nesta fase, ocorre cariocinese, mas não citocinese, o que resulta em binucleação dos miócitos ventriculares. Em roedores, até a terceira semana pós-parto, por volta de 85-90% dos miócitos cardíacos são binucleados, já em seres humanos esse valor varia de 25- 57% (CLUBB e BISHOP, 1984; SCHMID et al., 1985; SOONPAA et al., 1996). O significado fisiológico de células binucleadas não é claro. Supõe-se que seja uma resposta adaptativa, que confere aos miócitos cardíacos a capacidade de aumentar a transcrição gênica e a síntese de proteínas.

Estudos em humanos demonstraram que o aumento na síntese de DNA em miócitos cardíacos pós-natal não está relacionado à divisão e proliferação celular. Foi relatado que aproximadamente 93% dos miócitos cardíacos que apresentam aumento na síntese de DNA não apresentam citocinese. A síntese de DNA nessas células pode levar meramente à binucleação (divisão nuclear sem citocinese) ou à poliploidia (maior ou igual a 4N) (Figura 01) (STEINHAUSER e LEE, 2011).

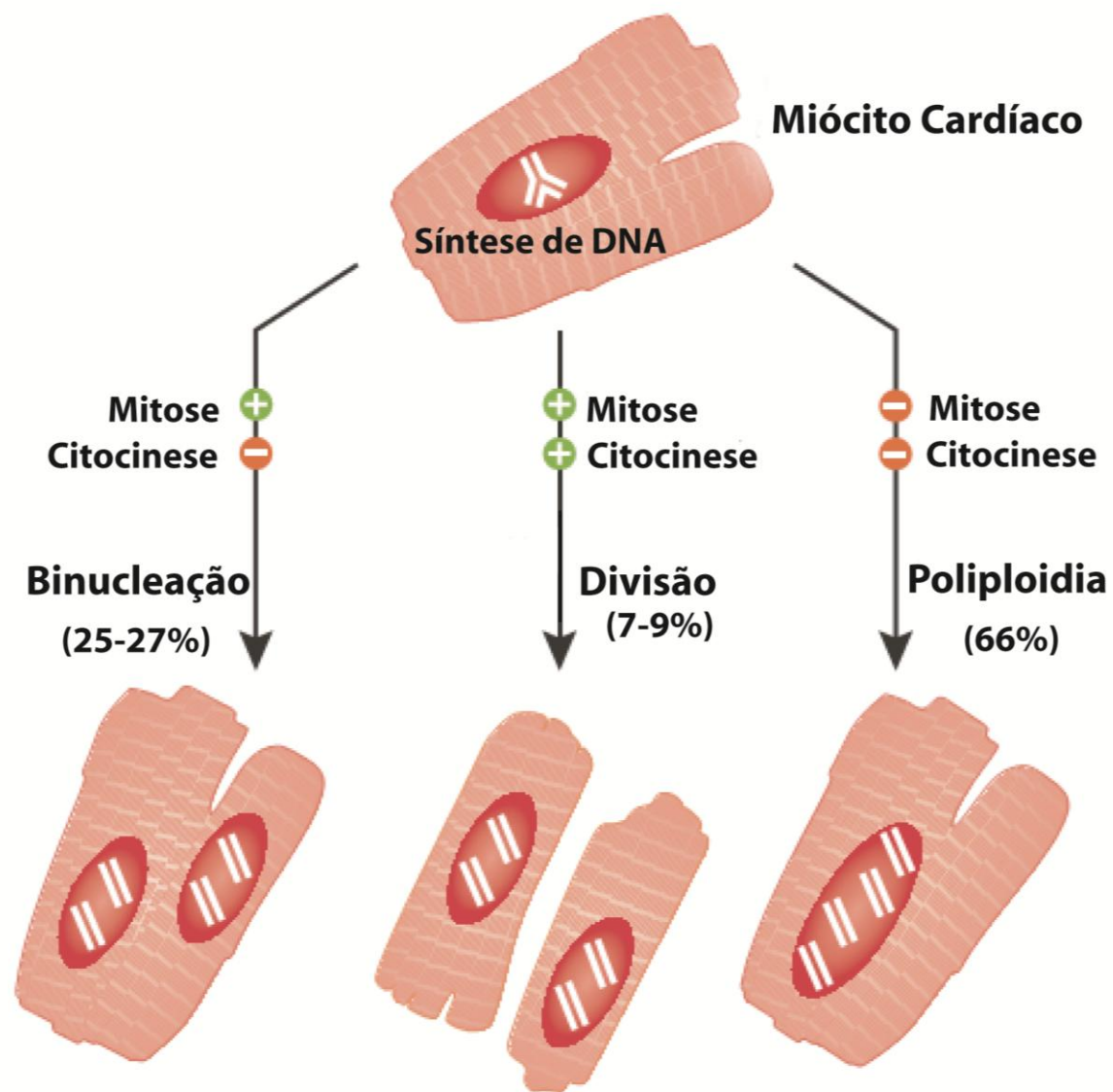


Figura 01 – Representação de miócitos cardíacos adultos, demonstrando que o aumento na síntese de DNA no miócito maduro, em humanos, leva a poliploidia na maioria dos casos, seguido por binucleação e em menor número ocorre a divisão celular (modificado de STEINHAUSER e LEE, 2011).

Estudos de proliferação celular, utilizando bromodeoxiuridina (BrdU) e incorporação de timidina tritiada indicaram que o número de miócitos cardíacos que entram no ciclo celular é muito baixo, sendo que apenas 0,005% dos miócitos cardíacos ventriculares mostram evidência de síntese de DNA em corações de ratos adultos intactos (RUMYANTSEV e BORISOV, 1987; SOONPAA e FIELD, 1998). Embora não seja observado um aumento na síntese de DNA no coração de ratos infartados (0,004%) (PASUMARTHI et al., 2005), um índice mitótico de 0,015-0,08% tem sido relatado em miocárdio humano após infarto do miocárdio (KAJSTURA et al., 1998; BELTRAMI et al., 2001). Assim, a capacidade proliferativa intrínseca de miócitos cardíacos adultos é bastante baixa.

Em humanos, foram realizados estudos utilizando medições de incorporação de Carbono 14 no DNA genômico, para avaliar a idade dos miócitos cardíacos. Foi observado que miócitos cardíacos adultos possuem a capacidade de se renovarem, porém com uma diminuição gradual durante a vida, variando de 1% ao ano até os 20 anos de idade a 0,3% ao ano por volta dos 75 anos. Esse estudo concluiu que menos de 50% dos miócitos são renovados durante toda a vida de um indivíduo sadio (BERGMANN et al., 2009).

Assim, após uma lesão grave, tal como ocorre durante o infarto do miocárdio, o miócito maduro é incapaz de gerar miócitos novos em uma taxa de proliferação suficiente para substituir o tecido lesionado. Portanto, o dano miocárdico ocorre devido à perda dos miócitos cardíacos e ao acúmulo de fibrose, o que contribui para a perda da função contrátil do coração (BUJA e VELA, 2008).

Quando o coração de adultos é submetido a estímulos diversos, como: eventos isquêmicos, sobrecargas de pressão ou de volume, fatores de crescimento ou por estimulação com angiotensina II ou agonistas α -adrenérgicos, ocorrem alterações nas células cardíacas culminando em um remodelamento global do coração. Particularmente, o miócito cardíaco responde a esses estímulos de 3 maneiras distintas: 1) Hipertrofia; 2) Morte celular e 3) Renovação (hiperplasia) em menor grau (Figura 02) (BUJA e VELA, 2008).

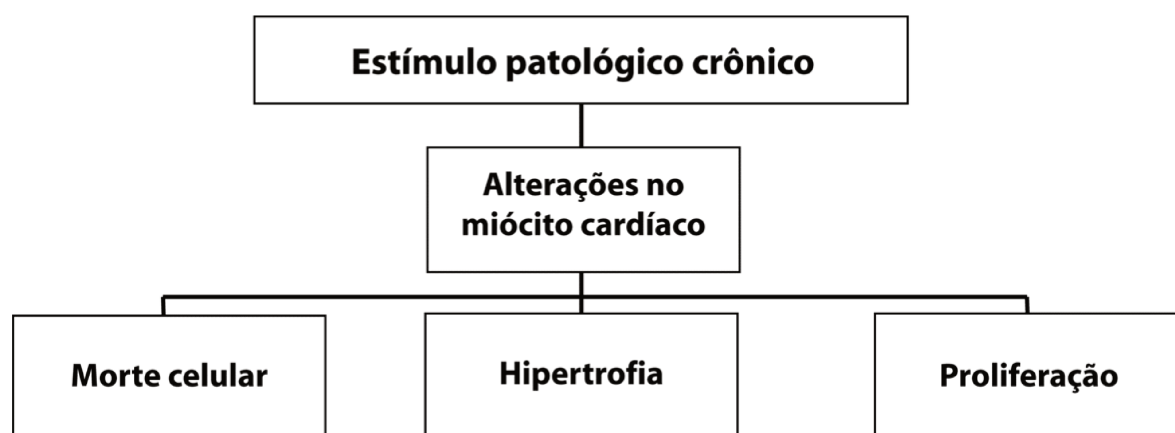


Figura 02 – Vias envolvidas na resposta adaptativa do miócito cardíaco decorrente de estímulos patológicos crônicos (BUJA e VELA, 2008- Modificado).

Um dos principais processos adaptativos que ocorrem no remodelamento cardíaco é a hipertrofia do miócito. O estresse hemodinâmico é detectado pelo miócito, via deformação da membrana e alteração do citoesqueleto culminando na ativação de diversas vias, tais como: modificação de canais iônicos sensíveis ao estiramento; ativação de proteínas sinalizadoras, como integrinas e enzimas

tirosino quinases e a produção e/ou secreção de fatores de crescimento (SADOSHIMA e IZUMO, 1997). Essas alterações ativam diversas vias de sinalização intracelular que culminam no núcleo, onde ocorre modificação da expressão gênica levando a alterações no fenótipo do miócito. O miócito hipertrófico apresenta-se com seu tamanho aumentado, devido a um aumento das unidades contráteis (sarcômeros), dispostos em paralelo (hipertrofia concêntrica) ou em série (hipertrofia excêntrica) (SADOSHIMA e IZUMO, 1997).

Em relação aos processos de morte e divisão dos miócitos cardíacos no processo de remodelamento, estudos demonstram que fisiologicamente a renovação do miócito cardíaco ocorre em uma taxa de aproximadamente 0,3% a 1% ao ano (BERGMANN et al., 2009). Essa taxa de renovação, apesar de aumentar bastante, em torno de 20 a 30 vezes após situações de injúria, ainda é inferior a taxa de morte dessas células que gira em torno de 25-30% ao ano no coração insuficiente, o que contribui para a deterioração estrutural e funcional do coração (BELTRAMI et al., 2001; BUJA e VELA, 2008).

Uma possível abordagem para promover a regeneração do músculo cardíaco após um infarto implica na indução da proliferação de miócitos cardíacos no miocárdio remanescente. O aumento no número de miócitos cardíacos pode ser estimulado por três maneiras distintas: 1) Diferenciação de células tronco cardíacas ou circulantes em miócitos cardíacos; 2) Estimulação da proliferação do miócito cardíaco, por meio de ativadores e bloqueio de inibidores do ciclo celular. Nesse caso, ocorre a desdiferenciação do miócito e posterior reativação do ciclo

celular; 3) Transdiferenciação de fibroblastos em miócitos cardíacos funcionais; (MERCOLA et al., 2011).

Na última década, houve um enorme progresso na definição dos fatores de transcrição e sinais envolvidos na diferenciação de células tronco em miócitos cardíacos. Vários grupos têm gerado com êxito preparações derivadas de células tronco, com mais de 50% de miócitos cardíacos funcionais (LAFLAMME et al., 2007; YANG et al., 2008). Os desafios técnicos inerentes ocorrem na injeção do número suficiente de miócitos cardíacos diferenciados e em assegurar a sobrevivência e integração correta no organismo (LAFLAMME e MURRY, 2011). Estudos com injeção de células tronco embrionárias, em animais submetidos à isquemia coronariana, para reparar o tecido lesionado foram realizados, porém os resultados são ainda controversos e ineficientes (LAFLAMME e MURRY, 2005; VAN LAAKE et al., 2008).

Em relação a estimulação da proliferação do miócito cardíaco, foi demonstrado em animais transgênicos, utilizando promotor α -MHC (cadeia pesada de miosina), que superexpressam mutantes das proteínas p53 e p193 (uma ubiquitina ligase E3, também conhecida como Cul7) resultou em uma indução do ciclo celular de miócitos cardíacos na área remota, 4 semanas após a oclusão permanente da artéria coronária. Uma concomitante redução no crescimento hipertrófico do miócito cardíaco também foi observado neste modelo, sugerindo que a ativação do ciclo celular interfere parcialmente no remodelamento ventricular que ocorre após o infarto (NAKAJIMA et al., 2004).

Nesse mesmo contexto, em outro estudo, no coração adulto de animais transgênicos para Ciclina D2, utilizando promotor α -MHC, foi observado um aumento na proliferação de miócitos cardíacos, sendo esse aumento ainda mais evidente no coração após infarto do miocárdio. A proliferação desses miócitos cardíacos adultos resultou em um aumento significativo no número de miócitos cardíacos e uma regressão concomitante do tamanho do infarto (PASUMARTHI et al., 2005). Coletivamente, estes dados sugerem que a modulação da atividade do ciclo celular de miócitos cardíacos pode ser explorada para promover o crescimento regenerativo em corações infartados.

Considerando que os fibroblastos cardíacos constituem a maioria das células do coração (60-70%) representam, portanto, uma fonte celular em potencial para a restauração da função cardíaca após lesão miocárdica. Os fibroblastos podem ser reprogramados em células tronco pluripotentes, células musculares e neurônios por combinação de expressão de fatores de transcrição (TAPSCOTT et al., 1988; WANG et al., 2003; TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; YU et al., 2007; VIERBUCHEN et al., 2010; CAIAZZO et al., 2011). Estudos recentes (SONG et al., 2012) demonstraram que quatro fatores de transcrição, GATA4 e Hand2 e MEF2C e Tbx5, podem cooperativamente reprogramar, tanto *in vitro* como *in vivo*, fibroblastos de ratos adultos em uma célula similar ao miócito cardíaco, inclusive com função contrátil ativa. A superexpressão desses 4 fatores de transcrição em não-miócitos no coração de ratos, levou a uma melhora da função cardíaca e redução do remodelamento ventricular adverso após o infarto do miocárdio. De

acordo com o estudo, os resultados sugerem uma estratégia para reparação cardíaca através da reprogramação de fibroblastos residentes no coração com fatores de transcrição cardíacos.

O desenvolvimento do coração é regido por diversos fatores de transcrição evolutivamente conservados, dentre eles destacam-se os fatores GATA, MEF2, NK2, Tbx e Hand que controlam o destino das células cardíacas, a expressão dos genes que codificam proteínas contráteis e a morfogênese das estruturas cardíacas (OLSON, 2006). Associados a estes, dezenas de outros fatores de transcrição contribuem para cardiogênese e em muitos casos, servindo como fatores acessórios para estes reguladores. Dentre os fatores de transcrição envolvidos na cardiogênese, nosso grupo tem dedicado esforços para compreender qual o papel do fator de transcrição MEF2 na homeostase do miócito cardíaco.

1.2 Fatores de Transcrição MEF2

1.2.1 Considerações Gerais

Os fatores MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) pertencem à família MADS Box (MCM1-Agamous-Deficiens-Serum response factor) e foram descritos pela primeira vez como fatores de transcrição que se ligam a sequências de DNA ricas em A/T nos promotores de vários genes músculo-específicos. Existem 4 genes da família MEF2 que foram identificados em vertebrados: *mef2a*, *b*, *c* e *d* que são expressos de forma distinta, mas em padrões de sobreposição durante a embriogênese e nos tecidos adultos.

A família de fatores de transcrição MEF2 possui domínios de ligação ao DNA quase idênticos na extremidade N-terminal com alta homologia no domínio MADS Box (aminoácidos 1-57). Este domínio é responsável pela ligação ao DNA e dimerização das proteínas, permitindo que os fatores MEF2 se liguem como homo ou heterodímeros a um elemento *cis* com a sequência de DNA (C/T)TA(A/T)₄TA(G/A). Um domínio adjacente ao MADS Box chamado domínio MEF2 (aminoácidos 58-86) que é característico da família, influencia a afinidade de ligação ao DNA, dimerização e interação com co-fatores (BLACK e OLSON, 1998).

Já a região C-terminal da família MEF2 é composta pelo domínio de transativação. Nessa região também ocorrem processos de *splicing* alternativo, sendo que certos exons estão presentes em todos os tipos celulares, enquanto outros são limitados a tipos celulares específicos (BLACK e OLSON, 1998).

Os fatores MEF2 desempenham um papel central na ativação dos programas gênicos que controlam diferenciação, proliferação, morfogênese, sobrevivência e apoptose em diversos tipos celulares (linfócitos, neurônios, condrócitos, endoteliais e musculares cardíaca, esquelética e lisa) (POTTHOFF e OLSON, 2007).

Como exemplo, MEF2 está relacionado a seleção e diferenciação de timócitos por desencadear a apoptose (pró-apoptótico) nas células que não sofreram desenvolvimento e maturação correta para se tornarem linfócito T. A ativação da apoptose nessas células é dependente da regulação do promotor do gene Nur77 por MEF2 (KASLER and VERDIN, 2007). Já em neurônios a atividade de MEF2 está relacionada com a sobrevivência celular (anti-apoptótico), cuja diminuição da atividade de MEF2 ou a superexpressão de um dominante negativo induz apoptose (MAO et al., 1999).

No músculo esquelético de vertebrados a diferenciação é regulada por interações cooperativas de fatores de transcrição miogênicos com MEF2 e por vias de sinalização que regulam a atividade MEF2. Isso porque fatores MEF2 por si só não possuem atividade miogênica, mas em combinação com fatores de

transcrição bHLH (*basic helix-loop-helix*), direciona e potencializa o programa de diferenciação miogênica (MOLKENTIN et al, 1995; WANG et al, 2001). Esses dados demonstram que MEF2 não é suficiente, mas necessário para induzir a diferenciação de miócitos esqueléticos. Além disso, foi sugerido que, enquanto MEF2A está envolvido na indução de diferenciação muscular, MEF2C está envolvido na manutenção do estado diferenciado (BREITBART et al., 1993).

No miócito cardíaco, MEF2 regula a expressão de diversas proteínas estruturais e contráteis. Durante o período embrionário (7º dia), a repressão da atividade de MEF2C impede a diferenciação de cardiomioblastos em cardiomiócitos, como também diminui a expressão dos fatores de transcrição GATA4 e Nkx2.5 (KARAMBOULAS et al., 2006). Esse estudo confirma o papel de MEF2 como um regulador de outros fatores de transcrição necessários para a diferenciação de miócitos cardíacos.

1.2.2 Regulação da atividade de MEF2

A regulação dos fatores de transcrição MEF2 se faz por modificação da afinidade de ligação a sua sequência específica no DNA, pelo controle de sua localização nuclear e pela modulação de sua capacidade de estimular a transcrição gênica (BLACK e OLSON, 1998).

Dentre os mecanismos específicos de regulação, podemos citar: a interação com as Deacetilases de Histona Classe II (HDAC-II), a desfosforilação mediada por calcineurina, a fosforilação por quinases em resíduos de treonina e serina e a acetilação em resíduos de lisina pelo co-ativador p300 (KATO et al., 1997; ZHAO et al., 1999; MCKINSEY et al., 2001; WU et al., 2001; BACKS e OLSON, 2006)

As HDACs reprimem a atividade de MEF2 ao deacetilar a porção N-terminal das histonas, o que resulta em condensação da cromatina (LU et al., 2000). Este mecanismo inibe a atividade de transcrição de MEF2, porém sem afetar a afinidade de MEF2 pelo DNA. Neste contexto, a Calmodulina Quinase (CaMK) estimula a atividade de transcrição de MEF2 principalmente por liberá-lo dos efeitos inibitórios das HDACs, através da fosforilação de dois resíduos de serina na região N-terminal das HDACs (MCKINSEY et al., 2001; BACKS e OLSON, 2006).

As principais proteínas quinases envolvidas na ativação direta de MEF2 são pertencentes à família de proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK -

mitogen-activated protein kinase). A ativação de MEF2 pelas MAPK p38 e ERK5 ocorre pela fosforilação em resíduos de serina e treonina no domínio de transativação de MEF2, levando a um aumento na atividade transcricional desse fator de transcrição (KATO et al., 1997; ZHAO et al., 1999). Já a ativação de MEF2 por calcineurina ocorre pela defosforilação de alguns resíduos de serina que potencializam a atividade transcricional de MEF2 sem alterar a afinidade desse ao DNA (WU et al., 2001).

Outro nível de regulação da atividade de MEF2 se dá através da acetilação de resíduos de lisina (K116, K119, K234, K239, K252 e K264) no domínio de transativação de MEF2 pelo o co-ativador transcricional p300 (MA et al., 2005; HE et al., 2011). Mutações em lisinas que foram demonstradas serem acetiladas por p300 no domínio de transativação de MEF2C, afetam a afinidade de ligação do MEF2 ao DNA e sua atividade transcricional. Em células C2C12, MEF2 é preferencialmente acetilado em miócitos em diferenciação, mas não em mioblastos indiferenciados. Quando introduzido em mioblastos C2C12, o MEF2C não acetilado (carregando mutações em lisinas) inibe a diferenciação miogênica. Assim, além da fosforilação, a atividade transcricional de MEF2 também é criticamente regulada por acetilação durante a miogênese (MA et al., 2005).

Por fim, foi demonstrada uma associação entre MEF2 e o repressor transcricional Cabin-1 que é responsável por interagir diretamente com o domínio MEF2 e recrutar Histonas Deacetilases para a região, levando ao silenciamento gênico (HAN et al., 2003). A Figura 03 demonstra a estrutura cristalográfica da

proteína MEF2B (resíduos 2-93 em verde) ligando-se de forma dimérica com sua sequência consenso de DNA (laranja) e em vermelho o peptídeo da proteína inibitória Cabin 1, que interage no domínio MEF2 (resíduos 60 a 76). Essa região do MEF2 que interage com o repressor Cabin-1 compreende a mesma região de interação do repressor HDAC e do co-ativador p300 (HE et al., 2011). Dessa forma, a interação com Cabin 1 e HDACs inibem o recrutamento de co-reguladores (p300) pelos fatores de transcrição MEF2 porém sem afetar a afinidade a ligação com DNA.

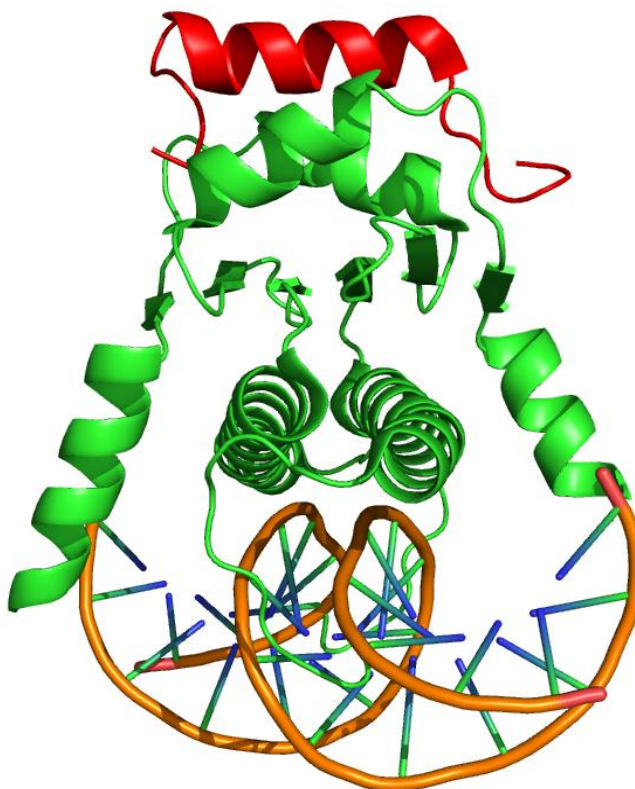


Figura 03 – Representação na forma de *cartoon* da estrutura cristalográfica de MEF2B (verde) ligado ao DNA (laranja) e ao repressor transcricional Cabin-1 (vermelho). (código PDB: 1N6J).

1.2.3 Efeitos da Atividade de MEF2 no Coração

No coração, diversos trabalhos demonstram que os fatores de transcrição MEF2 participam de forma crítica nas fases iniciais do desenvolvimento cardíaco, principalmente relacionado à diferenciação de cardiomioblastos em cardiomiócitos.

Estudos demonstraram que a deleção de MEF2C em camundongos foi acompanhada pela diminuição da expressão de genes estruturais cardíacos e mortalidade embrionária (9,5° dia) devido à parada do desenvolvimento do tubo cardíaco e não formação do ventrículo direito, sugerindo que MEF2C tem um papel crítico no desenvolvimento cardíaco (LIN et al., 1997). Camundongos que expressam um dominante negativo de MEF2C no coração também morreram durante o desenvolvimento pós-natal, sendo encontrado hipodesenvolvimento cardíaco (KOŁODZIEJCZYK et al., 1999). Camundongos com deleção de MEF2A morrem subitamente durante o período perinatal com dilatação do ventrículo direito, desorganização miofibrilar e anormalidades na estrutura e função de mitocôndrias (NAYA et al., 2002).

Apesar da ampla constatação da importância dos fatores de transcrição MEF2 nas fases iniciais do desenvolvimento cardíaco, pouco se sabe sobre a função desses fatores no miócito cardíaco no período pós-natal ou no miócito adulto.

Algumas evidências dão suporte à participação dos fatores da família MEF2 na regulação da expressão gênica do miocárdio em resposta a estímulos hipertróficos. Foi demonstrado que a atividade de ligação do MEF2 ao DNA aumenta cerca de 2 a 3 vezes tanto em resposta a sobrecarga de pressão como em resposta a sobrecarga de volume (MOLKENTIN e MARKHAM, 1993; NADRUZ et al., 2003).

Além disso, estudos demonstram que a regulação da expressão de genes do programa hipertrófico por estímulos mecânicos é dependente de MEF2. Como por exemplo, na regulação de genes que codificam proteínas de resposta imediata (por exemplo, cJUN), proteínas sarcoméricas, proteínas mitocondriais codificadas pelo genoma nuclear e proteínas relacionadas ao transporte celular de glicose (NADRUZ et al., 2003; NADRUZ et al., 2004; NADRUZ et al., 2005).

Estudos de nosso laboratório utilizando a técnica de silenciamento gênico com o uso de siRNA para MEF2C em camundongos demonstraram uma diminuição da resposta hipertrófica do coração à sobrecarga pressórica (PEREIRA et al., 2009).

Por outro lado, estudos demonstraram que a superexpressão de MEF2A e MEF2C está associada ao aparecimento espontâneo de cardiomiopatia dilatada em camundongos. Nesse modelo, a sobrecarga de pressão induzida pela coarctação da aorta não foi acompanhada por hipertrofia cardíaca compensatória. Ao contrário, esses animais apresentaram efeitos ainda mais deletérios na

estrutura e função do coração, com uma exagerada dilatação cardíaca, em resposta a sobrecarga mecânica. A superexpressão de MEF2A e MEF2C em cultura de miócitos cardíacos induziu desorganização sarcomérica, com alterações morfológicas das células, sem evidências de hipertrofia (Xu et al., 2006).

Ainda nesse contexto, outros estudos evidenciam que MEF2 não é necessário para a resposta hipertrófica do coração frente a estímulos mecânicos. El Azzouzi e colaboradores (2010) demonstraram que a inibição da atividade dos fatores MEF2, com utilização de dominante negativo, não impede o desenvolvimento da hipertrofia e insuficiência cardíaca durante a sobrecarga de pressão em ratos. Além disso, esses animais apresentaram uma disfunção cardíaca exagerada em resposta a sobrecarga pressórica crônica. Os animais com diminuição da atividade de MEF2 e submetidos a sobrecarga de pressão, apresentaram defeitos mitocondriais, diminuição significativa de NADH desidrogenase 6, produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e aumento de morte celular por apoptose (El Azzouzi et al., 2010). Esses dados sugerem que a atividade transcricional de MEF2 no coração é importante para a adaptação mitocondrial em resposta a sobrecarga de pressão, uma vez que a progressão para a insuficiência cardíaca está associada com uma diminuição na atividade das vias respiratórias mitocondriais que levam a uma capacidade diminuída na produção de ATP (INGWALL e WEISS, 2004).

Portanto, a avaliação desses animais, não permite a obtenção de dados conclusivos sobre a função dos fatores MEF2 em miócitos cardíacos no período

pós-natal, na homeostase e no remodelamento cardíaco em resposta a estímulos mecânicos.

Estudos de nosso laboratório dedicados ao entendimento dos mecanismos envolvidos na transdução de sinais mecânicos extracelulares em sinais bioquímicos intracelulares demonstraram que em resposta a sobrecarga de pressão por 60 minutos, ocorre um aumento na associação entre o fator de transcrição MEF2C com uma proteína quinase responsiva ao estímulo mecânico FAK (Quinase de Adesão Focal) (CARDOSO, 2008).

1.3. Quinase de Adesão Focal (FAK)

1.3.1 Estrutura

A FAK é uma tirosina quinase de aproximadamente 1053 aminoácidos, com um peso molecular aproximado de 125kDa. Possui 3 domínios em sua estrutura: o domínio FERM (band **F**our.1–**E**zrin–**R**adixin–**M**oesin), o domínio quinase e o domínio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) (Figura 04).

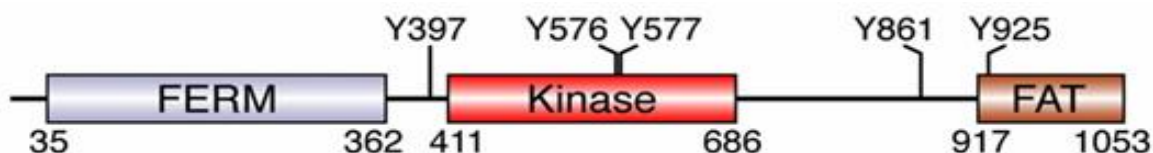


Figura 04 – Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, KINASE e FAT). Acima representado os resíduos de tirosina que são fosforilados durante a sua ativação. (LIETHA et al., 2007).

O domínio FERM, localizado na região N-terminal, é responsável pela interação com a extremidade citoplasmática da subunidade beta da integrina (SCHALLER et al., 1995), e regula a atividade de quinase da FAK através de um mecanismo inibitório intramolecular (COOPER et al., 2003; LIETHA et al., 2007). O domínio FERM é composto por 3 lobos (F1, F2 e F3). O lobo F1 é responsável

pela interação com a proteína supressor tumoral p53. O lobo F2 foi descrito ser responsável pela translocação para o núcleo celular. Já o lobo F3 do domínio FERM está relacionado com a interação com a proteína Mdm2 (*mouse double minute 2*) (LIM et al., 2008).

Uma sequência de aminoácidos (*linker*) conecta a região N-terminal ao domínio quinase. Esta sequência contém o resíduo de tirosina 397 que é sítio de autofosforilação e ativação da FAK e um sítio para a ligação da porção SH2 da proteína Src (CECCARELLI et al., 2006).

O domínio quinase na região central correspondente a porção catalítica da enzima, apresenta uma alça de ativação que contém os resíduos de tirosina 576 e 577 (CALALB et al., 1995). Esse domínio apresenta uma interação auto-inibitória com o domínio FERM (LIETHA et al., 2007). No estado auto-inibitório, o domínio FERM se estende pelos lobos C e N do domínio quinase, inclusive pela alça de ativação desse domínio, que contém os resíduos de tirosina 576 e 577. O maior contato entre os dois domínios ocorre entre o subdomínio F2 e o lobo C do domínio Quinase (Figura 05).

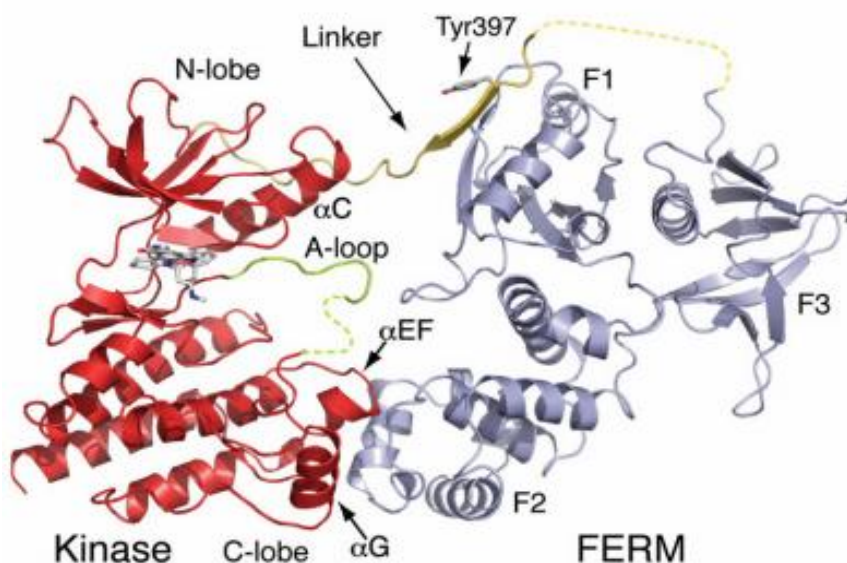


Figura 05 – Estrutura tridimensional da conformação auto-inibitória da FAK. A estrutura é composta pelos domínios FERM e Quinase (LIETHA et al., 2007).

Já a região C-terminal da FAK é composta por uma porção rica em sítios de interação proteína-proteína (sequências ricas em prolina) e pelo domínio FAT (*Focal Adhesion Targeting*) responsável pelo direcionamento da FAK para regiões de adesão focal (HILDEBRAND et al., 1993) e pela associação com as proteínas talina (CHEN et al., 1995) e paxilina (HILDEBRAND et al., 1995). O domínio FAT é composto por 4 alfa-hélices dispostas paralelamente, conforme demonstrado na estrutura cristalográfica da Figura 06.

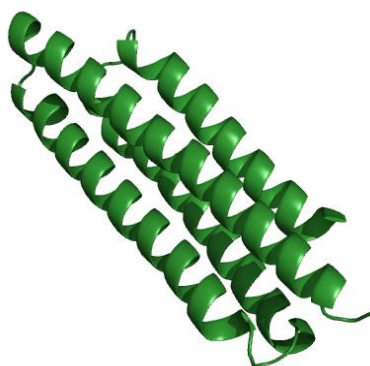


Figura 06 – Estrutura cristalográfica do domínio FAT da FAK (pdb: 1K40) (HAYASHI et al., 2002).

Foi demonstrado que a região C-terminal da FAK, denominada FRNK (FAK relacionada-não-quinase, por não possuir nem o domínio FERM nem o domínio quinase) é expressa de forma independente em certas células e pode funcionar como reguladora negativa da atividade da FAK (NOLAN et al., 1999; TAYLOR et al, 2001). A expressão da FRNK é controlada por elementos transcrpcionais que residem entre o último exon do domínio quinase e o primeiro exon do domínio C-terminal, demonstrando regulações gênicas distintas entre FAK e FRNK (NOLAN et al., 1999).

Além da demonstração que a expressão de FRNK ocorre de forma independente da expressão de FAK, outros estudos demonstraram que a proteína FRNK pode também ser gerada por proteólise mediada por calpaína 2 no resíduo de serina 745 da proteína FAK, gerando um fragmento com tamanho aproximado da FRNK endógena (CHAN et al., 2010).

Na maioria das células, a superexpressão de FRNK inibe a migração, proliferação e adesão celular. (TAYLOR et al, 2001). Sugere-se que os efeitos da FRNK são decorrentes da ação inibitória sobre a atividade de FAK por competir com a proteína FAK pelas regiões de adesão focal nas células e pelos sítios de interação proteína-proteína (NOLAN et al., 1999).

Estudos recentes em ratos neonatos (O'NEILL et al., 2012) demonstraram que o início da expressão de FRNK endógena coincide com parada no ciclo celular desses miócitos cardíacos pós-natal. Sendo que a superexpressão de FRNK no coração embrionário levou à letalidade associada à redução na proliferação de miócitos cardíacos, sugerindo que o aumento de FRNK pós-natal pode ser crítico para promover a quiescência na proliferação do miócito. Por outro lado, a depleção de FRNK no coração promove um aumento na síntese de DNA no 10º dia pós-natal desses corações acompanhado por: aumento no conteúdo de DNA, multi-nucleação celular, marcações positivas de citocinese e divisão celular e sem evidências de apoptose. Além disso, os corações desses animais com depleção de FRNK desenvolveram alargamento ventricular em decorrência do crescimento por proliferação dos miócitos (hiperplasia) em vez de hipertrofia (O'NEILL et al., 2012). Estes dados indicam que a FRNK endógena tem papel importante na homeostase do miócito, regulando a síntese de DNA e a divisão celular no miocárdio pós-natal.

1.3.2 Mecanismos de Ativação da FAK

A sinalização via FAK requer que esta seja ativada através da autofosforilação no resíduo de tirosina 397. Essa fosforilação em tirosina resulta na formação de um sítio de alta afinidade para a porção SH2 da Src e essa associação favorece a fosforilação em outros resíduos de tirosina da FAK (407, 576, 577, 861 e 925) levando a uma atividade máxima desta enzima (CALALB et al., 1995).

O resíduo 397 fosforilado constitui ainda um sítio de ligação para outras proteínas como a PI3K, participando nas cascatas de sinalização anti-apoptóticas via AKT. Os resíduos de tirosinas 576 e 577 se encontram no interior do domínio quinase da FAK e a fosforilação destes sítios estão envolvidas na regulação da atividade enzimática (MAA e LEU, 1998). A fosforilação do resíduo 861 demonstrou estar relacionada a associação com a proteína p130^{CAS} (LIM et al., 2004). Já a fosforilação da tirosina 925, localizado no domínio Cterminal da FAK, cria sítios de ligação para o domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2. Essa associação leva a ativação de MAPkinases, reguladoras do crescimento e proliferação celular (SCHWARTZ et al., 1995; PARSONS 1996; SCHLAEPFER et al., 1998).

Estudos anteriores demonstraram que estímulos mecânicos em miócitos cardíacos induzem um aumento na fosforilação e, por conseguinte, na atividade da FAK. O estiramento aplicado diretamente em miócitos cardíacos de ratos

neonatos provoca a ativação da FAK, verificada pelo aumento na fosforilação em tirosina 397, utilizando anticorpo anti-pFAK (Ty397) (TORSONI et al., 2003). Da mesma forma, a sobrecarga pressórica, induzida pela constrição do arco aórtico em modelo animal, induz um aumento na fosforilação da FAK (FRANCHINI et al., 2000). Uma vez ativada essa proteína ativa uma série de proteínas (ERK, JNK, MAP, RhoA/ROCK) envolvidas no processo de hipertrofia cardíaca (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002; TORSONI et al., 2003; FONSECA et al., 2005; NADRUZ et al., 2005; TORSONI et al., 2005).

1.3.3 Controle da Atividade da FAK

Foi demonstrado anteriormente (TORSONI et al., 2003; FONSECA et al., 2005; SANTOS et al., 2011) que a manutenção da FAK em seu estado quiescente em miócitos cardíacos, pode ser dependente da interação entre o domínio FERM da FAK e a cadeia pesada da miosina sarcomérica. Os resultados desses estudos demonstraram que FAK e miosina estão associadas na banda A sarcomérica em miócitos cardíacos e que a ativação da FAK, por estímulo mecânico, reduz drasticamente essa associação. Esses estudos sugerem que a deformação da miosina sarcomérica induzida pelo estiramento, daria início ao processo de desbloqueio da autoinibição que o domínio FERM exerce no domínio catalítico da FAK, possibilitando a fosforilação e ativação do sítio de tirosina 397.

Estudos demonstram que o nível de fosforilação basal da FAK seja regulado pela atividade basal da tirosino-fosfatase SHP2 e também que a sustentação de níveis elevados de fosforilação da FAK em miócitos cardíacos submetidos a estímulos mecânicos se deve à inibição da atividade da SHP2. (YU et al., 1998; MANES et al., 1999; MARIN et al., 2008). Além disso, estudos demonstram que a inativação da SHP2 é acompanhada por aumento na fosforilação em tirosina e, conseqüentemente, ativação da FAK em células em cultura (YU et al., 1998; MARIN et al., 2008).

1.3.4. Efeitos da Ativação da FAK no Coração

Os efeitos da FAK em células proliferativas estão bem compreendidos e estão relacionados a regulação de vias de crescimento e proliferação celular mediado pela ativação de MAPKinases via ligação com a proteína adaptadora Grb2 através da região Cterminal da FAK (SCHLAEPFER et al., 1994). São relatados também que a FAK promove a sinalização de vias relacionadas a sobrevivência celular via ativação da via Src-PI3K-AKT (CHEN et al., 1996).

No entanto, os efeitos da ativação da FAK em células terminalmente diferenciadas, como no caso dos miócitos cardíacos, são pouco compreendidos.

Estudos prévios, sobre mecanismos patogênicos da hipertrofia e insuficiência cardíacas demonstraram a importância crítica da sinalização pela quinase de adesão focal (FAK) para as alterações fenotípicas dos miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002; TORSONI et al., 2003; NADRUZ et al., 2003; NADRUZ et al., 2004; FONSECA et al., 2005; KOBARG et al., 2005; NADRUZ et al., 2005; TORSONI et al., 2005).

A FAK uma vez ativada participa na transdução de sinal em decorrência de estímulo mecânico. A ativação da FAK por estiramento em miócitos cardíacos tem papel crítico na regulação da re-expressão de genes do programa fetal induzida por estímulo mecânico (TORSONI et al., 2003; NADRUZ et al., 2005). Existe ampla constatação experimental (HOSHIJIMA e CHIEN, 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos.

Estudos em animais com deleção gênica da FAK resultaram em defeitos mesodermis e letalidade embrionária, por volta da segunda semana, principalmente devido a defeitos no desenvolvimento cardíaco (ILIC et al., 1995; FURUTA et al., 1995). Além disso, animais com deleção gênica condicional para FAK em miócitos cardíacos apresentaram também alta letalidade embrionária com defeitos na parede ventricular e defeitos no septo ventricular (PENG et al., 2008). Esses dados indicam que a FAK estaria envolvida em processos essenciais no desenvolvimento do coração.

Recentemente, a importância da sinalização da FAK no crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo provocado por estímulos mecânicos foi estudada em camundongos transgênicos, onde a expressão de FAK foi depletada em miócitos cardíacos utilizando-se a tecnologia de Cre recombinase dirigida pelo promotor da miosina de cadeia leve 2v (PENG et al., 2006; DiMICHELE et al., 2006). Nestes modelos, o coração se desenvolveu normalmente e apresentou função normal em condições basais embora resultados discrepantes foram observados sob condições de sobrecarga pressórica.

PENG et al., 2006, mostraram que a indução da hipertrofia por coarctação da aorta em camundongos com depleção de FAK resultava em remodelamento maladaptativo prematuro do ventrículo esquerdo, caracterizado por dilatação, aumento da fibrose intersticial e deterioração funcional. Ainda, a coarctação induziu o aumento da expressão gênica de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca. Por outro lado, DiMICHELE et al., 2006, mostraram que a perda da expressão de FAK atenuava a resposta hipertrófica dos miócitos cardíacos em relação à coarctação da aorta, incluindo a expressão de marcadores moleculares de hipertrofia. Estes dados, embora discrepantes, sugerem que a FAK possui papel importante na instalação da hipertrofia adaptativa cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica.

Dados do nosso laboratório, utilizando inibição gênica da FAK através do uso de interferência por RNA (siRNA_{FAK}), demonstraram que animais pré-tratados com siRNA_{FAK} e submetidos a sobrecarga pressórica induzida pela constrição da

aorta, apresentaram uma atenuação da hipertrofia ventricular esquerda e uma melhora na função cardíaca. Além disso, esses animais apresentaram uma diminuição do marcador gênico de hipertrofia β -MHC e uma atenuação da fibrose intersticial. Adicionalmente, o estudo demonstrou, que animais submetidos a sobrecarga pressórica e tratados após quatro semanas com siRNA_{FAK}, apresentaram uma regressão da hipertrofia ventricular esquerda, uma atenuação no diâmetro dos miócitos cardíacos e uma atenuação na fibrose intersticial (CLEMENTE et al., 2007).

Esses dados indicam que a FAK é importante não apenas para o desenvolvimento da hipertrofia ventricular, mas também para a manutenção do estado hipertrófico induzido por sobrecarga pressórica.

1.3.5. Distribuição Subcelular da FAK

A FAK apresenta uma distribuição citoplasmática em miócitos cardíacos, localizando-se nos pontos de adesão focal, na região intracelular de junção das integrinas com proteínas do citoesqueleto (CARY e GUAN, 1999) e presente na banda A sarcomérica, associada a cadeia pesada de miosina (FONSECA et al., 2005; SANTOS et al., 2011).

Estímulos mecânicos provocam modificações na localização subcelular da FAK. Em miócitos cardíacos submetidos a 60 minutos de sobrecarga ventricular esquerda, ocorre acúmulo de FAK no compartimento nuclear (FONSECA et al., 2005). Estes dados estão de acordo com dados de estudos anteriores (Yi et al., 2003; Yi et al., 2006), que indicam que a FAK e FRNK se acumulam no núcleo e discos intercalares de miócitos hipertróficos em ratos espontaneamente hipertensos com falência cardíaca. Miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura submetidos a 30 minutos de estiramento apresentam também grande quantidade de FAK no núcleo (SENYO et al., 2007). Estes dados dão suporte à ideia de que a translocação nuclear da FAK pode exercer função importante na transdução de sinal em miócitos cardíacos.

Ainda em suporte à hipótese de que a FAK pode contribuir diretamente para sinalização no nível do núcleo, a sequência de aminoácidos da FAK apresenta um domínio LXXLL (onde L é leucina e X é qualquer aminoácido) na porção Cterminal da FAK. Esta sequência é reconhecida como uma sequência de reconhecimento de receptores nucleares (SAVKUR e BURRIS, 2004). Portanto, é possível que a sequência LXXLL da FAK habilite ligações a receptores nucleares e determine sua participação no controle da atividade transcricional.

Além disso, LIM et al., 2008 relataram que o lobo F2 do domínio FERM é o responsável pela localização nuclear da FAK. Mutações pontuais em 5 aminoácidos básicos (Lisina 190, 191, 216, 218 e Arginina 221) no lobo F2 do domínio FERM inibiram a translocação da FAK para o núcleo.

Por fim, estudos recentes de nosso laboratório, demonstraram uma associação entre o fator de transcrição MEF2C e FAK no núcleo de miócitos cardíacos de ratos submetidos à constrição da aorta por 60 minutos (CARDOSO, 2008). No entanto as características estruturais do complexo MEF2C/FAK bem como a topologia da interação permaneceram inexploradas.

2. OBJETIVO

Objetivo

Objetivo:

Investigar a interação entre o fator de transcrição MEF2C e a FAK e suas implicações na regulação da homeostase dos miócitos cardíacos.

Objetivos Específicos

- 1 – Definir a natureza da interação entre MEF2C e FAK
- 2 – Avaliar o efeito da interação com FAK na função transcricional de MEF2C;
- 3 - Avaliar as consequências da interação entre MEF2C e FAK na homeostase dos miócitos cardíacos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Anticorpos: anti-FAK (c-20), anti-GAPDH (FL335), anti-Desmina (H76), anti-Ciclina E1 (M-20), anti-Actina (H196) da Santa Cruz Biotechnology, anticorpo secundário anti-*rabbit* biotinilado da Amersham, anticorpo secundário anti-*mouse* biotinilado da Amersham, anti-MEF2C (AP100561) da Protein Tech, anti-Miosina (ab- 15-100) da Abcan.

Reagentes: DMEM e estreptomicina-ampicilina foram adquiridos da Nutricell, soro fetal bovino, soro equino e OPTI-MEM® da Gibco BRL Co. Pancreatina foi adquirida da Sigma, colagenase tipo II da Worthington. Proteína A/G plus foram adquiridas da Santa Cruz Biotechnology (USA). Trizol, Superscript II e Lipofectamina™ 2000 foram adquiridos da Invitrogen, faloidina conjugada à rodamina da Molecular Probes. Ampliscribe™ T7 high yield transcription foi obtido da Epicentre Biotechnologies. O meio de montagem Vectashield contendo DAPI foi adquirido da Vector Laboratories. Os moldes de nucleotídeos foram encomendados da IDT.

Animais: Neste trabalho foram utilizados ratos neonatos da linhagem *Wistar* provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) da UNICAMP, com 1 a 3 dias de vida.

3.2. Cultura de Células – Miócitos Ventriculares de Ratos Neonatos (MVRNs)

Detalhes da técnica de extração e estiramento de miócitos ventriculares de ratos neonatos (MVRNs) foram descritos anteriormente (SEN et al., 1988; TORSONI et al., 2003). Os neonatos tiveram seus corações extraídos do tórax e os ventrículos foram separados dos átrios, reduzidos a pequenos tamanhos com o auxílio de pinça e tesoura estéreis, então transferidos para uma placa contendo solução tampão ADS 1X estéril (6,8 g NaCl, 4,76 g Hepes, 0,138 g NaH₄PO₄, 1,0 g D-glucose, 0,4 g KCl, 0,195 g MgSO₄ * 7 H₂O e água MilliQ para um volume final de 100 ml). O tecido foi então submetido a múltiplas digestões enzimáticas (5 a 6 digestões de 20 minutos cada) à 37 °C usando-se para isso uma mistura de collagenase tipo II (80 U/ml) e pancreatina (0,6 mg/ml) (tampão ADS 1X, 80 unidades/ml collagenase tipo II e 0,6 mg/ml pancreatina). A solução obtida em cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1,0 ml de soro fetal bovino (SFB), centrifugada (3000 rpm, 5 minutos, 37° C) e os *pellets* resultantes foram ressuspensos em 1,0 ml de SFB, colocados em placa de petri 35mm e mantidos em uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂, à 37° C, até o final da digestão do restante do tecido.

Os miócitos cardíacos foram purificados em um gradiente descontínuo de Percoll, ressuspensos em meio de plaqueamento contendo DMEM, 10% de soro de cavalo, 5% de soro fetal bovino, bromodeoxiuridina 0,01% e 0,5% de antibiótico

(penicilina/estreptomicina - 100 U/ml). Após a separação, as células foram plaqueadas em placas de 10 cm. Após 48 horas, o meio foi substituído pelo meio de manutenção contendo DMEM, 0,5% antibiótico (penicilina/estreptomicina - 100 U/ml), bromodeoxiuridina 0,01% e os miócitos foram incubados por 24 horas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂).

3.3 Extrato Proteico de Células

Para a extração das proteínas, as células foram rapidamente removidas, homogeneizadas imediatamente em tampão de extração-RIPA (50mM Tris-HCl pH 7.4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1% NP40; 0.25% Deoxicolato de Sódio; 5mM fluoreto de sódio; 2mM ortovanadato de sódio; 5µg/ml PMSF; 0,1 mg/ml aprotinina).

Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Após quantificação das proteínas, 400µL de amostra acrescida de 100µL de tampão da amostra 5x (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5% b-Mercaptoetanol;

10% glicerol e 0,01% bromofenol) e 0,015g de DTT, foram aquecidos a 95° C por 5 minutos e armazenados em biofreezer -80° C para posterior análise das proteínas por *western blotting*.

3.4 Western Blotting

As amostras das proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida- SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 45minutos, a temperatura ambiente, em solução de bloqueio (5% leite desnatado; 25mM Tris-HCl; 125mM NaCl; 0,02% Tween 20, pH8.0) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada sob agitação à temperatura ambiente em solução TBS-T (25mM Tris-HCl; 125mM NaCl; 0,02% Tween 20, pH8.0).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-FAKc20 (diluição 1:1000), anti-MEF2c21 (diluição 1:1000) anti-

GAPDH (diluição 1:1000) em solução de anticorpo (3% leite desnatado; 25mM Tris; 125mM NaCl; 0,02% Tween 20 pH8.0) durante 16 horas a 4º C.

Após serem lavadas por 15 minutos em solução TBS-T, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (diluição 1:5000) por 120 minutos a temperatura ambiente, sob agitação a temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos em solução TBS-T. As membranas foram expostas a um agente quimioluminescente proveniente do kit *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, EUA), e a reação produziu fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína. As imagens foram adquiridas no Image Quant™ 300 da GE Healthcare.

As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica utilizando o *software* Image J.

3.5 Transfecção de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura

Para a transfecção dos plasmídeos contendo FAK_FLAG, FERM_FLAG, CTERM_FLAG e o controle pFLAG (plasmídeo sem inserto), os miócitos cardíacos foram cultivados por 72 horas (1×10^5 células/well) sendo as últimas 24 horas de cultivo na ausência de soros e antibióticos. Em seguida os miócitos

cardíacos foram tratados por 48 horas com os plasmídeos complexados com lipofectamina. Como controle da reação, miócitos cardíacos foram tratados somente com o reagente Lipofectamina 2000 (2µl/ml).

Os complexos foram preparados adicionando-se a lipofectamina ao OPTI-MEM seguida por uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Em paralelo, os plasmídeos (28µgDNA/placa) foram incubados com OPTI-MEM por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, para a formação do complexo de transfecção, os siRNAs e o plasmídeo com OPTI-MEM foram incubados com a lipofectamina pré-incubada com OPTI-MEM por 45 minutos à temperatura ambiente. A seguir as células foram transfectadas por 48 horas. Após a transfecção os miócitos cardíacos extraídos para posterior análise.

3.6 Cultura de células – C2C12

Foi utilizada a linhagem celular C2C12 proveniente de músculo esquelético de camundongo C3H. As células C2C12 foram cultivadas em meio de cultura composto por DMEM (Nutricell) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Nutricell), em garrafas de cultura mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C.

Ao atingirem 70% de confluência, para não perder a população mioblástica pela confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O *pellet* foi homogenizado em meio de cultura, as células foram contadas, com o corante de exclusão azul de tripan, em câmara de Newbauer e plaqueadas na densidade de 10^4 células/placa.

3.7 Transfecção das células C2C12

As células C2C12 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na densidade de 10^4 céls/ml. Após 48 horas de plaqueamento, os mioblastos foram transfectados.

Para a transfecção dos plasmídeos contendo o gene para MEF2C selvagem (pcDNA3), FAK selvagem (pcDNA/FAK-Flag), o domínio FERM da FAK (FERM/FLAG), a região Cterminal da FAK (CTERM/FLAG) e apenas o plasmídeo fechado (pcDNA/Flag). foi utilizada a mesma metodologia de transfecção em miócitos cardíacos previamente descrita no item 3.5.

Os complexos foram preparados adicionando-se a lipofectamina ao OPTI-MEM seguida por uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Em paralelo, os plasmídeos (28µgDNA/placa) foram incubados com OPTI-MEM por 5

minutos à temperatura ambiente. Em seguida, para a formação do complexo de transfecção, o plasmídeo com OPTI-MEM foi incubado com a lipofectamina pré-incubada com OPTI-MEM por 45 minutos à temperatura ambiente. A seguir as células foram transfectadas por 48 horas.

3.8 Microscopia Confocal

Células em cultura foram lavadas 3 vezes em tampão PBS 1x pH7.4 (137mM NaCl, 27mM KCl, 43mM Na₂HPO₄, 14mM KH₂PO₄,). Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (p/v) mais sacarose 4%, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Este material foi submetido à reação de imunofluorescência.

As células foram incubadas com solução bloqueadora (0,8% Triton X-100, 3% BSA, diluído em PBS 1x, pH 7,4), por 1 hora, à temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas e incubadas com faloidina conjugada à rodamina por 2 horas à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em Vectashield com DAPI e examinadas pelo microscópio confocal LSM710_780 Zen.

3.9 Proteínas Recombinantes

As sequências gênicas codificadoras do domínio FAT da FAK foi inserida no vetor pET28a-TEV. A proteína MEF2C_95 foi clonada tanto em vetor pET28a_SUMO quanto em pET28a_GST.

A construção do domínio FAT da FAK foi transformada em *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21DE3 C41. As construções de MEF2 foram transformadas em *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 DE3 Rosetta 2 (contendo o plasmídeo pRARE 2 que confere resistência a cloranfenicol e suplementada com os tRNAs para os códons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA e CGG) (Novagem, USA).

Colônias transformantes foram pré-inoculadas em meio LB/antibiótico e cultivadas durante 18 horas a 37 °C. O pré-inóculo foi diluído 1:500 em meio LB/antibiótico para crescimento a 37 °C sob agitação constante de 200 rpm por 5 horas. Em seguida, a temperatura do agitador foi reduzida para 18 °C por 1 hora, para resfriar o meio de cultura, sendo então adicionado IPTG (isopropil- β -D-tiogalactosídeo) na concentração final de 0,2 mM para a indução da expressão da proteína recombinante por 16 horas. O meio de cultura, contendo as bactérias, foi centrifugado a 8000 g por 10 minutos. O *pellet* bacteriano foi ressuspensão em 30ml de tampão/litro de cultura em tampão (TrisHCl 50mM pH7.4, NaCl 150mM, Imidazol 20mM, 1mM PMSF, Lisozima (40mg/ml), 10% glicerol e 2mM de 2-Mercaptoetanol). Em seguida incubou-se com Lisozima (40mg/ml), à 4°C por 30

minutos, sendo posteriormente adicionados deoxicolato de sódio (20mg/ml) e DNase (50 µg/ml) por 30 minutos ou até diminuir a viscosidade do extrato. Para os ensaios de reação cruzada acoplada à espectrometria de massas, foi utilizado tampão fosfato para lise (NaH₂PO₄ 50mM pH 7.4).

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 18000rpm por 40minutos a 4° C. Os sobrenadantes contendo as proteínas recombinantes na fração solúvel, fusionadas a cauda de histidina foram incubadas com 1 mL de resina *Talon Gravity Flow* (Clontech), com íons de cobalto, para cada litro de meio de cultura. Essa resina foi previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50mM NaCl; 2mM DTT). A mistura foi inserida em coluna de plástico Poly-Prep (Bio-Rad) e coletada a fração que não se ligou a resina (*flow through*). As lavagens foram efetuadas acrescentando um volume de tampão de lavagem equivalente a 10 vezes o volume de resina. Esse procedimento foi repetido três vezes, para que as impurezas, com ligações inespecíficas à coluna, fossem eliminadas. A eluição se deu pela passagem de 10 mL de tampão de eluição (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 50mM NaCl; 2mM DTT; 500 mM imidazol). Foram realizadas de 3 a 4 eluições.

As amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (poliacrilamida 15%). As bandas de proteínas foram visualizadas através da coloração com *Coomassie brilliant blue* (0,25% de *Coomassie brilliant blue* R-250-Bio-Rad, 90% de etanol absoluto e 10% de ácido acético glacial).

Outra etapa de purificação utilizada foi a troca iônica, utilizando as colunas HiTrap® SP HP e HiTrap® Q HP (5 mL) (GE healthcare) para a realização da

troca catiônica e aniônica, respectivamente, acopladas ao sistema AKTA-FPLC (GE healthcare), acoplada ao sistema AKTA-FPLC (GE) em tampão TrisHCl 50mM pH 7.4 , NaCl 50mM e 2mM DTT.

Por fim, as proteínas foram purificadas por exclusão de tamanho em coluna Superdex 75 16/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC (GE) em tampão TrisHCl 50mM pH 7.4 , NaCl 50mM ou tampão NaH₂PO₄ 50mM pH7.4, 50mM NaCl.

A construção GST-MEF2C_95, foi purificada com o uso de resina de glutathione sepharose (Amersham). A resina foi previamente lavada 3 vezes com tampão PBS pH 7.4 com 1% de Triton X-100. Após incubação por 1 hora com o sobrenadante, a resina foi lavada 3 vezes com tampão PBS pH 7.4 acrescido de inibidores de proteases.

Para concentração das proteínas foi utilizado o concentrador Centriprep® (Millipore), submetido à centrifugação a 4000 rpm, 4 °C. Para a quantificação das proteínas purificadas foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) a 280 nm. Os coeficientes de extinção molar (ϵ) foram calculados utilizando-se o programa ProtParam Tool (<http://bo.expasy.org/tools/protparam.html>).

A seguir serão apresentados os passos utilizados na purificação da proteína MEF2C_95. A padronização da expressão e purificação do fator de transcrição MEF2C despendeu bastante tempo. Estudos anteriores, trabalhando com as

construções de MEF2C contendo as porções entre os aminoácidos 1-169 ou de 1-86 apresentaram degradação e pouca solubilidade. No entanto, dados recentes da literatura, demonstraram uma estrutura cristalográfica de MEF2A associado ao DNA (código pbd: 3KOV) compreendendo a porção da proteína entre os resíduos 1-95 clonado em cauda de histidina (Wu et al., 2010), sugerindo que essa construção poderia ser solúvel e menos sujeita a proteólise do que aquelas que estávamos utilizando (i.e. 1-169 e 1-86). Sendo assim, realizamos a clonagem do fragmento MEF2C_95, expressão e purificação.

O gel de indução e purificação da proteína MEF2C_95 clonada em pET28a_TEV é demonstrado na Figura 07.

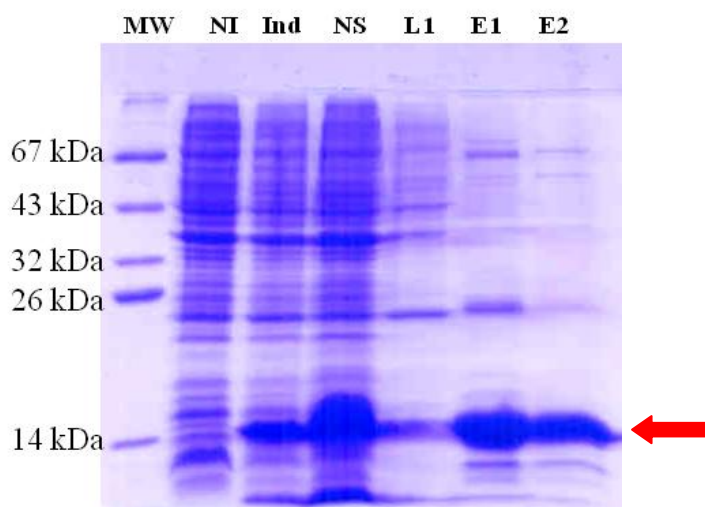


Figura 07 – Gel representativo SDS-PAGE 15%, da indução e purificação por afinidade da proteína MEF2C_95 (seta vermelha). MW: Marcador de peso molecular; NI: não induzido com IPTG; Ind: após 16 horas de indução com IPTG; NS: fração não solúvel; L1: lavagem 1; E1: eluato 1; E2: eluato 2.

Com a construção MEF2C_95 conseguimos uma quantidade substancial de proteína recombinante solúvel e estável, sem degradação significativa, sendo alcançada uma concentração de aproximadamente 5 mg/ml, um aumento de 25 vezes no rendimento da proteína recombinante em comparação com as construções MEF2C (1-169 e 1-86). Porém, um problema posteriormente verificado foi a contaminação com DNA bacteriano, detectado por meio de espectroscopia de luz ultravioleta (220-340 nm). A concentração de proteína foi obtida da medida da amostra em 280nm. Conforme podemos observar no espectro da Figura 08, há um aumento na absorbância em 230nm, com um pico em 260nm, que é o comprimento de onda absorvido pelo DNA.

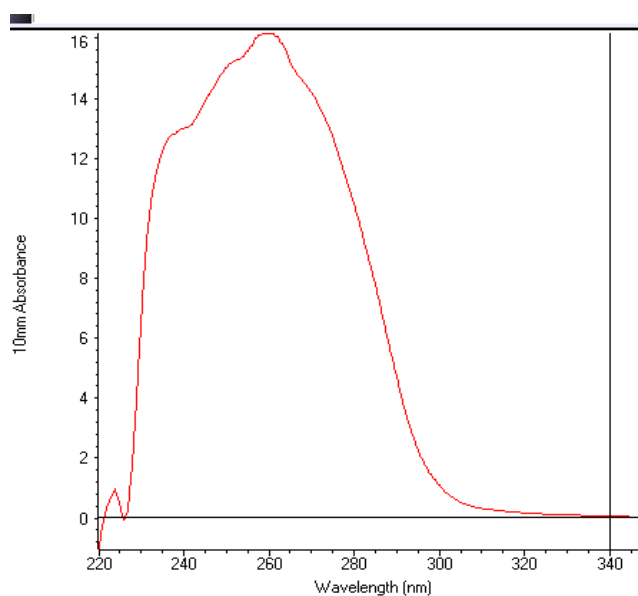


Figura 08 – Espectro de luz UV de 220 a 340 nm da proteína MEF2C_95, demonstrando a contaminação da proteína com ácidos nucleicos da bactéria.

Para comprovar a contaminação por DNA, submetemos a proteína purificada a eletroforese de agarose. No gel de agarose da Figura 09, demonstramos que há contaminação com ácidos nucleicos provenientes da bactéria. O tratamento prévio da amostra de proteína purificada MEF2C_95 com DNase (Figura 09) reduz a banda superior do gel, já o tratamento da amostra com RNase há uma redução da banda inferior do gel, indicando que a proteína esta contaminada tanto com DNA como RNA bacteriano. Essa contaminação prejudica procedimentos de quantificação da amostra, ensaios biofísicos e ensaios de interação proteína-proteína. Além do mais, a estabilidade da amostra é drasticamente reduzida, ocorrendo a precipitação da amostra em menos de 16 horas após a purificação.

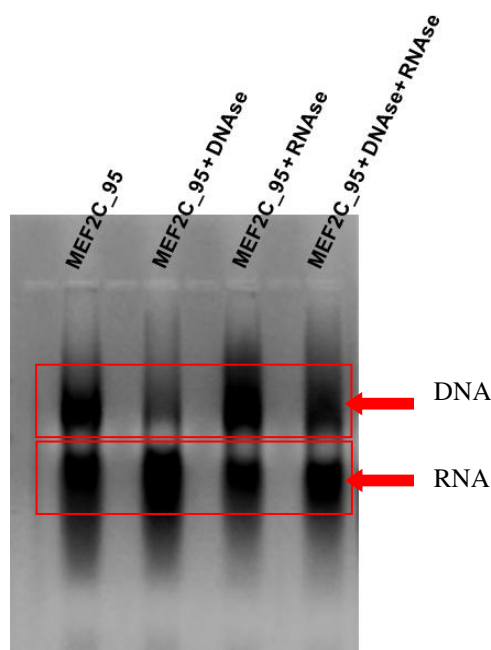


Figura 09 – Eletroforese de agarose 0,8% demonstrando a contaminação da proteína MEF2C_95 com DNA e RNA da bactéria.

Como indicado na Figura 09, os tratamentos com DNase e RNase (coluna 4) não aboliram completamente a contaminação com os ácidos nucleicos, sendo necessárias novas etapas de purificação para a retirada total dos contaminantes. A contaminação por DNA e RNA reflete provavelmente a dificuldade de ataque pelas nucleases devido ao fato de o MEF2 ser um fator de transcrição. Para a descontaminação, inicialmente realizamos ensaio de gel filtração por exclusão de tamanho, utilizando coluna superdex 200 16/60. No entanto, como podemos observar na Figura 10_A, esperava-se que os contaminantes saíssem em picos separados, porém devido à diversidade de tamanho dos contaminantes, não houve a formação de picos definidos, mas sim de um pico extremamente largo de mais de 30 mL de volume, que em todas as frações continham tanto a proteína MEF2C_95 como a contaminação com ácidos nucleicos (Figura 10_B).

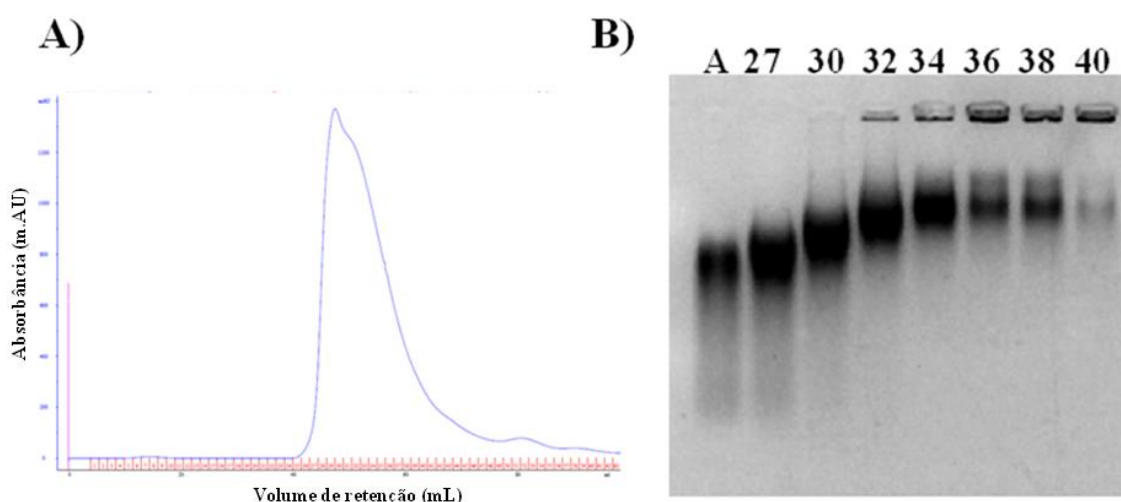


Figura 10 – A) Cromatograma representativo da purificação por gel filtração em coluna superdex 200 16/60 da proteína MEF2C_95, demonstrando a heterogeneidade da amostra devido a contaminação com ácidos nucleicos provenientes da bactéria, conforme demonstrado em B no gel de agarose 0,8% das frações eluídas da gel filtração (frações 27-40). Amostra proveniente da afinidade (A).

Além do mais, conforme podemos observar na Figura 10_B em todas as frações eluídas da gel filtração, a contaminação com ácidos nucleicos persistiram. As bandas apresentaram diferentes alturas no gel, inclusive quantidades que mal entraram na malha do gel, ficando nos poços, indicando que a amostra é bastante heterogênea tanto em relação à natureza (DNA e RNA) quanto em relação ao tamanho dos fragmentos de DNA e RNA.

Diante disso, decidimos realizar outro passo de purificação por meio de cromatografia de troca iônica. Biomoléculas com diferentes estados de carga podem ser separadas, utilizando uma resina (fase estacionária) carregada positivamente (troca aniônica) ou negativamente (troca catiônica). Na troca aniônica, as partículas carregadas negativamente terão afinidade pela carga positiva da resina e ficarão retidas na resina. Portanto, com um gradiente de sal (NaCl) haverá a troca de ânions (Cl^-) e as moléculas serão eluídas de acordo com a afinidade pela resina, em que partículas mais negativas terão maior afinidade pela resina e só serão eluídas em concentrações maiores de sal. Já na troca catiônica são trocados cátions, a resina da coluna tem carga negativa e com um gradiente de sal (NaCl) haverá a troca de cátions (Na^+), eluindo assim, de acordo com a carga, as biomoléculas de interesse.

A proteína MEF2C_95 apresenta pI (ponto isoelétrico) em torno de 9,3. A lise bacteriana foi realizada utilizando solução de Tris pH 7,5. Portanto, neste pH a proteína MEF2C_95 apresenta-se carregada positivamente, que determinou a opção pela coluna HiTrap™ SP HP (GE Healthcare Life Sciences) de troca catiônica. Neste caso, a resina é negativa e, portanto os ácidos nucleicos que

também são negativos serão retirados e o MEF2C, com carga predominante positiva, será atraído pela resina, sendo posteriormente, eluído com gradiente crescente de NaCl. Conforme indicado na Figura 11-A, durante a injeção da amostra na coluna (primeiros 30 ml) houve um aumento na absorbância a 280nm (curva azul) monitorada por FPLC e iniciamos o gradiente de NaCl (reta verde) com o aumento proporcional da condutividade (reta marron) em virtude do aumento da concentração de sal. Nos primeiros 30 ml de corrida, grande quantidade de DNA foi eluído, sem interação com a resina, quase não restando contaminantes na eluição da proteína nas amostras seguintes.

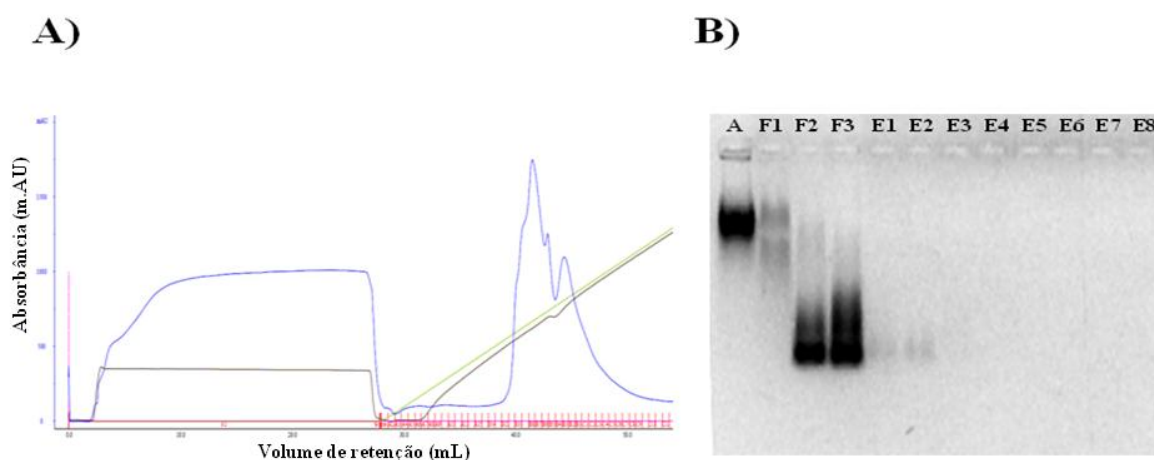


Figura 11 – A) Cromatograma representativo da purificação por troca iônica da proteína MEF2C_95 utilizando a coluna HiTrap™ SP HP. B) Gel de agarose 0,8% demonstrando a contaminação com ácidos nucleicos bacterianos antes da purificação por troca iônica e a ausência de contaminantes nas frações eluídas por gradiente salino (E1-E8). A: Afinidade; F1-F3: extrato protéico que não ligou na coluna (*flow through*).

Espectros de absorbância de luz (Figura 12) indicaram picos em 230 e 280nm, confirmando a pureza da proteína. Como esperado, não houve pico em 260nm, como ocorria com a amostra anterior à realização da purificação e retirada de ácidos nucleicos por cromatografia de troca iônica.

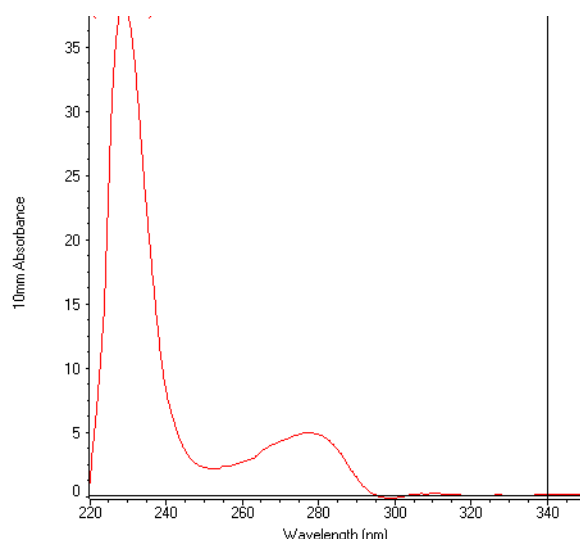


Figura 12 – Espectro de luz de 220 a 340 nm da proteína MEF2C_95, demonstrando a retirada dos contaminantes de ácidos nucleicos bacterianos.

Ao final de três etapas de purificação a proteína MEF2C_95 demonstrou um alto grau de estabilidade, chegando a concentração final de 5 mg/ml (um aumento de 25 vezes em comparação a proteína MEF2C_169 utilizada anteriormente) e com satisfatório grau de pureza (Figura 13).

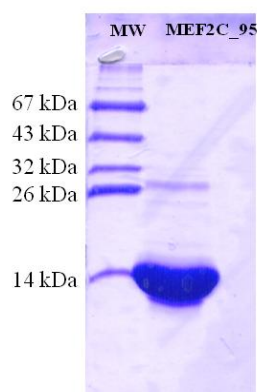


Figura 13 – Gel SDS-PAGE demonstrando a purificação da proteína MEF2C_95, após afinidade, troca iônica e gel filtração. MW: Marcador de peso molecular.

3.10 Ensaio de precipitação (*Pulldown assay*)

Para a realização deste ensaio, foi utilizada a proteína recombinante GST-MEF2C_95 como isca. Aproximadamente 5 µg de cada construção de FAT selvagem ou carregando mutações pontuais, foram incubadas por 16 horas a 4° C, sob agitação constante. Em seguida, foram submetidas a centrifugação e o precipitado lavado 3 vezes, 3000 rpm por 1 minuto a 4° C com tampão de lavagem (100mM Tris-HCl pH7,4; 1mM EDTA; 0,5% Triton-X 100; 2mM ortovanadato de sódio). Por fim, foi adicionado 40 µl de tampão da amostra 1x ao precipitado e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.11. Reação de ligação cruzada acoplado à espectrometria de massas (CXMS)

O experimento de CXMS se baseia na identificação de sequências peptídicas próximas na estrutura terciária, ligadas através de um reagente que se liga covalentemente a aminas primárias presentes principalmente nas cadeias laterais de lisinas ou na porção N-terminal da proteína.

Os agentes de ligação cruzada mais utilizados consistem em compostos contendo dois grupos N-hidroxisuccinimida (NHS) nas extremidades da cadeia, os quais reagem com os grupos aminas de proteínas por meio de uma substituição nucleofílica. Em nossos experimentos foi utilizado o reagente de ligação cruzada DSS (Bisuccinimidil Suberato), um reagente homobifuncional que contém um grupamento NHS em cada extremidade de um braço espaçador de oito carbonos [11,4 Angstroms (Å)]. Ésteres de NHS são suscetíveis a ataque nucleofílico, levando a perda do anel succinimida e formação da ligação entre a cadeia espaçadora e o resíduo de aminoácido. Esse reagente pode se ligar, devido a sua flexibilidade, a aminas com distâncias entre 6 a 11 angstroms (Å) na estrutura proteica. Os produtos da reação podem ser do tipo intramolecular (resíduos conectados estão na mesma cadeia), intermolecular (resíduos conectados encontram-se em cadeias distintas) ou ainda *dead-end*, onde somente um dos grupos reativos se ligou a cadeia peptídica (Figura 14).

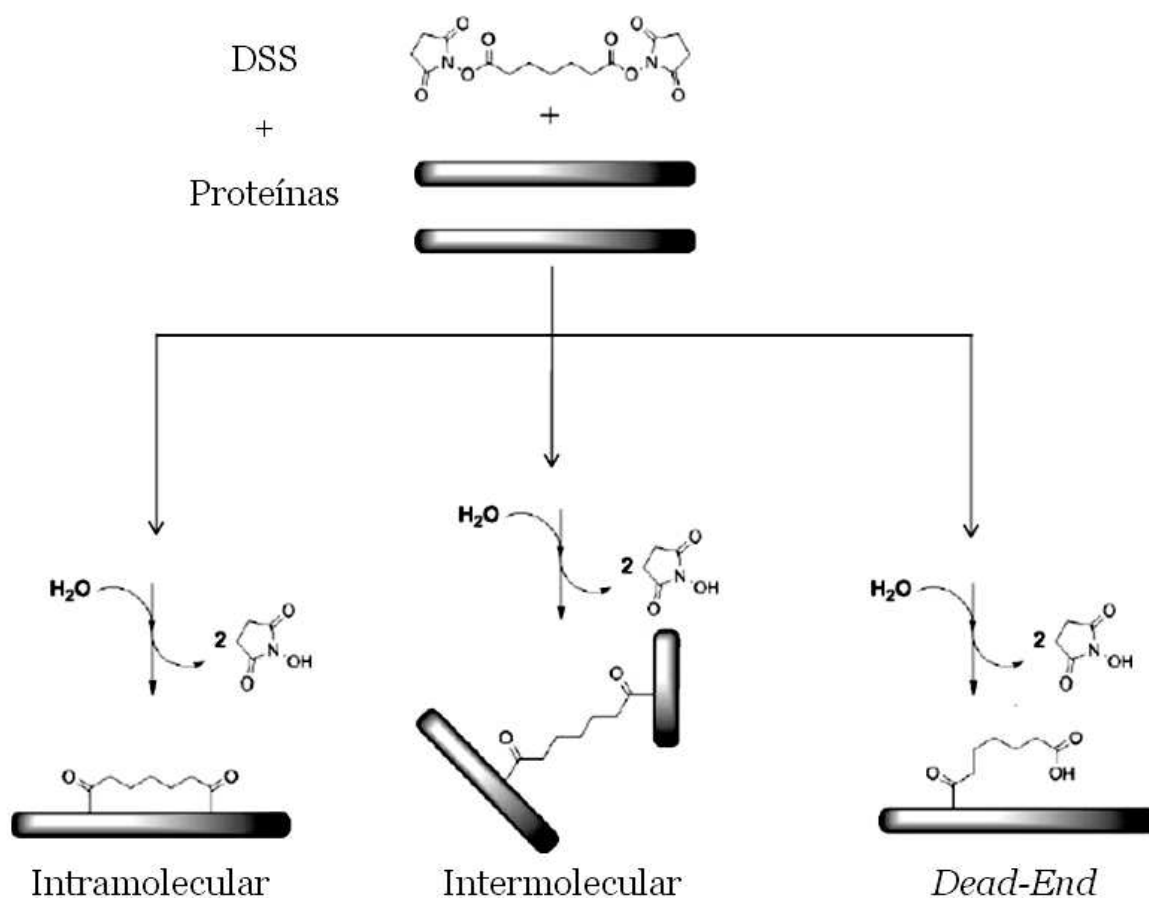


Figura 14 – Representação esquemática de espécies *cross-links*. a) Espécie intra-molecular; b) Espécie inter-molecular; c) Espécie hidrolisada (*dead end*).

O reagente de *cross-linking* utilizado foi o diéster de N-hidroxisuccinimida do ácido subérico (DSS, Pierce). O experimento de *cross-linking* das proteínas FAK_CT, MEF2C_169 e do complexo FAK/MEF2 com DSS foi realizado adicionando-se o *cross-linker* dissolvido em Dimetilformamida (DMF) (10 mg/mL) à solução de 10 μ M de proteína em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.4, 300mM NaCl, na proporção molar de 1:150 (proteína/DSS). Após 2 horas de reação, adicionou-se Tris•HCl 1M pH 7.5 de modo que sua concentração final fosse 50

mM. Uma alíquota de 10µl foi retirada e adicionado tampão de amostra para SDS-PAGE e submetido à eletroforese em gel 12%. O restante da amostra foi submetido à digestão com tripsina (razão tripsina/proteína 1:50 em massa) e a digestão enzimática foi conduzida a 37° C por 16 hora.

Para os nossos ensaios, as proteínas FAK_FAT e MEF2C_95 foram purificadas, separadamente, por afinidade em coluna HisTrap® HP (5ml) (GE). Em seguida o complexo foi co-purificado por cromatografia de exclusão de tamanho em coluna superdex 75 16/60 (GE) acoplada ao sistema AKTA-FPLC. Nos eluatos obtidos foram adicionados o agente de ligação cruzada (DSS) dissolvido em dimetilformamida (DMF) (10mg/ml) na proporção molar de 1:150 (proteína/DSS). A reação foi mantida a temperatura ambiente por 2 horas, e ao final foi adicionado tampão 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) para consumo do excesso de DSS. A análise da formação da reação foi feita por meio de gel SDS-PAGE. A amostra foi submetida à redução e alquilação das cisteínas seguido da digestão enzimática com tripsina (Promega), (razão tripsina/proteína 1:50 em massa), por 16 horas a 37°C. A redução das cisteínas foi realizada utilizando-se 100 µL da solução do complexo após a reação de ligação cruzada reagindo-se com 5 µL de uma solução de Ditrioteitol (DTT, Sigma-Aldrich) 10 mM preparada em tampão bicarbonato de amônio 100 mM incubado por 30 minutos à 37°C. Após o tempo reacional foi realizada a alquilação das cisteínas reduzidas adicionando-se ao meio reacional 5 µL de solução de Iodoacetamida 50 mM preparada em tampão bicarbonato de amônio 100 mM incubado durante 30 minutos à temperatura

ambiente. Subsequentemente, essas amostras foram concentradas em *speed vacuum* e submetidas à análise por Espectrometria de Massas (MS).

3.12. Análise por espectrometria de massas

A amostra proveniente da reação de ligação cruzada foi fracionada utilizando-se cartucho Oasis HLB (Waters Co.). A amostra foi eluída em cinco frações utilizando-se como fase móvel acetonitrila e água, com aumento de acetonitrila nas proporções de 5, 10, 15, 20 e 70%.

As amostras foram então analisadas por LC-MS/MS, utilizando-se o sistema cromatográfico nanoAcquity UPLC (Waters Co) com coluna BEH C18 AcquityWaters (100µmx 100 mm), acoplado ao espectrômetro de massas Waters Synapt HDMS (Waters Co.). Foram injetados 2µL de cada fração. A aquisição de dados foi realizada pelo modo DDA (Aquisição Dependente de Dados), onde a cada segundo o equipamento adquire um espectro de MS. No caso da presença de espécies multicarregadas, as três espécies mais intensas são fragmentadas na câmara de colisão (energia de colisão definida pela m/z e carga do precursor).

Além do método DDA foi elaborado também outro método no qual a seleção dos íons para fragmentação era feita apenas para íons com carga acima de +3, isso porque as espécies modificadas pelo ALC apresentam sempre 3 ou mais cargas, fazendo com que o novo método fosse mais específico para as espécies de ligação cruzada, ajudando na identificação dessas espécies.

Para verificar a presença e cobertura das proteínas os dados foram processados no software ProteinLynx Global Server (Waters Co.) e foi realizada busca no banco de dados utilizando-se o programa Mascot (Matrix Science), com os seguintes parâmetros: MSDB (banco de dados), 0,1 Da (erro nos modos MS e MS/MS), tripsina (protease), permitindo peptídeos com até 2 sítio de clivagem não-digeridos, carbamidometil - cisteína (modificação fixa) e oxidação de metionina (modificação variável).

Além disso, foi adicionada na lista de modificações do Mascot a massa 156,0786 Da para resíduos de lisinas, essa massa é a massa monoisotópica da modificação causada quando o ALC forma uma espécie de *dead end* (adição de C₈H₁₃O₃ e perda de um H). Dessa forma é possível utilizar o Mascot para busca de espécies hidrolisadas, utilizando-se uma modificação variável de 156,0786 Da.

Para avaliação da presença de ligação cruzada os dados foram analisados manualmente e com o auxílio do *software Crux for Xlink* (McILWAIN et al., 2010). É importante ressaltar que para esse tipo de análise os *softwares* ainda não são muito eficientes, sendo imprescindível a análise manual dos espectros de massas. Para o *software Crux for Xlink* foram utilizados os seguintes parâmetros: modificação que o ALC causa nos peptídeos: 138,06 Da; modificação variável: 156,07 Da referente à espécies hidrolisadas que podem ocorrer junto com as espécies de inter- e intra- molecular; resíduo que sofre reação: lisina (K); enzima de digestão: tripsina; peptídeos com até 2 sítio de clivagem não-digeridos e o banco de dados utilizado é gerado a partir das sequências das proteínas FAK_FAT e MEF2C_95.

3.13 Anisotropia de Fluorescência

A incidência da luz polarizada sobre uma molécula fluorescente resulta na fluorescência polarizada. A fluorescência polarizada emitida retorna à fluorescência não polarizada dependendo dentre outros fatores da difusão rotacional da molécula marcada. Assim, a fluorescência polarizada mede indiretamente a mobilidade de moléculas em solução e processos que modificam tal mobilidade, como por exemplo, interações proteína-proteína, interação proteína-DNA, proteólises, dentre outros. Ou seja, quando uma molécula marcada interage com outra proteína não marcada apresentará um tamanho maior que a molécula isolada. Assim quanto maior o complexo, maior serão os valores de polarização da molécula, pois apresentarão uma menor mobilidade, desviando mais a luz. Nesse caso, usaremos o cálculo da anisotropia para investigar forças dominantes envolvidas na interação proteína-proteína, dessa forma, pretendemos encontrar os valores de constante de dissociação do complexo e saber se esse tipo de interação é cooperativa ou não cooperativa.

Para medir a associação de FAT e MEF2C_95 em solução, inicialmente a proteína MEF2C_95 recém-purificada foi marcada com fluoresceína – isotiocianato (FITC), a qual se liga em grupos amina da proteína. O ensaio de marcação foi preparado incubando-se a proteína a 5mg/mL com um excesso molar de 3 vezes de sonda FITC, por 16 horas a 4°C. Após este passo, o complexo proteína-sonda foi aplicado em uma coluna de *desalting* (HiTrap desalting – GE healthcare) para a

separação do excesso de sonda do complexo MEF2C_95-fluoresceína. As amostras foram monitoradas no comprimento de onda de 280nm para a proteína e no 495nm, para a sonda.

Nesse ensaio, diferentes concentrações de FAK_FAT (1nM a 10µM), foram incubadas com 10nM de MEF2C_95 marcado com fluoresceína por 16 horas à 4°C. Os ensaios foram realizados em tampão PBS + 2 mM dithiothreitol (DTT). Todas as medidas foram obtidas em triplicata.

O ensaio foi realizado a 20°C no equipamento PerkinElmer EnVision multilabel reader (PerkinElmer). O comprimento de onda de excitação foi de 480 nm e a emissão a 535 nm, de acordo com os filtros do equipamento. Os valores de anisotropia (A) foram calculados no equipamento, em cada leitura, segundo a equação:

$$A = (I_{VV} - I_{VH}) / (I_{VV} + 2 * I_{VH})$$

em que I refere-se à intensidade de fluorescência medida, os índices vertical (V) e horizontal (H) referem-se à posição dos polarizadores durante a excitação (primeiro índice) e emissão (segundo índice) e G é um fator de correção o qual considera diferenças de sensibilidade, nas duas direções I_{HV} e I_{HH} , de acordo com:

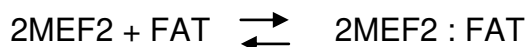
$$G = I_{HV} / I_{HH}$$

Os valores de anisotropia obtidos em cada curva foram plotados *versus* concentração de proteína no programa SIGMAPLOT e as constantes foram determinadas através do ajuste das curvas obtidas pela equação de Hill:

$$A_{\text{obs}} = A_i + (A_f - A_i) \times ([\text{Proteína}]^n / K_D^n)$$

onde A_i e A_f são os valores de polarização inicial e final; $[\text{Proteína}]$ é a concentração de proteína livre; K_D é a constante de dissociação aparente; e n é o coeficiente de Hill, que mede cooperatividade da ligação. Não havendo cooperatividade $n=1$.

Sabe-se que a ligação do MEF2 ao DNA ocorre com a proteína dimérica. Da mesma forma, baseado em nossos resultados anteriores de SAXS e DLS, que demonstraram que a interação MEF2-FAT também ocorre com a proteína MEF2 no estado dimérica.



nesse caso a constante de dissociação será calculada a partir da equação:

$$K_D = [\text{FAT}] \times [2\text{MEF2}] / [2\text{MEF2} : \text{FAT}]$$

3.14 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Os experimentos de DLS foram realizados com o equipamento *DynaPro™* (Wyatt Technology). As amostras analisadas foram primeiramente diluídas em tampão (50mM TrisHCl pH7.4, 150mM NaCl) e centrifugadas por 15 minutos, a 13200 rpm à 4°C. Em seguida, as medidas foram realizadas a 25°C, com tempo de aquisição de 5 segundos, com 100 aquisições por medida. O raio hidrodinâmico (R) foi deduzido a partir de coeficientes de difusão translacional (D) utilizando a equação de Stokes-Einstein. Esse coeficiente de difusão translacional pode ser inferido a partir da análise do decaimento da função de autocorrelação temporal da flutuação de intensidade de luz espalhada. A equação de Stokes-Einstein correlaciona D com R, para partículas esféricas:

$$D = K_B T / (6\pi\eta R)$$

Onde:

K_B : é a constante de Boltzmann,

T: é a temperatura absoluta;

η é a viscosidade do meio;

R: é o raio hidrodinâmico

Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa disponibilizado pelo fabricante.

3.15 Espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS)

Os experimentos de espalhamento de Raios-X a baixo ângulo (SAXS – *small angle X-ray scattering*) foram realizados na linha D02A-SAXS2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente, utilizando um porta amostra de um milímetro de espessura, vedado com janelas de mica por onde passa o feixe de raios-X monocromáticos (comprimento de onda de $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$). Os padrões de espalhamento de raios-X foram gravados usando um detector bidimensional do tipo CCD (MARCCD) sensível a posição. Três coletas sucessivas de 100 segundos cada foram registradas para cada amostra. As medidas foram realizadas com as amostras em tampão (50mM Tris HCl pH7.4, 150mM NaCl). Foram utilizadas duas concentrações diferentes da amostra: 1 e 2 mg/mL para o complexo MEF2C_95/FAT, valores medidos em um espectrofotômetro a 280nm.

As curvas de espalhamento foram obtidas por integração da intensidade registrada no detector bidimensional usando o programa FIT2D. As intensidades das curvas foram corrigidas pela resposta do detector e normalizadas pela intensidade do feixe incidente e pela absorção da amostra. Posteriormente, o espalhamento do tampão foi subtraído do espalhamento de cada amostra. As curvas resultantes foram inspecionadas para verificar a existência de danos na

amostra induzidos pela radiação, mas esse efeito não foi observado. Depois de normalizar as curvas pela concentração, nenhum efeito de concentração foi observado. Uma solução de 4 mg / ml da proteína BSA (66kDa) no mesmo tampão da amostra foi utilizada como padrão de massa molecular para estimar a massa molecular do complexo. Este valor foi inferido a partir da relação dos valores extrapolados da intensidade do espalhamento na origem, $I(0)$, tanto da amostra quanto da solução de BSA (MYLONAS e SVERGUN, 2007). A primeira análise foi a avaliação do raio de giro (R_g) usando a aproximação de Guinier: para $qR_g < 1$ (GUINIER e FOURNET, 1955). O R_g foi também calculado a partir da função de distribuição de distâncias, $p(r)$, que foi obtida por transformada de Fourier da curva de intensidade utilizando o programa GNOM (SVERGUN, 1992). A função $p(r)$ também fornece a dimensão máxima (D_{max}) da molécula, além disso, uma representação de Kratky da curva de intensidade ($q^2 I(q)$) vs. (q) (FEIGIN e SVERGUN, 1987) foi utilizada para analisar a compacidade da conformação das proteínas em solução.

3.16 Modelagem *ab initio* e de corpo-rígido a partir dos dados de SAXS

Os modelos de baixa resolução para o complexo MEF2C_95/FAT foram restaurados a partir da intensidade das curvas de SAXS utilizando diferentes abordagens. Essas abordagens não fornecem uma solução única, e, portanto, informações complementares são necessárias para tentar obter um modelo. No

caso das proteínas aqui estudadas, as estruturas cristalográficas de alta resolução de alguns domínios dessas proteínas já estão resolvidas e foram aproveitadas aqui. Sendo assim, os modelos apresentados para o complexo foram calculados a partir dos dados de SAXS utilizando um método que combina a técnica de modelagem de corpo rígido com cálculos *ab initio*. A estrutura de alta resolução da parte conhecida da proteína é tratada como corpo rígido, onde tentamos encontrar a melhor posição e orientação dentro do envelope molecular, e a parte desconhecida é simulada com cálculos *ab initio*. O refinamento da estrutura é feito impondo a restrição de que o espalhamento calculado do modelo final deve ajustar os dados experimentais de SAXS. Para verificar a estabilidade dos cálculos, dez cálculos independentes foram realizados para testar a consistência das soluções.

3.17 Mutagênese Sítio-Dirigida

Mutações na proteína FAK_FAT foi realizada usando o Kit de Mutagênese Sítio Dirigida Stratagene QuickChange II XL combinando com primers mutagênicos listados abaixo. Sequências sublinhadas destacam os códons modificados.

FAT_D922A_F: 5' GCCAACCTTGACCGGTCCAATGCCAAGGTATATG 3'

FAT_D922A_R: 5' CATATACCTTGGCATTGGACCGGTCAAGGTTGGC 3'

FAT_E926A_F: 5' CAAGGTATATGCGAATGTGACAGGCCTAGTGAAGG 3'

FAT_E926A_R: 5'CCTTCACTAGGCCTGTCACATTCGCATATACCTTG 3'

FAT_E937A_F: 5' GTGAAGGCTGTCATCGCGATGTCCAGCAAAATC 3'

FAT_E937A_R: 5' GATTTTGCTGGACATCGCGATGACAGCCTTCAC 3'

FAT_E970A_F: 5' GCCACGGTGGATGCGACCATTCCTGCTC 3'

FAT_E970A_R: 5' GAGCAGGAATGGTCGCATCCACCGTGGC 3'

FAT_E996A_F: 5' CTCCGACTTAGGCGCGCTCATCAGCAAGATG 3'

FAT_E996A_R: 5' CATCTTGCTGATGAGCGCGCCTAAGTCGGAG 3'

FAT_D1036A_F: 5' GATGCCAAGAACCTACTTGCCGTTATTGATCAAGC 3'

FAT_D1036A_R: 5' GCTTGATCAATAACGGCAAGTAGGTTCTTGGCATC 3'

O DNA dos plasmídeos pET28aTEV_FAT e pETSUMO_MEF2C95 foram usados como moldes. As mutações foram confirmadas pelo sequenciamento de DNA. Para a expressão e purificação das proteínas recombinantes foi utilizada a mesma metodologia para a expressão e purificação das proteínas recombinantes selvagens previamente descrita no item 3.9.

3.18 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) e estudos de desenovelamento.

Os experimentos de CD foram realizados com as proteínas FAK_FAT selvagem e mutantes. O equipamento utilizado foi o espectropolarímetro Jasco J-180 (JASCO) equipado o módulo Peltier para o controle da temperatura, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 mm. O espectro foi adquirido com a amostra a uma concentração de 10 μ M em 10mM Tris pH 7,5 e 50mM NaCl. As medidas foram coletadas entre 195 e 260 nm usando uma varredura de 50 nm/min, com tempo de resposta 4 segundos, 10 acumulações e intervalo de 60 segundos para os dados coletados. Para a desnaturação térmica, a amostra foi submetida ao aquecimento gradual (20°C-100°C por 90 minutos) e a estabilidade térmica da proteína foi monitorada pela perda da intensidade no comprimento de onda de 222 nm (pico negativo característico das proteínas que possuem α -hélices).

3.19 Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA ou gel shift)

3.19.1 Marcação da sonda de DNA

Oligonucleotídeos sintéticos foram desenhados e encomendados na escala de 25 nmol. A molécula de DNA compreende a uma sequência de 20 pares de base (pb), presente no promotor do gene MCK (creatina quinase muscular) que contém uma sequência consenso de reconhecimento e ligação do fator de transcrição MEF2C (CSERJESI et al., 1994).

MCK_SENSE: 5' GAT CCT CTA AAA ATA ACC CT 3'

MCK_ANTISENSE: 5' AGG GTT ATT TTT AGA GGA TC 3'

Os oligonucleotídeos foram anelados à 95°C por 15 minutos, com resfriamento gradual. Aproximadamente 5 pmol dos oligonucleotídeos anelados foram marcados radioativamente pela reação de preenchimento com a enzima T4 Polynucleotide Kinase (T4-PNK) (Promega) com dATP, [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP (3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer, USA), por 30 minutos à 37°C. A sonda marcada foi purificada em coluna de Sephadex G-25 (sigma-aldrich) de acordo com as instruções do fabricante.

3.19.2 Reação de ligação e eletroforese do complexo DNA/Proteína

Para o ensaio de EMSA, cerca de 10 μM de proteína MEF2C_95 purificada, foi incubada com 0,1 μM de DNA fita dupla marcada com dATP, [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP (3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer, USA), por 20 minutos à temperatura ambiente. Após 20 minutos de incubação do MEF2 ao DNA, realizamos a incubação por mais 20 minutos com a proteína FAT, nas concentrações de 0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 100 μM e 300 μM . Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 4%, em tampão TBE (89mM Tris HCl; 89mM Ácido Bórico; 2mM EDTA, pH8,0) a 80V por 2 horas, 4°C. A especificidade da reação foi verificada através de ensaios de competição utilizando sonda competidora não marcada em excesso (100 vezes molar).

3.20 Ensaio com gene repórter

O vetor 4xMEF2-LUC foi gentilmente cedido por Eric Olson (University of Texas, Southwestern Medical Center). Esse vetor contém 4 sítios de ligação para MEF2 e expressa a proteína *firefly luciferase*. Portanto, a atividade transcricional de MEF2 foi avaliada indiretamente pela razão entre a atividade de *firefly*

luciferase pela atividade de *Renilla luciferase*, co-transfectado junto com o gene repórter 4xMEF2-LUC como controle da transfecção.

Os plasmídeos foram transfectados em cultura de mioblastos C2C12 com aproximadamente 90% de confluência. Além dos plasmídeos contendo o gene repórter 4xMEF2-LUC e do normalizador RENILLA, as células foram transfectadas com vetores para a superexpressão das proteínas MEF2C *full length*, FAK *full length*, domínio FERM da FAK e domínio C-terminal da FAK. A leitura da atividade de luciferase foi avaliada após 48 horas de transfecção.

As células C2C12, cultivadas em placas 48 well (100 mm²) contendo 5*10⁴ células foram transfectados com 1,5 µg do gene repórter (4xMEF2-LUC) e dos plasmídeos para a superexpressão das proteínas recombinante, e com 0,2 µg de plasmídeo contendo o promotor SV40 fundido ao gene da luciferase de *renilla* usando 1 µl de LipofectamineTM (Invitrogen) em meio DMEM (volume final 50 µl) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas por 5 horas em 0,5 mL de meio DMEM puro sem antibióticos. Após este período, foi adicionado 0,5 mL de DMEM contendo 20% de soro fetal bovino, sem remoção do meio de transfecção. A atividade de luciferase foi medida através do uso de luminômetro após 48 horas da transfecção.

3.21. PCR em tempo real para detecção quantitativa de mRNAs

O RNA celular total foi extraído e a detecção e quantificação da expressão dos genes de interesse foram analisadas por *Sybr Green qRT-PCR*. As amostras de RNA total (2µg) passaram por experimentos de transcrição reversa (RT-PCRs) à 42°C por 1 hora com 1µg de *oligo(dT) primer(Invitrogen)* e transcriptase reversa *Superscript II*. As reações de PCR foram montados utilizando-se o *Brilliant SYBR Green qPCR Master Mix (Stratagene)*. As reações foram realizadas utilizando-se o programa *SYBR Green (with Dissociation Curve)* no *Mx3000Pro Comparative QuantitativePCR System (Stratagene)*. Os parâmetros para os ciclos foram os seguintes: 95°C for 10min e em seguida 30 ciclos de 95°C (30s), 55°C ou 60°C (45s), e 72°C (30s) seguido por análise da curva de anelamento.

Todas as reações foram normalizadas com o marcador de referência. Os valores do limiar médio do ciclo foram utilizados para as análises, sendo que todos eles foram normalizados pelos níveis de expressão do mRNA do GAPDH.

3.22. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura foram submetidos ao tratamento com vírus por 48 horas. Após isso, as células foram lavadas e fixadas com solução de Glutaraldeído 2,5% em Tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4 com 0,5% de ácido tânico durante 2 horas a 4°C. A seguir:

1. Lavagem em tampão Cacodilato 0,1M três vezes durante 5 minutos cada à temperatura ambiente.
2. Pós-fixação em Tetróxido de Ósmio 1% em tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4 durante 1 hora à 4°C
3. Lavagem com tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4 - três vezes durante 5 minutos cada à 4°C.
4. Desidratação em Etanol

Etanol 70%.....20 min. (4° C)

Etanol 95%.....20 min temp.

Etanol 100%.....2X-20 min

5. Embebição em Resina Epóxi EPON 812

Resina:Etanol1:3 – 1-2 horas

Resina:Etanol1:1 – 02 horas

Resina:Etanol3:1 – 16 horas

Resina Pura12 horas -2x

Resina PuraPara polimerizar- Estufa 60°C

6. Polimerização em estufa 60°C, durante 72 horas

7. Remoção do suporte plástico+laminula de vidro da resina. Foi feita uma triagem prévia da monocamada ao microscópio invertido.

8. Obtenção de cortes ultra-finos de 70nm paralelos às superfícies das monocamadas celulares, com emprego de Ultramicrotomo Leica (modelo UCT- Leica Áustria) e faca de diamante (Diatome- USA). Coleta de cortes ultra-finos em “*grids*” de Cobre de 200 mesh.

9. Contrastação com acetato de uranila durante 20 minutos e posteriormente com citrato de chumbo, durante 10 minutos.

10. Observação e análise ao Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906 (Leica – Alemanha) operando com tensão aceleradora de 60kV e equipado com sistema de captura de imagens digitais Morada (Gatan-USA).

3.23 Partículas Adenovirais e Lentivirais

No presente estudo, as partículas adenovirais de MEF2C (Ad-MEF2C) e do controle β -Galactosidade (Ad- β -Gal) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jeffery Molkentin (*University of Cincinnati*) e utilizado conforme descrito em (Xu et al., 2006).

As partículas lentivirais para FAK (Lent-FAK) e para o controle GFP (Lent-GFP) foram produzidas pelo Laboratório de vetores virais do LNBio / CNPEM / MCTi, utilizando plasmídeos de transferência FUGW (Lois et al., 2002), que foram co-transfectados com sistema de empacotamento para envelope de VSV-G (*vesicular stomatitis virus glycoprotein*). As preparações contendo genes repórteres foram tituladas por citometria de fluxo (BAJGELMAN et al., 2003).

3.24 Dinâmica Molecular

Os complexos moleculares para o domínio FAT e MEF2 foram construídos utilizando um sistema de restrição entre os resíduos de lisina ligados pelo reagente de DSS entre estruturas cristalográficas 1K40 e 3KOV. Estas estruturas foram submetidas a minimização de energia e simulação de dinâmica molecular usando o programa YASARA. Para isso, todos os átomos de hidrogênio e outros átomos ausentes do modelo foram criados usando parâmetros do campo de força YAMBER3. Uma caixa de simulação foi definida em 15 Å em torno de todos os átomos de cada complexo. Protonação foi realizada com base no pH 7. Neutralização da célula foi alcançada preenchendo a caixa com moléculas de água e íons Na/Cl. Uma curta simulação de dinâmica molecular foi realizada para ajustar o solvente, excluindo moléculas de água até que a densidade de água de 0,997 g/ml fosse atingida. Uma minimização de energia usando o algoritmo 'steepest descent' foi realizada até que a velocidade máxima dos átomos caísse abaixo de 2200 m/s. Em seguida, 500 passos de recozimento simulado foram realizados até temperatura do sistema atingir de 0 K. Finalmente, foi executada uma simulação de 20ns a 298 K e distância de corte para átomos não-ligados de 7.86Å. Conformações da estrutura do complexo foram armazenadas a cada 25ps para análise posterior.

3.25 Microarranjo de DNA

As amostras de RNA mensageiro foram hibridizadas em Chips de DNA de *Rattus norvegicus* (Affymetrix, Santa Clara, CA) conforme as recomendações do fabricante. Cada Chip de DNA contém aproximadamente 33 mil sondas representando, portanto, genes transcritos que podem ser analisados simultaneamente com relação a seus respectivos níveis de expressão.

Os Chips foram escaneados (Affymetrix Gene Chip Scanner 3000–7G) e analisados no software ArrayAssist (ArrayAssit x.5, Stratagene, USA) utilizando-se o algoritmo MAS5 para normalização e correção da linha base. Os tratamentos foram analisados sempre em comparação ao tratamento controle Adenovírus β Gal. Dados como genes presentes, induzidos ou reprimidos foram levados em consideração. Todos os genes com nível de expressão (*fold-change*) acima de 2 foram analisados. Cada experimento foi realizado a partir de três réplicas biológicas.

3.26 Análise estatística

As leituras densitométricas dos *immunoblots* foram representadas com o percentual de alteração em relação aos controles. Cada experimento foi realizado com distintas culturas primárias (aproximadamente 70 corações de ratos neonatos foram utilizados por cultura). As comparações estatísticas das leituras densitométricas foram feitas utilizando-se t de *Student* e *one-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni para comparação entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os resultados de atividade de luciferase estão apresentados como média $\pm$ erro padrão dos valores. Esses dados foram analisados usando ANOVA. A diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism versão 4.0.

4. RESULTADOS

Resultados

4.1. Natureza da interação entre o fator de transcrição MEF2C e a quinase de adesão focal FAK.

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a região C-terminal da FAK (resíduos 765-1052) interage diretamente com a região entre os aminoácidos 1-169 do fator de transcrição MEF2C (CARDOSO, 2008). No entanto as características estruturais do complexo MEF2C/FAK bem como a topologia da interação permaneceram inexploradas.

Assim, o primeiro objetivo específico do presente estudo foi definir a estrutura do complexo MEF2C/FAK. Nossa primeira escolha para abordar esse objetivo foi a utilização da técnica de cristalografia de proteínas, por se tratar de uma técnica padrão quando o assunto é a definição de estrutura de complexos proteicos. No entanto, os esforços para a obtenção de cristais do complexo entre as construções de MEF2C e FAK não resultaram até o momento em cristais com difração adequada para a resolução da estrutura cristalográfica do complexo. Os resultados das tentativas estão apresentados no apêndice 01 dessa tese.

Dadas as dificuldades na obtenção de dados por cristalografia optamos por explorar a estrutura do complexo MEF2/FAK por meio de uma combinação de técnicas complementares utilizadas anteriormente pelo nosso grupo (SANTOS et al., 2011). Assim, utilizamos uma combinação de reação cruzada (*cross linking*) associada à espectrometria de massas (CXMS), espalhamento de raios-X a

baixos ângulos (SAXS), dinâmica molecular e mutação sítio dirigida, para definir a estrutura do complexo MEF2/FAK. O uso dessas técnicas em combinação com informações da estrutura individual das proteínas do complexo permite a obtenção de modelos próximo ao real dos complexos proteicos.

Para os ensaios experimentais foram utilizados o domínio FAT da FAK, localizado na região C-terminal, resíduos 904-1052 e a porção N-terminal do MEF2C, resíduos 1-95, compreendendo os domínios MADS BOX e MEF2 da proteína MEF2C. Ambas proteínas foram expressas e purificadas separadamente (cromatografia de afinidade e por cromatografia de troca iônica) (Figura 15_A). Em seguida as proteínas foram incubadas por 16 horas a 4°C e submetidas à cromatografia de exclusão molecular (gel filtração). As proteínas foram co-eluídas (Figura 15_B) e as frações correspondentes ao pico de eluição do complexo FAT/MEF2 (Figura 15_C) foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

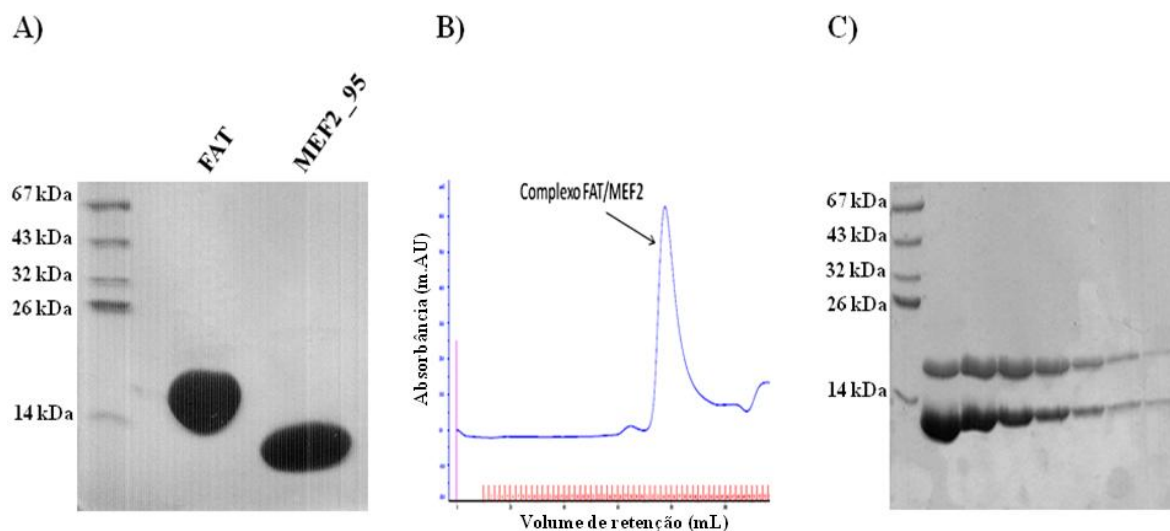
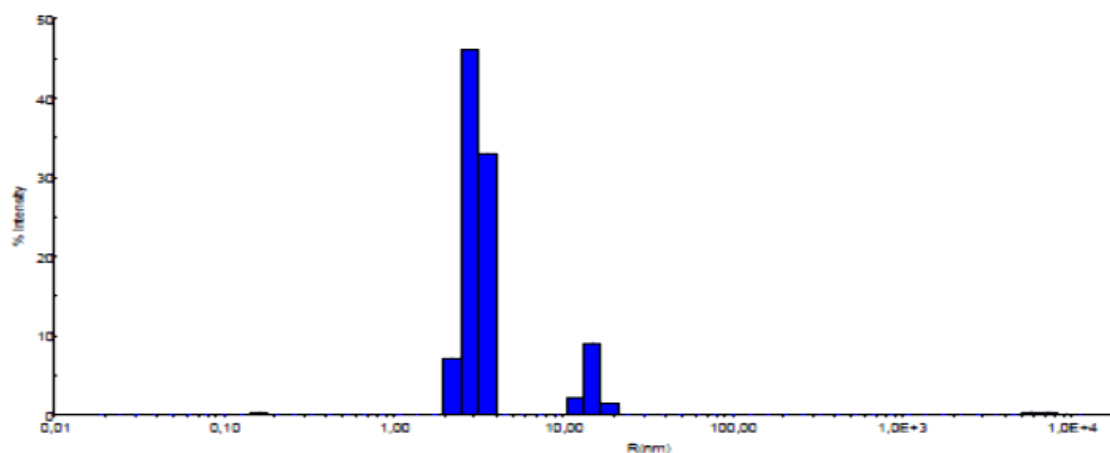


Figura 15 – Co-purificação do complexo MEF2C_95/FAT. **A.** Gel representativo SDS-PAGE 15% das proteínas isoladas FAT e MEF2C_95 após a purificação por afinidade e troca iônica. **B.** Cromatograma representativo da purificação por gel filtração em coluna superdex 75 16/60 do complexo MEF2C_95/FAT, demonstrando o pico em que o complexo é eluído. **C.** Gel representativo SDS-PAGE 15% das frações referentes ao pico de eluição do complexo após purificação por gel filtração.

A qualidade da amostra foi avaliada por espalhamento dinâmico de luz (DLS) para determinação do raio hidrodinâmico do complexo formado, assim como da polidispersividade da amostra. O raio hidrodinâmico do complexo MEF2C_95/FAT, estimado pelo software DYNAMICS v.6.10.1.2 foi de 3,0 nm, indicou polidispersividade de 14,3 % (Figura 16).

A)



B)

	Raio Hidrodinâmico (nm)	% Pd	% Int
Pico 1	0,2	3,1	0,3
Pico 2	3,0	14,3	86,1
Pico 3	14,8	12,6	12,6
Pico 4	6853	17,4	0,9

Figura 16 – Espalhamento dinâmico de luz do complexo MEF2C_95/FAT. **A)** Gráfico em porcentagem de intensidade por raio hidrodinâmico em nanômetro (nm) do complexo. **B)** Tabela que resume os dados experimentais demonstrando que o equipamento detectou 4 espécies, sendo pico 1 tampão, pico 2 o complexo e picos 3 e 4 agregados proteicos, porém em uma quantidade bem baixa, não prejudicando os experimentos subsequentes. %Pd= Porcentagem de polidispersividade da amostra; %Int= Porcentagem de intensidade.

Esses resultados confirmaram o alto grau de pureza, solubilidade e monodispersividade da amostra e permitiram a realização dos experimentos seguintes.

4.1.1 Ensaio de reação cruzada (*cross linking*) associada à espectrometria de massas (CXMS)

Assim, o complexo MEF2C_95/FAT foi utilizado em experimentos de CXMS para a identificação dos resíduos de aminoácidos que participam da interação entre MEF2C_95/FAT. Para isso, as amostras do complexo provenientes da purificação por gel filtração, foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com o agente de ligação cruzada *Disuccinimidyl suberate* (DSS, Sigma-Aldrich) em excesso de 100 vezes em relação ao complexo MEF2C_95/FAT. O DSS estabiliza o complexo proteico por meio de ligações cruzadas entre os resíduos de lisina das proteínas. A formação do complexo MEF2C_95/FAT foi confirmado por meio de SDS-PAGE, como indicado na Figura 17.

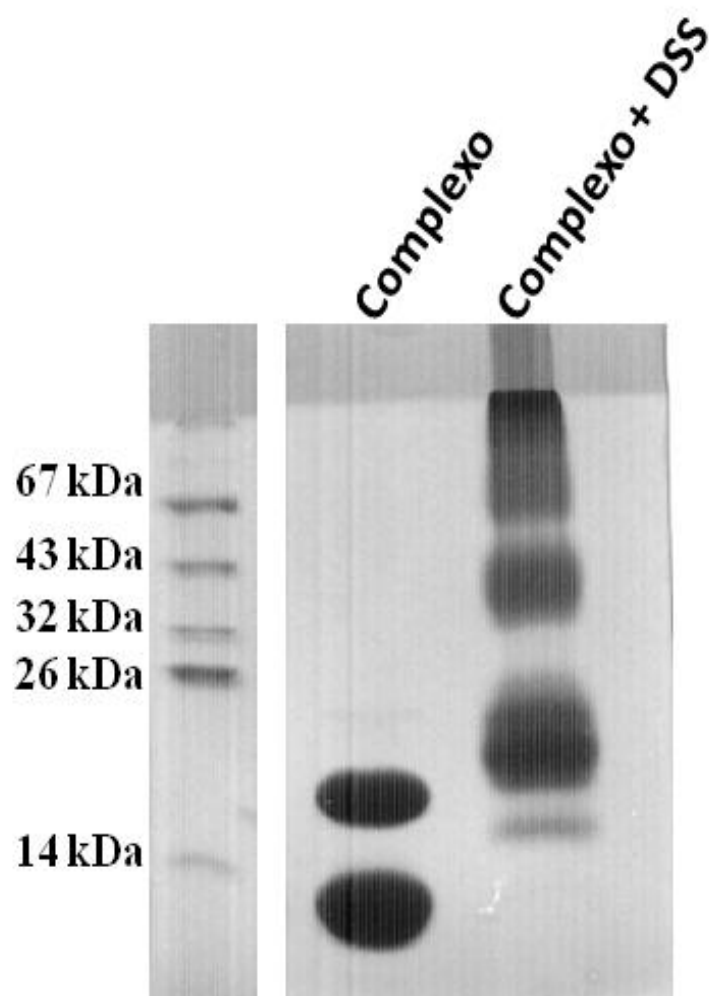


Figura 17 – Gel representativo SDS-PAGE 15% do complexo MEF2C_95/FAT antes e depois da incubação com o reagente de ligação cruzada (DSS).

Em seguida, a amostra foi submetida à digestão trípica por 16 horas à 37°C. Os peptídeos trípticos foram concentrados, separados por ultracromatografia líquida de alta pressão e a razão massa/carga dos peptídeos foi obtida por espectrometria de massas (Figura 18).

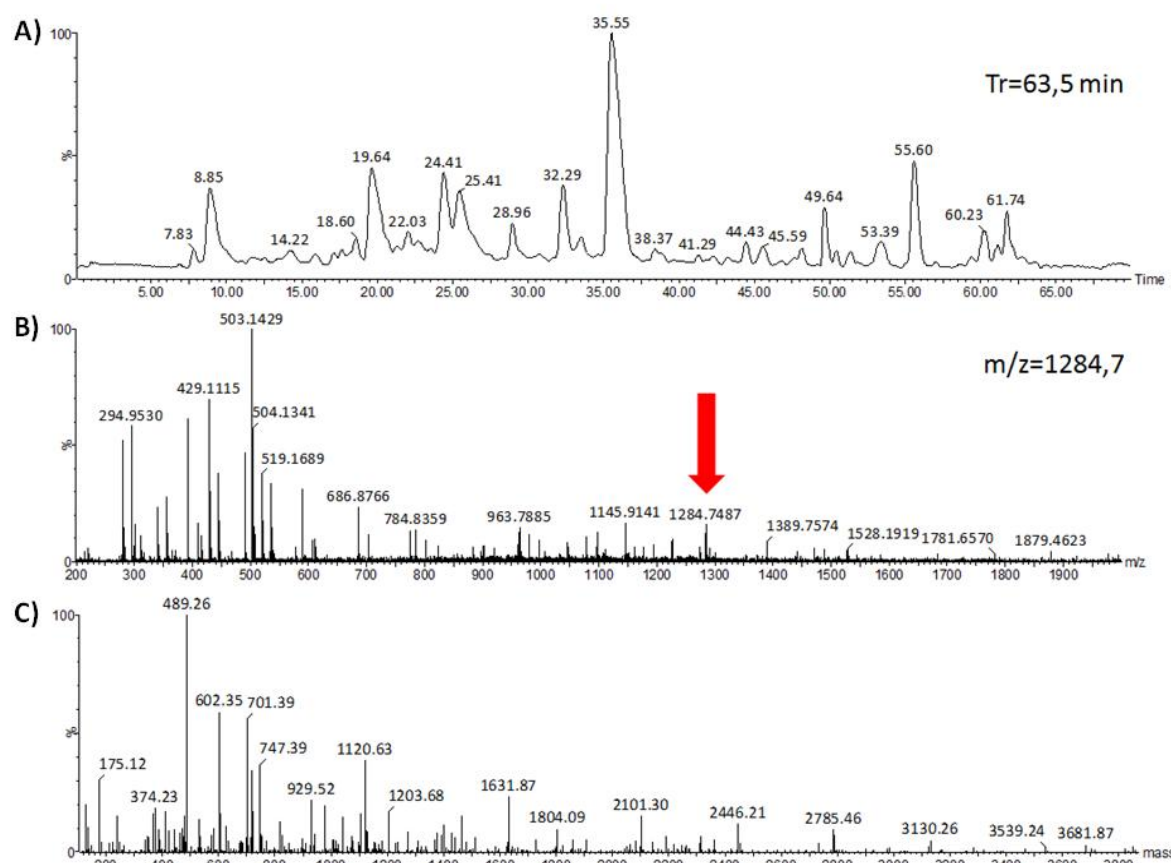


Figura 18 – A). Corrida cromatográfica, dos peptídeos originados do complexo MEF2C_95/FAT após a incubação com o DSS e após a digestão com tripsina. **B)** O espectro de MS da amostra eluída com tempo de retenção (Tr) de 63,5 minutos. Seta indica o íon de razão massa carga (m/z) de 1284,7 que contém os peptídeos intermoleculares entre FAT (lisina 130) e MEF2C_95 (lisina 23) ligadas pelo reagente DSS. **C)** Espectro de MS/MS do íon $m/z=1284,7$.

A análise dos espectros de MS/MS permitiram a identificação de foi possível identificar 3 pares de peptídeos híbridos de MEF2C_95 e FAT. As lisinas 4, 5 e 23 da proteína MEF2C_95 ligaram-se, respectivamente, às lisinas 31, 86 e 130 da proteína FAT. Essas lisinas do domínio FAT correspondem, respectivamente, às lisinas 933, 988 e 1032 na proteína FAK selvagem. A ligação

entre lisinas pelo reagente DSS é um indicativo de que estes peptídeos estão localizados na interface de interação entre FAT e MEF2C a uma distância entre 5 e 12 Å. Os espectros de MS/MS dessas 3 espécies de peptídeos intermoleculares, entre o domínio FAT da FAK e MEF2C_95 estão representados nas figura 19, 20 e 21.

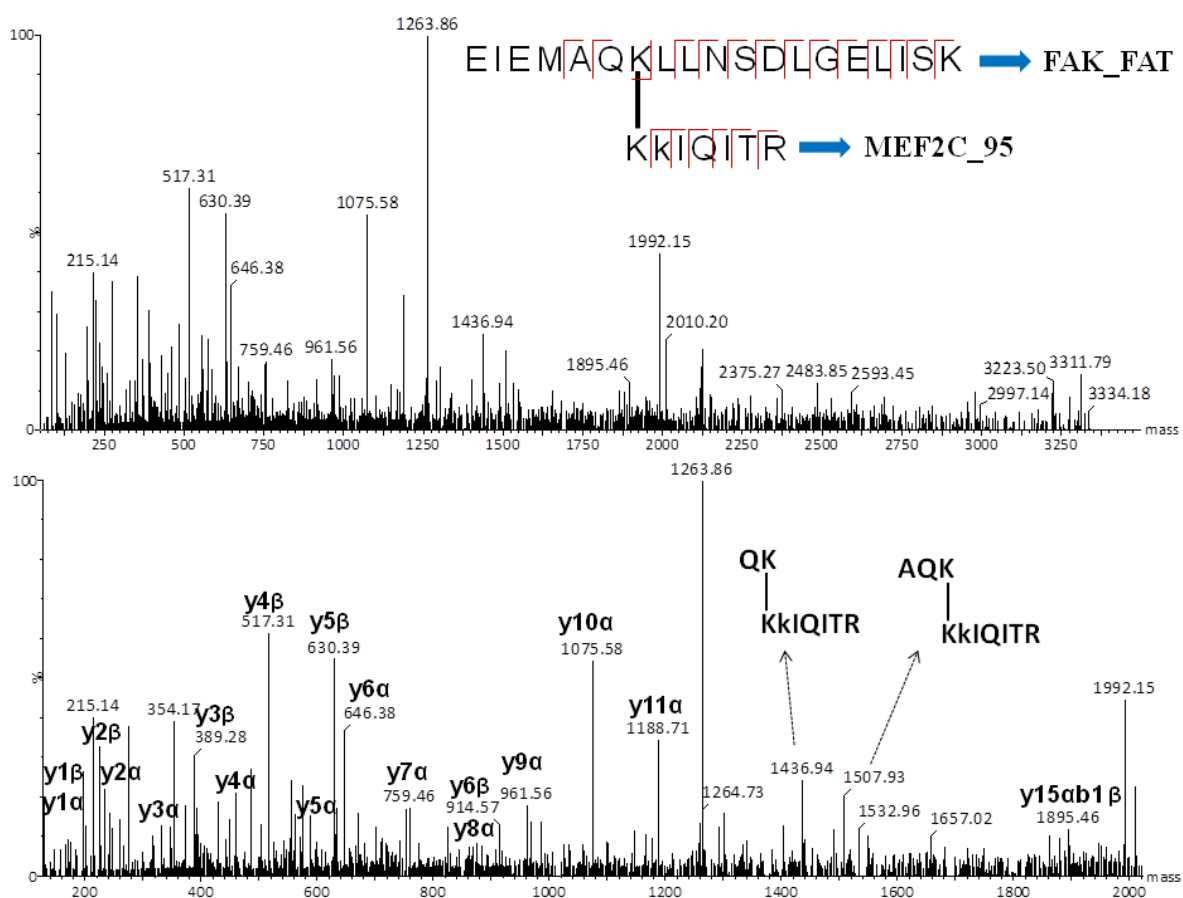


Figura 19 – Espectros de ESI-MS/MS de espécies inter-moleculares entre a proteína MEF2C_95 (lisina 4) e o domínio FAT da FAK (lisina 31). O painel superior demonstra o espectro de MS/MS do íon precursor e o painel inferior demonstra a atribuição dos íons identificados da cadeia α (EIEMAKLLNSDLGELISK) pertencente ao domínio FAT da FAK e a cadeia β (KKIQTIR) pertencente à proteína MEF2C_95.

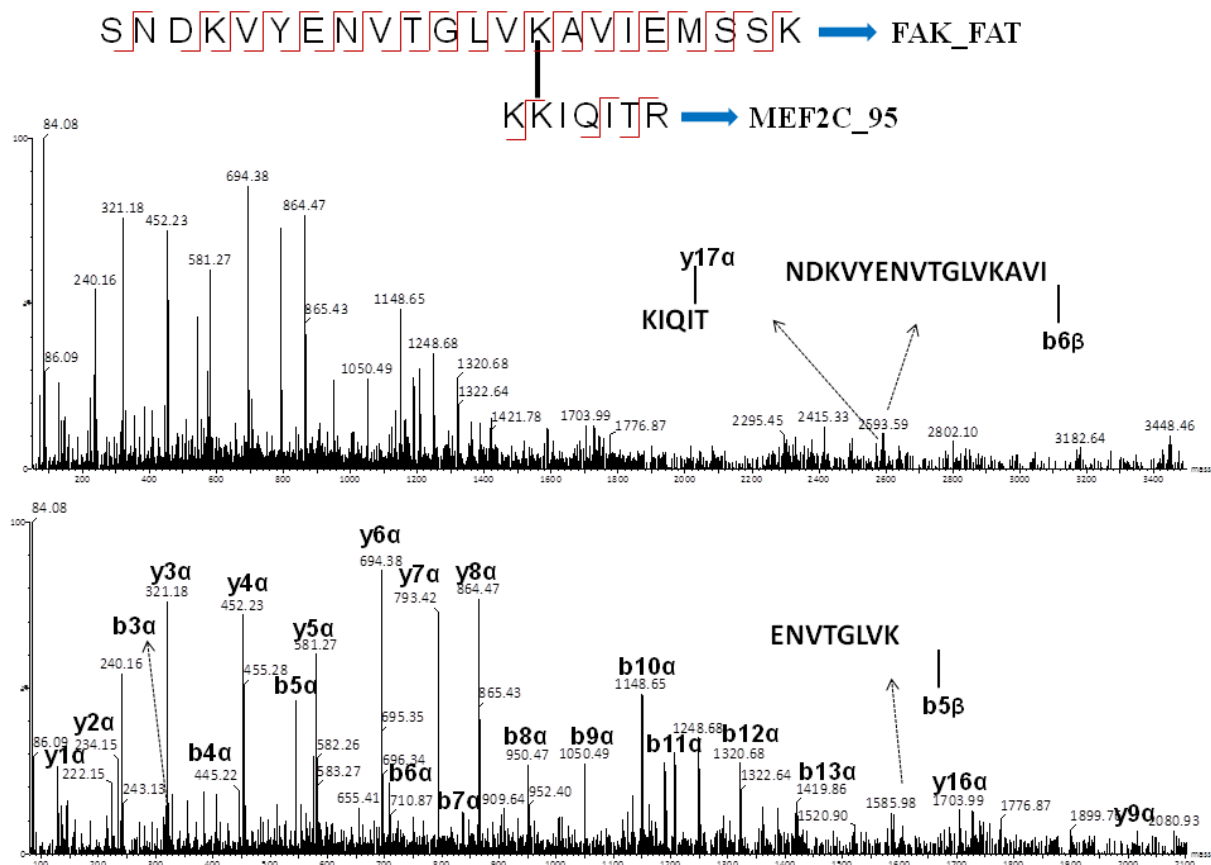


Figura 20 – Espectros de ESI-MS/MS de espécies inter-moleculares entre a proteína MEF2C_95 (lisina 5) e o domínio FAT da FAK (lisina 86). Os espectros representam a atribuição dos peptídeos ligados pelo DSS. Cadeia α (SNDKVYENVNTGLVKAVIEMSSK) pertencente ao domínio FAT da FAK e a cadeia β (KKIQITR) pertencente à proteína MEF2C_95.

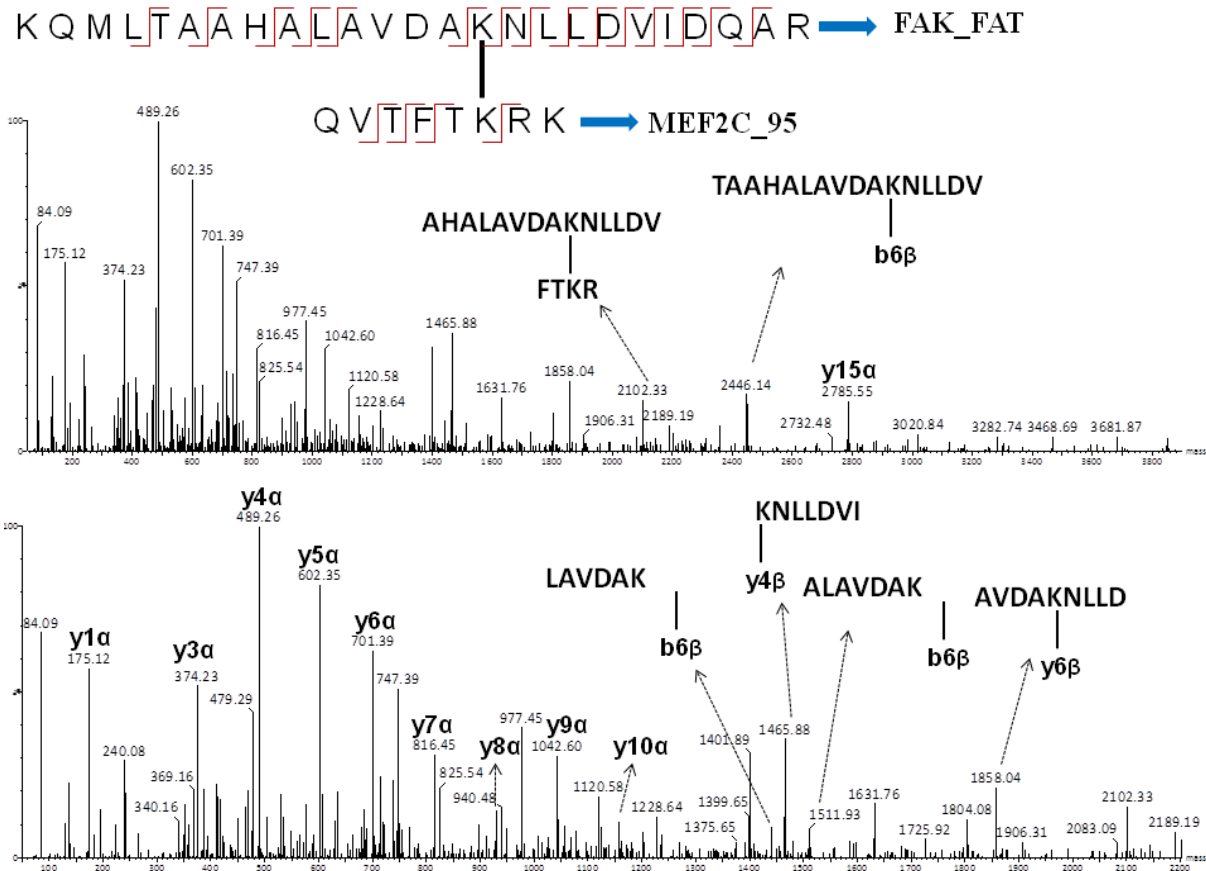


Figura 21 – Espectros de ESI-MS/MS de espécies inter-moleculares entre a proteína MEF2C_95 (lisina 23) e o domínio FAT da FAK (lisina 130). Os espectros representam a atribuição dos peptídeos ligados pelo DSS. Cadeia α (KQMLTAAHALAVDAKNLLDVIDQAR) pertencente ao domínio FAT da FAK e a cadeia β (QVTFTKRK) pertencente à proteína MEF2C_95.

Com base nos espectros de MS/MS identificados, contendo os peptídeos intermoleculares ligados pelo DSS, foi possível construir um mapa de proximidade espacial para o complexo MEF2C_95/FAT. A Figura 22 resume todas as espécies encontradas nos experimentos de LC-MS/MS dos peptídeos formados nos experimentos de ligação cruzada para o complexo MEF2C_95/FAT. As lisinas

MEF2

MGRKKIQITRIMDERNRQVTFTKRKFGLMKKAYELSVL

CDCEIALIIFNSTNKLQYASTDMDKVLKKYTEYNEPHES

RTNSDIVEALNKKENKG

MEF2

MGRKKIQITRIMDERNRQVTFTKRKFGLMKKAYELSVL

CDCEIALIIFNSTNKLQYASTDMDKVLKKYTEYNEPHES

RTNSDIVEALNKKENKG

MLQPQEISPPPTANLDRSNDKVYENV TGLVKAVIEMSSKIQPAPPEEYVPMVKEVGLALRTLATVDETIPALPAST

HREIEMAQKLLNSDLGELISKMKLAQQYVMTSLQQEYKQMLTAHALAVDAKNLDDVIDQARLKMLGQTRPH

FAT

Para a determinação da região de interação e a criação do modelo molecular do complexo, utilizamos como molde as estruturas cristalográficas da proteína MEF2A ligada ao DNA (código PDB: 3KOV) e do domínio FAT da FAK (código PDB: 1K40). A porção entre os aminoácidos 1-95 da proteína MEF2A apresenta uma identidade na sequência primária de aminoácidos de 99% com a proteína MEF2C.

Baseado em nossos dados de CXMS e nos dados de SAXS apresentados a seguir, observamos que a proteína MEF2C_95 interage na forma dimérica com a proteína FAT, devido à localização dos pares de peptídeos híbridos na estrutura cristalográfica de MEF2. Portanto a criação do modelo foi gerado utilizando a proteína MEF2 em seu estado dimérico, mesmo estado oligomérico adotado em relação a interação com o DNA.

Portanto, a partir das informações obtidas por meio de CXMS foi possível criar um modelo molecular do complexo MEF2C_95/FAT que satisfizesse as restrições de distância entre as proteínas impostas pelo DSS. Portanto, baseado nos parâmetros de restrição de distância e dados de trajetória de dinâmica molecular, foram obtidos pelo menos três modelos diferentes.

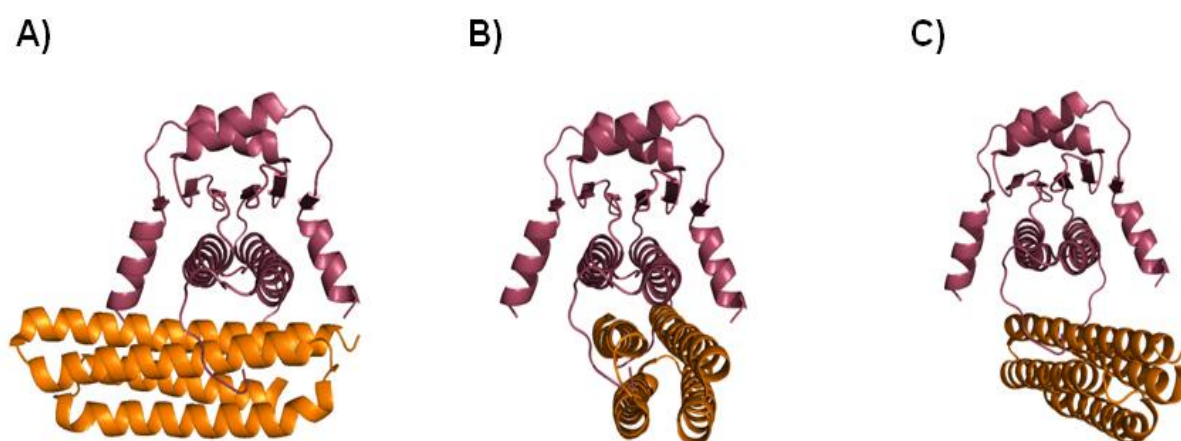


Figura 23 – A-C: Representação em fitas de três possíveis modelos da interação entre FAT e MEF2C_95, baseado nos ensaios de reação cruzada. Todas as três posições adotadas pelo FAT respeitam as distâncias entre os resíduos de lisina identificados pelo experimento de CXMS.

Dessa forma, foi necessário buscar novos métodos que permitissem determinar qual a conformação mais provável do complexo. Assim, utilizamos a técnica de Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo (SAXS) que permite a obtenção do envelope molecular, combinado com estudos computacionais de dinâmica molecular.

4.1.2 Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo (SAXS)

O Espalhamento de Raios-X a Baixo Ângulo é uma técnica que possibilita a obtenção de informações a respeito da forma e parâmetros estruturais de proteínas em solução. Um importante parâmetro que a técnica de SAXS fornece é o raio de giro do complexo, um parâmetro de tamanho independente da forma. Além disso, é possível calcular, por meio da transformada de Fourier da curva de espalhamento, a função de distribuição dos pares de distância ($p(r)$), o que nos permite obter informações a respeito do envelope molecular do complexo de uma maneira mais intuitiva. Para a realização desta técnica, as amostras do complexo provenientes purificação por gel filtração, na concentração de 4 mg/ml em tampão contendo 50mM Tris pH 7,5; 150mM NaCl e 2mM DTT, foram expostas ao feixe de raios X, ocorrendo então o fenômeno de espalhamento de luz pelos elétrons do complexo proteico. Dado que o espalhamento a baixo ângulo de uma amostra de proteínas em solução é isotrópico, os dados bidimensionais foram integrados para a obtenção de uma curva de intensidade unidimensional em função do módulo do

vetor de espalhamento (Figura 24_A). O ajuste teórico da curva experimental de espalhamento usado para o cálculo da função $p(r)$ é mostrado em vermelho na Figura 24_A e a função $p(r)$ correspondente na Figura 24_B. Através dessa função observa-se que o complexo apresenta-se globular contendo uma porção levemente alongada. O raio de giro do complexo obtido destas funções foi de $23,0 \pm 0,4 \text{ \AA}$ e a dimensão máxima foi de $\sim 80 \text{ \AA}$.

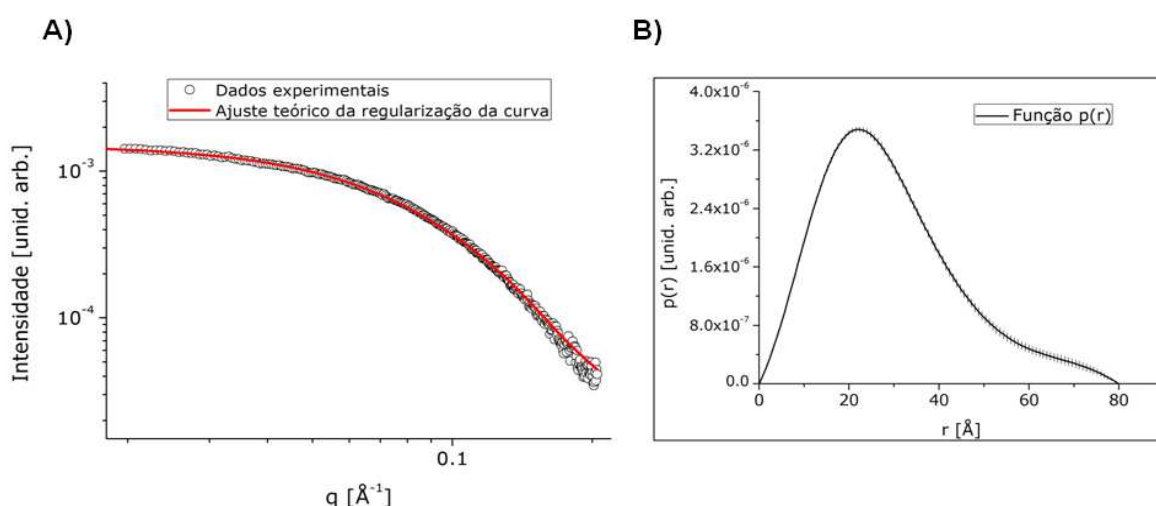


Figura 24 – Dados de SAXS do complexo MEF2C_95/FAT. **A.** Curva de intensidade de espalhamento em função do módulo do vetor de espalhamento ($q = (4\pi \sin \theta) / \lambda$). Os círculos abertos representam os dados experimentais do espalhamento e a linha sólida, em vermelho, o ajuste teórico calculado para a obtenção da função $p(r)$. **B.** Função de distribuição dos pares de distância ($p(r)$).

Conforme descrito na tabela 01, nos experimentos de SAXS, a massa molecular experimental calculada do complexo foi de aproximadamente 42 kDa. Conforme descrito nos resultados de CXMS e observado nos ensaios de SAXS, a estequiometria da interação do complexo ocorre entre o dímero de MEF2C_95 e monômero de FAT. A diferença de massa de aproximadamente 2 kDa entre a

massa molecular teórica (~40 kDa) e a experimental (~42 kDa) está dentro do erro experimental da técnica que gira em torno de 10% do valor teórico.

Portanto, tabela 01 resume alguns dados teóricos e experimentais do ensaio de SAXS.

Tabela 01 – Dados teóricos e experimentais de SAXS das proteínas FAT e MEF2C_95 isoladas e em complexo.

	FAT	MEF2C_95	Complexo MEF2C_95/FAT
Número de Aminoácidos	152	98	348
Massa Molecular Teórica	16837	11506	39849
Massa Molecular Experimental			~41800
Estado Oligomérico			2 MEF2 : 1 FAT
Concentrações			2,16 mg/ml e 1,08 mg/ml

A partir dos dados de SAXS o modelo do complexo formado entre MEF2C_95 e o domínio FAT da FAK foi obtido por meio da técnica de modelagem de corpo rígido (20 cálculos independentes). Os pares de lisinas identificados pela técnica de CXMS foram utilizados como condições de contato na modelagem. A estabilidade dos cálculos foi analisada por meio da Discrepância Espacial Normalizada (NSD). Os valores de NSD dos vinte modelos obtidos variaram de 0,97 a 1,09 (média de 1,04), indicando a estabilidade dos cálculos e a semelhança entre os modelos. O modelo com o menor valor de NSD, o qual representa a solução mais típica, é apresentado na Figura 25_A-C. O gráfico da Figura 25_D

apresenta o ajuste do cálculo teórico do espalhamento desse modelo aos dados experimentais de SAXS.

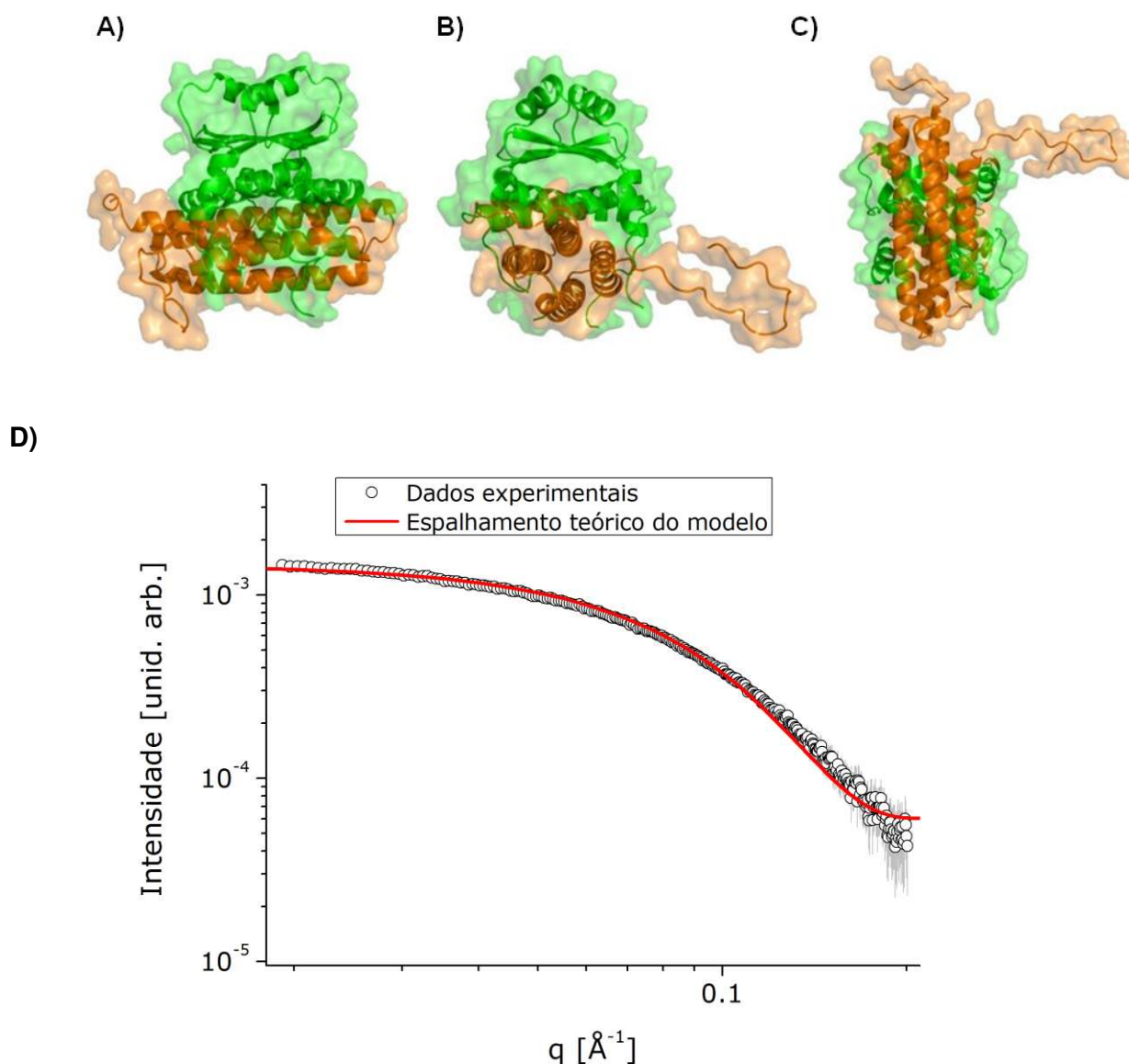


Figura 25 – Modelo do complexo MEF2C_95/FAT obtido por modelagem de corpo rígido baseado nos dados de SAXS. **A-C**). Três visões ortogonais do modelo do complexo MEF2C_95/FAT, onde FAT está mostrado em laranja e MEF2C_95, em verde. **D**). Curva de intensidade de espalhamento pelo ângulo. Os círculos abertos representam os dados experimentais de espalhamento e a linha sólida, em vermelho, o ajuste calculado a partir do modelo de corpo rígido apresentado em A.

O modelo de SAXS foi submetido a dinâmica molecular por 20 nanosegundos para ajustar o posicionamento do domínio FAT e também para corrigir possíveis choques estéricos de cadeia lateral entre as duas proteínas. O modelo da Figura 26 combina as informações de reação cruzada acoplada à espectrometria de massas (CXMS), dados experimentais de SAXS e de dinâmica molecular. Em destaque no modelo, estão representados os pares de lisinas que foram identificadas no experimento de CXMS.

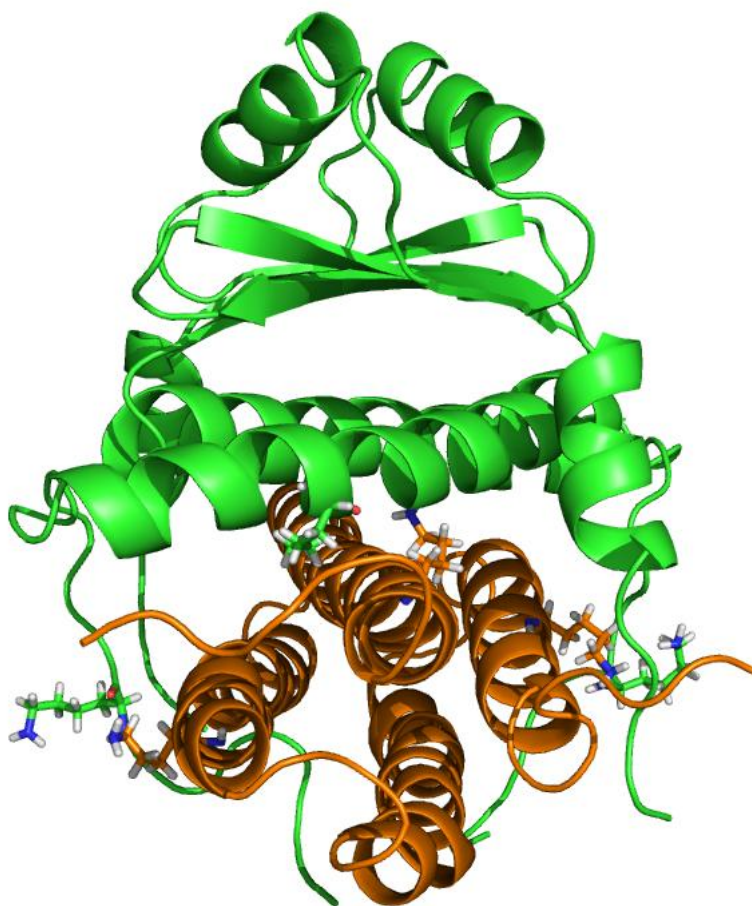


Figura 26 – Modelo do complexo MEF2C_95/FAT e a localização dos pares de lisina identificados no experimento de reação cruzada acoplado à espectrometria de massas (CXMS)

A distância entre as lisinas do modelo de SAXS e dinâmica molecular foram averiguadas por meio do programa Pymol™ versão 1.1 (DeLano Scientific). A Figura 27 demonstra em destaque as lisinas que se ligaram pelo DSS e as distâncias entre esses pares de lisinas.

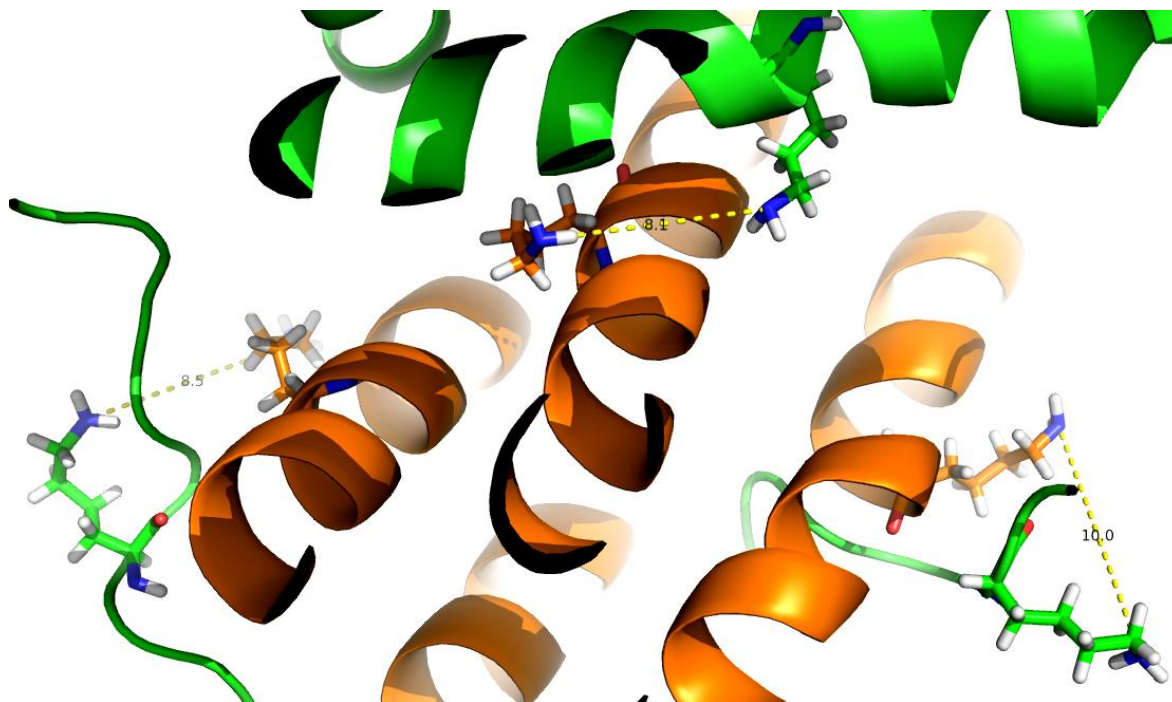


Figura 27 – Distância em *Angstrom* (Å), entre as lisinas identificadas pela técnica de reação cruzada acoplada à espectrometria de massas no modelo do complexo FAT/MEF2. As lisinas que reagiram com o reagente DSS estão em destaque. A distância entre as lisinas são de 8,5 Å entre K105 (MEF2C) com K34 (FAT); 8,1 Å entre K26 (MEF2C) com K133 (FAT) e de 10 Å entre K8 (MEF2C) com K89 (FAT).

Para confirmar os dados experimentais de ligação cruzada, SAXS e dinâmica molecular, ensaios de mutagênese sítio-dirigido foram realizados.

4.1.3 Mutações sítio dirigidas

Para a realização de estudos de mutação sítio dirigidas, foram realizados estudos computacionais para avaliar quais as características da região de interação entre as duas proteínas e identificar quais resíduos são importantes para a interação. A análise da superfície eletrostática da região da proteína MEF2C que interage com o domínio FAT da FAK é carregada positivamente, devido à abundância de resíduos polares básicos, como arginina (R) e lisina (K) (Figura 28_A). Por outro lado, a análise computacional da superfície eletrostática do domínio FAT da FAK, apresenta regiões contendo resíduos polares ácidos, como ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D) (Figura 28_B). Esses resíduos conferem uma carga negativa à superfície molecular que poderia interagir eletrostaticamente com a região positiva do fator de transcrição MEF2C.

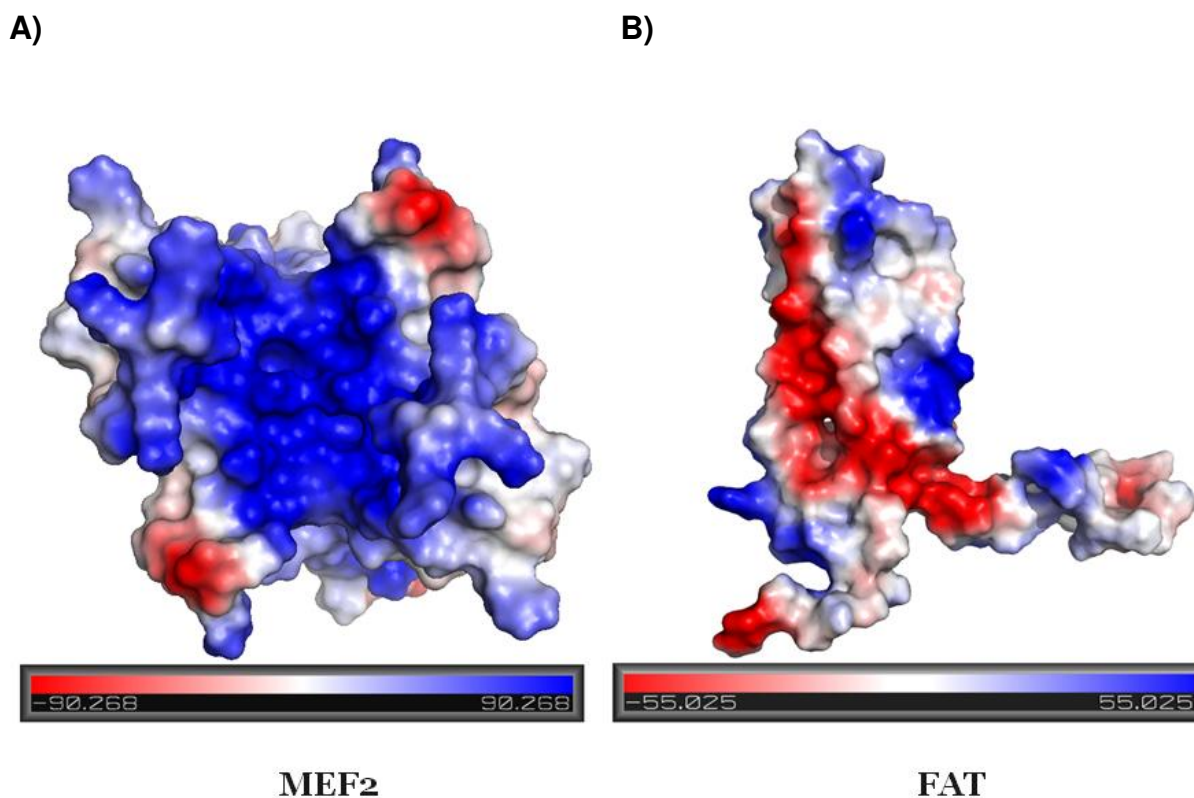


Figura 28 – A-B: Superfícies eletrostáticas das proteínas MEF2C e FAT. A cor em azul demonstra que as características da região são decorrentes da presença de resíduos carregados positivamente (como argininas e lisinas). Já a coloração em vermelho demonstra que a região é rica em resíduos carregados negativamente (ácido glutâmico e ácido aspártico). Em branco, resíduos não carregados.

Com base nessas características e nas análises computacionais, foram escolhidos alguns resíduos na superfície da proteína FAT para serem mutados. Os resíduos mutados estão localizados na superfície do domínio FAT tanto na provável região de interface com a proteína MEF2C_95 como na face oposta para serem usados como controle negativo. Na Figura 29, está demonstrada a localização dos resíduos que foram mutados na estrutura da proteína FAK_FAT.

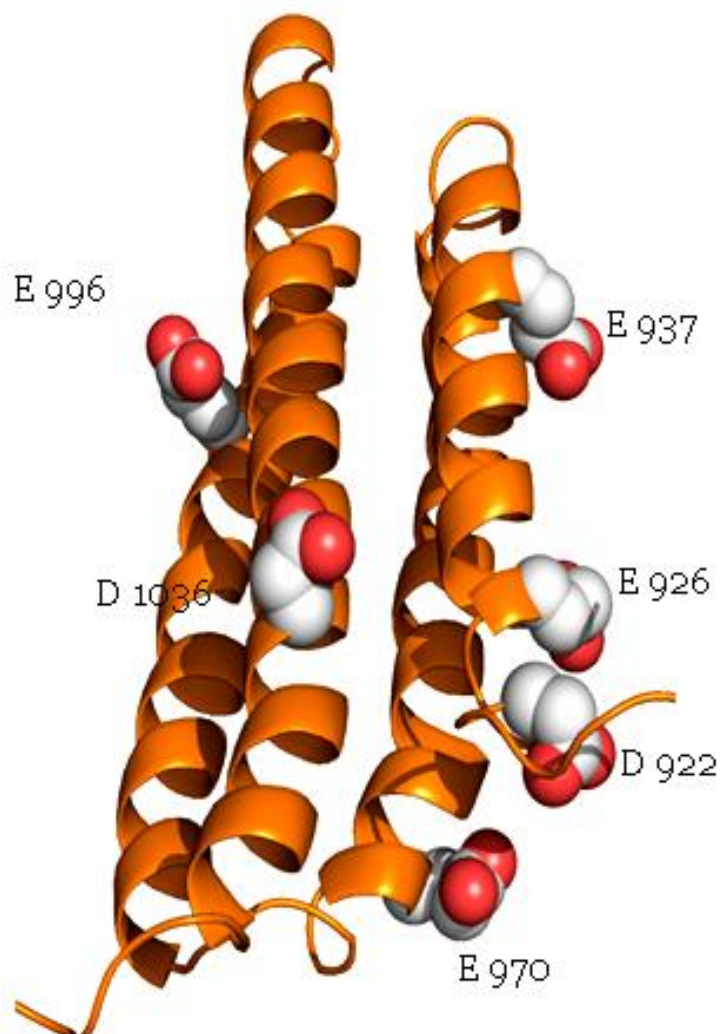


Figura 29 – Estruturas cristalográficas do domínio FAT da FAK mostrando os resíduos que foram mutados.

As mutações foram realizadas substituindo resíduos polares ácidos (na proteína FAK_FAT) pelo resíduo apolar alanina (A). A mutação por resíduos de alanina foi utilizada com o intuito de modificar as características físico-químicas do

resíduo mutado, ou seja, modificando a carga e a hidrofobicidade do resíduo sem modificar a estrutura secundária da proteína.

As proteínas mutadas foram expressas e purificadas conforme descrito no item 3.9 do material e métodos. Para avaliarmos se as mutações realizadas não modificaram a estrutura secundária ou terciária das proteínas, ensaios de dicroísmo circular e curvas de desnaturação térmica foram realizados. Conforme demonstrado nos espectros da Figura 30, fica evidente que o domínio FAT selvagem é composto predominantemente por alfa-hélices, com dois mínimos bem evidentes em 208 nm e em 220 nm. Observamos também que as mutações não alteraram a estrutura secundária da proteína FAK_FAT. Dois mutantes (D922A e E937) ambos na hélice 1, foram os únicos que apresentaram uma discreta alteração na curva de dicroísmo, porém sem diferença significativa quando comparado com a proteína selvagem.

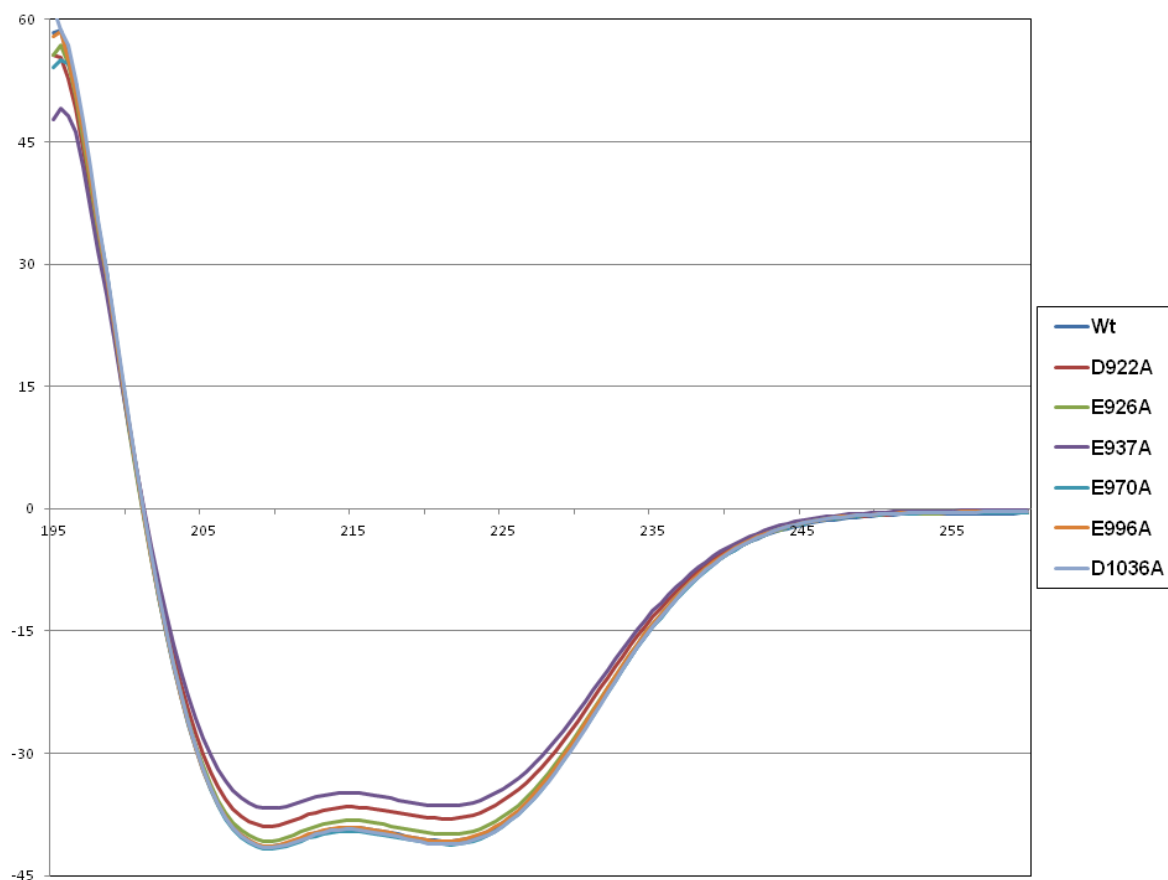


Figura 30 – Dicroísmo Circular da proteína FAK_FAT e de seus diferentes mutantes. Nessas medidas, é possível observar os picos proeminentes nos comprimentos 208 e 222, típicos de α -hélices. As mutações provocaram discreta (mutantes D922A e E937) ou nenhuma alteração (D926, E970, E996 e D1036) na estrutura secundária da proteína quando comparado à proteína FAT selvagem.

Para avaliarmos a termoestabilidade da proteína FAT e para avaliar se as mutações modificaram a estrutura terciária da proteína, utilizamos ensaios de desnaturação térmica. Para isso, a amostra foi submetida ao aquecimento gradual (20°C – 100°C) e realizada a monitoração do comprimento de onda de 222 nm, devido a quantidade de estrutura secundária do tipo α -hélice.

Os dados de desnaturação térmica da Figura 31 revelam que o domínio FAT apresenta apenas um estado de transição na desnaturação e que a perda da estrutura terciária ocorre em torno de 70°C, sendo que por volta de 80°C a proteína encontra-se quase totalmente desestruturada. Além disso, observamos que as diferentes mutações pontuais realizadas ao longo da proteína não provocaram modificações importantes na termoestabilidade da proteína.

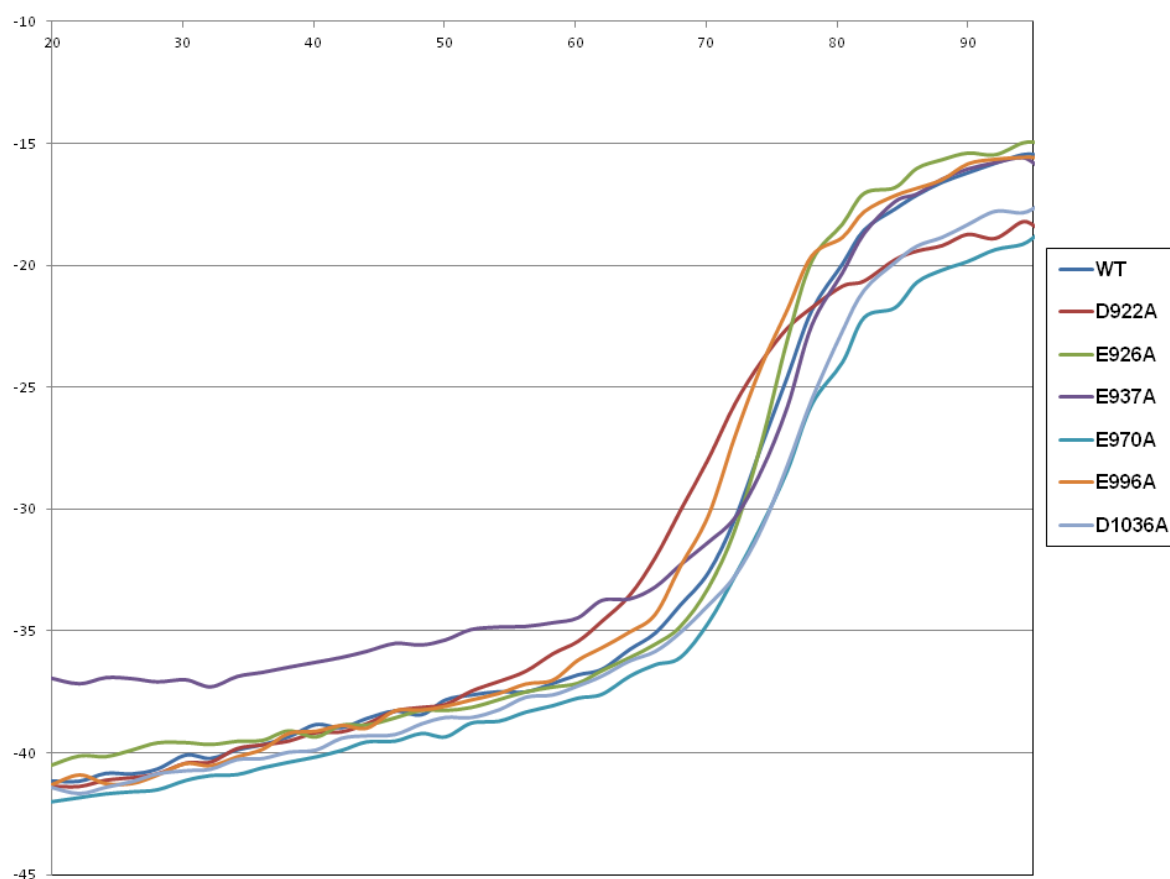


Figura 31 – Espectro da desnaturação térmica da proteína FAK_FAT e dos mutantes. Nota-se que os mutantes apresentaram pouca modificação na estabilidade térmica quando comparado com o selvagem.

Como apresentado na Figura 32, as mutações E926A, E937A e E1036A, presentes nas hélices 01 e 04 do domínio FAT reduziram a interação com GST-MEF2C. Esses dados confirmam os dados de reação cruzada, de SAXS e de dinâmica molecular.

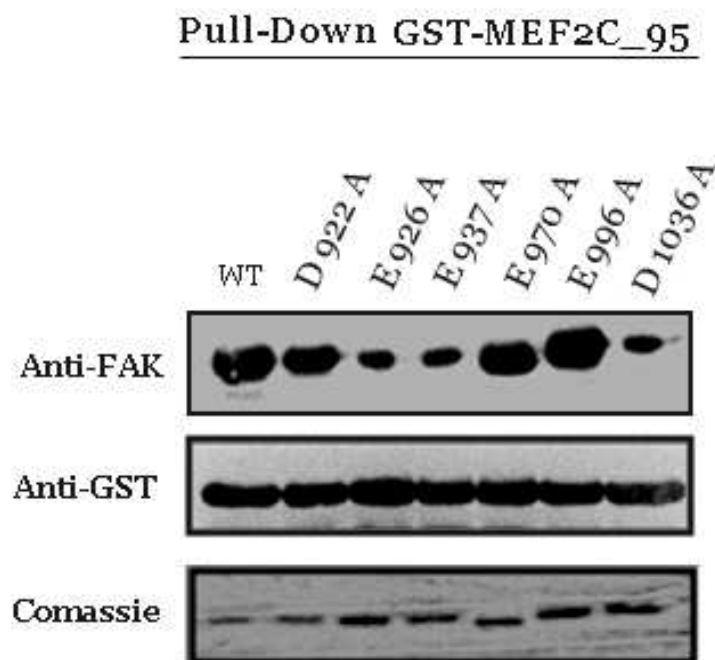


Figura 32 – Ensaio de *pull down* entre GST_MEF2C_95 com FAT selvagem ou mutada nos resíduos D922, E926, E937, E970, E996 e D1036.

A Figura 33 destaca os resíduos de aminoácidos que se mostraram importantes para a interação entre o domínio FAT da FAK e o fator de transcrição MEF2C.

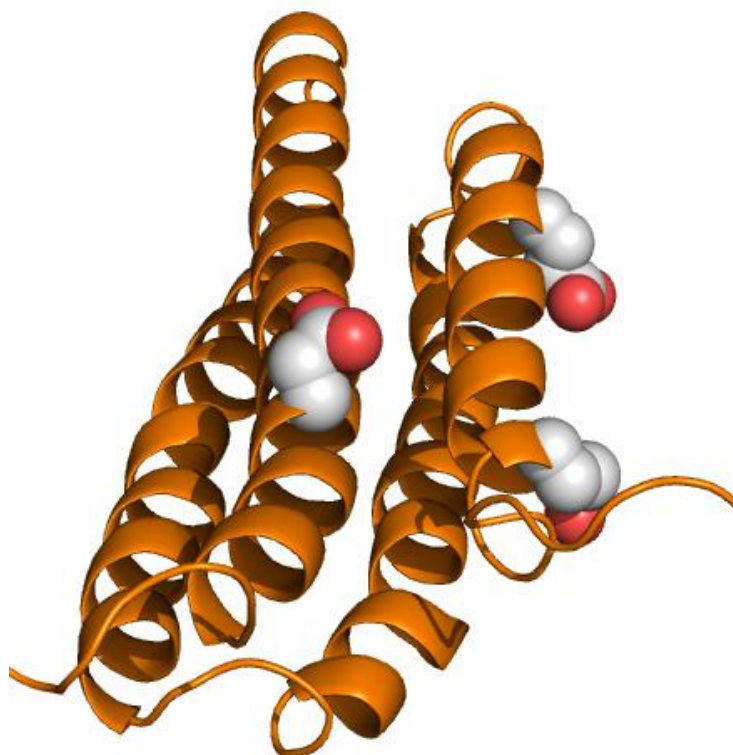


Figura 33 – Superfície do domínio FAT da FAK (PDB:1K40) destacando os resíduos de aminoácidos que são importantes na interação entre FAK_FAT e MEF2C_95.

O complexo MEF2C_95/FAT foi então comparado com o modelo da estrutura cristalográfica do MEF2A associado ao DNA (PDB 3KOV). Nota-se na Figura 34 que a sobreposição entre o modelo contendo o complexo MEF2C_95/FAT e a estrutura cristalográfica de MEF2A ligado ao DNA demonstra que a localização, a disposição e o volume do domínio FAT e do DNA são similares.

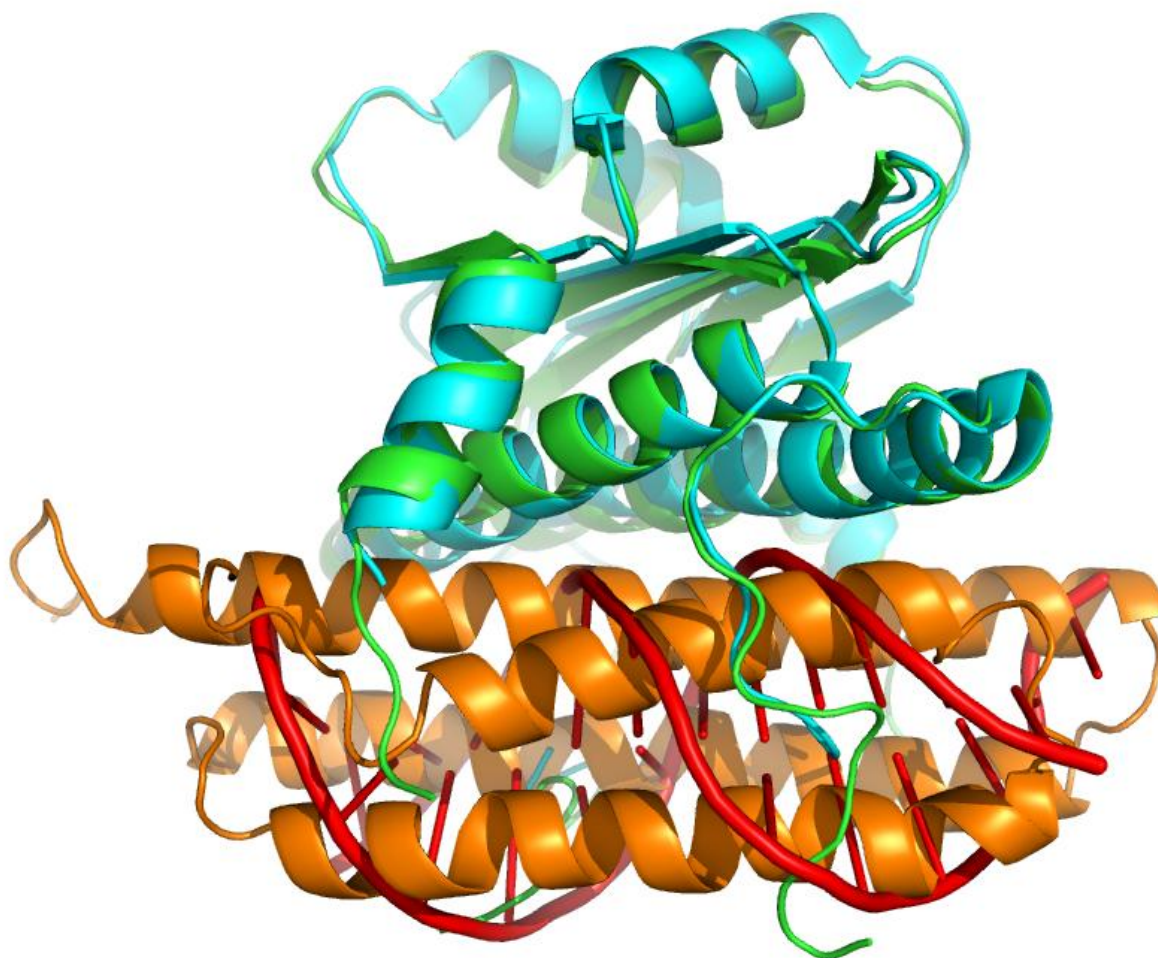


Figura 34 – Sobreposição do modelo de SAXS do complexo MEF2C_95/FAT (verde e laranja) com a estrutura cristalográfica de MEF2A ligado ao DNA (azul e vermelho), demonstrando a similaridade da posição, localização e volume do domínio FAT em laranja, com a dupla fita de DNA em vermelho.

Com base nesses dados, que demonstraram que a região de interação do FAT com o MEF2C compreende exatamente a mesma região de interação de MEF2 com o DNA, ensaios de competição foram realizados para avaliar se a interação entre MEF2C_95/FAT interfere na capacidade de MEF2C ligar-se ao DNA.

4.2. Influência da interação entre FAT e MEF2C na capacidade de MEF2C ligar-se ao DNA.

Uma vez demonstrado que a região de interação de MEF2C com a FAT é a mesma de interação de MEF2 ao DNA, foram realizados ensaios para avaliar se o domínio FAT da FAK é capaz de deslocar a interação de MEF2 ao DNA. Para isso, utilizamos ensaio de gel shift ou EMSA (Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética). Para o ensaio de EMSA, incubamos 10 μ M de proteína MEF2C_95 purificada, com 0,1 μ M de DNA fita dupla marcada com [γ^{32} P]-dATP (3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer, USA), por 20 minutos à temperatura ambiente. A molécula de DNA compreende a uma sequência de 20 pares de base (pb), presente no promotor do gene MCK (creatina quinase muscular) que contém uma sequência consenso de reconhecimento e ligação dos fatores de transcrição MEF2. Após 20 minutos de incubação de MEF2C_95 ao DNA, realizamos a incubação por mais 20 minutos com a proteína FAT, nas concentrações de 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M e 300 μ M. Em seguida, foi realizada a eletroforese por uma hora, 4°C, 80 Volts. Como resultado, observamos que a interação entre o fator de transcrição MEF2C_95 ao DNA diminuiu à medida que foi aumentando a concentração do domínio FAT da FAK. Esse dado demonstra que o domínio FAT da FAK foi capaz de competir com o DNA pela interação com MEF2C_95 e de deslocar a interação entre MEF2/DNA (Figura 35).

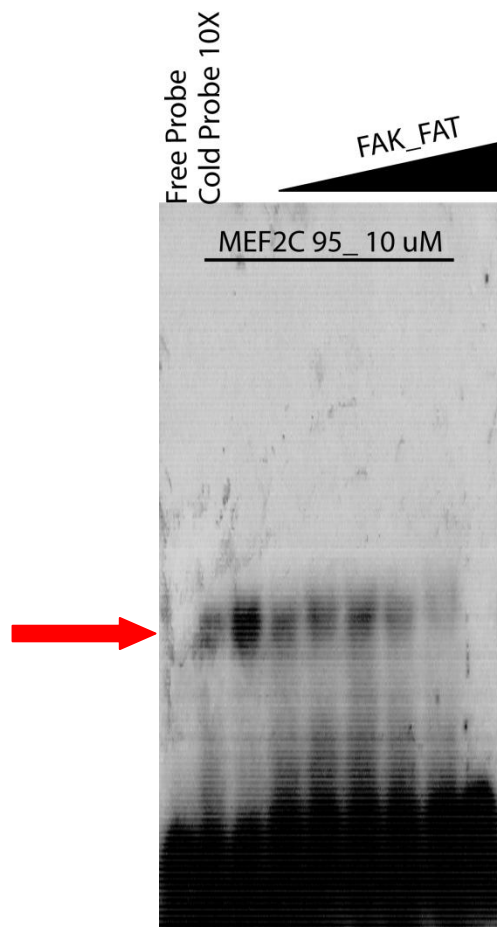


Figura 35 – Ensaio de gel shift entre MEF2C_95 e sua sequência consenso de DNA dupla fita marcada [$\gamma^{32}\text{P}$]-dATP, demonstrando a formação do complexo MEF2/DNA (seta). Observa-se a diminuição dessa interação MEF2/DNA, visto pela atenuação da intensidade da banda, com o aumento da concentração da proteína FAT.

Para avaliar e comparar a afinidade entre MEF2C_95 à FAT e entre MEF2 ao DNA foram realizados ensaios de anisotropia de fluorescência. Para o cálculo da afinidade entre MEF2 e o domínio FAT da FAK, utilizamos 10 nM da proteína MEF2C_95 marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) como sonda. A afinidade desta interação foi avaliada de acordo com o aumento da anisotropia

que ocorreu à medida que a concentração do domínio FAT da FAK foi aumentando na reação (1 nM – 10 μ M). Sendo o fundamento da anisotropia de fluorescência medir o desvio da luz polarizada em função do grau de rotação do complexo, quanto maior o volume final do complexo formado menor será sua velocidade de rotação no meio e, conseqüentemente, menor será o desvio da luz polarizada incidida, ocasionando valores crescentes de anisotropia. O valor de Kd é inversamente proporcional a afinidade de duas moléculas, ou seja, valores baixos de Kd indicam alta afinidade de ligação. O valor observado ($\sim 38\text{nM} \pm 9\text{ nM}$) aponta uma alta afinidade de ligação entre MEF2C_95 e o domínio FAT da FAK (Figura 36_A).

Para o cálculo de afinidade entre MEF2C_95 ao DNA, 10 nM de DNA marcado com FITC na extremidade 5' da fita sense, foi incubada com concentrações crescentes de MEF2C_95 (1nM- 10uM). Conforme indicado na Figura 36_B a constante de dissociação de MEF2C_95/DNA foi de $187,5 \pm 22\text{ nM}$. Portanto, de acordo com nossos resultados, a afinidade entre MEF2C_95 e FAT é aproximadamente 5 vezes maior do que a afinidade de MEF2C_95 pelo DNA.

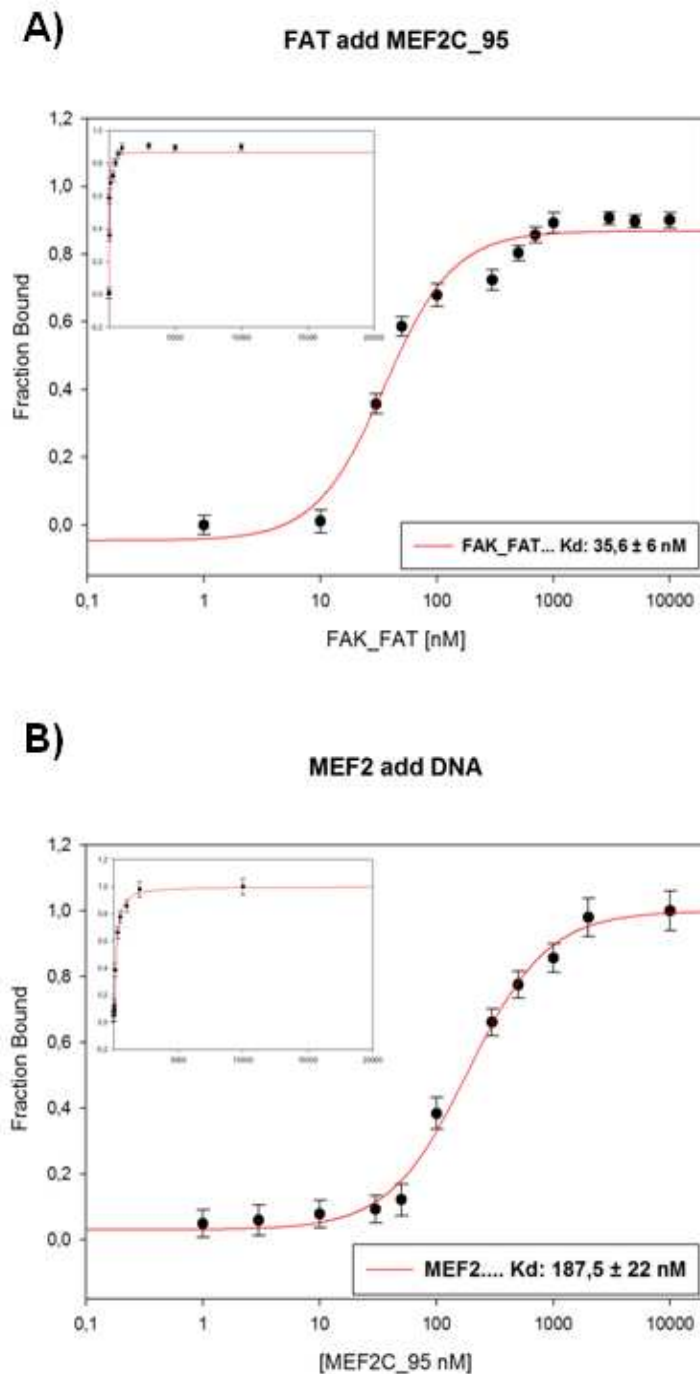


Figura 36 – Curvas de anisotropia de fluorescência da ligação MEF2C_95/FAT e de MEF2C_95/DNA (**A** e **B** respectivamente). Abaixo nos gráficos estão representados os valores da constante de dissociação (K_d) de cada curva, sendo de $35,6 \pm 6$ nM em **A** (MEF2C_95/FAT) e de $187,5 \pm 22$ nM em **B** (MEF2C_95/DNA).

4.3. Influência da interação entre FAT e MEF2C na capacidade de MEF2C ativar a transcrição em cultura de células C2C12.

Para avaliar a influência da interação intracelular entre FAT/MEF2 na capacidade de MEF2C ativar a transcrição gênica, utilizamos ensaio de gene repórter em cultura de mioblastos C2C12. Para isso, o vetor 4xMEF2-LUC, gentilmente cedido pelo Dr. Eric Olson (University of Texas, Southwestern Medical Center) foi utilizado como gene repórter para avaliar a ativação transcricional de MEF2C. O vetor 4xMEF2-LUC contém 4 sítios de ligação para MEF2 e expressa a proteína *firefly luciferase*. Portanto, a atividade transcricional de MEF2 foi avaliada indiretamente pela razão entre a atividade de *firefly luciferase* pela atividade de *renilla luciferase*, co-transfectado juntamente com o gene repórter 4xMEF2-LUC, como controle da transfecção.

Os plasmídeos foram transfectados em cultura de mioblastos C2C12 já diferenciados em miotubos. Além dos plasmídeos contendo o gene repórter 4xMEF2-LUC e do normalizador RENILLA, as células foram transfectadas com vetores para a superexpressão das proteínas MEF2C selvagem (MEF2C_pcDNA3), FAK fusionado com FLAG (FAK_FLAG), domínio FERM da FAK fusionado com FLAG (FERM_FLAG) e domínio C-terminal da FAK fusionado com FLAG (CTERM_FLAG). A Tabela 02 resume os plasmídeos utilizados no

experimento. A leitura da atividade de luciferase foi avaliada após 48 horas de transfecção.

Tabela 02 – Grupos experimentais e plasmídeos transfetados em cada grupo nos ensaios de gene repórter em cultura de células C2C12.

Grupo	Plasmídeos
Grupo 1- Controle	4xMEF2-LUC; RENILLA
Grupo 2- MEF2+ Plasmídeo FLAG vazio	4xMEF2-LUC RENILLA MEF2C_pcDNA3 pFLAG
Grupo 3- MEF2+ FAK_FLAG	4xMEF2-LUC RENILLA MEF2C_pcDNA3 FAK_FLAG <i>full length</i> ,
Grupo 4- MEF2+ CTERM_FLAG	4xMEF2-LUC RENILLA MEF2C_pcDNA3 CTERM_FLAG
Grupo 5- MEF2+ FERM_FLAG	4xMEF2-LUC RENILLA MEF2C_pcDNA3 FERM_FLAG

Como resultado, foi observado que, nas células co-transfectadas com o plasmídeo MEF2C_pCDNA3 e com o plasmídeo repórter (grupo 2) houve um aumento de 20 vezes na atividade de luciferase em relação ao grupo 1 que recebeu apenas o plasmídeo repórter 4xMEF2-LUC. Por outro lado, a superexpressão de FAK, concomitante com a superexpressão de MEF2C (grupo 3), atenuou significativamente o aumento da atividade de luciferase de 20 para 7 vezes em relação ao grupo 1. Para determinar se o efeito observado pela superexpressão da FAK se deve ao domínio Cterminal (que contém o domínio FAT) nós observamos que a superexpressão o domínio Cterminal da FAK (grupo 4) foi capaz de causar uma atenuação similar ao da superexpressão da FAK (grupo 3). Já a superexpressão do domínio FERM da FAK (grupo 5), localizado na região N-terminal da proteína, não foi capaz de causar a diminuição da atividade de luciferase quando comparado a superexpressão de MEF2C (grupo 2).

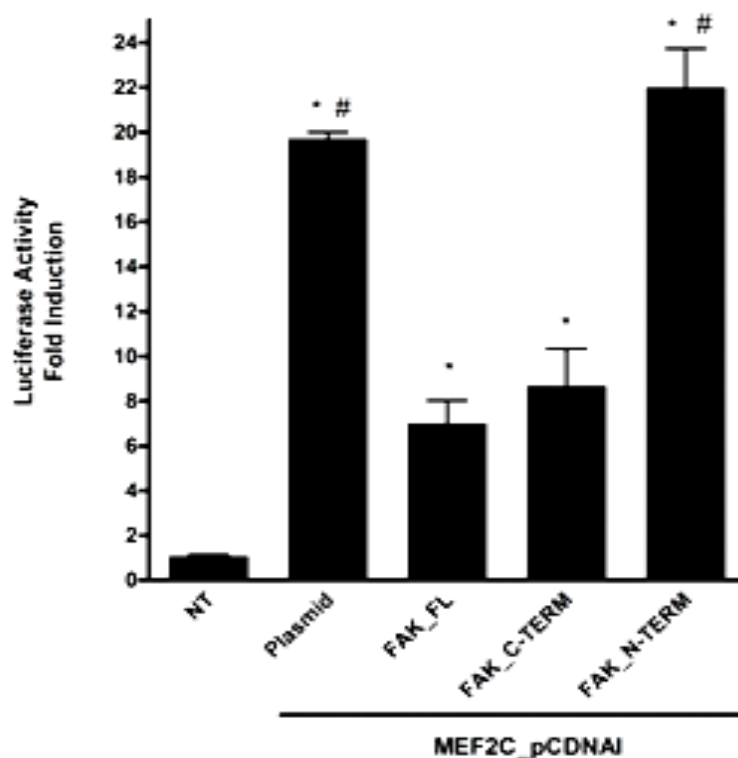


Figura 37 – Gráfico representativo do ensaio de gene repórter com o plasmídeo 4xMEF2-LUC, contendo 4 sítios de ligação para MEF2C associado a sequência de luciferase. A superexpressão de MEF2C com plasmídeo MEF2C_pcDNA3 aumentou em 20 vezes atividade de luciferase e a superexpressão de FAK inteira (FAK_FL) ou da porção C-terminal da FAK que contém o domínio FAT reduziram esse aumento da atividade induzida pela superexpressão de MEF2C.

Portanto, esses dados demonstram que a FAK, através de sua região C-terminal, diminui a ativação transcricional mediada por MEF2C, provavelmente por competir com o DNA pela região de interação de MEF2C.

No entanto os efeitos da atividade de MEF2C em miócitos cardíaco neonatos, onde essas células encontram-se diferenciadas, ainda não são bem conhecidos. Recentemente foi demonstrado que a superexpressão de MEF2A ou

MEF2C em cultura primária de miócitos cardíacos de ratos neonatos com partículas adenovirais, provocou desorganização sarcomérica e alteração no fenótipo desses miócitos cardíaco (Xu et al., 2006).

Diante desses dados, decidimos por utilizar o modelo da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos, para compreendermos quais genes apresentam alterados, quais vias estão ativadas e quais processos celulares são regulados por MEF2C em miócitos cardíaco. Para isso, uma combinação de ensaios de microarranjo de DNA (*Mycroarray*), PCR em tempo real, *western blotting* e análises por microscopias de luz, confocal e eletrônica de transmissão foram realizados, comparando células tratadas com adenovírus para MEF2C (Ad-MEF2C) com células tratadas com adenovírus para gene da β -galactosidade (Ad- β Gal) como controle. As partículas adenovirais utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jeffery Molkentin (*University of Cincinnati*).

4.4 Avaliação da expressão de MEF2C, por PCR em tempo real e *western blotting* em cultura de miócitos cardíaco tratados com Ad-MEF2C.

Os níveis de RNA mensageiro e de proteína de miócitos cardíaco tratados com Ad-MEF2C foram avaliados através das técnicas de PCR em tempo real e *western blotting*, respectivamente. Após 48 horas de tratamento o RNAm foi extraído em Trizol® e as proteínas totais extraídas em tampão RIPA. A análise

por PCR em tempo real do grupo tratado com Ad-MEF2C apresentou um aumento de aproximadamente 35 vezes no nível de RNA mensageiro transcrito comparado ao grupo controle tratado com Ad- β Gal (Figura 38_A). Já a análise densitométrica do nível de expressão proteica por WB demonstrou um aumento de aproximadamente 5,5 vezes quando comparado ao grupo controle (Figura 38_B). Sendo assim podemos afirmar que a infecção por partículas adenovirais é eficiente e que induz aumento da expressão gênica de MEF2C em cultura de miócitos cardíaco de ratos neonatos.

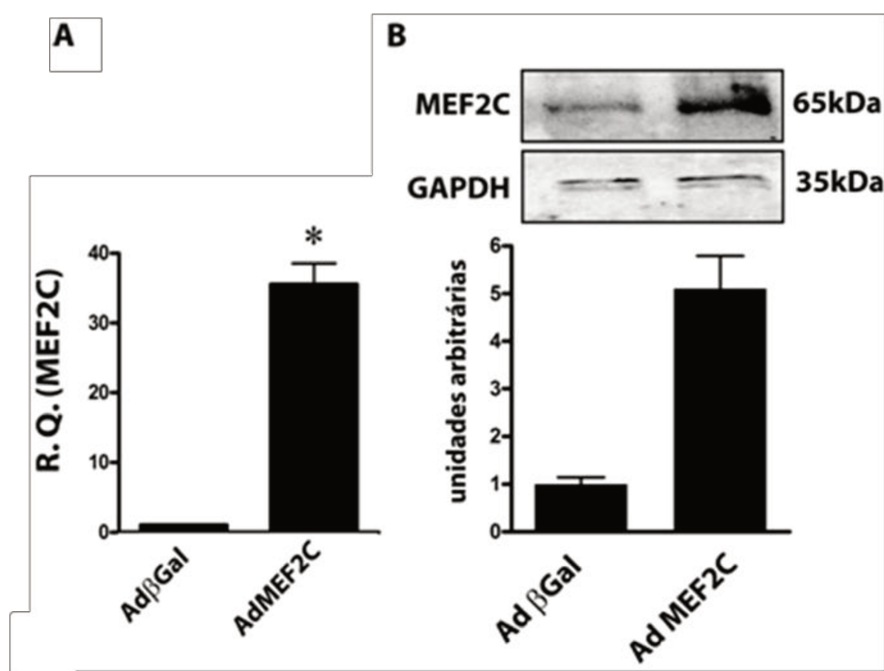


Figura 38 – Expressão gênica de MEF2C. Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm de MEF2C em miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C comparada ao grupo de células controle Ad- β Gal. **B)** *Western blotting* e gráfico representativos da expressão proteica de MEF2C em cultura de células tratadas com Ad-MEF2C comparada ao controle Ad- β Gal.

4.5. Análise por microarranjo de DNA da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco de ratos neonatos.

As amostras de cDNA de células tratadas com Ad-MEF2C ou com Ad- β Gal, como controle foram hibridizadas em triplicata, perfazendo um total de 6 membranas analisáveis. Os valores normalizados das médias da triplicata de cada gene foram submetidos à análise estatística pelo teste de Wilcoxon, sendo que os p-valores extraídos permitiu agrupá-los em ordem crescente de significância. Destas comparações foram selecionados os genes com p-valores menores que 0,05 (ou seja, os representantes com maior relevância estatística, $p < 0,05$). Os genes do grupo Ad-MEF2C foram comparados com o controle quanto ao nível de expressão do RNAm. Os valores com uma diferença de ± 2 vezes e valor de $p < 0,05$, foram submetidos à análise quanto aos seus aspectos funcionais através do programa *Ingenuity*TM.

Assim, as Tabelas 03 e 04 sumarizam os principais processos celulares e os genes identificados em cada processo, respectivamente, classificados de acordo com o *score* do programa *Ingenuity*, ao qual é derivado do p-valor de cada gene e indica a probabilidade dos genes alvo em uma rede serem encontrados juntos devido ao acaso.

A lista completa dos 1072 genes diferencialmente expressos (com variação mínima de ± 2 vezes e valor de $p < 0,05$) entre Ad-MEF2C e Ad- β Gal estão demonstrados no Apêndice II, classificados em ordem alfabética.

Tabela 03 – Principais processos celulares envolvidos na superexpressão de MEF2C em miócitos cardíaco, identificados no ensaio de Microarranjo de DNA, classificados de acordo com o *Score* do programa *Ingenuity* e com o número de genes identificados (ID) no processo celular em questão.

Número	Função	Score	Número de Genes ID
1	Morfologia do Órgão, Função e Desenvolvimento Sistema Muscular, Distúrbios do Desenvolvimento .	42	35
2	Replicação DNA, Recombinação, Reparo, Ciclo Celular, Anormalidade e Injúria do Organismo.	37	33
3	Ciclo Celular, Câncer, Replicação, Recombinação e Reparo do DNA.	37	33
4	Replicação DNA, Recombinação, Reparo, Ciclo Celular, Câncer.	32	31
5	Desordens do Sistema Endócrino, Doenças Hematológicas e Metabólicas	19	23
6	Doenças Cardiovasculares, Anormalidades Congênitas do Coração, Distúrbios do Desenvolvimento	17	22
7	Interação e Sinalização célula-célula, Desenvolvimento e Função do Sistema Hematológico	17	22
8	Ciclo Celular, Organização Celular, Replicação, Recombinação e Reparo do DNA	16	25
9	Replicação, Recombinação e Reparo do DNA, Resposta Celular ao Tratamento.	14	16
10	Arritmia Cardíaca, Doença Cardiovascular e Taquicardia	13	19

Tabela 04 – Genes diferencialmente expressos identificados no ensaio de Microarranjo de DNA. Lista de genes envolvidos em cada processo celular descrito na Tabela 03. A seta vermelha indica que o RNA_m do gene em questão encontra-se aumentado e a seta verde indica que a expressão do gene em questão está diminuído em relação ao controle.

1	↓ABCC9*, ↓ACSS2, ↑APEX1, ↓ATP2A2, ↓CIDEA, ↓COL1A1 (includes EG:1277), ↓COL3A1, ↓DES, ↓DLAT, ↓EDN1, ↓GPR56, ↓GPX3, ↓HRC, ↓HRX4, ↓KCNJ11, ↑MEF2C, ↓MURC, ↓MYH6, ↓MYH7, ↓MYL2, ↓MYOCD, ↓MYOM1, ↓MYOM2 (includes EG:17930), ↓MYOZ2, ↓NDRG2, ↓NR3C2 (includes EG:110784), ↓PPARA, ↓REG3A, ↓RRAD, ↓SMYD1, ↓TMEM38A, ↓TNNE1, ↓TNNI3, ↓TNNT2 (includes EG:21956), ↓VEGFA
2	↑TANKRD32*, ↑TATAD5, ↑TARD1, ↑BRCA1, ↑CAD, ↑CCND1, ↑CDC6 (includes EG:23834), ↑CDK2, ↑CHAF1A, Cyclin A, ↑DDX11/DDX12P, ↑DSCC1, ↑E2F7, ↑E2F8, ↑ECT2, ↑Hmgbl (includes EG:25459)*, ↑HSP90AA1, ↑KIAA0101, ↑KRT8*, ↑LMNB1, ↑MK167, ↑NOP58, ↑ORC1 (includes EG:18392), ↑PCNA, ↑POLH, ↑RAD18, Rb, ↑RBBP8, ↑REV1 (includes EG:316344), ↑RFC2, ↑RFC4, ↑RFC5, ↑RIF1 (includes EG:295602), ↑TYMS, ↑USP1
3	↓AKAP12, ↓AURKB, ↓CCNA2, ↓CCNE1, ↑CDC45, ↑CDC7 (includes EG:12545), ↑CDT1, ↓CXCR7, ↑DBF4 (includes EG:10926), ↑DHFR, ↑DNMT1, ↑E2F5, ↓ELN, ↓EMILIN1, ↑EZH2, ↓FBLN5, Histone h3, Histone h4, ↓IGFBP5, ↑MCM2, ↑MCM4, ↑MCM5, ↓mir-145, ↓MYBL2, ↑NPAT, ↑PLK4, ↓PLN, ↓PPP2R2B, ↑PRMT5, ↓RBL1, ↓SFRP1, ↑SKP2 (includes EG:27401), ↓UHRF1, ↓UPP1, ↑WDHD1
4	Akt, ↑BAX, ↑BRCA2, ↑CHEK1, ↑CLSPN*, ↑CPT1B, ↓DUSP1, ↓DUSP4, ↑FANCD2, ↑FKBP5, ↓GJA1, ↑H2AFX, ↑HMGB2*, Hsp90, ↓HSPB1, Jnk, ↓KCNH2, ↑KIF2C, ↑KLF5, ↑MAP3K7 (includes EG:172842), ↑MCM7, ↑MDM2, ↑MSH2, ↑MST1R, ↑MTBP, ↑NOLC1, P38 MAPK, ↑PLK1, ↑PPM1D, ↑RAD51, ↑RAD54B, ↑RAD54L, ↓SCN4B, ↓SCN5A, ↓TGFB11
5	↑ALOX5, ↑ANK3, ↑BAZ1A, BAZ1B, CBX5, ↑CKM, Creb, CYP8B1, ↓EEF1A2, ↑EXOSC8, ↓IGF1, IGFBP3, IGFBP1 (includes EG:16006), ↓IL1RN, ↓LDLR, ↑MAD2L1, ↑MB, ↑MCM3, MEF2, MEF2A, ↓MMP12, N-cor, ↓NR0B2, ↑OASL, PCIK (includes EG:18534), ↑POLA1, ↑PRKD2, RNA polymerase II, ↑SMARCA1, ↑SMARCA5*, ↓SORBS1, ↑TAF5, TAF10 (includes EG:216185), ↓THBS2, ↓WISP1
6	↓ABUIM1, ↑BRCA1, ↑CDK17, ↑DOCK11, E2F6, GATA4, ↓GJA1, GJA5, ↑GPSM2, HEY2, ↑HIF57, ↓KCNE1, ↑KIF4A, ↑LBR (includes EG:368360), miR-483-3p (miRNAs w/seed CACUCCU), ↓MYL7, ↓MYOCD, ↑NCAPD2, ↑NCAPG, NIX2-5, NPPA, ↑NPR3 (includes EG:18162), PKD2 (includes EG:18764), ↑PKP2 (includes EG:287925), ↑RPA2, ↑RYR2, ↓SCN1B, SCN2B, ↓SCN5A, ↓Sln, ↑SMC2, TBX3, TBX5, YAP1 (includes EG:10413), YWHAG
7	ADM, ↑ARL6IP5, ↓BGN, ↓BRP44L, ↓C3, CA1CA, ↑CALCRL, ↑CD34, CREBBP, ↓Ctla2a, ↑CXCL12 (includes EG:20315), ↑DLGAP5, DRAP1, ↓EGLN3, ↑FBXO5, HIF1A, ↑HIST1H2AG (includes others), ↑HIST1H2BJ/HIST1H2BK*, ↓HK2, KDM5B, MYC, ↑OIP5, P2RX4, ↓PRELP, ↑PRPS1, ↑PSIP1, ↑RAMP1, ↑RASSF4, RRAS, SELE (includes EG:20339), ↓SELP, ↓SELPLG, STAT4, TFRG, TLR2
8	↑BRCA1, ↑BRD2, ↑CCDC76, ↑CDC6 (includes EG:23834), ↑CDK2, ↑CENPE, ↑CEP57, Cyclin A, E2F1, E2F3, E2F4, ETV3, ↑MCM6, ↑MCM8, MED23, MHL1, ↑MRT04, ↑MTHFD1, ↑NDC80, NEK2, NPB1, ↑NUF2, ↑ORC1 (includes EG:18392), ↑PRIM2, ↑PSAT1, RBL1, ↑RBL1, RBL2 (includes EG:100331892), ↑RFC3, ↑SMC3, ↑SMC4, SMC1A, TFDP1, ↑TOP2A, YY1
9	↓ABCB4, ↑BUB1 (includes EG:100307076), ↑C11orf82, ↑CDH3, ↑CEP55, ↑DKK3, ↓HFE2, HTT, ↑KIF24, ↓Lyz1/Lyz2, ↑MIS18A, NEO1, PARP1, ↑PCNA, ↑POLD2, ↑RAD51, ↑RNASE4, ↓SCN3B, ↑TINAGL1, TP53 (includes EG:22059), WRN, XRCC6
10	Actin, ADCY, ↓ADORA1, ↓ADRA1A, ADRB2, ↓ARHGDI1B, ARR1, ↑ATP1A2, ↑BTG3, CACNA1C, ↑CACNB4, ↑CASP3, ↑CASP8AP2, ↑CAV3, ↑DYSF, ↑FAS, Gnas (mouse), ↓Gnas (rat), GSN, ↓ITGB1BP2, Lamin b, ↑MST4, P2RY2, ↑PASK, PI3K (complex), PP2A, ↑PPP2R1B, PRKAR2A, ↓RAC2, SRC, STRN3, STRN, ↓TGM2, ↓TRIM72, TUBB2A

Os genes diferencialmente expressos nas 10 vias citadas na tabela 04 foram agrupados e submetidos ao programa *Ingenuity* para fazer a classificação das proteínas de acordo com a localização subcelular. Portanto as proteínas foram agrupadas nos seguintes compartimentos: Núcleo, Citoplasma, Membrana Plasmática, Espaço extracelular e Desconhecido (caso não seja conhecida a localização subcelular da proteína). Conforme podemos observar na Figura 39, há um grande acúmulo de proteínas do núcleo, que apresentam aumento na

expressão do RNAm (vermelho) com o tratamento com Ad-MEF2C quando comparado ao controle. Além disso, a grande maioria dos genes que apresentaram diminuição na expressão do RNAm (verde) encontram-se fora do compartimento nuclear. Esses dados demonstram que os genes que estão envolvidos com vias de regulação do ciclo celular estão aumentados e por outro lado a grande quantidade de genes estruturais encontram-se diminuídos.

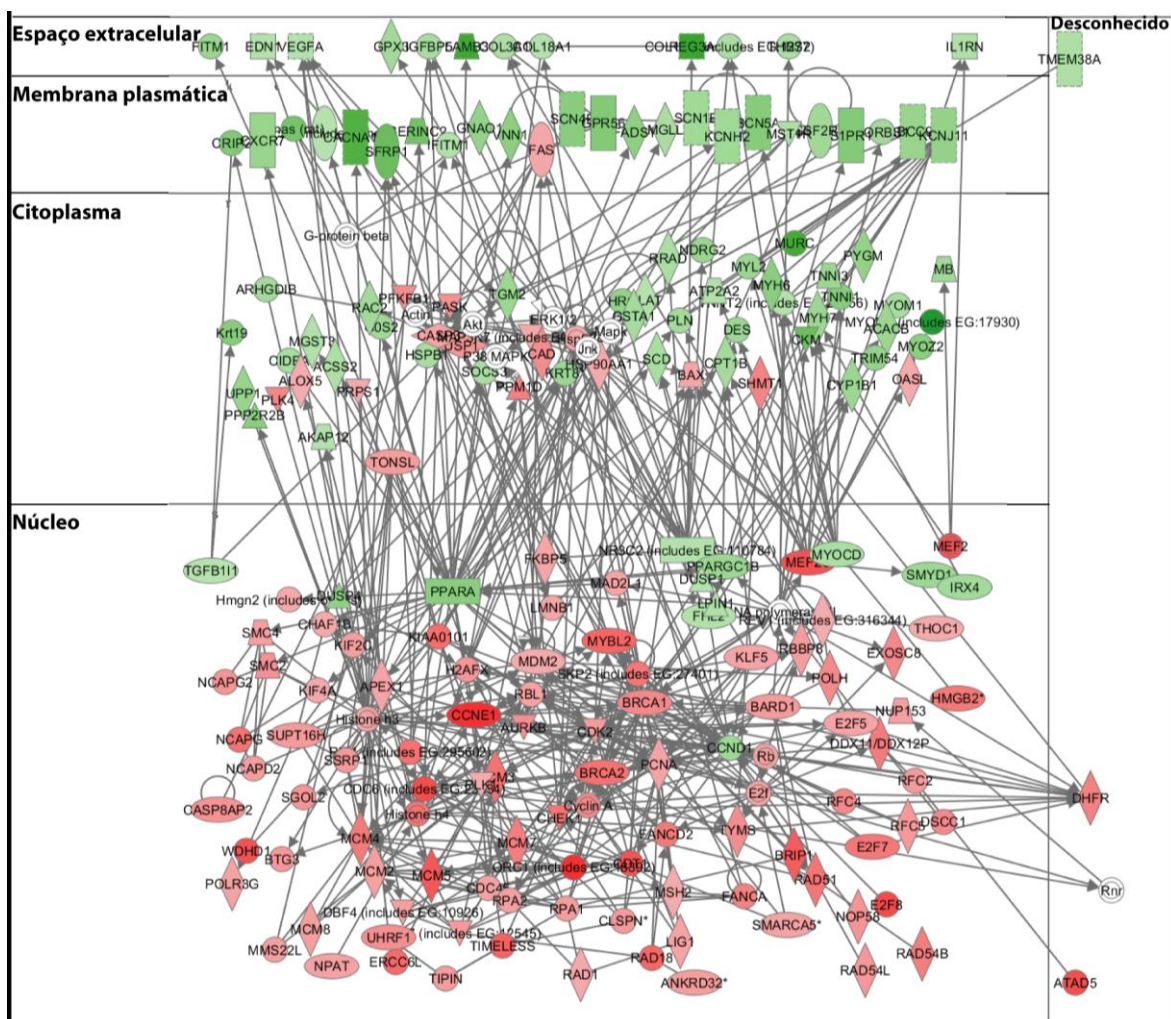


Figura 39 – Esquema representativo demonstrando o agrupamento de todos os genes envolvidos nas vias descritas nas tabelas 03 e 04. Os genes que apresentaram diferencialmente expressos, por aumento ou diminuição, encontram-se destacados em vermelho ou verde, respectivamente. Os genes em branco não estão diferencialmente expressos, de acordo com o ensaio de microarranjo de DNA em células tratadas com AdMEF2 comparado ao controle Ad-βGal. Os genes estão agrupados de acordo com a localização subcelular das proteínas codificadas por eles.

Dentre os genes diferencialmente expressos, distribuídos segundo sua relação funcional, observou-se um grande número de genes envolvidos com os processos de Ciclo Celular, Organização Celular, Replicação, Recombinação e Reparo do DNA.

Nesse contexto, a Figura 40 demonstra um resumo do processo de replicação do DNA juntamente com as proteínas envolvidas. Na mesma Figura 40, em vermelho, os genes que apresentaram aumento na análise do ensaio de Microarranjo de DNA de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C em relação ao controle. As proteínas em branco representadas no esquema indicam que os genes não estavam diferencialmente expressos nos ensaios de Microarranjo. O processo de replicação do DNA precede a divisão celular, ocorrendo durante a fase S do ciclo em eucariotos e envolve o recrutamento de diversas proteínas. O início da replicação do DNA ocorre somente em sítios específicos do DNA cromossômico denominado Complexo de Reconhecimento da Origem (ORC). Nesse processo, a proteína recém-sintetizada CDC6 associa-se temporalmente ao ORC na transição das fases G1-S sendo essencial para a montagem de um complexo de pré-replicação (preRC) na região de origem da replicação. Isto é seguido pelo recrutamento da proteína CDT1 e de proteínas do complexo de manutenção do minicromossomo (MCM) sobre as origens de replicação que conduzem juntamente com CDC6 à formação de preRCs. Em seguida, proteínas CDK da fase S fosforilam as proteínas CDC6/CDC18, inativando essas proteínas e impedindo a re-iniciação da replicação do DNA. O complexo CDC7-DBF4 fosforila a proteína MCM no preRC, recrutando CDC45. Finalmente, as proteínas de replicação, tais como RPA e DNA-polimerases são recrutadas para o complexo, levando a replicação do DNA. Portanto observa-se na Figura 40 que os genes envolvidos na transcrição de DNA foram, em sua grande maioria,

identificados em nossos ensaios de Microarranjo de DNA e encontraram-se aumentados no grupo de miócitos tratados com Ad-MEF2C quando comparado ao controle.

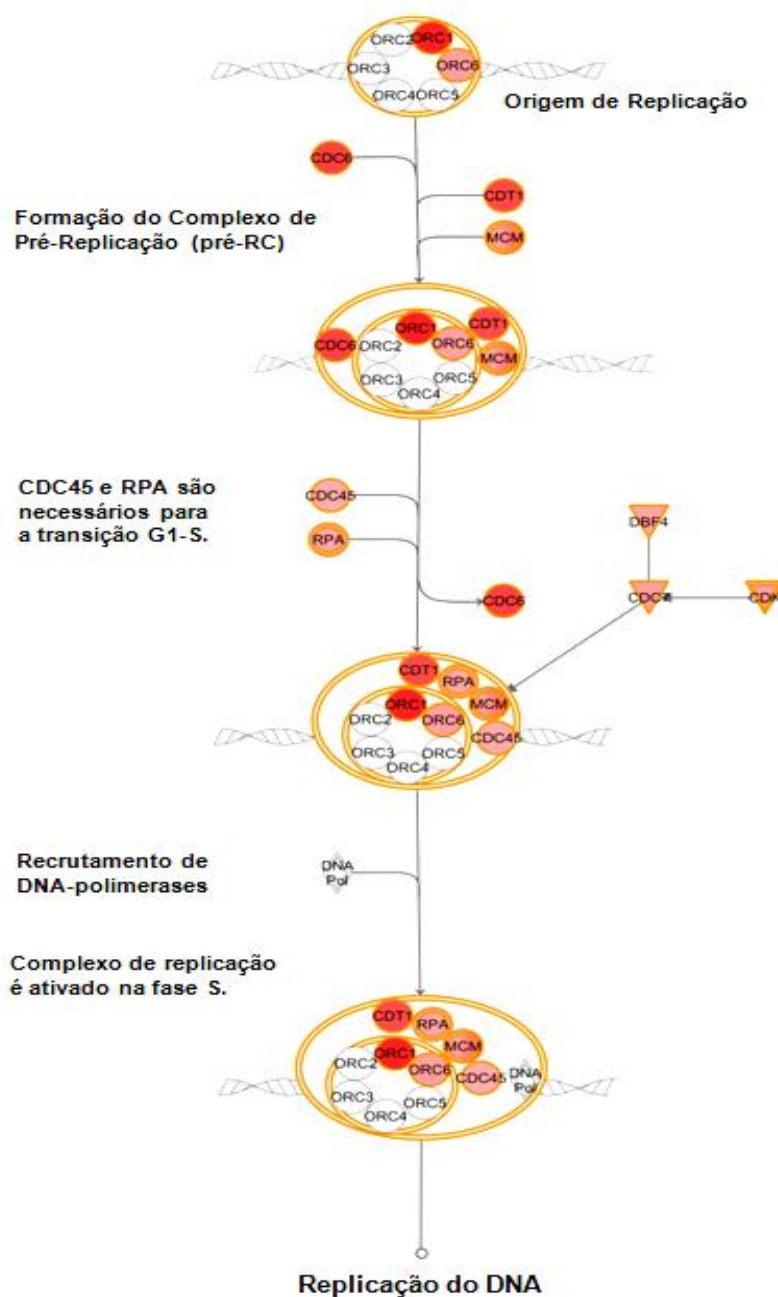


Figura 40 – Esquema representativo das etapas e das proteínas envolvidas na replicação do DNA em eucariotos. Em vermelho, genes diferencialmente aumentados e em branco, genes que não apresentaram diferenças no nível de expressão gênica no grupo Ad-MEF2C quando comparado ao controle.

4.6. Validação de genes diferencialmente expressos a partir dos resultados de Microarranjo de DNA

De acordo com os resultados do microarranjo de DNA, foram selecionados alguns genes para serem validados quanto ao nível de expressão. A tabela 05 lista 08 genes, dos quais 07 apresentaram-se diferencialmente expressos no ensaio de Microarranjo de DNA e foram selecionados para serem validados por PCR em tempo real e/ou *western blotting*. Como controle está demonstrado o gene da FAK o qual não apresentou alteração na expressão gênica com a transdução viral de AdMEF2.

Tabela 05 – Lista de genes e valores vezes alterado do RNAm dos genes avaliados nos ensaios de Microarranjo de DNA em células tratadas com Ad-MEF2C comparado a células controle (Ad-βGal)

Gene	Vezes Alterado
MEF2C	+4,22
Ciclina E1	+5,01
ANP	-4,11
MyBPC	-2,58
Miosina	-2,74
β-Actina	-2,22
Desmina	-2,75
FAK	+1,08

Portanto, os genes apresentados na tabela 05 foram validados por ensaios de PCR em tempo real (Figura 41) e/ou por *western blotting* (Figura 42) que confirmaram os resultados observados nos ensaios de Microarranjo de DNA.

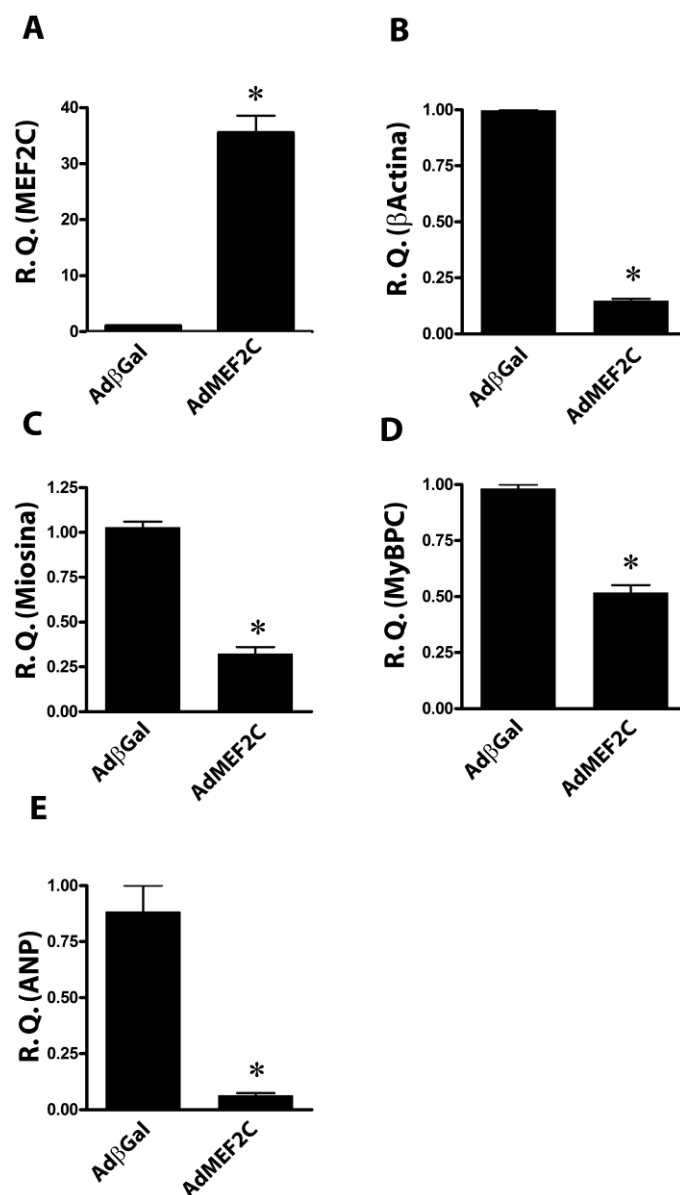


Figura 41 – Gráfico representativo da quantificação relativa de RNAm: **A)** MEF2C; **B)** β-Actina; **C)** Cadeia Pesada de Miosina; **D)** *Myosin Binding Protein C* (MyBPC); **E)** Peptídeo Natriurético Atrial (ANP); em células tratadas com Ad-MEF2C comparado ao grupo de células controle Ad-βGal. *p<0,05 vs AdβGal. n=4

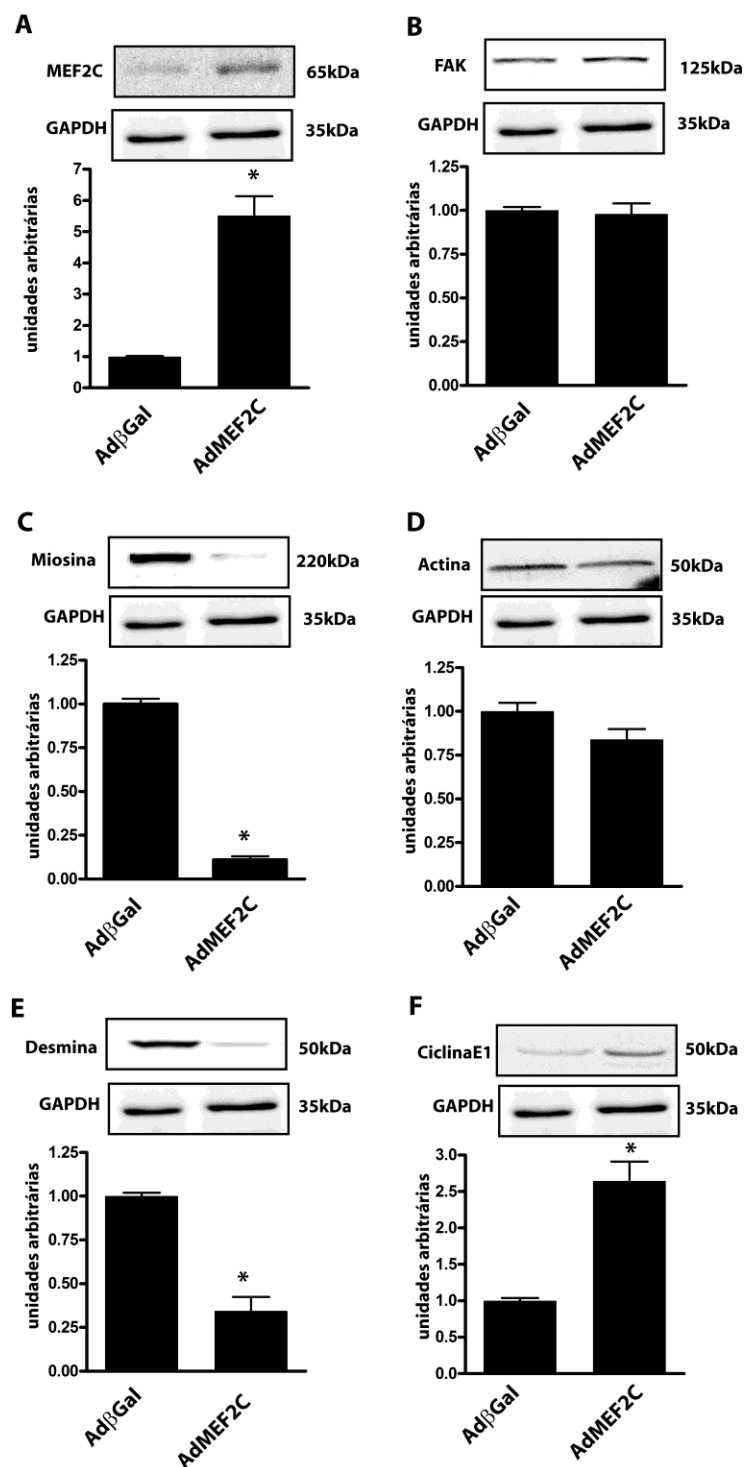


Figura 42 – Western blotting e gráficos representativos da expressão de: **A)** MEF2C; **B)** FAK; **C)** Cadeia Pesada de Miosina; **D)** Actina; **E)** Desmina; **F)** Ciclina E1; em células tratadas com Ad-MEF2C comparado ao grupo de células controle Ad-βGal. *p<0,05 vs AdβGal. n=4

4.7 Avaliação do fenótipo de miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C por meio de microscopia de luz, confocal e eletrônica de transmissão.

De acordo com os resultados apresentados anteriormente podemos afirmar que o aumento da expressão de MEF2C é efetivo e que através dos genes observados como diferencialmente expressos, pode existir alterações no fenótipo das células tratadas com Ad-MEF2C.

4.7.1 Microscopia de luz (coloração por hematoxilina-eosina)

Após 48 horas de tratamento com Ad-MEF2C e controle Ad- β Gal as células foram fixadas com formaldeído 3,7% e coradas com Hematoxilina (núcleo) e Eosina (citoplasma) H&E. Como resultado, podemos observar e destacar como característica mais marcante das células tratadas com Ad-MEF2C a presença de maior quantidade de células binucleadas ou até multinucleadas (setas brancas) quando comparada às células tratadas com Ad- β Gal (Figura 43). Em algumas oportunidades, foi possível observar a presença de núcleos com lobulações atípicas (detalhes da Figura 43). O gráfico da Figura 43_D compara a porcentagem de células com dois ou mais núcleos entre os grupos Ad-MEF2C e Ad- β Gal. Foram contadas um total de 200 células por grupo em triplicata. Esse dado demonstrou que a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos induziu um aumento no número de células multinucleadas (aproximadamente quatro vezes) quando comparado ao grupo controle.

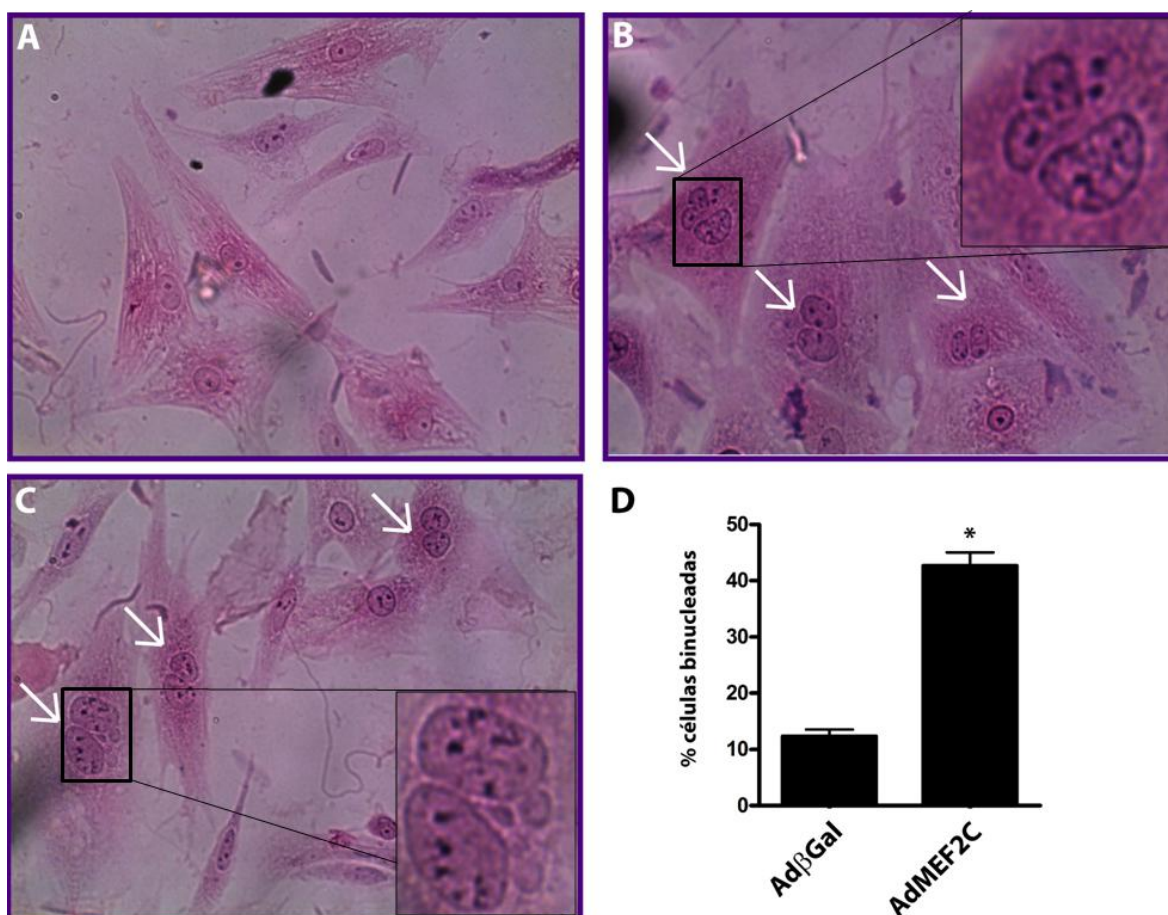


Figura 43 – Microscopia de luz representativa de miócitos cardíaco tratados com Ad-βGal (A) ou Ad-MEF2C (B e C) coradas com H&E. Observe em (A) a morfologia típica do núcleo do miócito cardíaco, enquanto que em (B e C) os núcleos apresentam-se multinucleados (seta) e com lobulações atípicas (detalhes). Aumento = 400x. (D) Gráfico representativo da porcentagem de células que apresentam multinucleação entre os grupos Ad-βGal e Ad-MEF2C. * $p < 0,05$ vs AdβGal.

4.7.2 Microscopia Confocal

Conforme observado na Figura 44, as fibras de actina das células controle (tratadas com Ad- β Gal) apresentam um padrão de estriação e organização típicos de miócito cardíaco em cultura. Já o grupo de células tratadas com Ad-MEF2C apresentou desorganização sarcomérica com fibras de actina dispostas de forma irregular e não ordenada.

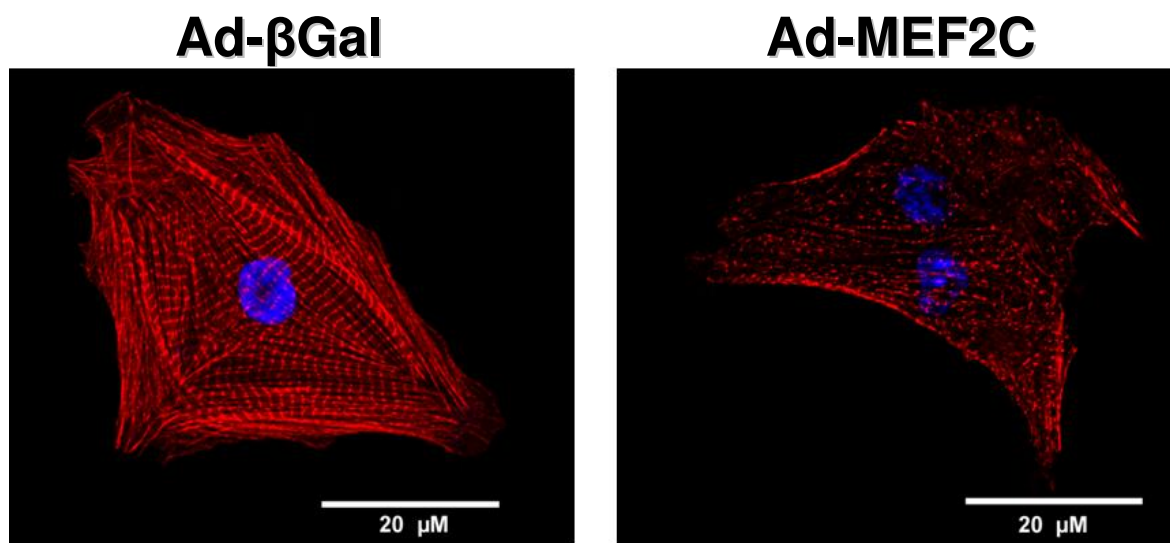


Figura 44 - Microscopia confocal representativa de miócitos cardíacos tratado com Ad- β Gal (A) ou Ad-MEF2C (B). Analise as fibras de actina, em vermelho, organizadas e com estriação típica de miócito no grupo controle (A), enquanto que o grupo Ad-MEF2C apresentou redução qualitativa da marcação e desorganização do padrão estriado das fibras de actina no sarcômero (B). Actina marcada com faloidina-rodamina (vermelha) e núcleo marcado com DAPI (azul).

4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para avaliação ultra-estrutural das diferenças fenotípicas encontradas pela microscopia de luz e confocal no núcleo e na organização sarcomérica, optou-se pela microscopia eletrônica de transmissão de miócitos cardíacos após 48h de transdução viral tratado com Ad-MEF2C ou controle com Ad- β Gal.

Na Figura 45 (A e C) observamos que as células controle apresentaram núcleo preservado, citoplasma íntegro, disposição e padrão sarcomérico típicos, mitocôndrias com aspectos ultra-estruturais preservados e sem estruturas vesiculares associadas. Por outro lado, os miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C (B e D) apresentam regiões de cromatina condensada (seta) no núcleo, já no citoplasma houve aumento no número e no tamanho de vesículas. Ainda neste grupo, destacou-se a degeneração sarcomérica com pequena quantidade de sarcômeros íntegros, presença de vesículas fusionadas às mitocôndrias.

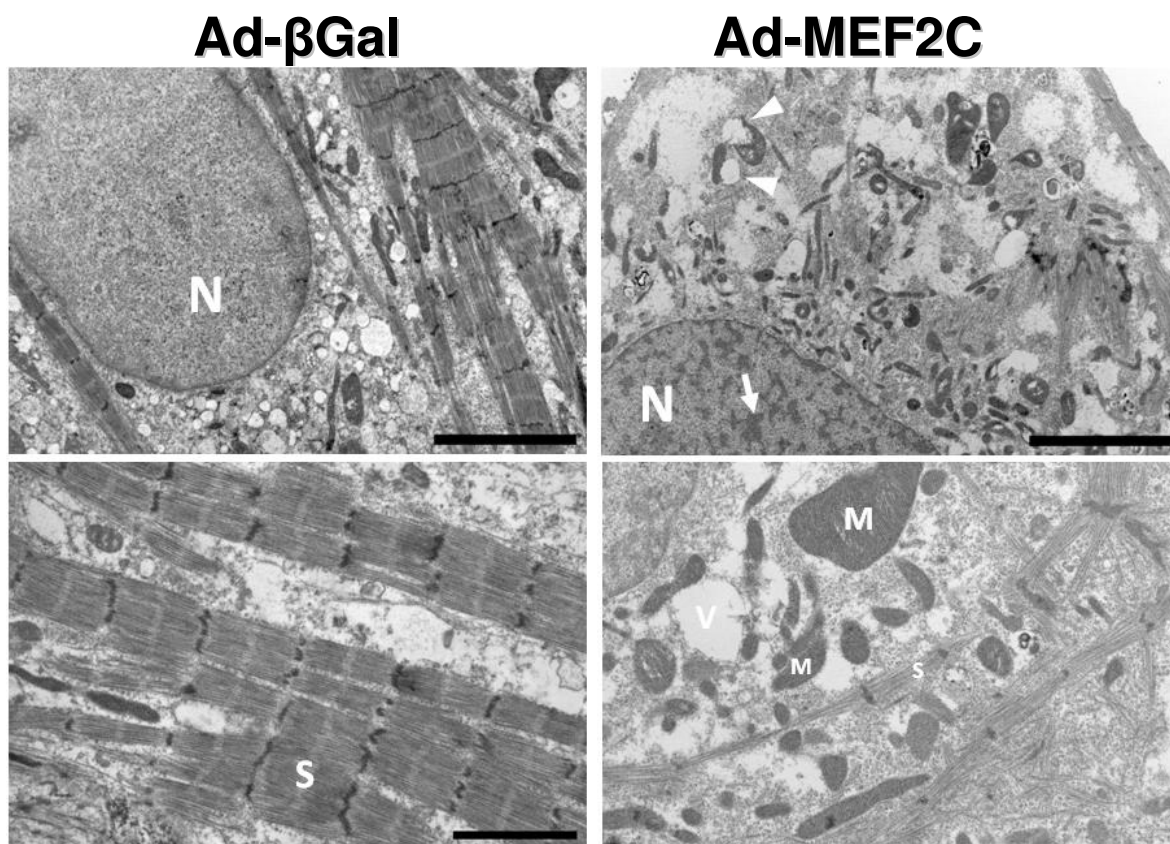


Figura 45 – Elétron-micrografias representativas de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad- β Gal (A e C) ou Ad-MEF2C (B e D) por 48h. Em A e C, observe a morfologia típica do núcleo (N) e cromatina do miócito, bem como a disposição orientada dos sarcômeros (S) com preservação das bandas A e I, além do disco Z. Já em B e D, analise o núcleo com maior quantidade de heterocromatina (seta), desorganização e adelgaçamento sarcomérico (*), presença de vesículas fusionadas às mitocôndrias (cabeça de seta). V = vesícula; M = mitocôndria. Barras A e B = 5 μ m; C e D = 2 μ m.

4.8. Avaliação da interação MEF2C/FAK na expressão proteica de genes diferencialmente expressos nos ensaios de Microarranjo de DNA e no fenótipo de miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C.

4.8.1 Expressão proteica

A superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos altera a expressão de diversos genes. Miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C apresentam aumento de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e diminuição de genes estruturais. Alguns desses genes, como Miosina tipo II e Desmina apresentaram-se diferencialmente expressos no ensaio de microarranjo de DNA validados por ensaios de *Western blotting*.

Nesse contexto, avaliamos se a interação inibitória entre o domínio FAT da FAK com o fator de transcrição MEF2C atenua as alterações gênicas decorrente da superexpressão de MEF2C. Para isso, as células foram submetidas a superexpressão de MEF2C com Ad-MEF2C com concomitante superexpressão de FAK ou de seus domínios FERM ou C-terminal e posteriormente avaliado o nível de expressão das proteínas Miosina tipo II e Desmina.

Primeiramente, foi demonstrado que a superexpressão de FAK ou de seus subdomínios FERM ou C-terminal, fusionados com Flag, não alterou o nível de expressão de MEF2C nos miócitos cardíacos (Figura 46_A).

A expressão da FAK também foi avaliada por *western blotting* com anticorpo anti-FAK (C20- Santa-Cruz) que reconhece a região C-terminal da FAK. Como resultado, no grupo de células transfectadas com o plasmídeo FAK_Flag, observou-se o surgimento de uma banda pouco acima da FAK endógena, decorrente da cauda de Flag que confere um pequeno aumento na massa molecular da proteína. No grupo de células transfectadas com o plasmídeo C-terminal_Flag, podemos observar o aparecimento de uma banda na altura de 34 kDa referente ao peso molecular desse domínio da FAK. Dessa forma, podemos afirmar que a transfecção e superexpressão de FAK e da região C-terminal da FAK ocorreu de modo eficiente (Figura 46_B).

Em relação ao nível de expressão da cadeia pesada de miosina tipo II, observamos que os miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C (Ad-MEF2C) apresentaram uma diminuição significativa (em torno de 80-90%) quando comparado ao controle. Nesse caso, a superexpressão do domínio C-terminal_flag da FAK atenuou essa diminuição em torno de 50%, não sendo observada essa mesma atenuação nos grupos FAK_flag ou FERM_flag (Figura 46_C).

Por fim, observamos na Figura 46_D que a proteína Desmina, localizada nas regiões de linha Z do sarcômero, apresentou uma diminuição significativa (em torno de 80%) na expressão em miócitos cardíacos tratado com Ad-MEF2C, quando comparado a células controle. Nesse caso, tanto a superexpressão de FAK como do domínio C-terminal da FAK atenuou a diminuição da expressão de Desmina.

A Tabela 06 lista os grupos experimentais utilizados nos ensaios de *western blotting* da Figura 46.

Tabela 06 – Grupos experimentais demonstrando os plasmídeos que foram transfectados com o uso de lipossomos (LipofectaminaTM) ou transduzidos com as partículas adenovirais carregando plasmídeos para os genes β Gal ou MEF2C.

Grupo	
1	Ad- β Gal + Lipofectamina
2	Ad-MEF2C + Lipofectamina
3	Ad-MEF2C + plasmídeo pFlag
4	Ad-MEF2C + FAK_Flag
5	Ad-MEF2C + Cterm_Flag
6	Ad-MEF2C + FERM_Flag

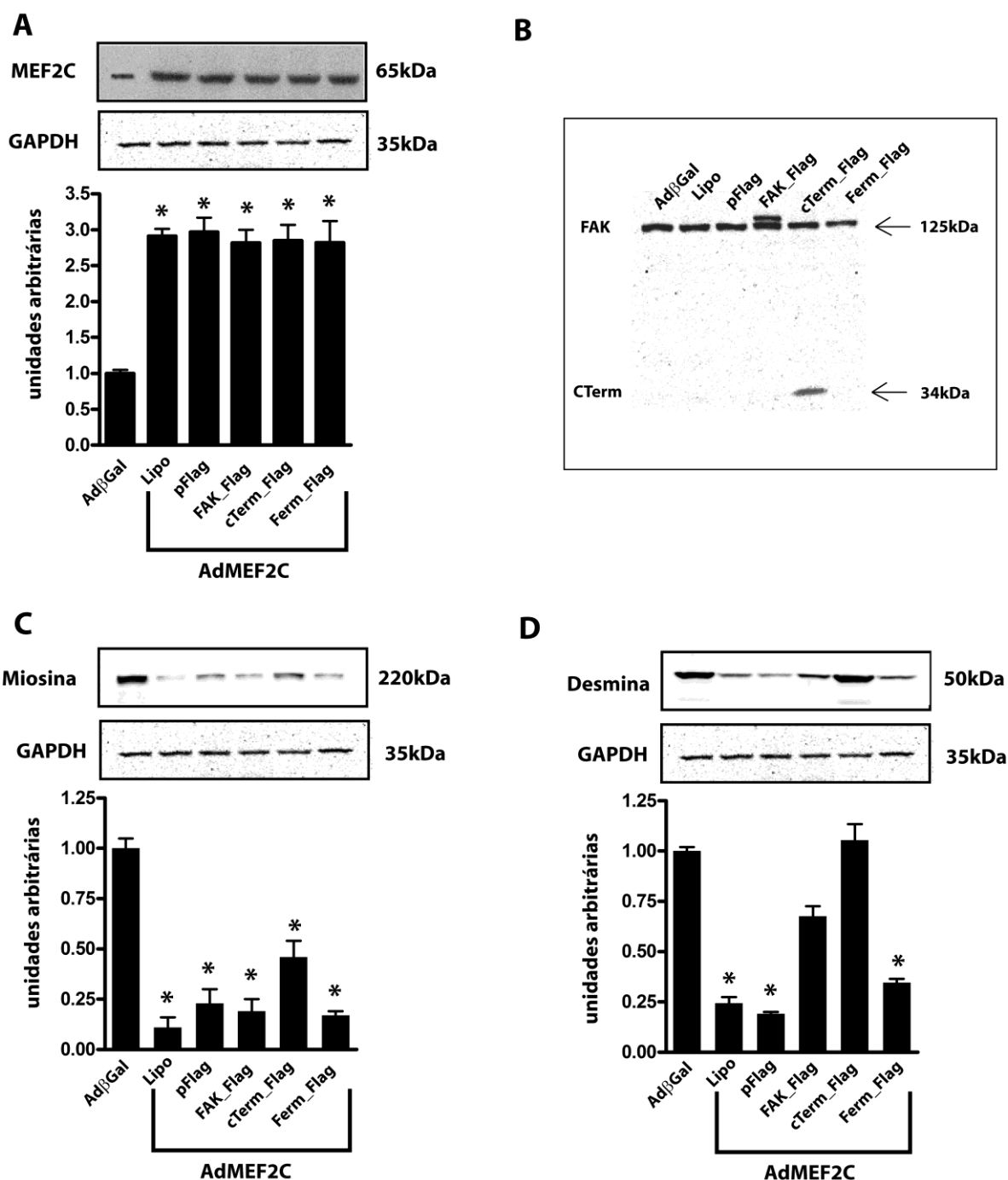


Figura 46 – *Immunoblots* e gráficos representativos da expressão: **A)** MEF2C; **B)** FAK; **C)** Cadeia Pesada de Miosina; **D)** Desmina; em miócitos cardíacos submetidos a diferentes tratamentos conforme descrito na tabela 06. * $p < 0,05$ vs AdβGal. $n=3$

Esses dados demonstram que a superexpressão de FAK ou de seu domínio C-terminal atenua os efeitos negativos sobre a expressão de genes estruturais como Miosina e Desmina decorrente da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos.

Para avaliar se a concomitante superexpressão de FAK e MEF2C em miócitos cardíacos interfere nos efeitos fenotípicos dessas células, ensaios de microscopia eletrônica de transmissão foram realizados.

4.8.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Com o objetivo de avaliar a interferência da interação MEF2C/FAK nos efeitos fenotípicos provocados pela superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos, foi realizada concomitante superexpressão de FAK ou controle GFP, com o uso de partículas Lentivirais (Lent-FAK, Lent-GFP). As células foram submetidas a estudos ultra-estruturais com o uso de microscopia eletrônica de transmissão.

Como resultado, na Figura 47 observamos que as células transduzidas com Ad-MEF2C + Lent-GFP apresentaram as mesmas alterações observadas anteriormente decorrentes da superexpressão de MEF2C, como presença de regiões de cromatina condensada, aumento no número e no tamanho de vesículas

e desorganização sarcomérica. Por outro lado, nos miócitos cardíacos transduzidos com Ad-MEF2C + Lent-FAK, observam-se estruturas sarcoméricas preservadas, redução qualitativa da presença de heterocromatina e citoplasma apresenta-se homogêneo, sem grandes quantidades de vesículas. Em ambos os grupos observamos alterações na morfologia do núcleo, apresentando lóbulos e regiões de invaginação do envoltório nuclear. Esses dados demonstram que a superexpressão de FAK atenua parte das alterações morfológicas diversas causadas pela superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos.

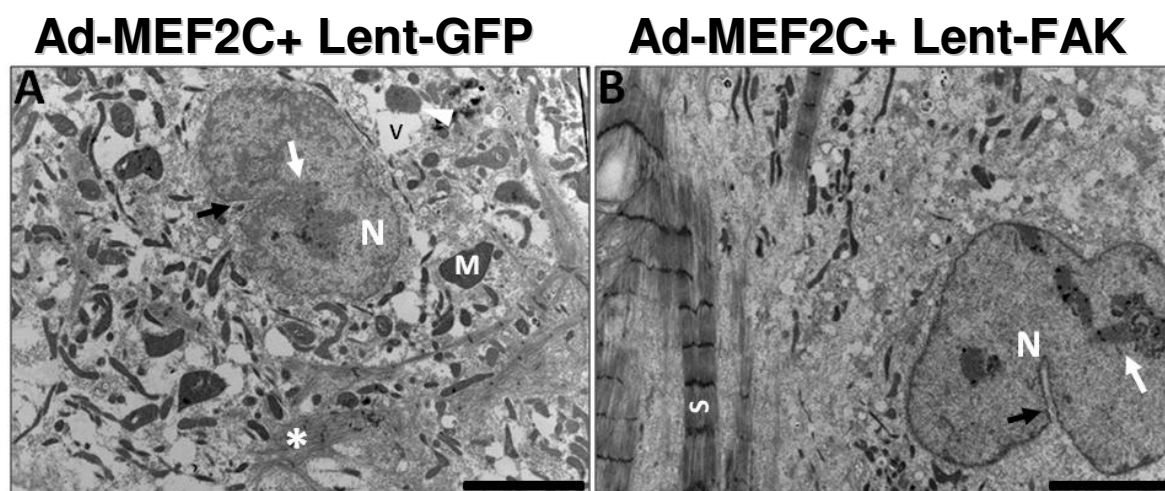


Figura 47 – Elétron-micrografias representativas de miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura tratados com Ad-MEF2C + Lent-GFP (A) ou Ad-MEF2C + Lent-FAK (B) por 48h. Em A, observe a morfologia do núcleo (N) com presença de heterocromatina (seta branca) e invaginações no envoltório nuclear (seta preta), desorganização sarcomérica (*) e presença de vesículas fusionadas às mitocôndrias (cabeça de seta). Já em B, analise o núcleo com menor quantidade de heterocromatina (seta branca) e presença de invaginação (seta preta), bem como sarcômeros (S) organizados e citoplasma homogêneo (menor quantidade de vesículas). V = vesícula; M = mitocôndria. Barras A e B = 5 μ m.

5 - DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da interação MEF2C/FAK

O presente estudo teve como objetivo investigar a interação entre o fator de transcrição MEF2C e a FAK e suas implicações na regulação da homeostase dos miócitos cardíacos. Diante disso, o primeiro objetivo foi definir a estrutura do complexo MEF2C/FAK.

As primeiras evidências da interação entre MEF2C e FAK foram descritas anteriormente em nosso grupo (CARDOSO, 2008), no entanto as características estruturais do complexo MEF2C/FAK bem como a topologia da interação não haviam sido exploradas.

Os resultados do presente estudo não apenas confirmam a interação entre MEF2C e FAK como também demonstram que a região de interação compreende as hélices 1 e 4 do domínio FAT da FAK com a região de interação com o DNA do dímero de MEF2C. Para isso foram utilizados ensaios de reação cruzada (*cross-linking*) associada à espectrometria de massas (CXMS), dinâmica molecular, espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS) e mutação sítio dirigida.

Ensaio de mutação sítio dirigida apresentados neste trabalho demonstraram que os resíduos E937, E970 e D1036 do domínio FAT são críticos para interação entre as duas proteínas. Esses resíduos localizados na superfície das hélices 1 e 4 da proteína FAT, conferem uma carga negativa à superfície da

proteína, favorecendo a interação com resíduos positivos do domínio de ligação ao DNA de MEF2C_95.

A interação entre FAK e MEF2C apresentada nesse estudo demonstra um novo tipo de interação e função do domínio FAT. A principal função na célula do domínio FAT refere-se à ligação e direcionamento da FAK aos pontos de adesão focal (SHEN e SCHALLER, 1999). O domínio FAT exerce esta função via ligação com as proteínas citoplasmáticas paxilina e talina, por sua vez associadas a porção citoplasmática das integrinas (HAYASHI et al., 2002). Além disso, também no domínio FAT, o resíduo de tirosina 925 quando fosforilado, cria um motivo do tipo SH2 para interação com a proteína adaptadora Grb2, levando a ativação de vias proliferação e crescimento celular através da sinalização pela família de proteínas quinase ativadas por mitogenos (MAPK -*mitogen-activated protein kinase*) (SCHLAEPFER et al., 1998). Dessa forma, ainda não foram descritas interações do domínio FAT da FAK com proteínas nucleares.

Em relação ao MEF2C, existe uma ampla demonstração na literatura que a família MEF2 liga-se ao DNA na forma de homo ou heterodímero (HAN et al., 2003; WU et al., 2010; HE et al., 2011). Baseado em nossos dados de CXMS e nos dados de SAXS observamos que a proteína MEF2C_95 também interage com a proteína FAT na forma dimérica, através do domínio de interação ao DNA. Essas evidências sugerem que a FAK pode competir com o DNA pelo fator de transcrição MEF2C, atuando como uma proteína inibidora da ligação de MEF2C ao DNA.

A região de MEF2C que interage com a FAK ocorre em uma região diferente das proteínas repressoras da atividade de MEF2. Por exemplo, as proteínas Cabin 1 e as HDACs 4 e 5 reprimem a atividade transcricional de MEF2 por interagirem na face oposta da interação de MEF2 ao DNA e impedir a ligação do co-ativador p300 (Wu et al., 2010; HE et al., 2011). A interação proteína-proteína no sítio de ligação de MEF2C ao DNA ainda não foi descrita na literatura, sugerindo um novo mecanismo de controle da atividade de MEF2C dependente da diminuição da afinidade de MEF2 ao DNA.

Além disso, a sinalização via MAPK que leva a ativação de MEF2C ocorre via fosforilação em resíduos de serina/treonina tanto nos domínios MADS/MEF2 como no domínio de transativação. Diante disso, ensaios de fosforilação utilizando a proteína FAK selvagem com a construção 1-169 de MEF2C foram realizados. No entanto, não foi observada a fosforilação em resíduos de tirosina na proteína MEF2C_169 (dados não mostrados). Estudos adicionais utilizando a proteína MEF2C inteira deverão ser realizados para poder concluir se FAK regula a atividade de MEF2C através da fosforilação em resíduos de tirosina. Da mesma forma, não foi encontrado dados na literatura a respeito da regulação de proteínas da família MEF2 por proteínas quinases através da fosforilação em resíduos de tirosina.

A região de MEF2C que interage com FAK é altamente conservada, apresentando uma homologia maior que 90% entre os membros da família MEF2,

sugerindo que a FAK possa interagir e regular também a função transcricional dos quatro membros da família MEF2.

Nesse estudo foi realizada e comparada a afinidade da interação entre MEF2C_95 ao domínio FAT e ao DNA. O valor da constante de dissociação (Kd) entre a proteína MEF2C_95 e o domínio FAT da FAK demonstrou ser bastante alto, em torno de 40 nM. Já o valor de Kd entre MEF2C_95 e o DNA foi de aproximadamente 190 nM.

Estudos realizados por MEIERHANS et al., 1998, trabalhando com um fragmento de MEF2C, entre os resíduos 1-117, observaram uma afinidade ao DNA em torno de 110 nM. Estudos com a proteína MEF2A inteira demonstraram, também por fluorescência polarizada, que a proteína MEF2A apresenta uma afinidade ao DNA próxima de 60 nM (OCTOBRE et al., 2005).

Ou seja, de acordo com nossos dados e os apresentados na literatura, podemos afirmar que a afinidade entre MEF2C_95 à FAT é aproximadamente 5 vezes maior que a afinidade de MEF2C_95 à sua sequencia consenso de DNA. Esses resultados reforçam a ideia que a FAK pode competir com o DNA pelo sítio do dímero de MEF2C, agindo dessa forma como uma proteína inibitória, deslocando ou impedindo a ligação de MEF2C à sua sequencia específica no DNA.

Nesse trabalho, foi demonstrado utilizando ensaios de gel shift (EMSA) dados que reforçam a hipótese que o domínio FAT compete com DNA pela interação com MEF2C. Concentrações crescentes de FAT diminuem a ligação de MEF2C_95 à sonda de DNA marcada radioativamente. De acordo com esses dados, podemos concluir que a porção FAT da FAK apresenta uma afinidade maior que a sequência consenso de DNA pelo fator de transcrição MEF2C, sendo o FAT capaz de deslocar a interação MEF2C_95/DNA *in vitro*.

Estudos adicionais foram realizados para avaliar se a interação FAK/MEF2C, além de diminuir a afinidade ao DNA é capaz de interferir na atividade transcricional de MEF2C. Para confirmar nossa hipótese foram realizados ensaios de gene repórter contendo quatro sítios consenso de reconhecimento e ligação dos fatores de transcrição MEF2. De acordo com nossos resultados, a superexpressão de MEF2C foi capaz de ativar em torno de 20 vezes a expressão do gene repórter de luciferase quando comparado às células que receberam apenas o gene repórter. No entanto quando co-expresso a FAK inteira ou somente a região C-terminal, observamos que o aumento foi de 5 vezes. Esse efeito não foi observado quando co-expresso o domínio FERM da FAK. Esses dados demonstraram que a FAK diminui a atividade transcricional de MEF2C, provavelmente através da interação inibitória da região C-terminal (que contém o domínio FAT) da FAK, com o domínio de ligação de MEF2C ao DNA.

Todos esses dados demonstram que a interação entre FAK e MEF2C é inibitória tanto da ligação de MEF2C ao DNA quanto da regulação da atividade transcricional de MEF2C.

No entanto ainda não sabemos qual a importância do papel inibitório da FAK na atividade transcricional de MEF2C. Dados na literatura demonstram que tanto FAK como MEF2C encontram-se ativados e participam da resposta hipertrófica do miócito cardíaco quando submetido a estímulos mecânicos (NADRUZ et al., 2003). Foi demonstrado que a atividade de ligação de MEF2C ao DNA aumenta cerca de 2 a 3 vezes tanto em resposta a sobrecarga de pressão como em resposta a sobrecarga de volume (MOLKENTIN e MARKHAM, 1993).

Várias evidências dão suporte à participação dos fatores da família MEF2 na regulação da expressão gênica do miocárdio em resposta a estímulos hipertróficos. Estímulos mecânicos em miócitos cardíacos ativam rapidamente os fatores de transcrição MEF2 e sua ativação precoce coordena a expressão e ativação de genes de resposta imediata e genes relacionados a proteínas estruturais (NADRUZ et al., 2003). De maneira geral, estes resultados indicam a importância dos fatores MEF2 na coordenação do controle gênico em resposta a estímulos mecânicos (NADRUZ et al., 2003; NADRUZ et al., 2004; NADRUZ et al., 2005).

Por outro lado, alguns dados da literatura vão contra no que diz respeito ao papel do MEF2 na resposta hipertrófica do miócito cardíaco (Xu et al., 2006; El

Azzouzi et al., 2010). Estudos demonstraram que as proteínas pertencentes à família MEF2 não são necessárias para a progressão da resposta hipertrófica do miócito frente a estímulos mecânicos (El Azzouzi et al., 2010). Da mesma forma, foi demonstrado que a superexpressão de MEF2A e MEF2C em camundongos transgênicos está associada ao aparecimento espontâneo de cardiomiopatia dilatada. Além disso, esses animais não desenvolvem hipertrofia em resposta a estímulos mecânicos (Xu et al., 2006). Nesse contexto, há evidências que a participação dos fatores de transcrição MEF2 na resposta hipertrófica do miócitos pode ocorrer de forma indireta.

Uma das inferências de MEF2 como um mediador hipertrófico foi feita com base em semelhanças conhecidas entre os fatores de transcrição SRF (*Serum Response Factor*) e MEF2, ambos pertencentes à família MADS-box e responsivos a estímulos de estresse, de desenvolvimento e de mitogéno. Camundongos transgênicos com superexpressão de SRF no coração demonstraram um fenótipo de cardiomiopatia hipertrófica (ZHANG et al., 2001). Além disso, a superexpressão de SRF em miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura induziu um fenótipo hipertrófico com aumento na área superficial e de estruturas sarcoméricas (ZHANG et al., 2001). Por outro lado, a superexpressão de MEF2A ou MEF2C nesse mesmo modelo de cultura de células, induziu desorganização sarcomérica e fenótipo alongado dos miócitos compatível com cardiomiopatia dilatada (Xu et al., 2006).

Nesse mesmo contexto, os fatores MEF2 foram indiretamente implicados na mediação da hipertrofia cardíaca através da sua interação com os repressores transcricionais HDAC de classe II. Segundo os autores, a saída de HDAC4 e HDAC5 do núcleo permite o aumento da atividade transcricional de MEF2, levando à hipertrofia cardíaca (LU et al., 2000). Isso porque camundongos com deleção de HDAC5 e 9 desenvolvem exagerada hipertrofia em resposta a sobrecarga de pressão (CHANG et al., 2004). No entanto, HDACs de classe II interagem com uma grande variedade de outros fatores de transcrição além MEF2. Portanto a ativação de vias pro-hipertrofica em animais com deleção de HDAC 5 e 9 pode ser mediada pela ativação de outros fatores de transcrição envolvidos na resposta hipertrofica do miócito cardíaco.

Portanto, alguns estudos demonstram a importância de MEF2 no desenvolvimento da hipertrofia, enquanto outros demonstram que a ativação desse fator não é suficiente para a indução da hipertrofia. Dessa forma, podemos concluir que as funções dos fatores de transcrição MEF2 em miócitos cardíacos após o desenvolvimento embrionário são pouco compreendidas.

5.2. Avaliação gênica e fenotípica da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos

Estudos de ganho de função, por meio da superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos, foram realizados para compreender o papel de MEF2C nessas células. Os efeitos no transcriptoma e no fenótipo foram avaliados através do uso das técnicas: microarranjo de DNA (*Microarray*), PCR em tempo real, *western blotting* e microscopias de luz, confocal e eletrônica de transmissão.

Os resultados do presente estudo demonstraram que miócitos cardíacos em cultura superexpressando MEF2C apresentam um perfil gênico contrário ao apresentado por miócito cardíaco em crescimento hipertrófico. No ensaio de microarranjo de DNA foram identificados 1072 genes diferencialmente expressos (com variação mínima de ± 2 vezes e valor de $p < 0,05$) entre miócitos cardíacos de ratos neonatos com tratamento com Ad-MEF2C comparados ao controle Ad- β Gal. Desses, 49% apresentaram aumento na expressão gênica contra 51% com diminuição. Os genes foram submetidos à análise quanto aos seus aspectos funcionais através do programa *Ingenuity*TM. Observou-se que os genes com expressão aumentada estão relacionados à replicação do DNA e progressão do ciclo celular. Por outro lado, os genes com expressão diminuída estão relacionados a proteínas sarcoméricas e estruturais. É descrito que a progressão

do fenótipo hipertrófico de miócitos cardíacos é acompanhada com um aumento na expressão de genes estruturais e principalmente sarcoméricos, com formação e disposição de novos sarcômeros em paralelo, levando ao aumento no tamanho do miócito (SADOSHIMA e IZUMO 1997).

O fenótipo do miócito cardíaco superexpressando MEF2C avaliado por microscopia de luz, confocal e eletrônica de transmissão demonstrou um aumento no número de células multinucleadas e uma diminuição considerável de estruturas sarcoméricas, não apresentando fenótipo hipertrófico. A presença de células binucleadas em miócitos cardíacos é um fenômeno fisiológico, ocorrendo em torno de 10% durante os primeiros dias pós-natal (PASUMARTHI et al., 1996). Em nossos estudos, observou-se que em miócitos cardíacos controle, o número de células binucleadas é de aproximadamente 10-15%. Com o tratamento com Ad-MEF2C por 48 horas, o número de miócitos binucleados foi de 40-45%, um aumento aproximado de três vezes. O aumento no número de células multinucleadas está relacionado ao aumento na síntese de DNA com presença de mitose, porém com ausência de citocinese (AHUJA et al., 2007). Em nosso estudo, observamos algumas evidências que os miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C apresentam aumento na replicação do DNA. Diversos genes identificados diferencialmente aumentados estão relacionados ao processo de replicação do DNA. No entanto estudos adicionais serão realizados para avaliar se há aumento na proliferação de miócitos ou aumento na síntese de DNA decorrente do tratamento com Ad-MEF2C.

As observações realizadas nesse estudo baseiam-se nos resultados de microarranjo de DNA que demonstraram um aumento na transcrição de genes envolvidos na síntese de DNA e progressão do ciclo celular e nas alterações fenotípicas do miócito. Baseado nesses dados, podemos sugerir que as alterações morfológicas do miócito cardíaco com superexpressão de MEF2C podem ser decorrentes de um processo de desdiferenciação e reativação do ciclo celular.

Nesse contexto, sabe-se que o miócito cardíaco adulto responde ao estímulo de estresse por três maneiras distintas: Hipertrofia; Morte celular e hiperplasia (BUJA e VELA, 2008). O crescimento no número de miócitos cardíacos no coração de adultos pode ocorrer tanto pela reativação do ciclo celular, como pelo recrutamento e diferenciação de células progenitoras, cardíacas ou circulantes, em miócitos cardíacos funcionais (BUJA e VELA, 2008). Em relação ao crescimento do miócito maduro por divisão celular é necessário um processo de desdiferenciação anterior ao processo de divisão celular (ZHANG et al., 2010).

De fato, a replicação de miócitos cardíacos após lesão do miocárdio em rato ou *zebrafish* é precedida por evidência molecular e/ou morfológica de desdiferenciação, como por exemplo, expressão de marcadores de síntese de DNA e degeneração sarcomérica (OBERPRILLER & OBERPRILLER, 1974; JOPLING et al, 2010; KIKUCHI et al, 2010; PORRELLO et al, 2011).

Em nossos estudos com superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos, ambas observações referentes à expressão de marcadores de síntese de DNA e à

degeneração sarcomérica foram relatadas, reforçando a hipótese que um processo de desdiferenciação e uma tentativa de reativação do ciclo celular estejam ocorrendo.

A proteína p38 foi relacionada como um regulador negativo da proliferação de miócitos cardíacos (ENGEL et al., 2005). No entanto, a inibição de p38 não foi suficiente para resultar na proliferação de cardiomiócitos. Por outro lado o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) foi confirmado como um regulador positivo da proliferação de cardiomiócitos. Estimulação de miócitos cardíacos com FGF resultou no aumento na síntese de DNA sem ocorrência de proliferação. No entanto, a simultânea inibição de p38 e estimulação com FGF1 é acompanhada pela proliferação de miócitos cardíacos (ENGEL et al., 2005). Recentemente, foi relatado que miócitos cardíacos de rato adulto em cultura com estimulação com fator de crescimento de fibroblasto (FGF), são capazes de desdiferenciar, promover a divisão celular e re-diferenciar em miócito cardíaco funcional (Zhang et al., 2010). A desdiferenciação desses miócitos cardíacos adultos foi acompanhada pela diminuição na expressão proteínas inibidoras do ciclo celular, como p21, p53 e 14-3-3, além da diminuição da expressão de proteínas sarcoméricas e aumento de marcadores de proliferação celular, como Ki67, BrdU e histona H3 fosforilada (Zhang et al., 2010).

Em nosso estudo, a degeneração sarcomérica observada por microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão corroboram com os dados obtidos por microarranjo de DNA, PCR em tempo real e WB, que demonstraram

uma diminuição na expressão de genes sarcoméricos, como miosina, actina e desmina. É possível que durante o processo de desdiferenciação ocorra repressão de diversos genes sarcoméricos, o que justificaria a perda considerável de estruturas sarcoméricas. Essa repressão gênica pode estar associada ao aumento qualitativo de heterocromatina observada no núcleo de miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C.

Outra alteração fenotípica observada nos miócitos cardíacos com superexpressão de MEF2C foi o aumento na quantidade de vesículas citoplasmáticas e a associação dessas vesículas com mitocôndrias. A natureza das vesículas ainda é desconhecida em nosso estudo. Essas vesículas associadas a mitocôndrias poderiam ser indícios que essa célula apresenta-se em processo de autofagia. No entanto morfológicamente o processo de autofagia apresenta-se de forma diferente, no qual a organela obsoleta é envolta por membrana, apresentando, portanto duplas ou múltiplas membranas (CLARKE, 1990), morfologia não observada em nosso material.

Alguns estudos sugerem que essas “vesículas” tratam-se na verdade de gotículas de natureza lipídica (*Lipid Droplets*-LD), que consistem em acúmulo de triacilglicerol. Foram relatadas associações entre essas gotículas lipídicas e mitocôndrias (BLANCHETTE-MACKIE e SCOW, 1983), onde acumulam e transportam ácidos graxos para os locais de β -oxidação. A homeostase energética depende de um balanço crítico entre a absorção de ácidos graxos (AG) e do consumo por oxidação mitocondrial, evitando a acumulação de intermediários lipídicos tóxicos

e/ou lipídios oxidados. O acúmulo de LD foi relacionado a disfunções mitocondriais (ZEHMER et al., 2009), portanto a formação dos LD pode estar relacionada à proteção e prevenção da lipotoxicidade celular (WANG et al., 2011).

Apesar de cardiomiócitos normalmente não acumularem LD, eles podem fazê-lo durante o jejum (SUZUKI et al 2001), ou em condições patológicas, como isquemia (JODALEN et al 1985;. GREVE et al 1990) e obesidade (MCGAVOCK et al ou 2006). No coração isquêmico, LD acumula principalmente em miócitos cardíacos presentes na periferia da área infartada (JODALEN et al, 1985;. STRAETER-KNOWLEN et al 1996), e tem sido sugerido como marcador de isquemia em células viáveis. De forma geral, baseado em nossos resultados, o aumento no número de “vesículas” e associação com mitocôndria, em miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C, podem ser na verdade acúmulo de lipídio intracelular, resultado de alterações no balanço energético e na função mitocondrial. No entanto estudos adicionais deverão ser realizados para avaliar o estado funcional das mitocôndrias em miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C e sua relação com a formação e acúmulo de LD.

5.3 Efeitos da interação entre MEF2C e FAK na homeostase de miócitos cardíacos.

Em nossos estudos, a superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos foi acompanhada por diminuição da expressão de genes sarcoméricos associado a desorganização do sarcômero. Essas características associadas ao aumento na expressão de genes relacionado à síntese de DNA e progressão do ciclo celular sugerem que MEF2C induz a desdiferenciação e proliferação celular.

Portanto, para avaliar os efeitos da interação MEF2C/FAK nos efeitos fenotípicos e na expressão de genes sarcoméricos, foi realizada a concomitante superexpressão de MEF2C e FAK (ou domínios) em miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura. Como resultado observamos que a diminuição na expressão de proteínas sarcoméricas como Miosina e Desmina provocadas pela superexpressão de MEF2C foi atenuada com a superexpressão de FAK e ainda mais com a superexpressão do domínio C-terminal da FAK.

O fenótipo dos miócitos cardíacos tratados com Ad-MEF2C + Lent-FAK ou controle Lent-GFP foi avaliado com a utilização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se que a superexpressão de FAK impediu a desorganização sarcomérica nos miócitos cardíacos de ratos neonatos tratados com Ad-MEF2C quando comparados ao controle com superexpressão de GFP.

O conjunto de dados demonstra que a superexpressão de FAK impede a redução da expressão de genes sarcoméricos e a desorganização sarcomérica provocados pela superexpressão de MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos em cultura. Isso sugere que a interação inibitória de FAK com MEF2C impede a desdiferenciação celular promovida pela superexpressão de MEF2C nessa célula.

Foi demonstrada a importância da família de fatores de transcrição MEF2 no desenvolvimento embrionário do coração, como um regulador de outros fatores de transcrição necessários para a diferenciação de cardiomioblastos em cardiomiócitos (LIN et al., 1997; MCKINSEY et al., 2002). A deleção de MEF2C em camundongos é acompanhada pela diminuição da expressão de genes estruturais cardíacos e mortalidade embrionária (LIN et al., 1997). Camundongos com deleção de MEF2A morrem subitamente durante o período perinatal com dilatação do ventrículo direito e desorganização miofibrilar (NAYA et al., 2002). Os defeitos estruturais apresentados pelo coração dos animais com deleção de membros da família MEF2 são decorrentes de defeitos na diferenciação dos mioblastos em miócitos cardíacos (LIN et al., 1997). No entanto ainda não está compreendido o papel dos fatores de transcrição MEF2 em miócitos cardíacos pós-natal e os efeitos provocados pela ativação de membros da família MEF2 após o período embrionário.

Durante o período pós-natal, o coração de mamíferos apresenta uma diminuição da proliferação de miócitos, promovendo o aumento do órgão principalmente por hipertrofia do miócito cardíaco. Portanto nesse período são ativadas vias de sinalização intracelular que promovem o desenvolvimento hipertrófico fisiológico do miócito cardíaco e concomitante inibição do ciclo celular (BUJA e VELA, 2008; ZHANG et al., 2010).

Estudos de nosso laboratório demonstraram a importância da FAK no desenvolvimento hipertrófico do miócito cardíaco. Recentemente demonstramos que a superexpressão da FAK em miócitos cardíacos de ratos neonatos foi suficiente para promover o crescimento hipertrófico pela ativação da via PI3K-AKT-mTOR (SANTOS et al., 2011). Animais transgênicos com superexpressão cardíaca específica para FAK, com a utilização do promotor α -MHC, são capazes de desenvolver espontaneamente o fenótipo hipertrófico (CLEMENTE et al., 2011). Por outro lado, a diminuição da expressão de FAK no coração de camundongos, com a utilização de siRNA^{FAK}, impediu o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca adaptativa em resposta à sobrecarga de pressão por coarctação da aorta (CLEMENTE et al., 2007). Além disso, DiMICHELE et al., 2006, demonstraram que a perda da expressão de FAK atenua a resposta hipertrófica dos cardiomiócitos em resposta à coarctação da aorta, incluindo a expressão de marcadores moleculares de hipertrofia. Esses dados demonstram que a FAK é necessária e suficiente para o desenvolvimento da hipertrofia do miócito cardíaco.

Ainda mais interessantes são as funções desempenhadas pela região C-terminal da FAK, denominada FRNK (FAK relacionada-não-quinase, por não possuir os domínios FERM e quinase) expressa de forma independente da FAK. Estudos recentes em coração de ratos neonatos demonstraram que o início da expressão de FRNK endógena coincide com a parada no ciclo celular do miócito cardíaco pós-natal (O'NEILL et al., 2012). A superexpressão de FRNK no coração embrionário leva a letalidade associada à redução na proliferação de cardiomiócitos. Isso sugere que o aumento de FRNK pós-natal promove a quiescência na proliferação do miócito (O'NEILL et al., 2012). Por outro lado, a depleção de FRNK em miócitos cardíacos de camundongos promove um aumento na síntese de DNA no 10º dia pós-natal, acompanhado por: aumento na ploidia, multinucleação celular, marcações positivas de citocinese e divisão celular sem evidências de apoptose (O'NEILL et al., 2012). Além disso, os corações desses animais com depleção de FRNK desenvolveram alargamento ventricular em decorrência do crescimento por proliferação dos miócitos (hiperplasia) em vez de hipertrofia (O'NEILL et al., 2012). Estes dados indicam que a FRNK endógena tem papel importante na homeostase do miócito, regulando a síntese de DNA e a divisão celular no miocárdio pós-natal.

A interação entre a FAK e o fator de transcrição MEF2C é mediada pelo domínio FAT (localizado na região C-terminal da FAK e também presente na proteína FRNK). Além disso, fisiologicamente, durante os primeiros dias do desenvolvimento pós-natal do coração, os miócitos cardíacos apresentam baixos

índices de proliferação, apresentando o crescimento por hipertrofia dos miócitos cardíacos. Portanto, podemos sugerir que o papel da FAK (mediada pela região C-terminal) e da FRNK, seja promover a inibição de membros da família MEF2, evitando a desdiferenciação celular promovendo dessa forma a hipertrofia do miócito cardíaco pós-natal e o crescimento fisiológico do coração.

6 - CONCLUSÃO.

Conclusão

Nossos achados demonstram um novo mecanismo de regulação da atividade transcricional de MEF2C que ocorre por meio de uma interação inibitória entre o domínio FAT da FAK e o domínio de ligação ao DNA do dímero de MEF2C. O conjunto de dados demonstra que a ativação do fator de transcrição MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos induz a desdiferenciação e ativação de mecanismos de progressão do ciclo celular e que a FAK impede esses efeitos através da interação inibitória no domínio de ligação de MEF2C ao DNA

Baseado em dados da literatura e em nossas observações propomos um modelo (Figura 48) do processo de diferenciação do miócito cardíaco durante o período embrionário e a progressão do miócito cardíaco fetal durante os primeiros dias pós-natal. No modelo estão representadas as proteínas ativadoras do processo de diferenciação, como MEF2C, Tbx5, Nkx2.5, GATA-4 e Rb. Nessa fase, a ativação de FAK, Src e p38a impede a progressão da diferenciação, mantendo as células no estado indiferenciado. Já no desenvolvimento do miócito cardíaco fetal pode ocorrer diversos processos que inclui a multinucleação, desdiferenciação, crescimento por hiperplasia (proliferação) e hipertrofia. Nesse trabalho, observou-se que a ativação do fator de transcrição MEF2C em miócitos cardíacos de ratos neonatos, favorece os processos de multinucleação e desdiferenciação não sendo observado o fenótipo hipertrófico. Por outro lado, foi demonstrado que a FAK participa de forma crítica para o desenvolvimento hipertrófico do miócito cardíaco.

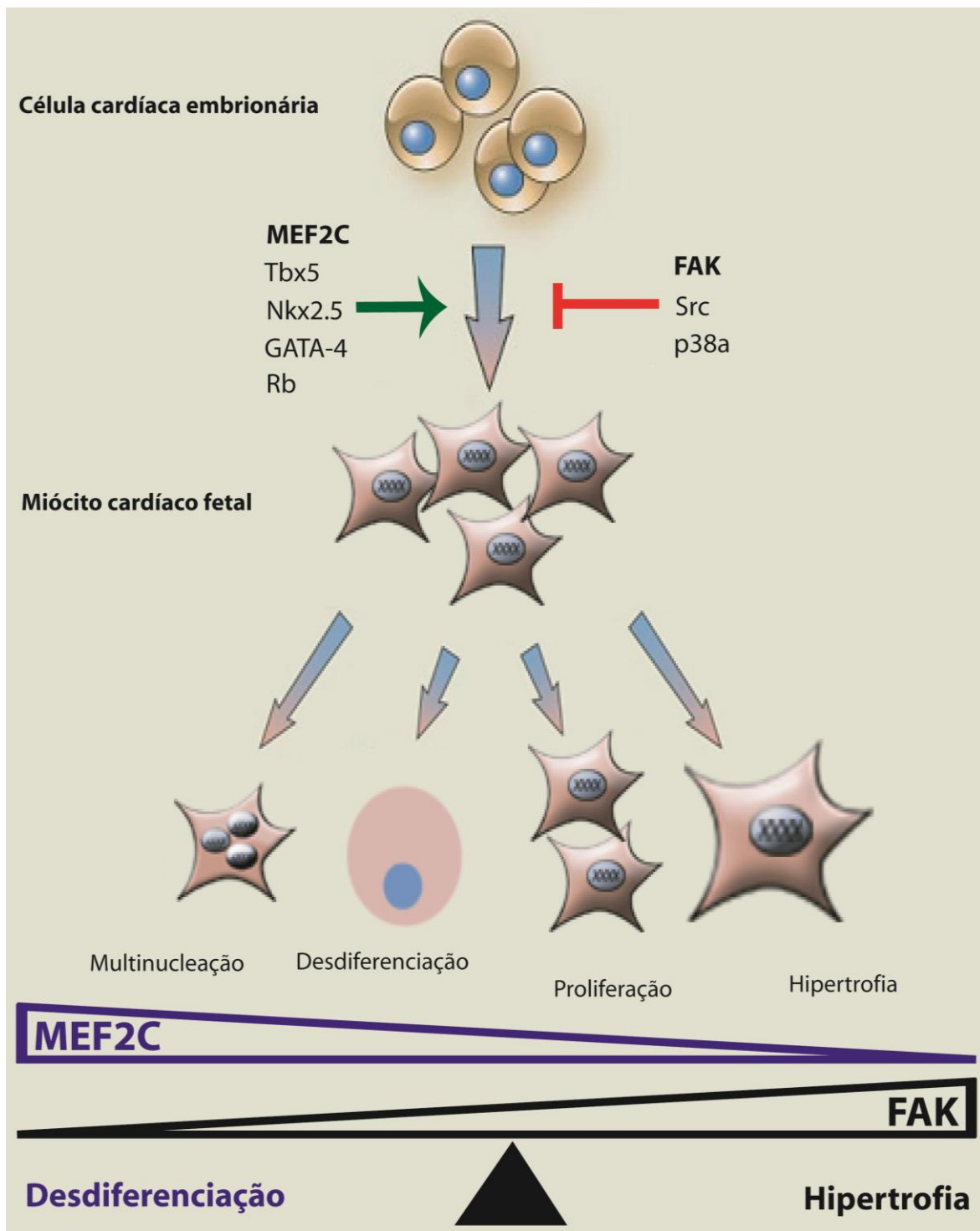


Figura 48 – Modelo proposto da diferenciação do miócito cardíaco fetal, da progressão durante os primeiros dias pós-natal e as proteínas envolvidas.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

AHUJA P, SDEK P, MACLELLAN WR. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. **Physiol Rev.** 2007; 87: 521–544.

BACKS J, OLSON EN. Control of Cardiac Growth by Histone Acetylation/Deacetylation. **Circ Res.** 2006; 98: 15 - 24.

BAJGELMAN MC, COSTANZI-STRAUSS E, STRAUSS BE. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. **J Biotechnol.** 2003; 103(2): 97-106.

BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN SM, FINATO N, BUS-SANI R, NADALGINARD B, SILVESTRI F, LERI A, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. **N Engl J Med.** 2001; 344: 1750 –1757.

BERGMANN O, BHARDWAJ RD, BERNARD S, ZDUNEK S, BARNABÉ-HEIDER F, WALSH S, ZUPICICH J, ALKASS K, BUCHHOLZ BA, DRUID H, JOVINGE S, FRISÉN J. Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans **Science.** 2009; 324 (5923), 98-102.

BLACK BL, OLSON EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 1998; 14: 167-96.

BLANCHETTE-MACKIE EJ, SCOW RO. Movement of lipolytic products to mitochondria in brown adipose tissue of young rats: an electron microscope study. **J. Lipid Res.** 1983; 24:229–44.

BREITBART RE, LIANG CS, SMOOT LB, LAHERU DA, MAHDAVI V, NADAL-GINARD B. A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of the myogenic lineage. **Development.** 1993;118(4):1095-106.

BUJA LM e VELA D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. **Cardiovasc Pathol.** 2008; 17(6):349-74.

CAIAZZO M, DELL'ANNO MT, DVORETSKOVA E, LAZAREVIC D, TAVERNA S, LEO D, SOTNIKOVA TD, MENEGON A, RONCAGLIA P, COLCIAGO G, RUSSO G, CARNINCI P, PEZZOLI G, GAINETDINOV RR, GUSTINCICH S, DITYATEV A, BROCCOLI V. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. **Nature.** 2011; 476: 224–227.

CALALB MB, POLTE TR, HANKS SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. **Mol Cell Biol.** 1995; 15: 954–963.

CAPASSO JM, BRUNO S, CHENG W, LI P, RODGERS R, DARZYNKIEWICZ Z, ANVERSA P. Ventricular loading is coupled with DNA synthesis in adult cardiac myocytes after acute and chronic myocardial infarction in rats. **Circ Res** 1992; 71:1379–1389.

CARDOSO AC. FAK interage com MEF2 e ativa região intrônica regulatória do fosfolamban em resposta ao estímulo mecânico. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Estadual de Campinas. 2008.

CARY LA e GUAN JL. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. **Front Biosci.** 1999; 15: 102-13.

CECCARELLI DFJ, SONG HK, POY F, SCHALLER MD, ECK MJ. Crystal Structure of the FERM Domain of Focal Adhesion Kinase. **J Biol Chem.** 2006; 281: 252 - 259.

CHAN KT, BENNIN DA, HUTTENLOCHER A. Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). **J Biol Chem.** 2010; 285(15):11418-26.

CHANG S, MCKINSEY TA, ZHANG CL, RICHARDSON JA, HILL JA, OLSON EN. Histone Deacetylases 5 and 9 Govern Responsiveness of the Heart to a Subset of Stress Signals and Play Redundant Roles in Heart Development. **Mol Cell Biol.** 2004; 24: 8467-8476

CHEN CH, APPEDDU AP, PARSONS JT, HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, GUAN JL. Interaction of Focal Adhesion Kinase with Cytoskeletal Protein Talin. **ASBMB.** 1995; 270: 16995-16999.

CHEN HC, APPEDDU PA, ISODA H, GUAN JL. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. **J. Biol. Chem.** 1996; 271: 26329-26334.

CLARKE PG. Developmental cell death: Morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat. Embryol. (Berl.)** 1990; 181(3): 195–213.

CLAYCOMB WC. Control of cardiac muscle cell division. **Trends Cardiovasc Med.** 1992; 2: 231–236.

CLEMENTE CFMZ, TORNATORE TF, THEIZEN TH, DECKMANN AC, PEREIRA TC, LOPES-GENDES I, SOUZA JRM, FRANCHINI KG. Targeting Focal Adhesion Kinase With Small Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice. **Circ Res.** 2007; 101: 1339 - 1348.

CLEMENTE CFMZ, XAVIER NETO J, COSTA APD, CONSONNI SR, ANTUNES JE, ROCCO S, PEREIRA MB, JUDICE C, STRAUSS B, JOAZEIRO PP, MATOS-SOUZA JR, FRANCHINI KG. Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mTOR pathways. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.** 2011; 52: 493-501.

CLUBB FJJ e BISHOP SP. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. **Lab Invest.** 1984; 50: 571–577.

COOPER LA, SHEN LT, GUAN JL. Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction. **Mol Cell Biol.** 2003; 23: 8030-8041.

CSEJESI P, LILLY B, HINKLEY C, PERRY M, OLSON EN. Homeodomain Protein MHox and MADS Protein Myocyte Enhancer-binding Factor-2 Converge on a Common Element in the Muscle Creatine Kinase Enhancer. **JBC.** 1994; 269: 16740-45.

DIMICHELE LA, DOHERTY LT, ROJAS M, BEGGS HE, REICHARDT LF, MACK CP, TAYLOR JM. Myocyte-Restricted Focal Adhesion Kinase Deletion Attenuates Pressure Overload–Induced Hypertrophy **Circ Res.** 2006; 99:636-645.

DOMINGOS PP, FONSECA PM, NADRUZ WJR, FRANCHINI KG. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. **Am J Physiol (Heart Circ Physiol).** 2002; 282: H556–H564.

EL AZZOUZI H, VAN OORT RJ, VAN DER NAGEL R, SLUITER W, BERGMANN MW, DE WINDT LJ. MEF2 transcriptional activity maintains mitochondrial adaptation in cardiac pressure overload. **Eur J Heart Fail.** 2010; 12(1):4-12.

ENGEL FB, SCHEBESTA M, DUONG MT, LU G, REN S, MADWED JB, JIANG H, WANG Y, KEATING MT. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. **Genes Dev.** 2005; 19:1175-87.

FEIGIN LA, SVERGUN D.I Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering **Plenum Press**. 1987.

FONSECA PM, INOUE RY, KOBARG CB, CROSARA-ALBERTO DP, KOBARG J, FRANCHINI KG. Targeting to Cterminal Myosin Heavy Chain May Explain Mechanotransduction Involving Focal Adhesion Kinase in Cardiac Myocytes. **Circ Res** 2005; 96: 73 - 81.

FRANCHINI KG, TORSONI AS, SOARES PHA, SAAD MJA. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. **Circ Res**. 2000; 87: 558-565.

FURUTA Y, ILIC D, KANAZAWA S, TAKEDA N, YAMAMOTO T, AIZAWA S. Mesodermal defect in late phase of gastrulation by a targeted mutation of focal adhesion kinase, FAK. **Oncogene**. 1995; 16: 1989-1995.

GREVE G, ROTEVATN S, SVENDBY K, GRONG K. Early morphologic changes in cat heart muscle cells after acute coronary artery occlusion. **Am J Pathol**. 1990; 136: 273–283.

GUINIER A, FOURNET G. Small angle scattering of X-rays **John Wiley and Sons, Inc**. 1955.

HAN, A., PAN, F., STROUD, J.C., YOUN, H.D., LIU, J.O., CHEN, L. Sequence-specific recruitment of transcriptional co-repressor Cabin1 by myocyte enhancer factor-2. **Nature.** 2003; 422: 730-734.

HAYASHI I, VUORI K, LIDDINGTON RC. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. **Nat Struct Biol.** 2002; 9(2):101-6.

HE J, YE J, CAI Y, RIQUELME C, LIU JO, LIU X, HAN A, CHEN L. Structure of p300 bound to MEF2 on DNA reveals a mechanism of enhanceosome assembly. **Nucleic Acids Res.** 2011; 39: 4464-4474.

HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. **J Cell Biol.** 1993; 123: 993.

HILDEBRAND JD, SCHALLER MD, PARSONS JT. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. **Mol Biol Cell.** 1995; 6: 637.

HOSHIJIMA M, CHIEN KR. Mixed signals in heart failure: cancer rules. **J Clin Invest.** 2002; 109:849-855.

ILIC D, FURUTA Y, KANAZAWA S, TAKEDA N, SOBUE K, NAKATSUJI N, NOMURA S, FUJIMOTO J, OKADA M, YAMAMOTO T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. **Nature.** 1995; 377: 539-544.

INGWALL JS, WEISS RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. **Circ Res.** 2004; 95: 135 – 145.

JODALEN H, STANGELAND L, GRONG K, VIK-MO H, LEKVEN J. Lipid accumulation in the myocardium during acute regional ischemia in cats. **J Mol Cell Cardiol.** 1985; 17: 973–980.

JOPLING C, SLEEP E, RAYA M, MARTI M, RAYA A, BELMONTE JC. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. **Nature.** 2010; 464: 606–609.

KAJSTURA J, LERI A, FINATO N, DI LORETO C, BELTRAMI CA, ANVERSA P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. **Proc Natl Acad Sci.** 1998; 95: 8801– 8805.

KARAMBOULAS C, DAKUBO_GD, LIU J, REPENTIGNY YD, YUTZEY K, WALLACE VA, KOTHARY R, SKERJANC IS. Disruption of MEF2 activity in cardiomyoblasts inhibits cardiomyogenesis. **J Cell Sci.** 2006; 119:4315-4321.

KASLER HG e VERDIN E. Histone deacetylase 7 functions as a key regulator of genes involved in both positive and negative selection of thymocytes. **Mol Cell Biol.** 2007; 27(14): 5184-200.

KATO Y, KRAVCHENKO VV, TAPPING RI, HAN J, ULEVITCH RJ, LEE JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. **EMBO J.** 1997; 16(23):7054-66.

KIKUCHI K, HOLDWAY JE, WERDICH AA, ANDERSON RM, FANG Y, EGNACZYK GF, EVANS T, MACRAE CA, STAINIER DY, POSS KD. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. **Nature.** 2010; 464: 601–605.

KOŁODZIEJCZYK SM, WANG L, BALAZSI K, DEREPENTIGNY Y, KOTHARY R, MEGENEY LA. MEF2 is upregulated during cardiac hypertrophy and is required for normal post-natal growth of the myocardium. **Curr. Biol.** 1999; 9:1203.

LAFLAMME MA e MURRY CE. Heart regeneration. **Nature.** 2011; 473(7347):326-35.

LAFLAMME MA e MURRY CE. Regenerating the heart. **Nature Biotechnology.** 2005; 23: 845 – 856.

LAFLAMME MA, CHEN KY, NAUMOVA AV, MUSKHELI V, FUGATE JA, DUPRAS SK, REINECKE H, XU C, HASSANIPOUR M, POLICE S et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. **Nat Biotechnol.** 2007; 25: 1015-1024.

LI F, WANG X, CAPASSO JM, GERDES AM. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. **J Mol Cell Cardiol.** 1996; 28:1737–1746.

LIETHA D, CAI X, CECCARELLI DFJ, LI Y, SCHALLER MD, ECK MJ. Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase **Cell.** 2007; 129: 1177-1187.

LIM TA, CHEN XL, LIM Y, HANSON DA, VO TT, HOWERTON K, LAROCQUE N, FISHER SJ, SCHLAEPFER DD, ILIC D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-Enhanced p53 degradation. **Mol Cell.** 2008; 29: 9-22.

LIM Y, HAN I, JEON J, PARK H, BAHK YY, OH ES. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. **J Biol Chem.** 2004; 279(28):29060-5.

LIN Q, SCHWARZ J, BUCANA C, OLSON EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. **Science.** 1997; 276:1404-1407.

LOIS C, HONG EJ, PEASE S, BROWN EJ, BALTIMORE D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**. 2002; 295(5556): 868-72.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951;193(1):265-75.

Lu J, McKinsey TA, Nicol RL, Olson EN. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. **Proc Natl Acad Sci**. 2000; 97: 4070–4075.

MA K, CHAN JKL, ZHU G, WU Z. Myocyte Enhancer Factor 2 Acetylation by p300 Enhances Its DNA Binding Activity, Transcriptional Activity, and Myogenic Differentiation. **Mol Cell Biol**. 2005; 9: 3575-3582.

MAA MC e LEU TH. Vanadate-dependent FAK activation is accomplished by the sustained FAK Tyr-576/577 phosphorylation. **Biochem Biophys Res Commun**. 1998; 251(1): 344-9.

MANES S, MIRA E, GÓMEZ-MOUTON C, ZHAO ZJ, LACALLE RA, MARTÍNEZ AC. Concerted Activity of Tyrosine Phosphatase SHP-2 and Focal Adhesion Kinase in Regulation of Cell Motility. **Mol Cell Biol**. 1999; 19: 3125 – 3135.

MAO Z, BONNI A, XIA F, NADAL-VICENS M, GREENBERG ME. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. **Science**. 1999; 286:785–790.

MARIN, T.M.; CLEMENTE, C.F.M.Z.; SANTOS, A.M.; PICARDI, P.K.; PASCOAL, V.D.B.; LOPES-CENDES, I.; SAAD, M.J.A.; FRANCHINI, K.G. (2008). Shp2 Negatively Regulates Growth in Cardiomyocytes by Controlling Focal Adhesion Kinase/Src and mTOR Pathways. **CIRC RES**. 103: 813-824.

MCGAVOCK JM, VICTOR RG, UNGER RH & SZCZEPANIAK LS. Adiposity of the heart, revisited. **Ann Intern Med**. 2006;.144: 517–524.

McILWAIN S, SINGH P, DRAGHICESCU P, GOODLETT DR, NOBLE WS. Detecting cross-linked peptides by searching against a database of cross-linked peptide pairs. **J Proteome Res**. 2010; 9(5): 2488–2495.

MCKINSEY TA, ZHANG CL, OLSON EN. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. **Curr Opin Genet Dev**. 2001; 11(5): 497-504.

MCKINSEY TA, ZHANG CL, OLSON EN. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. **Trends Bioch Science**. 2002; 27:40-47.

MEIERHANS D, ALLEMANN RK. The N-terminal methionine is a major determinant of the DNA binding specificity of MEF-2C. **J Biol Chem**. 1998, 273: 26052–26060.

MERCOLA M, RUIZ-LOZANO P, SCHNEIDER MD. Cardiac muscle regeneration: lessons from development. **Genes Dev.** 2011; 25: 299-309.

MOLKENTIN JD, BLACK BL, MARTIN JF, OLSON EN. Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. **Cell.** 1995; 83: 1125-1136.

MOLKENTIN JD, MARKHAM BE. Myocyte-specific enhancer-binding factor (MEF-2) regulates alpha-cardiac myosin heavy chain gene expression in vitro and in vivo. **J Biol Chem.** 1993; 268(26):19512–19520.

MYLONAS E, SVERGUN D.I. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering. **J Appl Cryst.** 2007, 40: 245-249.

NADRUZ JR W, KOBARG CB, CONSTANCIO SS, CORAT PD, FRANCHINI KG. Load-induced transcriptional activation of *c-jun* in rat myocardium: regulation by myocyte enhancer factor 2. **Circ Res.** 2003; 92: 243-251.

NADRUZ JRW, KOBARG CB, KOBARG J, FRANCHINI KG. C-Jun is regulated by a combination of enhanced expression and phosphorylation in acute-overloaded rat heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 2004; 286:H760-H767.

NADRUZ JRW, CORAT MA, MARIN TM, GUIMARAES PEREIRA GA, FRANCHINI KG. Focal Adhesion Kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. **Cardiovasc Res.** 2005; 68: 87-97.

NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, TSAI SC, FIELD LJ. Expression of Mutant p193 and p53 Permits Cardiomyocyte Cell Cycle Reentry After Myocardial Infarction in Transgenic Mice. **Circ Res.** 2004; 94: 1606-1614.

NAYA FJ, BLACK BL, WU H, BASSEL-DUBY R, RICHARDSON JA, HILL JA, OLSON EN. Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. **Nat Med.** 2002; 8(11): 1303-9.

NOLAN K, LACOSTE J, PARSONS JT. Regulated Expression of Focal Adhesion Kinase-Related Nonkinase, the Autonomously Expressed C-Terminal Domain of Focal Adhesion Kinase **Mol Cell Biol.** 1999;19(9): 6120–6129.

OBERPRILLER JO, OBERPRILLER JC. Response of the adult newt ventricle to injury. **J Exp Zoology.** 1974; 187:249-259.

OCTOBRE G, LEMERCIER C, KHOCHBIN S, ROBERT-NICOUD M, SOUCHIE C. Monitoring the interaction between DNA and a transcription factor (MEF2A) using fluorescence correlation spectroscopy. **C R Biologies.** 2005, 328:1033–1040.

OLIVETTI G., QUAINI F., SALA R.; et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. **J Mol Cell Cardiol.** 1996; 28: 2005-2016.

OLSON EN. Gene Regulatory Networks in the Evolution and Development of the Heart. **Science.** 2006; 313: 1922-1927.

O'NEILL TJ, MACK CP, TAYLOR JM. Germline deletion of FAK-related non-kinase delays post-natal cardiomyocyte mitotic arrest. **J Mol Cell Cardiol.** 2012; 53(2):156-64.

PARSONS JT. Integrin-mediated signalling: regulation by protein tyrosine kinases and small GTP-binding proteins. **Curr Opin Cell Biol.** 1996; 8: 146-152.

PASUMARTHI KB, KARDAMI E, CATTINI PA. High and low molecular weight fibroblast growth factor-2 increase proliferation of neonatal rat cardiac myocytes but have differential effects on binucleation and nuclear morphology. Evidence for both paracrine and intracrine actions of fibroblast growth factor-2. **Circ Res.** 1996; 78(1):126-36.

PASUMARTHI KB, NAKAJIMA H, NAKAJIMA HO, SOONPAA MH, FIELD LJ. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. **Circ Res.** 2005; 96: 110 –118.

PENG X, KRAUS MS, WEI H, SHEN TH, PARIAUT R, ALCARAZ A, JI G, CHENG L, YANG Q, KOTLIKOFF MI, CHEN J, CHIEN K, GU H, GUAN JL. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. **J Clin Invest.** 2006; 116:217-227.

PENG X, WU X, DRUSO JE, WEI H, PARK AYJ, KRAUS MS, ALCARAZ A, CHEN J, CHIEN S, CERIONE RA, GUAN JL. Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. **Proc Natl Acad Sci.** 2008; 105: 6638 - 6643.

PEREIRA AHM, CLEMENTE CFMZ, CARDOSO AC, THEIZEN TH, ROCCO AS, JUDICE CC, GUIDO MC, PASCOAL VDB, LOPES-CENDES I, SOUZA JRM, FRANCHINI KG. MEF2C silencing attenuates load-induced left ventricular hypertrophy by modulating mTOR/S6K pathway in mice. **PLoS ONE.** 2009; 12:e8472.

PORRELLO ER, MAHMOUD AI, SIMPSON E, HILL JA, RICHARDSON JA, OLSON EN, SADEK HA. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. **Science.** 2011; 331: 1078-1080.

POTTHOFF MJ e OLSON EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. **Development.** 2007; 134(23): 4131-40.

RUMYANTSEV PP, BORISOV A. DNA synthesis in myocytes from different myocardial compartments of young rats in norm, after experimental infarction and in vitro. **Biomed Biochim Acta.** 1987; 46: S610 –S615.

SADOSHIMA J e IZUMO S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu Rev Physiol.** 1997; 59:551-571.

SANTOS AM, SCHECHTMAN D, CARDOSO AC, CLEMENTE CFMZ, SILVA JC, FIORAMONTE M, PEREIRA MBM, MARIN TM, OLIVEIRA PSL, FIGUEIRA ACM, OLIVEIRA SHP, TORRIANI IL, GOZZO FC, NETO JX, FRANCHINI KG. FERM domain interaction with myosin negatively regulates FAK in cardiomyocyte hypertrophy. **Nat Chem Biol.** 2011; 8(1):102-110.

SAVKUR RS, BURRIS TP. The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. **J Pept Res.** 2004; 63(3): 207-212.

SCHALLER MD, OTEY CA, HILDEBRAND JD, PARSONS JT. Focal Adhesion Kinase and Paxillin Bind to Peptides Mimicking β Integrin Cytoplasmic Domains. **J Cell Biol.** 1995; 130: 1181-1185.

SCHLAEPFER DD, HANKS SK, HUNTER T AND VAN DER GEER P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. **Nature.** 1994; 372: 786-791.

SCHLAEPFER DD, JONES KC, HUNTER T. Multiple Grb2-Mediated Integrin-Stimulated Signaling Pathways to ERK2/Mitogen-Activated Protein Kinase: Summation of Both c-Src- and Focal Adhesion Kinase-Initiated Tyrosine Phosphorylation Events. **Mol Cell Biol.** 1998; 18: 2571 - 2585.

SCHMID G, PFITZER P. Mitoses and binucleated cells in perinatal human hearts. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.** 1985; 48: 59 – 67.

SCHWARTZ MA, SCHALLER MD, GINSBERG MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 1995; 11: 549-599.

SEN A, DUNNMON P, HENDERSON SA, GERARDS RD, AND CHIEN KR. Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of sv40 large t antigen. **J Biol Chem.** 1988; 263: 19132-36.

SENYO SE, KOSHMAN YE, RUSSELL B. Stimulus interval, rate and direction differentially regulate phosphorylation for mechanotransduction in neonatal cardiac myocytes. **FEBS Lett.** 2007; 581: 4241-4247.

SHEN Y, SCHALLER MD. Focal Adhesion Targeting: The Critical Determinant of FAK Regulation and Substrate Phosphorylation. **Mol Biol Cell.** 1999; 10 (8): 2507-18.

SONG K, YOUNG-JAE N, LUO X, QI X, TAN W, HUANG GN, ACHARYA A, SMITH CL, TALLQUIST MD, NEILSON EG, HILL JA, BASSEL-DUBY R, OLSON EN. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. **Nature.** 2012; 485: 599-604.

SOONPAA MH, KIM KK, PAJAK L, FRANKLIN M, FIELD LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 1996; 271: H2183–H2189.

SOONPAA MH e FIELD LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. **Circ Res.** 1998; 83: 15–26.

STEINHAUSER ML. e LEE RT. Regeneration of the heart. **EMBO Mol Med.** 2011; 3: 701–712.

STRAETER-KNOWLEN IM, EVANOCHKO WT, DEN HOLLANDER JA, WOLKOWICZ PE, BALSCHI JA, CAULFIELD JB, KU DD, POHOST GM. ¹H NMR spectroscopic imaging of myocardial triglycerides in excised dog hearts subjected to 24 hours of coronary occlusion. **Circulation.** 1996; 93: 1464–1470.

SUZUKI J, SHEN W-J, NELSON BD, PATEL S, VEERKAMP JH, SELWOOD SP, MURPHY GM, REAVEN E, KRAMER FB. Absence of cardiac lipid accumulation in transgenic mice with heart-specific HSL overexpression. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2001; 281: E857–E866.

SVERGUN DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **J Appl Cryst.** 1992; 25:495-503.

TAKAHASHI K, e YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell.** 2006; 126: 663–676.

TAPSCOTT SJ, DAVIS RL, THAYER MJ, CHENG PF, WEINTRAUB H, LASSAR AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. **Science.** 1988; 242: 405–411.

TAYLOR JM, MACK CP, NOLAN K, REGAN CP, OWENS GK, PARSONS JT. Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. **Mol Cell Biol.** 2001; 21: 1565-1572.

TORSONI AS, CONSTANCIO SS, NADRUZ. JRW, HANKS SK, FRANCHINI KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. **Circ Res.** 2003; 93: 140 – 147.

TORSONI AS, MARIN TM, VELLOSO LA. FRANCHINI, K.G. RhoA/ROCK signaling is critical to activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. **Am J Physiol.** 2005; 289: H1488-1496.

VAN LAAKE LW, PASSIER R, DOEVEDANS PA, MUMMERY CL. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and cardiac repair in rodents. **Circ Res.** 2008; 102(9):1008-10.

VIERBUCHEN T, OSTERMEIER A, PANG ZP, KOKUBU Y, SÜDHOF TC, WERNIG M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. **Nature.** 2010; 463: 1035–1041.

WALSH K, PERLMAN H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation. **Curr Opin Genet Dev.** 1997; 7(5): 597-602.

WANG DZ, VALDEZ MR, MCANALLY J, RICHARDSON J, OLSON EN. The MEF2C gene is a direct transcriptional target of myogenic bHLH and MEF2 proteins during skeletal muscle development. **Development.** 2001; 128: 4623-4633.

WANG H, SREENEVASAN U, HU H, SALADINO A, POLSTER BM, LUND LM, GONG DW, STANLEY WC, SZTALRYD C. Perilipin 5, a lipid droplet-associated protein, provides physical and metabolic linkage to mitochondria. **J Lipid Res.** 2011; 52(12):2159-68.

WANG Z, WANG DZ, PIPES GC, OLSON EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. **Proc Natl Acad Sci.** 2003; 100: 7129–7134.

WU H, ROTHERMEL B, KANATOUS S, ROSENBERG P, NAYA FJ, SHELTON JM, HUTCHESON KA, DIMAIO JM, OLSON EN, BASSEL-DUBY R, WILLIAMS RS. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. **EMBO J.** 2001; 20(22): 6414–6423.

WU Y, DEY R, HAN A, JAYATHILAKA N, PHILIPS M, YE J, CHEN L. Structure of the MADS-box/MEF2 domain of MEF2A bound to DNA and its implication for myocardin recruitment. **J.Mol.Biol.** 2010; 397: 520-533

XU J, GONG NL, BODI I, ARONOW BJ, BACKX PH, MOKKENTIN JD. Myocyte Enhancer Factors 2A and 2C Induce Dilated Cardiomyopathy in Transgenic Mice. **J Biol Chem.** 2006. 281: 9152.

YANG L, SOONPAA MH, ADLER ED, ROEPKE TK, KATTMAN SJ, KENNEDY M, HENCKAERTS E, BONHAM K, ABBOTT GW, LINDEN RM et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. **Nature.** 2008; 453: 524-528.

YI XP, Wang X, GERDS AM, LI F. Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hyperthrophic myocardium. **Hypertension.** 2003; 41:1317-1323.

YI XP, ZHOU J, HUBER L, QU J, WANG X, GERDES AM, LI F. Nuclear compartmentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2006; 290: 2509 - 2515.

YU DH, QU CK, HENEGARIU O, LU X, FENG GS. Protein-tyrosine Phosphatase Shp-2 Regulates Cell Spreading, Migration, and Focal Adhesion. **J Biol Chem.** 1998; 273: 21125.

YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S, NIE J, JONSDOTTIR GA, RUOTTI V, STEWART R, SLUKVIN II, THOMSON JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science.** 2007; 318: 1917–1920.

ZEHMER JK, HUANG Y, PENG G, PU J, ANDERSON RGW, LIU P. A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic . **Proteomics.** 2009; 9(4): 914–921.

ZHANG X, AZHAR G, CHAI J, SHERIDAN P, NAGANO K, BROWN T, YANG J, KHRAPKO K, BORRAS AM, LAWITTS J, MISRA RP, WEI JY. Cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of serum response factor. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2001; 280(4): H1782–H1792.

ZHANG Y, LI TS, LEE ST, WAWROWSKY KA, CHENG K, GALANG G, MALLIARAS K, ABRAHAM MR, WANG C, MARBAN E. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. **PLoS One.** 2010; 5(9):e12559.

ZHAO M, NEW L, KRAVCHENKO VV, KATO Y, GRAM H, DI PADOVA F, OLSON EN, ULEVITCH RJ, HAN J. Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. **Mol Cell Biol.** 1999; 19(1): 21-30.

APÊNDICE I

As proteínas MEF2C_95 e FAK_FAT foram purificadas, incubadas (1:2 FAT:MEF2 mol/mol) sob agitação por 16 horas, 4°C e submetidas a gel filtração em cromatografia utilizando coluna superdex 75 16 60, fluxo 0,3ml/min em tampão 50mM Tris HCl pH 7,5; 50mM NaCl; 2mM DTT. O pico correspondente a eluição do complexo foi concentrado em concentradores AmiconTM (Millipore) a uma concentração final de aproximadamente 10 mg/ml. Posteriormente o complexo MEF2C_95/FAT foi submetido a ensaios de cristalização realizados no Laboratório Automatizado de Cristalização de Macromoléculas (RoboLab) do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). O método utilizado foi de difusão de vapor de gota sentada (*sitting drop*) utilizando 1 µL de proteína e 1 µL de solução do reservatório das placas de cristalização.

Após 10 dias, observamos a formação de cristais na condição 100mM Bis-Tris Propano pH 7.0; 2500mM Sulfato de Amônio (Figura 49_A). Esses cristais foram submetidos ao feixe de raio X na linha de cristalografia de proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) D03BMX1. Ao cristal foi adicionada uma solução crioprotetora de 20% de etilenoglicol para evitar a formação de cristais de gelo. Os cristais difrataram em baixa resolução (máximo 7 Å) o que não permitiu a resolução da estrutura do complexo. Um desses cristais foi submetido a eletroforese SDS-PAGE para avaliar se o cristal tratava mesmo do complexo MEF2C_95/FAT. Conforme podemos observar na figura 49_B, há a presença de duas bandas correspondentes à massa molecular esperada das proteínas.

A partir das condições de cristalização foi realizado o refinamento, variando pH e concentração de sal. Após o refinamento observou-se uma melhora no tamanho dos cristais, em pH 5,5, como indicado na Figura 49_C. Esses cristais estão em processos de refinamento, para obtenção de cristais maiores, em menor número e reprodutíveis.

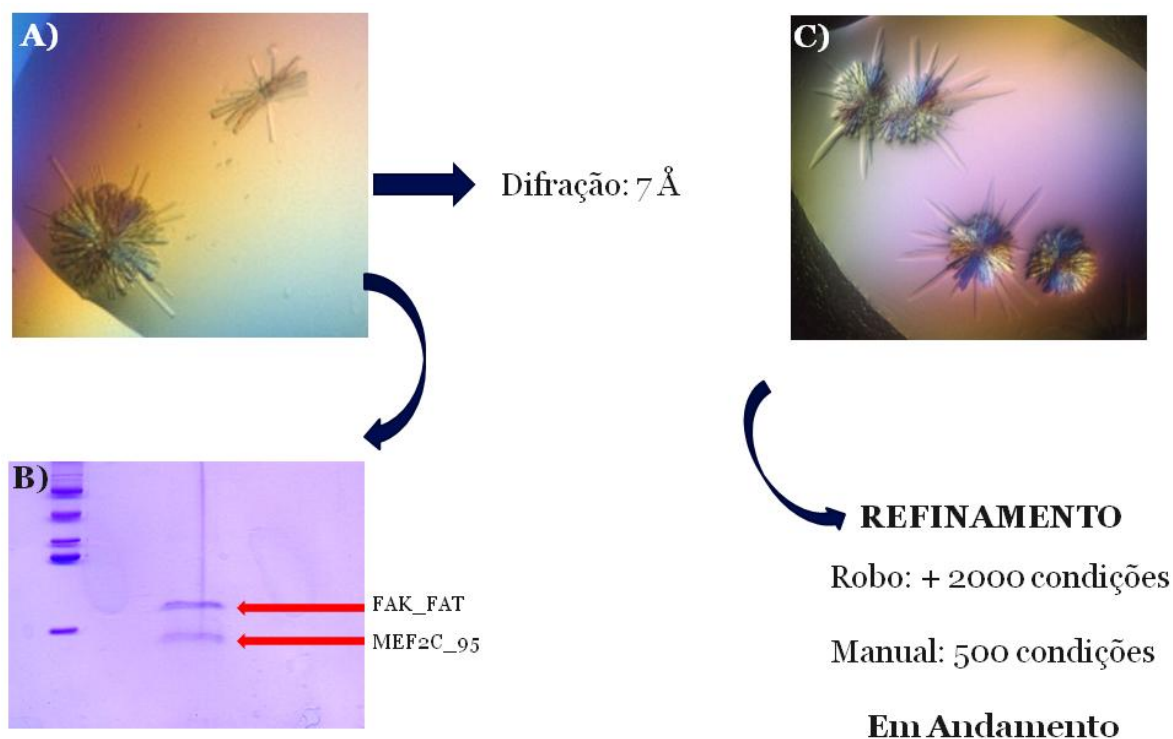


Figura 49 – Cristalização do complexo MEF2C_95/FAT. **A)** e **C)** Fotos representativas dos cristais do complexo. **B)** Gel SDS-PAGE do cristal em A demonstrando a presença das duas proteínas no cristal.

APÊNDICE II

Lista completa dos genes diferencialmente expressos (com variação mínima de ± 2 vezes e valor de $p < 0,05$) entre AdMEF2C e Ad β Gal, classificados em ordem alfabética.

Gene ID	GENE	Descrição	Diferença
10762740	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	2,038
10932917	PFKFB1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1	2,783
10850015	LOC100360676	a disintegrin and metallopeptidase domain 33 (predicted)-like	-2,075
10702660	AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	-2,055
10762792	ACACB	acetyl-CoA carboxylase beta	-2,807
10731047	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	-2,217
10795736	ACTN2	actinin, alpha 2	-2,286
10841348	ACSS2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	-2,256
10726371	ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12	-3,008
10915933	ADAMTS15	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 15	-2,156
10869737	ADAMTSL1	ADAMTS-like 1	-2,717
10834670	ADAMTSL2	ADAMTS-like 2	-4,204
10833985	ADAMTSL4	ADAMTS-like 4	-2,094
10767771	ADORA1	adenosine A1 receptor	-2,253
10701825	ADAT2	adenosine deaminase, tRNA-specific 2	2,060
10817943	AMPD1	adenosine monophosphate deaminase 1	2,009
10709880	AMPD3	adenosine monophosphate deaminase 3	-2,479
10870261	AK4	adenylate kinase 4	2,364
10906643	AMIGO2	adhesion molecule with Ig-like domain 2	3,042
10857430	ARL6IP5	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5	-2,582
10775805	ART3	ADP-ribosyltransferase 3	-3,469
10866507	ART4	ADP-ribosyltransferase 4 (Dombrock blood group)	-2,376
10781207	ADRA1A	adrenergic, alpha-1A-, receptor	-4,360
10892330	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	-2,412
10745095	ALDOC	aldolase C, fructose-bisphosphate	-3,564
10884292	AGMO	alkylglycerol monooxygenase	-3,120
10905819	A4GALT	alpha 1,4-galactosyltransferase	-2,888
10804945	ALPK2	alpha-kinase 2	-4,201
10856888	ALMS1	Alstrom syndrome 1	2,087
10749681	ALYREF	Aly/REF export factor	2,008
10835654	ANGPTL2	angiopoietin-like 2	-3,593
10813969	ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse)	-2,079
10832715	ANK3	ankyrin 3, node of Ranvier (ankyrin G)	-2,001
10937709	ASB11	ankyrin repeat and SOCS box containing 11	-3,072
10938488	ASB12	ankyrin repeat and SOCS box containing 12	-2,364
10891888	ASB2	ankyrin repeat and SOCS box containing 2	-5,070
10820108	ANKRD32	ankyrin repeat domain 32	2,344
10848042	ANO3	anoctamin 3	3,808
10726408	MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	2,266
10901538	LOC100310874	antisense RNA overlapping MCH	2,302
10779811	APEX1	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	2,220
10921380	APOBEC2	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	-2,560
10708011	AEN	apoptosis enhancing nuclease	2,100
10855701	AQP1	aquaporin 1 (Colton blood group)	-2,804
10864848	ALOX5	arachidonate 5-lipoxygenase	2,013
10772863	ARAP2	ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2	2,448
10802023	ARSI	arylsulfatase family, member I	-2,589

10877540	LOC100361323	astrotactin 2-like	-2,173
10746583	ATP5G1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)	-2,461
10770996	ATP5I	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit E	-2,196
10903864	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	3,061
10736557	ATAD5	ATPase family, AAA domain containing 5	4,306
10758555	ATP2A2	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	-2,122
10939958	ATP11C	ATPase, class VI, type 11C	2,068
10831152	ATP6V1G2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G2	-2,211
10769998	ATP1A2	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 2 polypeptide	-2,439
10719728	ATP1A3 (includes EG:232975)	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide	-5,679
10769476	ATP1B1	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	-2,100
10853347	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	-3,217
10866724	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	-2,890
10829082	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	-2,255
10855862	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	4,501
10734853	AURKB	aurora kinase B	2,709
10727683	BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1	2,008
10822864	BBS7	Bardet-Biedl syndrome 7	3,308
10857610	BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	-2,694
10721834	BAX	BCL2-associated X protein	2,148
10935890	BGN	biglycan	-2,234
10840138	BMP2	bone morphogenetic protein 2	2,059
10935038	BEX4	brain expressed, X-linked 4	2,875
10765293	Brp44	brain protein 44	-2,182
10718102	BRP44L	brain protein 44-like	-2,115
10928684	BARD1	BRCA1 associated RING domain 1	2,412
10745850	BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	3,944
10747640	BRCA1	breast cancer 1, early onset	2,888
10759805	BRCA2	breast cancer 2, early onset	3,462
10889965	BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	2,571
10828364	BRD2	bromodomain containing 2	2,045
10752758	BTG3	BTG family, member 3	2,482
10849737	BUB1 (includes EG:100307076)	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	2,716
10838647	BUB1B	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta (yeast)	2,818
10909442	C1QTNF5	C1q and tumor necrosis factor related protein 5	-3,866
10808274	CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)	-2,675
10783607	CDH24	cadherin 24, type 2	2,214
10807525	CDH3	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)	-3,036
10846762	CALCRL	calcitonin receptor-like	3,243
10912917	CACNA2D2	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 2	-4,003
10845306	CACNB4	calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit	2,443
10746327	CACNA1G	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	-4,802
10741422	CACNA1H	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	-2,185
10769959	CASQ1	calsequestrin 1 (fast-twitch, skeletal muscle)	-2,241
10817881	CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)	-2,238
10838745	CASC5	cancer susceptibility candidate 5	3,391
10888872	CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	2,760
10822242	CA3	carbonic anhydrase III, muscle specific	-2,703
10705034	CEACAM4	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4	-2,094
10906302	CPT1B	carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle)	-2,482

10721563	CPT1C	carnitine palmitoyltransferase 1C	2,147
10791652	CASP3	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	2,224
10868007	CASP8AP2	caspase 8 associated protein 2	2,620
10857663	CAV3	caveolin 3	-3,116
10887901	CEBPZ	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), zeta	2,140
10812775	CD180	CD180 molecule	-2,074
10751091	CD200	CD200 molecule	-2,925
10923799	CD28	CD28 molecule	-2,151
10766869	CD34	CD34 molecule	-2,590
10777232	CD38	CD38 molecule	-3,491
10754176	CD80 (includes EG:12519)	CD80 molecule	3,528
10788125	CDKN2AIP	CDKN2A interacting protein	2,568
10802416	CIDEA	cell death-inducing DFFA-like effector a	-2,364
10803824	CDC25C	cell division cycle 25 homolog C (S. pombe)	2,634
10755992	CDC45	cell division cycle 45 homolog (S. cerevisiae)	2,204
10738118	CDC6 (includes EG:23834)	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	4,334
10775231	CDC7 (includes EG:12545)	cell division cycle 7 homolog (S. cerevisiae)	2,455
10784729	CDCA2	cell division cycle associated 2	2,688
10728440	CDCA5	cell division cycle associated 5	2,578
10836945	Cdca7	cell division cycle associated 7	3,787
10887802	CDCA7L	cell division cycle associated 7-like	2,125
10869695	CNTLN	centlein, centrosomal protein	2,246
10710179	CCP110	centriolar coiled coil protein 110kDa	2,595
10819145	CENPE	centromere protein E, 312kDa	2,324
10934891	CENPI	centromere protein I	3,248
10784074	CENPJ	centromere protein J	2,213
10812823	CENPK	centromere protein K	3,567
10765044	CENPL	centromere protein L	2,144
10810703	CENPT	centromere protein T	2,337
10776370	CEP135	centrosomal protein 135kDa	2,568
10895167	CEP290	centrosomal protein 290kDa	2,337
10788016	CEP44	centrosomal protein 44kDa	2,212
10715107	CEP55	centrosomal protein 55kDa	2,130
10914923	CEP57	centrosomal protein 57kDa	2,004
10702505	CEP72	centrosomal protein 72kDa	2,969
10799622	CDNF	cerebral dopamine neurotrophic factor	-2,036
10937725	FIGF	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	-3,409
10916110	CHEK1	checkpoint kinase 1	3,383
10736712	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	-5,297
10924780	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	-2,237
10736702	CCL7	chemokine (C-C motif) ligand 7	-2,478
10858165	CXCL12 (includes EG:20315)	chemokine (C-X-C motif) ligand 12	-3,680
10925291	CXCR7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7	-2,883
10764069	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	-2,226
10926642	CLIC5	chloride intracellular channel 5	-3,094
10854544	CHRM2	cholinergic receptor, muscarinic 2	-2,544
10931498	CHAF1A	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	3,039
10750391	CHAF1B	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)	2,021
10808536	CDT1	chromatin licensing and DNA replication factor 1	4,174
10769441	C1orf112	chromosome 1 open reading frame 112	3,483

10874860	C1orf170	chromosome 1 open reading frame 170	-2,928
10858160	C10orf10	chromosome 10 open reading frame 10	-3,355
10726604	C10orf125	chromosome 10 open reading frame 125	-2,163
10790352	C10orf71	chromosome 10 open reading frame 71	-3,712
10723689	C11orf82	chromosome 11 open reading frame 82	4,750
10780491	C14orf21	chromosome 14 open reading frame 21	2,016
10884826	C14orf28	chromosome 14 open reading frame 28	3,063
10708099	C15orf42	chromosome 15 open reading frame 42	3,345
10917916	C15orf60	chromosome 15 open reading frame 60	-2,093
10738538	C17orf53	chromosome 17 open reading frame 53	2,033
10750688	C3orf26	chromosome 3 open reading frame 26	3,149
10818946	C4orf21	chromosome 4 open reading frame 21	2,423
10816014	C4orf46	chromosome 4 open reading frame 46	4,570
10813191	C5orf34	chromosome 5 open reading frame 34	3,900
10813510	C5orf42	chromosome 5 open reading frame 42	2,556
10926390	C6orf108	chromosome 6 open reading frame 108	2,927
10855472	C7orf46	chromosome 7 open reading frame 46	2,115
10794353	C9orf89	chromosome 9 open reading frame 89	-2,801
10918600	CGNL1	cingulin-like 1	-2,152
10872057	CLSPN	claspin	2,457
10782020	CLDN10	claudin 10	2,185
10818708	F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	-2,705
10788180	CCDC111	coiled-coil domain containing 111	2,172
10833470	CCDC138	coiled-coil domain containing 138	2,243
10775084	CCDC18	coiled-coil domain containing 18	2,001
10838373	CCDC34	coiled-coil domain containing 34	2,186
10818606	CCDC76	coiled-coil domain containing 76	-3,551
10907992	CCDC82	coiled-coil domain containing 82	2,102
10832482	CHCHD10	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10	-2,249
10896263	CTHRC1	collagen triple helix repeat containing 1	-2,596
10737532	COL1A1 (includes EG:1277)	collagen, type I, alpha 1	-2,309
10923052	COL3A1	collagen, type III, alpha 1	-2,260
10929396	Col4a4	collagen, type IV, alpha 4	-2,403
10929766	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	-2,167
10750685	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	-2,756
10896558	COL14A1	collagen, type XIV, alpha 1	-2,200
10829378	COL18A1	collagen, type XVIII, alpha 1	-2,075
10897428	CSF2RB	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)	-2,610
10931717	C3	complement component 3	-2,138
10821666	C7	complement component 7	-2,751
10861171	CTTNBP2	cortactin binding protein 2	3,242
10862677	CRHR2	corticotropin releasing hormone receptor 2	-2,498
10892265	CKB	creatine kinase, brain	-2,811
10704831	CKM	creatine kinase, muscle	-4,133
10865960	CLEC2A	C-type lectin domain family 2, member A	-2,343
10859108	Clec2d (includes others)	C-type lectin domain family 2, member d	-2,035
10822852	CCNA2	cyclin A2	2,864
10727260	CCND1	cyclin D1	-2,676
10721176	CCNE1	cyclin E1	5,017
10867614	CCNE2	cyclin E2	5,909
10741028	CCNF	cyclin F	2,652

10894857	CDK17	cyclin-dependent kinase 17	2,279
10899901	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	2,417
10722241	CSRP3	cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	-5,210
10887615	CRIP2	cysteine-rich protein 2	-3,499
10808377	Crispld2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	-2,174
10726114	COX6A2	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 2	-2,095
10726669	Cox8b	cytochrome c oxidase, subunit VIIIb	-4,186
10887947	CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	-2,738
10805986	CIAPIN1	cytokine induced apoptosis inhibitor 1	-2,285
10912908	CISH	cytokine inducible SH2-containing protein	-2,797
10710026	CKAP2	cytoskeleton associated protein 2	4,098
10793675	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	-3,733
10785867	DZIP1	DAZ interacting protein 1	3,189
10860584	DBF4 (includes EG:10926)	DBF4 homolog (S. cerevisiae)	2,316
10791604	DCTD	dCMP deaminase	3,058
10763428	DDX6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 6	2,460
10925839	DDX11/DDX12P	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11	3,200
10895075	DCN	decorin	-2,371
10936377	DOCK11	dedicator of cytokinesis 11	3,197
10903790	DSCC1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog (S. cerevisiae)	2,860
10836588	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	-2,152
10794453	DEK	DEK oncogene	2,453
10770728	DTL	denticless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)	4,033
10776026	DCK	deoxycytidine kinase	6,183
10765280	DPT	dermatopontin	-2,432
10924507	DES	desmin	-2,753
10785479	DIAPH3	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	2,049
10724967	DKK3	dickkopf 3 homolog (Xenopus laevis)	-2,039
10812456	DHFR	dihydrofolate reductase	3,072
10917245	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	-2,055
10812886	DIMT1	DIM1 dimethyladenosine transferase 1 homolog (S. cerevisiae)	2,200
10785565	DIS3	DIS3 mitotic control homolog (S. cerevisiae)	2,451
10782956	DLGAP5	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 5	2,073
10915437	DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	3,120
10892939	Prim1	DNA primase, p49 subunit	2,596
10829840	DNA2	DNA replication helicase 2 homolog (yeast)	3,567
10853110	DNAJC2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2	2,637
10779162	DNAJC9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 9	2,331
10778486	DDC	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	-3,197
10824091	DCLK2	doublecortin-like kinase 2	2,619
10753172	DONSON	downstream neighbor of SON	3,677
10851251	DSN1 (includes EG:100002916)	DSN1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	2,570
10732652	DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-2,022
10792035	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	-3,109
10767503	DYRK3	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	2,136
10856797	DYSF	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive)	-2,374
10872069	LOC100294508	dyslexia susceptibility 2-like	-2,532
10822258	E2F5	E2F transcription factor 5, p130-binding	2,214
10895344	E2F7	E2F transcription factor 7	3,317
10722247	E2F8	E2F transcription factor 8	4,378
10938540	EDA2R	ectodysplasin A2 receptor	2,167

10774638	EFEMP1	EGF containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-5,455
10889923	EGLN3	egl nine homolog 3 (C. elegans)	-2,348
10848733	EHD4	EH-domain containing 4	-2,111
10757726	ELN	elastin	-2,602
10888953	EMILIN1	elastin microfibril interfacer 1	-2,250
10813152	EMB	embigin	2,202
10797857	EDN1	endothelin 1	-2,062
10862338	EZH2	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	2,704
10744081	EFNB3	ephrin-B3	-3,088
10822558	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	2,060
10746387	EPN3	epsin 3	-2,299
10715519	ERLIN1	ER lipid raft associated 1	2,223
10746416	EME1	essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S. pombe)	2,753
10852464	EEF1A2	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2	-2,246
10778579	ETAA1	Ewing tumor-associated antigen 1	2,061
10938719	ERCC6L	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like	3,648
10765996	EXO1 (includes EG:26909)	exonuclease 1	2,968
10788497	ERI1 (includes EG:361159)	exoribonuclease 1	2,562
10835396	EXOSC2	exosome component 2	2,411
10823184	EXOSC8	exosome component 8	2,895
10899499	ESPL1	extra spindle pole bodies homolog 1 (S. cerevisiae)	2,447
10765600	F11R	F11 receptor	-2,076
10744995	FAM101B	family with sequence similarity 101, member B	2,111
10714106	FAM111A	family with sequence similarity 111, member A	2,089
10939805	FAM122B	family with sequence similarity 122B	2,904
10936823	FAM133B	family with sequence similarity 133, member B	2,469
10813949	FAM134B	family with sequence similarity 134, member B	-2,783
10843935	FAM163B	family with sequence similarity 163, member B	-2,240
10812656	FAM169A	family with sequence similarity 169, member A	3,107
10837310	FAM171B	family with sequence similarity 171, member B	2,058
10771360	FAM175A	family with sequence similarity 175, member A	2,231
10741629	FAM195A	family with sequence similarity 195, member A	-2,700
10844283	FAM78A	family with sequence similarity 78, member A	-2,108
10811768	FANCA	Fanconi anemia, complementation group A	3,001
10937691	FANCB	Fanconi anemia, complementation group B	3,059
10857838	FANCD2	Fanconi anemia, complementation group D2	3,230
10714890	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	2,122
10780393	FITM1	fat storage-inducing transmembrane protein 1	-2,787
10713857	FADS1	fatty acid desaturase 1	-3,166
10918342	Fbxl22	F-box and leucine-rich repeat protein 22	-6,164
10903896	FBXO32	F-box protein 32	-2,209
10751393	FBXO40	F-box protein 40	-4,468
10717779	FBXO5	F-box protein 5	2,521
10769788	FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)	-2,027
10769771	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-2,130
10718111	LOC683722	Fgfr1 oncogene partner	2,157
10860231	FGL2	fibrinogen-like 2	-2,063
10804127	FGF1	fibroblast growth factor 1 (acidic)	-3,899
10934569	FGF16	fibroblast growth factor 16	-2,879
10764050	FMOD	fibromodulin	-4,339
10723284	FSD2	fibronectin type III and SPRY domain containing 2	-5,124

10702913	FNDC1	fibronectin type III domain containing 1	-2,103
10857278	FBLN2	fibulin 2	-3,686
10891780	FBLN5	fibulin 5	-2,067
10881124	FBLIM1	filamin binding LIM protein 1	-2,208
10831940	FKBP5	FK506 binding protein 5	2,140
10733102	FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	-2,707
10927692	FHL2	four and a half LIM domains 2	-2,102
10706509	Fv1	Friend virus susceptibility 1	3,054
10853469	FZD1	frizzled family receptor 1	-2,466
10701817	FUCA2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma	-2,379
10720878	FXYP1	FXYP domain containing ion transport regulator 1	-2,518
10760663	GPR146	G protein-coupled receptor 146	-2,481
10866410	GPR19	G protein-coupled receptor 19	2,279
10809216	GPR56	G protein-coupled receptor 56	-3,504
10770807	G0S2	G0/G1 switch 2	-2,624
10898382	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	2,914
10915843	GLB1L2	galactosidase, beta 1-like 2	-2,482
10742171	GABRA1	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1	2,672
10732824	GABRB2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2	2,499
10830189	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	-2,371
10852378	GATA5	GATA binding protein 5	-2,019
10889199	GEN1	Gen endonuclease homolog 1 (Drosophila)	3,241
10809122	GINS3	GINS complex subunit 3 (Psf3 homolog)	2,343
10789052	GINS4	GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog)	2,155
10835037	GLE1 (includes EG:2733)	GLE1 RNA export mediator homolog (yeast)	2,016
10771049	GLMN	glomulin, FKBP associated protein	2,086
10864121	GRIP2	glutamate receptor interacting protein 2	-2,267
10831849	GRM4	glutamate receptor, metabotropic 4	-2,362
10733680	GPX3	glutathione peroxidase 3 (plasma)	-2,538
10926958	GSTA1	glutathione S-transferase alpha 1	-2,482
10825915	GSTM1	glutathione S-transferase mu 1	-2,630
10855449	GPNNB	glycoprotein (transmembrane) nmb	-2,081
10932459	GLOD5	glyoxalase domain containing 5	-2,999
10842657	Gnas (rat)	GNAS complex locus	-3,821
10826082	GPSM2	G-protein signaling modulator 2	2,210
10848281	GREM1	gremlin 1	-2,005
10918586	GCOM1	GRINL1A complex locus 1	-3,307
10741208	GFER	growth factor, augments of liver regeneration	2,053
10800122	Greb11	growth regulation by estrogen in breast cancer-like	2,966
10729314	GDA	guanine deaminase	-2,654
10809428	GNAO1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	-3,007
10790002	GNL3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	2,242
10783868	GMPR2	guanosine monophosphate reductase 2	2,034
10726991	H19	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)	-3,755
10909480	H2AFX	H2A histone family, member X	2,538
10728697	H3F3C	H3 histone, family 3C	2,646
10773553	HAUS3	HAUS augmin-like complex, subunit 3	2,738
10783572	HAUS4	HAUS augmin-like complex, subunit 4	2,393
10720745	LOC100362495	HAUS augmin-like complex, subunit 5	2,426
10799087	HEATR1	HEAT repeat containing 1	2,082
10761128	HSPB1	heat shock 27kDa protein 1	-2,349
10917290	HSPB2	heat shock 27kDa protein 2	-2,554

10821389	HSPB3	heat shock 27kDa protein 3	-2,738
10873732	HSPB7	heat shock 27kDa protein family, member 7 (cardiovascular)	-3,602
10892184	HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	2,033
10862765	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	2,692
10914424	HHATL	hedgehog acyltransferase-like	-4,059
10715200	HELLS	helicase, lymphoid-specific	3,980
10741302	HN1L	hematological and neurological expressed 1-like	2,012
10717014	HEBP2	heme binding protein 2	2,001
10817547	HFE2	hemochromatosis type 2 (juvenile)	-2,583
10741756	HBA1/HBA2	hemoglobin, alpha 1	-5,620
10720829	Hamp	hepcidin antimicrobial peptide	-4,645
10863430	HK2	hexokinase 2	-2,922
10812015	Hmgb1 (includes EG:25459)	high mobility group box 1	4,847
10750876	HMGB2	high mobility group box 2	3,270
10880408	Hmgn2 (includes others)	high mobility group nucleosomal binding domain 2	2,044
10706792	HRC	histidine rich calcium binding protein	-3,000
10836815	HAT1	histone acetyltransferase 1	2,130
10795203	HIST1H1A	histone cluster 1, H1a	2,746
10798507	HIST1H2AD	histone cluster 1, H2ad	2,264
10795196	HIST1H2AG (includes others)	histone cluster 1, H2ag	2,298
10733938	HIST1H2BB	histone cluster 1, H2bb	2,527
10798475	HIST1H2BJ/HIST1H2BK	histone cluster 1, H2bk	3,267
10817539	HIST2H2BF	histone cluster 2, H2bf	2,317
10825144	HIST2H3C (includes others)	histone cluster 2, H3c	2,088
10795297	Hist2h4 (includes others)	histone cluster 2, H4	3,386
10741804	HMP19	HMP19 protein	-4,400
10711566	HTRA1	HtrA serine peptidase 1	-2,421
10812399	HAPLN1	hyaluronan and proteoglycan link protein 1	-2,233
10722897	HAPLN3	hyaluronan and proteoglycan link protein 3	2,031
10770795	HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	-4,019
10752535	RGD1308065	hypothetical LOC287935	2,232
10818958	LOC100363957	hypothetical protein LOC100363957	3,977
10744597	LOC691995	hypothetical protein LOC691995	-2,209
10913186	IMPDH2	IMP (inosine 5'-monophosphate) dehydrogenase 2	2,343
10924593	INHA	inhibin, alpha	-5,130
10777958	Inpp5j	inositol polyphosphate 5-phosphatase J	-2,481
10894695	IGF1	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	-4,310
10928837	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	-2,353
10934394	ITGB1BP2	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2	-3,253
10799684	ITGA8	integrin, alpha 8	-2,361
10782187	ITGBL1	integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains)	-3,360
10712171	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1	-2,078
10834109	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	-2,147
10922857	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	-5,151
10937292	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2	-2,350
10714745	IL33	interleukin 33	-2,269
10753784	IFT57	intraflagellar transport 57 homolog (Chlamydomonas)	2,225
10796838	IRX4	iroquois homeobox 4	-2,534
10915910	JAM3	junctional adhesion molecule 3	2,021
10836606	KBTBD10	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10	-2,199

10857423	KBTD8	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8	2,370
10911745	KLHL31	kelch-like 31 (Drosophila)	-2,040
10752205	KLHL6	kelch-like 6 (Drosophila)	-2,123
10747262	Krt19	keratin 19	-3,330
10907524	KRT8	keratin 8	-2,740
10911010	KIAA0101	KIAA0101	3,583
10868416	KIAA1045	KIAA1045	-2,644
10723383	KIAA1199	KIAA1199	-5,479
10914833	KIAA1377	KIAA1377	3,132
10753839	KIAA1524	KIAA1524	2,540
10915071	KIAA1731	KIAA1731	3,155
10938849	KIAA2022	KIAA2022	2,704
10715078	KIF11	kinesin family member 11	2,498
10914481	KIF15	kinesin family member 15	3,070
10838331	KIF18A	kinesin family member 18A	2,831
10747959	KIF18B	kinesin family member 18B	2,140
10714913	KIF20B	kinesin family member 20B	2,758
10918031	KIF23	kinesin family member 23	2,186
10876131	KIF24	kinesin family member 24	4,518
10878969	KIF2C	kinesin family member 2C	2,352
10934239	KIF4A	kinesin family member 4A	2,082
10821207	KIF2A	kinesin heavy chain member 2A	2,437
10761810	KNTC1	kinetochore associated 1	2,909
10895152	KITLG	KIT ligand	2,698
10781829	KLF5	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	2,226
10770396	LBR (includes EG:368360)	lamin B receptor	2,249
10801821	LMNB1	lamin B1	2,145
10766809	LAMB3	laminin, beta 3	-5,356
10891165	LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2	-3,015
10779673	LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3	-2,326
10745292	LGALS9B	lectin, galactoside-binding, soluble, 9B	-2,054
10754676	LMLN	leishmanolysin-like (metallopeptidase M8 family)	2,003
10822269	LRRCC1	leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	2,289
10895583	LRRC10	leucine rich repeat containing 10	-5,101
10734045	LRRC48	leucine rich repeat containing 48	-2,968
10706559	LRRC4B	leucine rich repeat containing 4B	-2,346
10850170	LRRN4	leucine rich repeat neuronal 4	-2,766
10704312	LIG1	ligase I, DNA, ATP-dependent	2,222
10800696	LIMS2	LIM and senescent cell antigen-like domains 2	-3,383
10790490	LDB3	LIM domain binding 3	-3,192
10772807	LIN9	lin-9 homolog (C. elegans)	2,382
10889269	LPIN1	lipin 1	-2,154
10844331	LCN2	lipocalin 2	-2,870
10841693	LBP	lipopolysaccharide binding protein	-3,379
10936346	LONRF3	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	3,238
10908521	LDLR	low density lipoprotein receptor	-2,295
10895083	LUM	lumican	-2,240
10904528	LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	-3,619
10763604	LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	-2,467
10904590	Ly6c (includes others)	Ly6-C antigen	-3,368
10712477	LSP1 (includes EG:16985)	lymphocyte-specific protein 1	-2,137

10717571	LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	2,335
10902547	Lyz1/Lyz2	lysozyme 2	-2,183
10917883	LOXL1	lysyl oxidase-like 1	-2,470
10913043	MST1R	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	-2,250
10856043	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	2,226
10773481	MFSD10	major facilitator superfamily domain containing 10	2,184
10831099	HLA-C	major histocompatibility complex, class I, C	3,507
10831620	HLA-DMB	major histocompatibility complex, class II, DM beta	-2,080
10708544	ME3	malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial	-2,007
10890210	MDGA2	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2	3,694
10751948	Masp1	mannan-binding lectin serine peptidase 1	-2,352
10868643	MELK	maternal embryonic leucine zipper kinase	3,318
10866512	MGP	matrix Gla protein	-5,256
10907869	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	-3,222
10874728	MXRA8	matrix-remodelling associated 8	-2,254
10895600	MDM1 (includes EG:17245)	Mdm1 nuclear protein homolog (mouse)	2,164
10902564	MDM2	Mdm2, p53 E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	2,027
10896605	MTBP	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) binding protein, 104kDa	3,064
10911419	MNS1	meiosis-specific nuclear structural 1	3,862
10824010	MND1 (includes EG:295160)	meiotic nuclear divisions 1 homolog (S. cerevisiae)	2,675
10798199	MBOAT1	membrane bound O-acyltransferase domain containing 1	2,326
10741486	MSLN	mesothelin	-2,178
10931247	METRNL	meteorin, glial cell differentiation regulator-like	-2,214
10885382	MTHFD1	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	2,081
10707721	MCEE	methylmalonyl CoA epimerase	-2,716
10769301	METTL13	methyltransferase like 13	2,412
10858499	MFAP5	microfibrillar associated protein 5	-4,483
10734242	MFAP4	microfibrillar-associated protein 4	-2,988
10804710	mir-145	microRNA 145	-3,192
10745931	mir-21	microRNA 21	-2,405
10735887	mir-22	microRNA 22	-3,230
10854542	mir-490	microRNA 490	-3,247
10815308	MGST2	microsomal glutathione S-transferase 2	-3,821
10769629	MGST3	microsomal glutathione S-transferase 3	-2,107
10709951	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	-2,002
10799999	MASTL	microtubule associated serine/threonine kinase-like	2,989
10839135	MAP1A	microtubule-associated protein 1A	-2,141
10796347	MCM10 (includes EG:307126)	minichromosome maintenance complex component 10	4,262
10863950	MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	2,330
10926930	MCM3	minichromosome maintenance complex component 3	3,432
10752603	MCM4	minichromosome maintenance complex component 4	3,225
10806129	MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	4,099
10767338	MCM6	minichromosome maintenance complex component 6	3,276
10760824	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	3,103
10840112	MCM8	minichromosome maintenance complex component 8	2,339
10890190	MIS18BP1	MIS18 binding protein 1	2,090
10753017	MIS18A	MIS18 kinetochore protein homolog A (S. pombe)	2,723
10821004	MRPS36	mitochondrial ribosomal protein S36	-2,038
10867979	MAP3K7 (includes	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	2,078

	EG:172842)		
10791661	MLF1IP	MLF1 interacting protein	2,334
10867919	MMS22L	MMS22-like, DNA repair protein	2,303
10857130	MGLL	monoglyceride lipase	-2,337
10722566	MPHOSPH10	M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)	2,052
10880913	MRT04	mRNA turnover 4 homolog (S. cerevisiae)	2,023
10868999	MURC	muscle-related coiled-coil protein	-5,185
10882812	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	2,002
10753533	MINA	MYC induced nuclear antigen	2,024
10743652	MYOCD	myocardin	-2,275
10820223	MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	4,225
10905153	MB	myoglobin	-2,566
10792621	MYOM2 (includes EG:17930)	myomesin (M-protein) 2, 165kDa	-7,836
10925991	MYOM1	myomesin 1, 185kDa	-2,358
10721361	MYBPC2	myosin binding protein C, fast type	-2,589
10818347	MYBPHL	myosin binding protein H-like	-2,709
10806461	MYLK3	myosin light chain kinase 3	-2,152
10911593	MYO5A	myosin VA (heavy chain 12, myoxin)	2,676
10783686	MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	-3,269
10783715	MYH7	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	-2,743
10928614	MYL1	myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	-2,333
10762067	MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow	-2,754
10778247	MYL7	myosin, light chain 7, regulatory	-4,514
10826534	MYOZ2	myozenin 2	-3,214
10810299	NDUFB7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 7, 18kDa	-2,136
10847283	NDUFS3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3, 30kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	-2,080
10778859	NDUFS5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 5, 15kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	-2,402
10821991	NPR3 (includes EG:18162)	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	-2,286
10873895	Nppb	natriuretic peptide type B	-4,112
10930488	NDC80	NDC80 kinetochore complex component homolog (S. cerevisiae)	2,469
10783213	NDRG2	NDRG family member 2	-2,789
10851219	NDRG3	NDRG family member 3	2,380
10809100	NDRG4	NDRG family member 4	-2,381
10799848	NEBL	nebulette	-2,004
10788059	NEIL3	nei endonuclease VIII-like 3 (E. coli)	3,610
10826148	NTNG1	netrin G1	2,231
10851667	NEURL2	neuralized homolog 2 (Drosophila)	-2,037
10889779	NOVA1	neuro-oncological ventral antigen 1	2,318
10855506	NPY	neuropeptide Y	-2,208
10806436	NETO2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	5,337
10808959	NRP1 (includes EG:18186)	neuropilin 1	-2,802
10908127	LOC690209/Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2	2,230
10865630	NCAPD2	non-SMC condensin I complex, subunit D2	2,400
10777182	NCAPG	non-SMC condensin I complex, subunit G	3,385
10887719	NCAPG2	non-SMC condensin II complex, subunit G2	2,563
10858827	NOP2	NOP2 nucleolar protein homolog (yeast)	2,663
10839857	NOP56	NOP56 ribonucleoprotein homolog (yeast)	2,173
10923670	NOP58	NOP58 ribonucleoprotein homolog (yeast)	2,574
10910015	NPAT	nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus	2,196

10725778	NUPR1	nuclear protein, transcriptional regulator, 1	-2,097
10904769	NRBP2	nuclear receptor binding protein 2	-2,036
10880267	NR0B2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	-2,868
10810539	NR3C2 (includes EG:110784)	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2	-2,052
10770351	NVL	nuclear VCP-like	2,160
10715721	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	2,129
10797631	NOL8	nucleolar protein 8	3,918
10874245	NOL9	nucleolar protein 9	2,180
10902584	NUP107	nucleoporin 107kDa	2,124
10794511	NUP153	nucleoporin 153kDa	2,314
10813472	NUP155	nucleoporin 155kDa	2,516
10837648	NUP160	nucleoporin 160kDa	2,626
10837232	NUP35	nucleoporin 35kDa	2,005
10739568	NUP85 (includes EG:287830)	nucleoporin 85kDa	2,694
10799539	NUDT5	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5	2,038
10769657	NUF2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	2,739
10743027	OBSCN	obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF	-3,324
10820953	Ocln	occludin	2,039
10709687	OLFML1	olfactomedin-like 1	-2,339
10848589	OIP5	Opa interacting protein 5	2,260
10927041	OGFRL1	opioid growth factor receptor-like 1	2,283
10870791	ORC1 (includes EG:18392)	origin recognition complex, subunit 1	5,214
10809856	ORC6 (includes EG:23594)	origin recognition complex, subunit 6	2,450
10797648	OGN	osteoglycin	-2,489
10726836	PIDD	p53-induced death domain protein	2,923
10835257	PRRX2	paired related homeobox 2	-2,105
10725480	PALB2	partner and localizer of BRCA2	2,070
10929995	PASK	PAS domain containing serine/threonine kinase	2,641
10852694	PAXIP1	PAX interacting (with transcription-activation domain) protein 1	2,113
10877860	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	2,063
10822007	PDZD2	PDZ domain containing 2	-2,333
10815785	PTX3	pentraxin 3, long	-2,585
10821149	PPWD1	peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat containing 1	2,744
10898359	PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	-3,249
10804678	PPARGC1B	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 beta	-2,762
10709200	PDE2A	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	-3,334
10818823	PDE5A	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	2,075
10898968	PFKM	phosphofructokinase, muscle	-2,006
10881669	PGD	phosphogluconate dehydrogenase	2,052
10778220	PGAM2	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	-2,055
10830174	PLN	phospholamban	-2,464
10880872	PLA2G5	phospholipase A2, group V	-9,125
10713538	PLA2G16	phospholipase A2, group XVI	-2,002
10866459	PLBD1	phospholipase B domain containing 1	-2,006
10935204	PRPS1	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	2,031
10743825	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase	3,134
10713382	PYGM	phosphorylase, glycogen, muscle	-3,049
10729096	PSAT1	phosphoserine aminotransferase 1	2,322
10799558	PHYH	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase	-2,159
10752576	PKP2 (includes	plakophilin 2	-2,148

	EG:287925)		
10918981	PHIP	pleckstrin homology domain interacting protein	2,240
10710627	PLK1	polo-like kinase 1	2,000
10815120	PLK4	polo-like kinase 4	2,921
10919928	PARP3	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 3	-2,123
10821511	PARP8	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 8	2,129
10730624	PCGF6	polycomb group ring finger 6	2,463
10896405	PKHD1L1	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)-like 1	-2,030
10774151	PKD1L1	polycystic kidney disease 1 like 1	-2,324
10820649	POLK	polymerase (DNA directed) kappa	3,629
10938346	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit	2,474
10778236	POLD2	polymerase (DNA directed), delta 2, regulatory subunit 50kDa	2,070
10890252	POLE2	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	3,755
10877443	POLE3	polymerase (DNA directed), epsilon 3 (p17 subunit)	2,609
10921751	POLH	polymerase (DNA directed), eta	2,840
10754260	POLQ	polymerase (DNA directed), theta	2,432
10723943	POLD3	polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	2,063
10839751	POLR1B	polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa	2,154
10820206	POLR3G	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)	2,262
10754179	POPDC2	popeye domain containing 2	-2,193
10722005	KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11	-2,963
10915998	KCNJ5	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5	-3,760
10753211	KCNE1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1	-7,214
10712530	KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1	-3,660
10853905	KCND2	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 2	3,123
10852934	KCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2	-2,650
10816807	PBXIP1	pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1	-2,275
10781733	Gm5465	predicted gene 5465	2,425
10927213	PRIM2	primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)	3,007
10795027	Prl8a9	prolactin family8, subfamily a, member 9	-3,753
10850131	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	2,170
10746022	PRR11	proline rich 11	2,326
10767763	PRELP	proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	-4,844
10818358	PSRC1	proline/serine-rich coiled-coil 1	2,613
10834005	PTGFR	prostaglandin F receptor (FP)	-4,365
10851947	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-3,382
10835817	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	-2,623
10775862	PARM1	prostate androgen-regulated mucin-like protein 1	-2,208
10852144	PMEPA1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	-2,120
10723576	PRSS23	protease, serine, 23	-2,401
10783553	PRMT5	protein arginine methyltransferase 5	2,038
10704536	PRKD2	protein kinase D2	2,231
10909918	PPP2R1B	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, beta	2,101
10919574	PPP2R3A	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha	-2,035
10804225	PPP2R2B	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, beta	-3,262
10737068	PPM1D	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1D	3,079
10891530	PTPN21	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21	2,154
10929128	PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	-2,082
10908990	PUS3	pseudouridylate synthase 3	2,090
10769812	Pcp4l1	Purkinje cell protein 4-like 1	-2,447
10746469	PKD2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	-2,482
10790912	RAB3A	RAB3A, member RAS oncogene family	-2,125

10870847	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	-3,279
10813664	RAD1	RAD1 homolog (S. pombe)	2,071
10864572	RAD18	RAD18 homolog (S. cerevisiae)	3,713
10838762	RAD51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)	3,351
10746042	RAD51C	RAD51 homolog C (S. cerevisiae)	2,391
10867642	RAD54B	RAD54 homolog B (S. cerevisiae)	3,139
10871151	RAD54L	RAD54-like (S. cerevisiae)	2,518
10836169	RIF1 (includes EG:295602)	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	3,446
10864874	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4	-2,495
10888404	RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	-3,299
10805646	RRAD	Ras-related associated with diabetes	-2,297
10905316	RAC2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	-2,537
10924326	RQCD1	RCD1 required for cell differentiation1 homolog (S. pombe)	2,087
10882829	LOC100360342	rCG61559-like	2,160
10925365	RAMP1	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1	-2,771
10774115	RAMP3	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 3	-2,281
10900511	REEP6	receptor accessory protein 6	2,351
10870190	ROR1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1	-2,810
10856488	REG1A	regenerating islet-derived 1 alpha	-2,909
10863410	REG3A	regenerating islet-derived 3 alpha	-5,592
10856474	REG3G	regenerating islet-derived 3 gamma	-4,329
10753214	Rcan1	regulator of calcineurin 1	-2,266
10926658	RCAN2	regulator of calcineurin 2	-2,044
10885769	RGS6	regulator of G-protein signaling 6	-2,736
10911431	RFX7	regulatory factor X, 7	2,053
10823819	RXFP1	relaxin/insulin-like family peptide receptor 1	-3,461
10761255	RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	2,433
10759752	RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	3,417
10751973	RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	2,836
10758883	RFC5	replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa	2,503
10744918	RPA1	replication protein A1, 70kDa	2,359
10880361	RPA2	replication protein A2, 32kDa	2,288
10826764	RRH	retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog	2,154
10800173	RBBP8	retinoblastoma binding protein 8	2,392
10851280	RBL1	retinoblastoma-like 1 (p107)	2,259
10912439	RBP1	retinol binding protein 1, cellular	-2,188
10927538	REV1 (includes EG:316344)	REV1 homolog (S. cerevisiae)	2,002
10806198	LOC296778 (includes others)	RGD1562877	-2,257
10866526	ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	-2,489
10779832	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4	-2,271
10865321	RIMKLB	ribosomal modification protein rimK-like family member B	4,861
10784805	Rpl7a	ribosomal protein L7a	-2,038
10921527	RPL7L1	ribosomal protein L7-like 1	2,006
10939093	RPS6KA6	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 6	2,398
10829176	RRP1B	ribosomal RNA processing 1 homolog B (S. cerevisiae)	2,080
10862178	2210010C04Rik	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	-2,162
10877669	2310002L09Rik	RIKEN cDNA 2310002L09 gene	-3,363
10719665	2310033E01Rik	RIKEN cDNA 2310033E01 gene	2,262
10797442	LOC100365086	RIKEN cDNA 4732471D19-like	2,465
10800442	RNF138	ring finger protein 138, E3 ubiquitin protein ligase	2,280

10881989	RNF207	ring finger protein 207	-4,515
10797774	RBM24	RNA binding motif protein 24	-2,164
10861429	RBM28	RNA binding motif protein 28	2,019
10853515	RBM48	RNA binding motif protein 48	2,485
10826216	RNPC3	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3	2,042
10795796	RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)	-3,586
10817057	S100A4	S100 calcium binding protein A4	-2,470
10817065	S100A6	S100 calcium binding protein A6	-3,245
10731795	SRL	sarcalumenin	-2,669
10784346	SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)	-2,004
10910047	Sln	sarcolipin	-6,395
10859641	SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	-3,496
10745595	SLFN13	schlafen family member 13	3,026
10871054	STIL	SCL/TAL1 interrupting locus	2,513
10786495	SFMBT1	Scm-like with four mbt domains 1	2,484
10734486	SCO1	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 1 (yeast)	2,122
10792344	SFRP1	secreted frizzled-related protein 1	-4,234
10816144	SFRP2	secreted frizzled-related protein 2	-4,236
10851581	Slpi (includes others)	secretory leukocyte peptidase inhibitor	-2,209
10765195	SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	-3,451
10759173	SELPLG	selectin P ligand	-2,443
10773716	SELM	selenoprotein M	-2,348
10814119	SEMA5A	sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5A	-2,502
10743318	SHMT1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	2,991
10880095	SERINC2	serine incorporator 2	-3,902
10913538	SPINK8	serine peptidase inhibitor, Kazal type 8 (putative)	-2,498
10828823	SRSF3	serine/arginine-rich splicing factor 3	2,145
10935418	MST4	serine/threonine protein kinase MST4	2,114
10798135	SERPINB9	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	-2,052
10744939	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	-3,418
10815962	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	2,050
10927900	SDPR	serum deprivation response	-3,428
10863104	SMYD1	SET and MYND domain containing 1	-2,712
10937839	SCML2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	2,732
10773390	SH3TC1	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 1	-2,335
10802133	SH3TC2	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2	-2,127
10750479	SH3BGR (includes EG:445130)	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein	-2,568
10921232	SGOL1	shugoshin-like 1 (S. pombe)	2,792
10923385	SGOL2	shugoshin-like 2 (S. pombe)	2,546
10821008	LOC681185	similar to centromere autoantigen H	2,109
10708065	LOC683179	similar to CG13745-PA	2,663
10772847	LOC685792 (includes others)	similar to Discs large homolog 5 (Placenta and prostate DLG) (Discs large protein P-dlg)	2,088
10904787	LOC686567	similar to Epiplakin	-2,298
10761446	LOC689257	similar to G protein-coupled receptor 133	-2,163
10795265	LOC680322	similar to Histone H2A type 1	2,148
10888608	LOC683626	similar to limb-bud and heart	-3,278
10844136	LOC499770	similar to LOC495800 protein	2,044
10935031	MGC109340	similar to Microsomal signal peptidase 23 kDa subunit (SPase 22 kDa subunit) (SPC22/23)	2,063
10784566	LOC691979	similar to N-acetyltransferase ESCO2 (Establishment of cohesion 1 homolog 2) (ECO1 homolog 2)	3,384

10918776	LOC681849	similar to Protein C6orf142 homolog	-2,967
10834046	LOC304239	similar to RalA binding protein 1	2,496
10930632	LOC501224	similar to RIKEN cDNA 2610042L04	2,602
10917998	RGD1566296	similar to RIKEN cDNA B230114P05	-2,573
10792751	MGC112830	similar to transcription factor	2,208
10800323	RGD1562997	similar to Transcription initiation factor TFIID 105 kDa subunit (TAFII-105)	2,233
10778108	LOC685322	similar to ubiquinol-cytochrome c reductase complex 7.2kDa protein isoform b	-2,229
10858083	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	2,254
10781966	SLITRK5	SLIT and NTRK-like family, member 5	2,159
10938060	SMPX	small muscle protein, X-linked	-3,225
10720907	SCN1B	sodium channel, voltage-gated, type I, beta subunit	-2,656
10909328	SCN3B	sodium channel, voltage-gated, type III, beta subunit	-3,438
10909621	SCN4B	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta subunit	-3,307
10920868	SCN5A	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit	-3,390
10729795	SLC16A12	solute carrier family 16, member 12 (monocarboxylic acid transporter 12)	-3,031
10744324	SLC2A4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	-2,538
10930790	SLC25A23	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	-2,978
10824611	SLC27A3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	2,105
10910038	SLC35F2	solute carrier family 35, member F2	2,664
10920122	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	2,769
10779863	SLC39A2	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 2	-2,927
10908391	SLC44A2	solute carrier family 44, member 2	-2,001
10857314	SLC6A6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	-2,870
10912614	SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	-3,514
10722818	SLCO3A1	solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	-2,046
10867225	SLCO5A1	solute carrier organic anion transporter family, member 5A1	-2,402
10730065	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1	-2,517
10791750	Sorbs2	sorbin and SH3 domain containing 2	-2,164
10889944	SNX6	sorting nexin 6	2,019
10771210	SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)	-2,513
10924517	SPEG	SPEG complex locus	-2,124
10871004	SPATA6	spermatogenesis associated 6	2,211
10933651	Sms/Sms-ps1	spermine synthase	2,079
10821840	SKP2 (includes EG:27401)	S-phase kinase-associated protein 2, E3 ubiquitin protein ligase	3,317
10755672	SMPD4	sphingomyelin phosphodiesterase 4, neutral membrane (neutral sphingomyelinase-3)	2,186
10826235	S1PR1	sphingosine-1-phosphate receptor 1	-3,472
10929458	SPHKAP	SPHK1 interactor, AKAP domain containing	-2,153
10784172	SKA3	spindle and kinetochore associated complex subunit 3	4,096
10818615	SASS6	spindle assembly 6 homolog (C. elegans)	3,002
10804993	SPIRE1	spire homolog 1 (Drosophila)	3,536
10710067	SPON1	spondin 1, extracellular matrix protein	-2,235
10904189	ST3GAL1	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	-2,089
10781273	STC1	stanniocalcin 1	-3,023
10860597	STEAP4	STEAP family member 4	-2,141
10730349	SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	-2,368
10715546	Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	-2,442
10716704	SAMD5	sterile alpha motif domain containing 5	-2,225
10791500	SCRG1	stimulator of chondrogenesis 1	2,055
10869050	SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	2,635
10716087	SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	2,099
10815888	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	2,320

10837393	SSRP1	structure specific recognition protein 1	2,484
10839320	Sqrd1	sulfide quinone reductase-like (yeast)	-2,184
10777108	SOD3	superoxide dismutase 3, extracellular	-2,115
10901996	SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	-2,134
10749372	SOCS3	suppressor of cytokine signaling 3	-2,351
10783253	SUPT16H	suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae)	2,453
10796405	SUV39H2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)	2,676
10706059	SBSN	suprabasin	-2,002
10939538	SMARCA1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	2,380
10799133	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	2,187
10779068	SYNPO2L	synaptopodin 2-like	-3,273
10715904	TAF5	TAF5 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 100kDa	2,274
10798471	TAF5L	TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor, 65kDa	2,588
10918415	TLN2	talin 2	-2,251
10908089	TAF1D	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, D, 41kDa	2,575
10701853	TXLNB	taxilin beta	-2,262
10810341	TBC1D9	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)	2,043
10874940	TERF1	telomeric repeat binding factor (NIMA-interacting) 1	2,791
10928855	TNS1	tensin 1	-2,392
10876688	TEX10	testis expressed 10	2,152
10847562	TSPAN18	tetraspanin 18	-2,149
10712349	TSPAN4	tetraspanin 4	-2,113
10800098	THOC1	THO complex 1	2,040
10718217	THBS2	thrombospondin 2	-2,300
10909407	THY1	Thy-1 cell surface antigen	-2,383
10930510	TYMS	thymidylate synthetase	2,740
10702519	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13	3,303
10893035	TIMELESS	timeless homolog (Drosophila)	3,814
10930531	TIPIN	TIMELESS interacting protein	2,393
10749484	TIMP2 (includes EG:21858)	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	-2,015
10846429	Ttn	titin	-2,074
10827484	TNNI3K	TNNI3 interacting kinase	-6,823
10905051	TONSL	tonsoku-like, DNA repair protein	2,399
10746976	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	2,144
10912640	TOPBP1	topoisomerase (DNA) II binding protein 1	2,974
10840910	TPX2	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)	2,109
10913078	TRAIP	TRAF interacting protein	2,387
10914385	TRAK1	trafficking protein, kinesin binding 1	-2,751
10928307	TRAK2	trafficking protein, kinesin binding 2	-2,037
10772147	TECRL	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like	-2,705
10752050	TRA2B	transformer 2 beta homolog (Drosophila)	2,205
10711364	TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	-2,000
10797138	TGFB1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	-2,010
10777770	TACC3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3	2,208
10783880	TGM1	transglutaminase 1 (K polypeptide epidermal type I, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	-2,220
10851350	TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	-2,759
10823278	TM4SF1	transmembrane 4 L six family member 1	-2,191
10708327	TM6SF1	transmembrane 6 superfamily member 1	-2,547

10855416	TMEM176A	transmembrane protein 176A	-3,792
10862415	TMEM176B	transmembrane protein 176B	-3,128
10922923	TMEM182	transmembrane protein 182	-3,007
10790651	TMEM38A	transmembrane protein 38A	-2,247
10881253	TMEM51	transmembrane protein 51	-2,021
10904151	TMEM71	transmembrane protein 71	-2,615
10743961	TMEM88	transmembrane protein 88	2,115
10800426	TTR	transthyretin	-2,144
10867447	TGS1	trimethylguanosine synthase 1	2,007
10888852	TRIM54	tripartite motif containing 54	-2,978
10814415	TRIM55	tripartite motif containing 55	-2,865
10823591	TRIM59	tripartite motif containing 59	2,597
10711260	TRIM72	tripartite motif containing 72	-6,087
10755604	TRMT2A	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A (S. cerevisiae)	2,013
10899073	TROAP	trophinin associated protein (tastin)	2,016
10868817	TMOD1	tropomodulin 1	-2,093
10764233	TNNI1	troponin I type 1 (skeletal, slow)	-3,355
10704062	TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)	-2,775
10764244	TNNT2 (includes EG:21956)	troponin T type 2 (cardiac)	-2,081
10723822	TSKU	tsukushi small leucine rich proteoglycan homolog (Xenopus laevis)	-2,641
10911947	TTK	TTK protein kinase	2,540
10924392	TTL4	tubulin tyrosine ligase-like family, member 4	2,460
10830369	TUBE1	tubulin, epsilon 1	2,547
10880074	TINAGL1	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	-2,644
10765096	TNFSF18	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18	-4,329
10781321	TNFRSF10A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	2,095
10841339	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	-3,331
10705874	TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	-2,329
10870098	USP1	ubiquitin specific peptidase 1	2,532
10720965	UBA2	ubiquitin-like modifier activating enzyme 2	2,120
10931457	UHRF1	ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1	2,729
10764495	B3GALT2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 2	-4,041
10724950	GALNTL4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4	-2,587
10745074	UNC119	unc-119 homolog (C. elegans)	-2,140
10736764	UNC45B	unc-45 homolog B (C. elegans)	-3,285
10734967	LOC284023	uncharacterized LOC284023	2,087
10774171	UPP1	uridine phosphorylase 1	-2,877
10761101	UPK3B	uroplakin 3B	-4,297
10820748	UTP15	UTP15, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog (S. cerevisiae)	2,023
10717295	VNN1	vanin 1	-3,210
10921772	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	-2,054
10863215	VAMP5	vesicle-associated membrane protein 5 (myobrevin)	-2,784
10889213	VSNL1	visinin-like 1	-2,683
10841974	MYBL2	v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2	3,715
10808348	WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	-3,920
10855637	WIPF3	WAS/WASL interacting protein family, member 3	-2,061
10782927	WDHD1	WD repeat and HMG-box DNA binding protein 1	4,221
10928446	WDR12	WD repeat domain 12	2,146
10888662	WDR43	WD repeat domain 43	2,005
10896935	WISP1	WNT1 inducible signaling pathway protein 1	-2,220
10842043	WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	-2,160

10777731	WHSC1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	2,608
10882933	XDH	xanthine dehydrogenase	-2,307
10920977	XIRP1	xin actin-binding repeat containing 1	-2,205
10836504	XIRP2	xin actin-binding repeat containing 2	-4,673
10772564	YIPF7	Yip1 domain family, member 7	-3,455
10793495	ZNF367	zinc finger protein 367	3
10721475	ZNF473	zinc finger protein 473	2,125
10934720	ZNF711	zinc finger protein 711	2,022
10939570	ZDHHC9	zinc finger, DHHC-type containing 9	-2,036
10918191	ZWILCH	Zwilch, kinetochore associated, homolog (Drosophila)	3,352