BÁRBARA SANTOS PIRES DA SILVA

O PAPEL DOS RECEPTORES NUCLEARES NA ESPECIFICAÇÃO ATRIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

BÁRBARA SANTOS PIRES DA SILVA

O PAPEL DOS RECEPTORES NUCLEARES NA ESPECIFICAÇÃO ATRIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Dr. José Xavier Neto

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Bárbara Santos Pires da.

O papel dos receptores nucleares na especificação atrial / Bárbara Santos Pires da Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Xavier Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Desenvolvimento cardíaco.

Versão do título para o inglês: The role of nuclear receptors in atrial specification.

1. Desenvolvimento cardíaco 2. Embriologia molecular
3. Regulação gênica 4. Receptores nucleares 5. I. Neto, Prof. Dr. José Xavier II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0208/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bárbara Santos Pires da Silva.

Título da Dissertação: O papel dos receptores nucleares na especificação atrial.

Orientador(a): Prof. Dr. José Xavier Neto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 152 nas fls. 112 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Xavier Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*O papel dos receptores nucleares na especificação atrial*" do qual participam o(s) aluno(s) **Bárbara Santos Pires da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **29.11.2011, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 30 de novembro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

Aos meus pais César e Elisa, que sempre me apoiaram e me incentivaram, ao meu irmão Guilherme, que sempre esteve ao meu lado e a minha avó Emilia.

AGRADECIMENTOS

Finalizar mais esta etapa é a prova de que sonhar e correr atrás de seus objetivos vale à pena. Agradeço a Deus, por possibilitar a realização de mais um sonho.

Ao Dr. José Xavier Neto, meu orientador, pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço a orientação, confiança e incentivo.

Ao Laboratório Nacional de Biociências e seus funcionários, que permitiram que este trabalho fosse concluído com êxito.

Ao Dr. Márcio Chaim Bajgelman, pelos ensinamentos, paciência e pela ajuda em todos os momentos, inclusive os de desespero.

À Dra. Ana Carolina Migliorini Figueira, pelos ensinamentos, ajuda, e incentivo à realização deste projeto.

À Dra. Hozana Andrade Castillo pelos ensinamentos e ajuda durante toda a realização deste projeto.

À Dra. Carolina Clemente, pelos ensinamentos, ajuda na realização deste projeto, conselhos e pela amizade.

À Dra. Aline Mara dos Santos, obrigada por sempre estar ao meu lado. Agradeço os ensinamentos profissionais e pessoais. Você e a Lavínia são a minha família, obrigada pelo apoio incondicional.

Ao grupo do Laboratório de Modificação do Genoma, Lara Maldanis, Fábio Amaral, Fábio Henrique, Tailise Souza, Carlo Donato e Ângela Costa, agradeço a companhia diária de vocês, obrigada por me ouvirem, me darem conselhos e pela diversão. À Giulia Gonçalves, pela ajuda, paciência, conversas e pela amizade. Ao

Michel Vaz e Juliano Dias, por me ajudarem no biotério. A ajuda de vocês foi imprescindível.

Ao grupo do Laboratório de Vetores Virais, principalmente à Anna Carolina, obrigada por me salvar em momentos de desespero, pela ajuda, pelos conselhos, pela diversão e pela amizade. Agradeço também à Andrea, que na reta final deste trabalho me ajudou com o seu bom humor, e conselhos.

Ao grupo do Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria, pela colaboração, troca de conhecimento, conversas e pela grande amizade. Agradeço especialmente à ajuda da Beatriz Alves. À Juliana Fattori, agradeço as conversas, colaboração, e ajuda para concluir este projeto. E à minha grande “amiga-irmã” Jéssica Lóis, com certeza os dias mais difíceis se tornaram fáceis após conversar com você, obrigada pelo apoio, ensinamentos, e pela sua amizade.

Ao grupo do Laboratório de Espectrometria de Massas, principalmente à Dra. Adriana Paes Leme e Annelize Zambon pela ajuda nos experimentos de proteômica.

Aos meus pais, muito obrigada por serem pais maravilhosos, por estarem sempre comigo, me apoiando, me amparando e mostrando o caminho certo. Obrigada principalmente pelos valores e princípios que adquiri com vocês. Vocês são um exemplo de dedicação, de amor, de união e principalmente de vida.

Ao Guilherme, meu irmão, meu amigo e meu companheiro, que me ensina diariamente como ser uma pessoa melhor e como acreditar no meu potencial. Obrigada pelo apoio e por ser essa pessoa madura que eu me orgulho tanto.

À minha avó, Emilia, que por todo o tempo me aconselhou, me apoiou e esteve sempre ao meu lado tanto nas alegrias quanto nas tristezas.

Aos meus tios, Ademir e Sônia, que me acolheram durante esta etapa, obrigada pela ajuda durante esses anos, pelos conselhos e incentivos. Isso foi imprescindível para a minha formação pessoal e profissional.

Ao Lucas, que esteve comigo na conclusão desta etapa tão importante e foi tão compreensivo e paciente com as minhas oscilações de humor. Obrigada pelos momentos especiais e felizes ao seu lado.

Agradeço em especial às minhas companheiras, irmãs e amigas, Lívia, Camila e Érika. Obrigada por serem pessoas especiais, que estiveram sempre junto comigo nas minhas derrotas e vitórias, que me aconselharam, me apoiaram e me incentivaram. Obrigada pela amizade e por todos os nossos momentos juntas.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

"Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto"

Albert Einsten

RESUMO

SILVA, B. S. P. **O papel dos receptores nucleares na especificação atrial.** 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Foi definido que elementos regulatórios da expressão atrial-específica do promotor da SMyHC3 estão contidos em um elemento complexo de resposta a receptores nucleares (ECRRN). Ensaios de transativação celular indicam que alguns receptores nucleares se ligam nesta região. A partir destes ensaios verificamos a ativação do promotor por um receptor nuclear, o COUP-TFII. Ele regula muitos processos biológicos, como angiogênese e o próprio desenvolvimento atrial. Através da deleção do ECRRN observamos que o promotor não era ativado por COUP-TFII, indicando a sua ligação nessa região. Verificamos ainda que somente o domínio de ligação ao ligante do COUP-TFII é capaz de ativar o promotor, sugerindo a necessidade de uma interação com outros RNs para ativar o promotor. Uma análise proteômica indica que a maioria dos interactores de COUP-TFII está relacionada com complexos reguladores da transcrição e com a via de sinalização do receptor de andrógenos (AR). Ensaios de transativação celular mostram que juntos, COUP-TFII e AR, são capazes de aumentar a ativação do promotor.

Palavras-chave: Especificação Atrial. SMyHC3. Receptores Nucleares. COUP-TFII.

ABSTRACT

SILVA, B. S. P. **The role of nuclear receptors in atrial specification.** 2013. 126 p. Masters thesis (Master in Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

It was determined that regulatory elements of the atrial-specific expression of the promoter SMyHC3 are contained in a complex nuclear receptor response element (CNRRE). Cellular transactivation assays indicated certain nuclear receptors (NR) can bind in this region. From these trials, was observed the promoter activation by a nuclear receptor, COUP-TFII. It regulates many biological processes such as angiogenesis and atrial development. Deletion of CNRRE resulted in no activation of the promoter by COUP-TFII, indicating their connection in this region. We also verified that only the ligand binding domain of COUP-TFII is able to activate the promoter, suggesting interaction with other NRs to activate it. A proteomic analysis revealed that most of COUP-TFII partners relates to complexes of transcription regulators and the androgen receptor (AR) signaling pathway. Cell transactivation assays showed that together, COUP - TFII and AR, are able to increase promoter activation.

Keywords: Atrial Specification. SMyHC3. Nuclear Receptors. COUP-TFII.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento Cardíaco.....	20
Figura 2. Sequência da região -840 a -680 do promotor do gene SMyHC3.....	25
Figura 3. Variação entre as linhagens transgênicas do promotor do gene SMyHC3, 840-HAP e 768-HAP.....	27
Figura 4. A superfamília de Receptores Nucleares.....	28
Figura 5. Estrutura dos receptores nucleares.....	30
Figura 6. Região de anelamento dos primers para deleção e região ECRRN de 32 pb deletada.....	39
Figura 7. Construção plasmideal contendo o FLAG, o receptor nuclear COUP-TFII (NR2F2) e uma proteína fluorescente Venus.....	44
Figura 8. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com os receptores nucleares RAR/RXR.....	48
Figura 9. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear RXR.....	48
Figura 10. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR3 e o promotor SMyHC3 com os receptores nucleares VDR/RXR.....	49
Figura 11. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear PPARα.....	50
Figura 12. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear PPARβ.....	50

Figura 13. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo F2 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear TR β	51
Figura 14. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear PPAR γ	52
Figura 15. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear TR α	53
Figura 16. Ensaio de transativação celular do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear AR.....	53
Figura 17. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear ROR α	54
Figura 18. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear Rev-Erb β	54
Figura 19. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear ERR α	55
Figura 20. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o Receptor nuclear COUP-TFII.....	56
Figura 21. Construções do COUP-TFII utilizadas nos experimentos de transativação celular.....	57
Figura 22. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear COUP-TFII.....	58
Figura 23. Alinhamento da sequência <i>wild-tipe</i> do promotor de 840 pb <i>versus</i> a sequência do promotor mutado, evidenciando a deleção da região de 32 pb, o ECRRN.....	59
Figura 24. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 e o seu mutante delecional Δ ECRRN com o receptor nuclear COUP-TFII.....	59

Figura 25. Confirmações por Western Blot para a Espectrometria de Massas.....	61
Figura 26. Proteínas interactoras de COUP-TFII.....	68
Figura 27. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 e os receptores nucleares COUP-TFII e AR.....	69
Figura 28. Papel da sequencia ECRRN (elemento complexo de resposta a receptores nucleares) na transativação dos promotores mínimos TK (esquerda) e TK fusionado ao ECRRN (TK-ECRRN) por receptores nucleares COUPTF-II e AR (receptor de andrógeno).....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências e temperatura de melting (T_m) dos primers utilizados na deleção do ECRRN no plasmídio 840luc.....	39
Tabela 2. Resumo dos receptores nucleares ativadores e não-ativadores do promotor SMyHC3.....	55
Tabela 3. Proteínas de maior relevância imunoprecipitadas com COUP-TFII-FLAG por espectrometria de massas.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1.1	Desenvolvimento cardíaco	19
1.2	O ácido retinóico e o desenvolvimento cardíaco	21
1.3	O gene SMyHC3	23
1.3.1	O promotor atrial-específico do gene SMyHC3	24
1.3.2	Deleção da região dos 72 pb distais do promotor	26
1.4	Receptores nucleares	27
1.4.1	Elemento de resposta a receptores nucleares	30
1.4.2	Co-reguladores	32
1.4.3	Receptores de ácido retinóico (RARs e RXRs)	32
1.4.4	O receptor nuclear órfão COUP-TFII	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Objetivos gerais	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Cultura celular	38
3.2	Procedência dos clones	38
3.3	Desenho dos oligonucleotídeos	38
3.4	Purificação dos oligonucleotídeos	40
3.5	PCR de mutação	40
3.6	Transativação celular	41
3.7	Espectrometria de massas	42
4	RESULTADOS	45
4.1	Rastreamento de receptores nucleares por transativação celular	46
4.2	O rastreamento de receptores nucleares revelou um novo candidato: COUP-TFII	56
4.2.1	Domínios de ligação do COUP-TFII	57
4.3	Elemento complexo de resposta a receptores nucleares (ECRRN)	58
4.4	Espectrometria de massas	60

5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS.....	90
	APÊNDICE – Tabela.....	99

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Desenvolvimento cardíaco

Um dos primeiros órgãos a ser formado, o coração tem um papel vital na distribuição de nutrientes e oxigênio no embrião. Inicialmente ele funciona como um tubo cardíaco e é composto principalmente por células miocárdicas contráteis e células endocárdicas que, em conjunto, são essenciais para seu funcionamento como uma bomba peristáltica (XAVIER-NETO et al., 2001).

Durante os primeiros estágios da embriogênese, os campos bilaterais cardiogênicos são originados por células progenitoras no mesoderma embrionário anterior. Com os processos de dobramento e curvatura embrionária, estes campos de células são alinhados na região mediana do embrião e se unem formando um tubo cardíaco primitivo. Este tubo sofre processos de padronização espacial e molecular ao longo do seu eixo ântero-posterior para especificar as zonas progenitoras que darão origem aos segmentos de influxo (câmaras posteriores, região sino-atrial) e efluxo cardíaco (câmaras anteriores, regiões de ventrículo e trato de saída do coração) (SIMOES-COSTA et al., 2005; YUTZEY; BADER, 1995). A distinção inicial entre as extremidades anterior (efluxo) e posterior (influxo) é decisiva para a junção entre o coração e os vasos sanguíneos. Além disso, também é necessária para a divisão do tecido cardíaco em discretos segmentos, cada um apresentando diferenças eletrofisiológicas e contráteis que, coletivamente, fazem com que a ativação dos músculos cardíacos produza a contração coordenada e o fluxo direcional, requeridos para um bombeamento efetivo (HOCHGREB et al., 2003). Durante as fases posteriores do desenvolvimento, o tubo cardíaco sofre adições de células em seus pólos craniais e caudais, aumenta em comprimento e inicia um processo de dobramento, que é fundamental para alinhar as futuras câmaras cardíacas e estabelecer a configuração tridimensional do coração adulto (MANNER, 2000) (figura 1).

Figura 1. Desenvolvimento Cardíaco (A) Os progenitores cardíacos apresentam-se como um crescente cardíaco na parte cranial e cranio-lateral do embrião. A população progenitora estende-se cranialmente e lateralmente até a junção entre as regiões embrionárias e extra-embrionárias. (B) Os progenitores cardíacos movem-se ventralmente para formar um tubo cardíaco linear. (C) O coração tubular então inicia um processo chamado dobramento cardíaco, onde o coração tubular adquire uma forma espiral. Durante o dobramento, a região de influxo do coração é forçada dorsalmente e cranialmente, ficando acima dos ventrículos em desenvolvimento. (D) Durante essa fase de remodelamento, a divisão das câmaras cardíacas pela septação está completa, os ventrículos direito e esquerdo, e os átrios direito e esquerdo estão evidentes. Adaptado (HARVEY, 2002).

O processo de desenvolvimento cardíaco é regulado inicialmente pela expressão de alguns genes como, por exemplo, Gata-4, Tbx-5, Tbx-20, receptores nucleares como o COUP-TFII (PEREIRA et al., 1999; PLAGEMAN; YUTZEY, 2004; ROSENTHAL; XAVIER-NETO, 2000; WANG et al., 1998) e outros. Além disto, múltiplas moléculas sinalizadoras estão envolvidas na padronização cardíaca. Uma das moléculas que possui um papel importante na formação das câmaras cardíacas é o ácido retinóico (HOCHGREB et al., 2003; NIEDERREITHER et al., 2001; XAVIER-NETO et al., 1999). Em 1999, Xavier-Neto et al. administraram pulsos de ácido retinóico em camundongas grávidas com embriões no estágio de 7.5 dias pós-coito (dpc), e observaram uma dismorfologia cardíaca com completa ausência do trato de efluxo e de ventrículos. Em contraste, o bloqueio da síntese de ácido retinóico produziu corações com ausência de câmara atrial. A partir de então nosso grupo vem acumulando dados consistentes com a interpretação de que a sinalização por ácido retinóico exerce um papel essencial na

especificação do tecido cardíaco progenitor que vai dar origem às câmaras de influxo cardíaco: os átrios e o seio venoso (XAVIER-NETO et al., 1999).

1.2 O ácido retinóico e o desenvolvimento cardíaco

O ácido retinóico é uma molécula essencial para o crescimento e desenvolvimento. Ele é sintetizado a partir da vitamina A (retinol), que sofre duas oxidações sucessivas: de retinol à retinaldeído, pelas álcool desidrogenases (ADHs) e pela família de redutases de cadeia curta (SDR), e de retinaldeído em ácido retinóico, pelas retinaldeído desidrogenases (RALDHs) (NIEDERREITHER et al., 2001). A síntese de ácido retinóico é, portanto, regulada por enzimas da família das retinaldeído desidrogenases, sendo a RALDH2 a mais importante para o desenvolvimento cardíaco precoce (DUESTER, 2001), uma vez que a expressão de outras RALDHs não pode ser detectada antes de 8.5-9.5 dpc (DUESTER, 2000) e que dentre todas as RALDHs, apenas a RALDH2 apresenta fenótipos letais em animais nocautes. RALDH2 é uma enzima altamente específica (ZHAO et al., 1996) que é expressa primeiramente no mesoderma posterior de embriões de camundongos durante a gastrulação (NIEDERREITHER et al., 1997), e depois se torna restrita a estruturas posteriores (trato de influxo) do coração em desenvolvimento (MOSS et al., 1998).

Em 1999, Niederreither et al. demonstraram a importância do gene RALDH2 para o desenvolvimento, incluindo a correta formação cardíaca, utilizando camundongos nocaute para o gene (NIEDERREITHER et al., 1999). Os embriões dos camundongos desenvolveram um tubo cardíaco, o qual não apresentava o átrio e possuía uma câmara ventricular anormalmente aumentada (NIEDERREITHER et al., 2001). Também em 1999, Xavier-Neto e colaboradores demonstraram que o ácido retinóico exógeno é capaz de expandir os domínios de expressão de um gene específico de regiões que originarão as câmaras atriais, o gene para a cadeia pesada de uma miosina lenta, SMyHC3, e que, inibidores da enzima RALDH2, causam grande diminuição da expressão deste gene (XAVIER-NETO et al., 1999).

Rosenthal e Xavier-Neto, baseados nas mudanças dinâmicas da imunorreatividade na RALDH2 descrita em camundongo (MOSS et al., 1998) e em

corações embrionários de aves (XAVIER-NETO et al., 2000), propuseram que a segmentação cardíaca pode ser iniciada por dois eventos distintos de especificação e destino sino-atrial. No evento de especificação, células precursoras sino-atriais são instruídas pela difusão de ácido retinóico nas proximidades do mesoderma lateral, ou pela produção autônoma de ácido retinóico via RALDH2. O tecido precursor atrial é dotado com a capacidade estável de expressar RALDH2 e produzir ácido retinóico. Portanto, de acordo com esse modelo, a sinalização por ácido retinóico determina o destino atrial (posterior) das células, enquanto o destino ventricular (anterior) é especificado na ausência de ácido retinóico (MOSS et al., 1998; ROSENTHAL; XAVIER-NETO, 2000; XAVIER-NETO et al., 1999; XAVIER-NETO et al., 2000).

Em 2003, Hochgreb et al. estabeleceram a participação do ácido retinóico na organização do coração em átrios e ventrículos. De acordo com o modelo proposto acima, foi demonstrado que durante a morfogênese cardíaca, as células que entram em contato com ácido retinóico adquirem as características atriais e as que não entram em contato transformam-se em células ventriculares. As células que adquiriram características atriais tornam-se irreversíveis em resposta as altas concentrações de ácido retinóico produzidas por uma onda caudorostral de RALDH2, que em galinha ocorre entre os estágios Hamburger e Hamilton (HH) 7 e 8 e em camundongo, entre 8.5 e 9.5 dpc (HOCHGREB et al., 2003).

Além de RALDH2, genes para fatores de transcrição também são expressos nas regiões de influxo cardíaco, como por exemplo, Gata-4, Tbx5 e o receptor nuclear COUP-TFII (PEREIRA et al., 1999; PLAGEMAN; YUTZEY, 2004; ROSENTHAL; XAVIER-NETO, 2000; WANG et al., 1998). GATA-4 é um gene expresso em um domínio amplo durante os primeiros estágios do desenvolvimento cardíaco, porém, sua expressão diminui nos territórios ventriculares permanecendo concentrado na futura região atrial (WANG et al., 1998). De maneira interessante, a expressão de GATA-4 é reduzida em embriões de codorna deficientes em ácido retinóico. Estes embriões apresentam desenvolvimento deficiente dos átrios e uma formação exagerada de tecido ventricular (KOSTETSKII et al., 1999). Tbx5 está presente nos átrios e no ventrículo esquerdo, mas não é expresso no ventrículo direito e trato de saída (PLAGEMAN; YUTZEY, 2004). Por sua vez, COUP-TFII é expresso no mesênquima de órgãos

internos como glândulas salivares, septo nasal, língua, também expresso no átrio, pulmão, estômago, pâncreas e bastante expresso no sistema nervoso (PEREIRA et al., 1995; QIU et al., 1994). A sua inativação por recombinação homóloga resulta em falha no desenvolvimento do átrio e do seio venoso em camundongos (PEREIRA et al., 1999).

Em resumo, nosso entendimento sobre a rede de regulação genética necessária para a especificação, determinação, diferenciação e morfogenia do átrio ainda é muito rudimentar. Para avançar no entendimento das vias moleculares envolvidas com a diferenciação atrial é necessário elucidar como as células progenitoras cardíacas se comprometem com uma via de diferenciação atrial. Para tanto, utilizamos um transgene que corresponde à região promotora de um gene que se expressa nas futuras regiões embrionárias que formarão o átrio cardíaco, o gene SMyHC3 (WANG et al., 1996; XAVIER-NETO et al., 1999).

1.3 O gene SMyHC3

Em 1996, Wang et al identificaram e caracterizaram um novo gene, o SMyHC3, que é expresso em corações de embriões de codorna em desenvolvimento e em músculos esqueléticos embrionários. Este gene é homólogo a um gene que codifica a cadeia pesada de uma miosina atrial, AMHC1, na galinha, e é preferencialmente expresso nos átrios (NIKOVITS et al., 1996; WANG et al., 1996; YUTZEY et al., 1994). Inicialmente SMyHC3 é expresso no coração tubular, porém, à medida que as câmaras cardíacas vão se desenvolvendo, a expressão do SMyHC3 nos ventrículos vai diminuindo, enquanto no átrio a expressão é mantida (WANG et al., 1996).

Wang et al., 1996, identificaram um fragmento de 840 pares de base (pb) do promotor do gene SMyHC3 como suficiente para regular a expressão gênica preferencial nos átrios. Dentro desse promotor foram encontradas regiões que continham tanto elementos cis-regulatórios positivos quanto negativos.

Em 1999, Xavier-Neto et al. ligaram o fragmento de 840 pb do promotor SMyHC3 ao gene-repórter da fosfatase alcalina (HAP) para gerar os camundongos transgênicos SMyHC3-HAP. Os autores observaram que este fragmento direciona a expressão do

gene-repórter no átrio dos camundongos desde o início do desenvolvimento (XAVIER-NETO et al., 1999). Os padrões de expressão da HAP durante o desenvolvimento cardíaco indicam que a especificação do trato de influxo está bem estabelecida antes da formação das câmaras cardíacas e o transgene SMyHC3-HAP é ativado somente nas estruturas sino-atriais (WANG et al., 1996; XAVIER-NETO et al., 1999). Com inibição da síntese de ácido retinóico, pode-se observar deleção do átrio e redução da expressão cardíaca do transgene SMyHC3, enquanto o tratamento com ácido retinóico exógeno aumenta a expressão de HAP, expande o compartimento sino-atrial e há expressão ectópica do transgene na região que daria origem aos ventrículos. Esses resultados sugeriram que o promotor do gene SMyHC3 é um alvo direto ou indireto de ácido retinóico (XAVIER-NETO et al., 1999).

1.3.1 O promotor atrial-específico do gene SMyHC3

Para entender como o gene SMyHC3 é regulado de maneira atrial-específica, sua região promotora foi estudada.

Uma sequência de 160 pb entre -840 e -680 foi identificada dentro do promotor de 840 pb e foi designada como domínio regulatório atrial 1 (ARD1). Essa região funciona como um enhancer atrial-específico em embriões de codorna (WANG et al., 1996). Vários elementos cis-regulatórios estão presentes no promotor SMyHC3, incluindo HF-1A, M-CAT, E-box, elemento de resposta à vitamina D (VDRE) ou ácido retinóico (RARE) e um sítio GATA (WANG et al., 1996).

Através da deleção e mutação do domínio regulatório atrial 1 (ARD1) e transfecção transiente dos mutantes em culturas de cardiomiócitos atriais e ventriculares, foi identificado um elemento dual de resposta à vitamina D ou ácido retinóico (VDRE/RARE). Esse elemento dual, VDRE/RARE, quando ligado a um promotor heterólogo em um vetor retroviral direcionava a expressão gênica preferencialmente atrial em embriões de galinha. Ambos os receptores de ácido retinóico e vitamina D (RAR e VDR) se ligavam ao elemento dual e inibiam a expressão do gene repórter em cultura ventricular, mas não nos cardiomiócitos atriais (WANG et al., 1998). Portanto,

este elemento regula a expressão atrial específica, uma vez que inibe a expressão do gene-repórter em cardiomiócitos ventriculares (WANG et al., 1996).

Esse estudo sugere que os elementos HF-1A, M-CAT e E-box contidos no ARD1 não são necessários para a expressão câmara-específica do gene SMyHC3, mas que as sequências envolvidas em sua restrição atrial-específica estão dentro dos 40 pb que incluem o elemento de resposta à vitamina D ou ao ácido retinóico (VDRE/RARE) (WANG et al., 1996).

Essa região de 40 pb está localizada dentro de um fragmento de 72 pb mais distais do promotor de 840 pb do gene que é requerido para a restrição atrial do SMyHC3 (WANG et al., 1996). Dada a importância do elemento dual VDRE/RARE e a sinalização por ácido retinóico na morfogênese cardíaca e na determinação das linhagens atriais e ventriculares (HOCHGREB et al., 2003), uma análise do fragmento de 72 pb para a existência de outros sítios potenciais de ligação a receptores nucleares, inclusive para ácido retinóico, foi realizada. Essa análise revelou que o fragmento contém sítios para repressores ventriculares, ativadores atriais, múltiplos sítios de ligação para receptores nucleares e um elemento complexo de resposta para receptores nucleares (ECRRN) de 32 pb. Aparentemente, ao invés de conter apenas um elemento dual de resposta a ácido retinóico e vitamina D (RARE/VDRE), como proposto anteriormente (WANG et al., 1998), essa região contém pelo menos mais uma região com potencial de sítio de ligação para receptores nucleares. O ECRRN abrange três sítios de ligação, as hexades A, B e C, que suporta três modos de ligação exclusivos: distal (A+B), proximal (B+C) e espaçado (A+C) (MATOS, 2002) (figura 2).

Figura 2. Sequência da região -840 a -680 do promotor do gene SMyHC3. Sequência de nucleotídeos do promotor do gene SMyHC3 mostrando a região entre -840 e -680 pb que contém o elemento dual de resposta a receptores nucleares descritos por Wang et al. (1996) e a nova região de 32 pb definida pelas análise de bioinformática (contendo 3 héxades, ABC). A região demarcada em azul claro representa os 72 pb mais distais do sítio inicial de tradução, a qual contém o *enhancer* de 32 pb. Também observa-se o sítio de ligação para proteínas GATA. Em destaque (linha pontilhada), o *enhancer* composto de 3 héxades, A,B e C, mostrando o elemento dual, composto pelas héxades A e B. A héxade B pode estar separada da héxade A por 3 nucleotídeos (VDRE) ou por 5 nucleotídeos (RARE) (SAMPAIO, 2010)

1.3.2 Deleção da região de 72 pb do promotor

Foram identificados os centros controladores da expressão atrial-específica do transgene SMyHC3-HAP utilizando mutagênese no contexto de camundongos transgênicos. Esse centro controlador encontra-se em uma região de 72 pb à 5' do promotor, na região do ARD1 descrito anteriormente (WANG et al., 1998). Os camundongos transgênicos contém o promotor de 840 pb com os 72 pb mais distais deletados, ligado ao gene repórter da fosfatase alcalina. Foi observado que a redução desse fragmento de 72 pb libera a expressão do gene repórter nos ventrículos e, simultaneamente, reduz consideravelmente a expressão atrial, de modo que o coração apresenta uma coloração ubíqua indiscriminada (MATOS, 2002) (figura 3).

Desta maneira, pode-se concluir que o fragmento de 72 pb contém elementos repressores da expressão ventricular e elementos estimuladores da expressão atrial. Além disso, a coloração indiscriminada em átrios e ventrículos indica que sequências fora do fragmento de 72 pb controlam uma expressão que não discrimina entre as câmaras cardíacas. Em resumo, controladores positivos e negativos dentro do fragmento de 72 pb atuam sobre uma expressão cardíaca basal, indiscriminada entre as câmaras cardíacas, para torná-las atrial específica (MATOS, 2002).

Para definir quais os elementos regulatórios da expressão atrial-específica contidos no fragmento de 72 pb, análises para a detecção de sequências regulatórias putativas foram realizadas e foi verificado que o fragmento de 72 pb continha sequências típicas de um elemento de resposta a receptores nucleares.

Figura 3. Variação entre as linhagens transgênicas do promotor do gene SMYHC3, 840-HAP e 768-HAP. (A) Embrião 840-HAP com 10,5dps mostrando coloração atrial intensa e delimitada. (B) Embrião 768-HAP com 10,5dpc mostrando ausência de coloração atrial, o que indica que o fragmento de 72 pb deletado nesta linhagem controla a especificidade atrial do promotor do gene SMYHC3 (MATOS, 2002).

1.4 Receptores nucleares

Os receptores nucleares compreendem uma ampla família de fatores de transcrição ativados por ligantes que medeiam a expressão de genes-alvo envolvidos no metabolismo, desenvolvimento e reprodução. A função primária é mediar a resposta transcricional, em células-alvo, a ligantes específicos como esteroides sexuais (progesterinas, estrógenos e andrógenos), esteroides adrenais (mineralocorticoides e glicocorticoides), vitamina D, hormônio tireoidiano e retinóides (9-cis e all-trans) (MANGELSDORF et al., 1995; MCKENNA et al., 1999).

Os receptores nucleares podem ser subdivididos em três tipos gerais: o tipo 1 inclui os receptores esteroides clássicos como receptor de andrógenos (RA), receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de glicocorticoide (GR) e receptor de mineralocorticoide (MR). O tipo 2 inclui os receptores nucleares que dimerizam com o receptor de retinóide X (RXR). São eles os receptores de vitamina D (VDR), hormônio tireoidiano (TR), ácido retinóico all-trans e receptores de ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR). O tipo 3 são os receptores nucleares órfãos, como o *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor* (COUP-TFII), para os quais ainda não foram encontrados ligantes (MCKENNA et al., 1999) (figura 4).

Figura 4. A superfamília de Receptores Nucleares. Os receptores nucleares formam uma superfamília de proteínas relacionadas filogeneticamente. Essa diversidade tem sido organizada em uma nomenclatura baseada na filogenia, onde a abreviação NR (nuclear receptor) é seguida por xyz, sendo x a subfamília, y o grupo e z o gene. A superfamília inclui receptores para moléculas hidrofóbicas como hormônios esteroides (por exemplo, estrógeno, glicocorticoides, progesterona, mineralocorticoides,

andrógenos, vitamina D), ácido retinóico (isoformas all-trans e 9-cis), hormônios tireoideos, ácidos graxos, leucotrienos e prostaglandinas. Adaptado (ROBINSON-RECHAVI et al., 2003)

Foi proposto que os receptores nucleares evoluíram de um receptor órfão ancestral sem ligante conhecido, por uma diversificação precoce, o qual só mais tarde adquiriu a ligação ao ligante. Esse conceito é bem aceito juntamente com a hipótese de que alguns receptores órfãos funcionem exclusivamente como repressores constitutivos ou ativadores de transcrição. Um exemplo disso é o repressor constitutivo Rev-Erb, capaz de recrutar correpressores ou ativadores mesmo sem a presença do AF-2 (GRONEMEYER; LAUDET, 1995).

Na região N-terminal ou A/B se encontra a região AF-1 (Active Function-1), que atua como ativadora constitutiva da transcrição (ARANDA; PASCUAL, 2001). A comparação da região A/B de subfamílias diferentes demonstra que esta é a região mais fracamente conservada entre os receptores nucleares. A principal função do AF-1 é conferir especificidade à célula, ao DNA e aos promotores (KRAICHELY et al., 1999; REICHARDT et al., 1998). Além disso, a região N-terminal dos receptores nucleares pode sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, que aumenta a probabilidade de transativação do AF-1, assim como a sinergia e cooperatividade do AF-1 com o AF-2 (REICHARDT et al., 1998; SHAO; LAZAR, 1999).

A região C abriga o domínio de ligação ao DNA (DBD) e é responsável pelo reconhecimento de sequências específicas de DNA (HREs, Elementos Responsivos a Hormônios). O DBD possui quatro sub-regiões que foram caracterizadas por definir ou contribuir diretamente em diversos fatores como: na especificidade aos elementos responsivos; na formação de uma interface de dimerização entre os DBDs; e no contato com o esqueleto do DNA (CHAMBON, 1996; GRONEMEYER; LAUDET, 1995).

Já a região D é menos conservada que as regiões que a cercam (C e E) e parece corresponder a uma “dobradiça” (“hinge”) que permite que os domínios de ligação ao ligante e ao DNA adotem diversas conformações evitando problemas conformacionais. Esta região também contém um sinal de localização nuclear (NLS) ou pelo menos uma parte funcional dele (CHEN et al., 1994). A região E engloba o domínio de ligação ao ligante (LBD) e AF-2, é uma das regiões mais bem estruturadas e ainda possui diversas funções reguladas pela ligação de moléculas lipofílicas, entre elas

estão a liberação do receptor do complexo de proteínas de choque térmico, translocação para o núcleo, homodimerização, heterodimerização e ativação da transcrição de genes-alvo (ARANDA; PASCUAL, 2001). Sua associação com proteínas correguladoras, como os correpressores (HEERY et al., 1997; HORLEIN et al., 1995) e os coativadores (FENG et al., 1998; RIBEIRO et al., 1995), são respectivamente essenciais para repressão e ativação de genes pelos receptores. A função ativadora dependente de ligante, AF-2, presente nesta região é a responsável pelo recrutamento de coativadores, embora às vezes, possa ter função repressora. É no LBD que agem os agonistas e antagonistas, ativando ou reprimindo a transcrição (GRONEMEYER; LAUDET, 1995) (figura 5).

Figura 5. Estrutura dos receptores nucleares. Ilustração esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. As regiões mais bem conservadas C e E estão representadas por um retângulo cinza, e as barras coloridas são as regiões divergentes A/B, D e F. AF 1 e 2 representam os domínios de ativação da transcrição (Transcription Activation Function, AF). Dentro do AF-2 existe um domínio de transativação autônoma (Autonomous Transactivation Domain, AD).

1.4.1 Elemento de resposta a receptores nucleares

Os receptores nucleares regulam a transcrição por se ligarem a sequências específicas de DNA nos genes alvos, chamados de elementos de resposta a receptores nucleares. Esses elementos estão localizados nas sequências regulatórias normalmente presentes na região 5' (promotora) do gene alvo (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Os elementos de resposta a receptores nucleares consistem em duas héxades de nucleotídeos, cujo consenso é 5'-PuGGTCA-3' (Pu = A ou G), que podem ser configuradas em uma variedade de motivos funcionais (GLASS, 1994; MANGELSDORF

et al., 1995). Esses elementos de resposta a receptores nucleares refletem diretamente os modos de ligação do receptor, que podem ser como heterodímeros, homodímeros ou monômeros (MANGELSDORF et al., 1995). Múltiplas combinações dois a dois podem formar palíndromos, palíndromos invertidos ou repetições diretas (direct repeats ou DRs) das sequências consensuais. A análise da maioria dos elementos de resposta, revelou que o consenso das repetições diretas mais comum é “AGGTCAN_xAGGTCA” (N_x – onde **N** pode ser qualquer nucleotídeo e **x** representa o número de nucleotídeos). Uma visão popular é que a especificidade de ligação obedeceria a uma regra em que o espaçamento entre as héxades definiria o tipo de receptor nuclear capaz de se ligar ao elemento regulatório em questão. Assim, um espaçamento de 1 nucleotídeo entre as héxades (DR1) caracterizaria um receptor de COUPTF-II, PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) ou de RXR; um espaçamento de 2 nucleotídeos (DR2) caracterizaria um receptor de ácido retinóico; um espaçamento de 3 nucleotídeos (DR3), um receptor de vitamina D; um espaçamento de 4 nucleotídeos (DR4), um receptor tireoideano; e um espaçamento de 5 nucleotídeos (DR5), um receptor de AR (PERLMANN et al., 1993).

Atualmente, sabe-se que os receptores de ácido retinóico podem se ligar a elementos de resposta além de DR2 e DR5, como DR1, DR3 e DR4 (MADER et al., 1993). Por sua vez, o receptor de vitamina D pode se ligar a elementos tipo DR3 e DR5, enquanto que COUPTF-II, por exemplo, exibe uma grande flexibilidade de ligação a vários tipos de elementos como DR0, DR1, DR4, DR6, DR8, DR11, podendo ainda ligar-se a DR2, DR3 e DR5, embora o elemento preferido e mais comum em promotores de genes influenciados pelo COUPTF-II seja o DR1. Para enfatizar a grande diversidade de possibilidades, determinou-se também que DRs com mais de 150 nucleotídeos de espaçamento conferem resposta a ácido retinóico e vitamina D (KATO et al., 1995). Em resumo, esse esquema simples tem sido útil para uma visão preliminar de sítios putativos de ligação a receptores nucleares, mas tornou-se claro que ele representa apenas uma aproximação superficial da grande variação estrutural dos receptores nucleares (UMESONO et al., 1988; UMESONO et al., 1991).

1.4.2 Co-reguladores

A atividade transcricional depende de uma série de proteínas associadas após a ligação dos receptores nucleares ao DNA, os co-ativadores e os co-repressores (CHEN; EVANS, 1995; HORLEIN et al., 1995). Os dois principais grupos de co-repressores incluem o co-repressor de receptores nucleares NCoR (NCoR/TRIP13) e o SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), NCoR2/TRAC (GLASS; ROSENFELD, 2000). Os co-ativadores incluem uma subfamília de proteínas p160 de co-ativadores de receptores esteróides (SRC) denominadas SRC-1 (NCoA-1), SRC-2 (TIF-2, GRIP-1) e SRC-3 (pCIP, ACTR, AIB1, TRAM1, RAC3) (GLASS; ROSENFELD, 2000).

Os receptores nucleares têm a capacidade de recrutarem correpressores tais como NCoR e SMRT, os quais, por sua vez, possuem uma atividade enzimática intrínseca ou recrutam complexos com atividade de histona desacetilase (HDAC) (GLASS; ROSENFELD, 2000). Durante a ligação do ligante, os correpressores são liberados e os receptores nucleares interagem com coativadores da transcrição, tais como as proteínas da família p160, as quais possuem atividade de remodelamento e modificação da cromatina, liberando-a do estado repressivo (GLASS; ROSENFELD, 2000).

1.4.3 Receptores de ácido retinóico (RARs e RXRs)

A sinalização por ácido retinóico é gerada através da existência de duas famílias de receptores, os RARs (α , β e γ) e os RXRs (α , β e γ), e suas inúmeras isoformas, que ligam como heterodímeros RXR/RAR aos elementos de resposta dos genes alvos de ácido retinóico. RAR e RXR interagem com múltiplos coativadores (mediadores transcricionais) e/ou corepressores (CHAMBON, 1996). Camundongos nocautes para cada uma das isoformas de RAR mostraram ser viáveis, porém, mutações para várias das combinações de RAR morrem in utero (MARK et al., 2006) ou apresentam defeitos embrionários que incluem o espectro de malformações da síndrome induzida por deficiência de vitamina A descrita muitos anos atrás (WILSON et al., 1953). Das

mutações para RXR, foi evidenciado que a isoforma RXR α é o principal envolvido na embriogênese, uma vez que camundongos mutantes para esta isoforma desenvolvem uma hipoplasia da camada compacta do miocárdio ventricular, o que parece ser a principal causa de morte do embrião por volta dos 14,5 dias de desenvolvimento (KASTNER et al., 1997).

Assim, os heterodímeros de RAR/RXR α são as unidades funcionais da via de transdução de sinal por ácido retinóico durante o desenvolvimento controlando a expressão de vários genes-alvo (LEID et al., 1992; MARK et al., 2006).

1.4.4 O receptor nuclear órfão COUP-TFII

Outros receptores nucleares importantes durante o desenvolvimento são aqueles da família do COUP-TFII. Estes são receptores nucleares órfãos, para qual ainda nenhum ligante foi encontrado (MCKENNA et al., 1999).

O COUP-TFII funciona como dímero e se liga com alta afinidade em repetições diretas imperfeitas do tipo DR-1 (TSAI; TSAI, 1997), podendo também se ligar a uma grande variedade de diferentes conformações (COONEY et al., 1992). Geralmente funciona como homodímero, mas pode se associar com RXR, um receptor promíscuo universal dos receptores nucleares (COONEY et al., 1992).

Em mamíferos, o COUP-TFII regula muitos processos biológicos, incluindo angiogênese, desenvolvimento neural, organogênese, determinação celular, homeostasia metabólica, ritmo circadiano e desenvolvimento atrial (KRUSE et al., 2008; PEREIRA et al., 1999). Está presente no mesênquima de órgãos internos como glândulas salivares, septo nasal, língua, também expresso no átrio, pulmão, estômago, pâncreas e bastante expresso no sistema nervoso (PEREIRA et al., 1995; QIU et al., 1994). Camundongos nocautes para COUP-TFII apresentam defeitos na angiogênese e no desenvolvimento cardíaco, e morrem antes de 10.5dpc devido a crescimento retardado da cabeça e problemas no coração, principalmente no átrio, seio venoso e nas veias cardinais (PEREIRA et al., 1995).

De acordo com esses estudos, é possível notar que o COUP-TFII é um receptor nuclear crítico durante o desenvolvimento e diferenciação de diversos tecidos. Contudo,

o papel do COUP-TFII durante o desenvolvimento cardíaco não está bem estabelecido. Ainda, a regulação de COUP-TFII não está bem clara, seja por ligantes ou através da modulação de sua expressão por outros fatores de transcrição ou mecanismos de sinalização como, por exemplo, o do ácido retinóico (KRUSE et al., 2008). Portanto, uma análise da regulação de genes-alvo, regulados por COUP-TFII permitirá uma melhor compreensão dos papéis que esse receptor nuclear órfão desempenha no desenvolvimento e na diferenciação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Identificar os fatores de transcrição da classe dos receptores nucleares importantes para a especificação atrial utilizando como ferramenta de investigação o promotor do gene SMyHC3.

2.2 Objetivos específicos

- Através de um screening de transfecção transiente em células-modelo, determinar quais receptores nucleares ativam o promotor da SMyHC3;
- Estabelecer especificamente que papel o receptor nuclear órfão COUPTF-II, nosso mais importante candidato, desempenha como ativador do promotor SMyHC3;
- Através de ensaios de transativação, determinar que domínio do COUP-TFII, ativa o promotor do SMyHC3;
- Através de análises de espectrometria de massas, identificar possíveis parceiros de interação do COUP-TFII.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

A linhagem HEK293T foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos), acrescido de 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL streptomycin, 2 mM L-glutamina, e 10% v/v de soro fetal bovino (Invitrogen). A cada dois dias, ou quando atingiram 80-90% de confluência, as subculturas de HEK293T foram feitas através da adição de 50% v/v de tripsina (Invitrogen) a 37 °C por 1 a 3 minutos. Para os ensaios de transativação celular são plaqueadas 2×10^5 células por poço em placas de cultura de 12 poços e mantidas a 37 °C por 48 h ou até atingirem 80% de confluência.

3.2 Procedência dos clones

Os promotor do gene SMyHC3 utilizado no ensaio de transativação celular foi clonado em vetor repórter de luciferase pGL2 Basic (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Estados Unidos). Os receptores nucleares RXR α , RAR α e VDR utilizados no ensaio de transativação celular foram clonados em vetor de expressão em células de mamíferos pCDNA 3.1(+) (Invitrogen). O plasmídeo que codifica o receptor nuclear COUP-TFII foi cedido pelo Dr. Bert O'Malley (Baylor College of Medicine - Texas Medical Center - Houston, Texas), os receptores nucleares PPAR α , PPAR β , PPAR γ (receptor de proliferação de peroxissomos α , β e γ), TR α , TR β (receptores de hormônio tireoidiano α e β) e as construções COUP-TFII-DBD (aa 74 ao 150), COUP-TFII-LBD (aa 150 ao 414) e COUP-TFII-DL (aa 74 ao 414) foram gentilmente cedidos pela Dra. Ana Carolina M. Figueira (Laboratório Nacional de Biociências LNBio – CNPEM – Campinas, SP – Brasil) e ERR α (receptor relacionado ao estrogênio α), ROR α (receptor órfão relacionado ao AR) e Rev-Erb β pelo Dr. Michael Schubert (Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon – Lyon, França).

3.3 Desenho dos oligonucleotídeos para deleção da região ECRRN

A partir da análise da região de 840 pb do promotor do gene SMyHC3, que contém 32 pb caracterizados como elemento complexo de resposta a receptores nucleares, deletamos esta região para verificar a função da mesma na ativação atrial-específica do promotor. Os oligonucleotídeos de DNA usados na deleção da região do ECRRN, foram desenhados de acordo com o protocolo do kit QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis (Qiagen, Hilden, Mettmann, Alemanha). Os primers 840luc32del sense e 840luc32del antisense possuem aproximadamente 25 pb (tabela 1) e flanqueiam a região de 32 pb. Estes primers são parcialmente complementares (figura 6).

Tabela 1: Sequências e temperatura de melting (T_m) dos primers utilizados na deleção do ECRRN no plasmídeo 840luc.

Nome	Sequência	T _m (°C)
840luc32del sense	5'AGG AAT TTG TCA CTT GCG GGG CTG G 3'	61,0
840luc32del antisense	5'CTG GCC TCC TTA TCT CCC AGC CCC GC 3'	67,4

Figura 6. Região de anelamento dos primers para deleção (azul: 840luc32del sense; verde: 840luc32del antisense) e região ECRRN de 32 pb a ser deletada (vermelho).

3.4 Purificação dos oligonucleotídeos para a reação de deleção do ECRRN

Os oligonucleotídeos foram purificados através do protocolo SDS-PAGE.

Os oligonucleotídeos (25 uL do forward e 25 uL do reverse) foram anelados em H₂O, a 95 °C por 5 minutos, e resfriados a temperatura ambiente por duas horas.

Após o passo de anelamento, os primers foram submetidos à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 5%, a 100 v. O gel foi corado com brometo de etídio 10 ug/ml e a banda recortada. A banda foi eluída em tampão de eluição (0,5 M acetato de amônio; 10 mM acetato de magnésio; 1 mM EDTA pH8; 0,1 SDS) a 37 °C, overnight.

No dia seguinte, os oligonucleotídeos purificados e eluídos no tampão de eluição foram filtrados em lã de vidro. Foi adicionado 5 ml de isobutanol saturado, e após agitação, coletamos o DNA na fase inferior.

Para extração do DNA utilizamos fenol : clorofórmio.

3.5 PCR de mutação

A primeira etapa envolveu a amplificação das duas fitas do DNA plasmidial molde em um termociclador pela enzima *Pfu* utilizando os primers contendo a mutação da região do ECRRN. A reação de mutação contém 10 ng do plasmídeo 840luc, 125 ng de cada oligonucleotídeo sense e antisense (Tabela 1), 1,25 mM de dNTP mix, 5 µL de tampão 10x e 38,5 µL de ddH₂O para um volume final de 50 µL, após o preparo do mix da reação adicionou-se 2,5 U/µL de PfuUltra HF DNA polymerase. O PCR foi realizado a uma temperatura de desnaturação inicial de 95 °C por 30 segundos, seguido de 18 ciclos de amplificação, sendo que as condições de cada ciclo foram: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 68 °C por 7 minutos. Após a amplificação, as amostras foram digeridas com 10 U da enzima Dpn-I por 1 h a 37 °C. A enzima Dpn-I só reconhece sequências de 4 pb (G^{me}ATC) metiladas e só atuará no DNA oriundo da bactéria, ou seja, o DNA molde contendo a sequência nativa do promotor. A digestão de múltiplos sítios Dpn-I quebra o plasmídeo molde em

vários fragmentos menores que são incapazes de se replicar autonomamente em bactérias. Assim, a reação é enriquecida para o DNA de dupla fita contendo a sequência mutante. Um microlitro da reação foi utilizado para a transformação em bactérias competentes e o DNA plasmidial foi purificado com o kit Plamid Maxi Kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.6 Transativação celular

Um método amplamente empregado para se estudar a expressão de genes eucarióticos é o sistema de gene "repórter". Essa abordagem permite avaliar o efeito que uma sequência regulatória de um determinado gene exerce sobre o nível de transcrição de um gene "repórter" - artificialmente inserido à montante do gene de interesse. Em razão desta característica, este é o método de escolha para se delimitar preliminarmente os elementos regulatórios, avaliar os efeitos de agentes hormonais sobre a transcrição gênica e estudar o impacto das mutações em elementos regulatórios cis. Este tipo de sistema, utilizado em diferentes tipos de células ou em diferentes ambientes bioquímicos, pode também revelar onde ou em que circunstâncias estão presentes os fatores adequados, necessários para a transcrição.

Para estudar quais receptores nucleares que estão envolvidos na especificação atrial foram realizados experimentos de transativação do gene repórter da luciferase, fusionado ao promotor de 840 pb do gene SMYHC3, foram realizados.

Células HEK293T foram transfectadas em poços da placa de 12 poços utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) na proporção 1,5 : 2 (m/v) com 1ml de DMEM sem soro e sem antibióticos. A lipofectamina foi diluída em 25 µl de meio OPTI MEM (Invitrogen). Os seguintes DNAs foram também diluídos em 25 µl de meio OPTI MEM: 0,5 µg do plasmídeo 840-luc; 0,5 µg do plasmídeo do gene repórter da renilla luciferase, como um controle da transfecção; 0,5 µg do plasmídeo do receptor nuclear de interesse e para completar a mesma quantidade de DNA em todas as condições, 3 µg de DNA total por poço, foi utilizado o plasmídeo pBlueScript vazio. A solução de lipofectamina e o DNA diluído em OPTI MEM foram incubados juntos por 15 minutos para a formação do complexo DNA-lipossomos.

Após 4h de transfecção o meio foi trocado para DMEM com soro e com antibiótico. As células transfectadas, após a troca do meio, foram tratadas com 1uM do ligante específico para o receptor nuclear transfectado.

Após 48 horas da transfecção, as células foram coletadas de acordo com as instruções do kit Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Foi adicionado 75ul do Dual-Glo® Luciferase Reagent. Este reagente induz a lise celular e age como um substrato para luciferase de vagalume. A leitura do gene repórter da luciferase de vagalume foi realizada com o auxílio do luminômetro GloMax® Microplate Reader (Promega). Ao lisado, foi adicionado o Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent, que extingue a reação de luminescência da luciferase de vagalume e fornece substrato para a reação de luciferase de *Renilla*, que então é medida no luminômetro.

A leitura da luminescência da luciferase de vagalume foi normalizada através da divisão das leituras da luciferase de vagalume pela luciferase de *Renilla*. Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão da média de pelo menos 3 experimentos independentes contendo cada um pelo menos 3 replicatas para cada condição experimental. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho (mais de duas condições experimentais, cada uma com controle e tratamento) seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*. A significância estatística foi fixada em $P < 0,05$.

3.7 Espectrometria de massas

Com a espectrometria de massas (MS) é possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação.

Para análise por MS, as amostras podem ser injetadas diretamente no espectrômetro de massas, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, como a cromatografia líquida (LC) ou a eletroforese capilar. Resumidamente, a análise por MS consiste na geração de íons por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação

massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e ou quantitativamente por meio de um detector. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente.

Enriquecimento Nuclear

Foram plaqueadas em 5 placas de 100 mm com 10^6 células HEK293T e foram transfectadas com pCSII-EF-Flag-Nr2f2-IRES2-Venus (figura 7) ou com o controle eGFP-flag na proporção de 2 : 5 (m/v) de lipofectamina (Invitrogen). Essas células foram coletadas após 48 h e foram lavadas com PBS 1x gelado. O *pellet* foi ressuspensionado em 700ul de tampão LSB (10 mM TRIS-HCl pH 7,4; 320 mM Sacarose; 2 mM $MgCl_2$; 3 mM $CaCl_2$; 0,4% NP-40; 0,5 mM DTT; coquetel inibidor de proteases e 12,5 mM de β -glicerofosfato) e incubado por 12 minutos no gelo. As células foram recuperadas por centrifugação a 800 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante, a fração citosólica, foi coletado e guardado no gelo. O *pellet*, a fração nuclear, foi lavado com 300ul do tampão LSB modificado (10 mM TRIS-HCl pH 7,4; 2 mM $MgCl_2$; 3 mM $CaCl_2$) e centrifugado a 800 g por 5 minutos a 4 °C. A fração nuclear foi ressuspensionada em 230 ul de tampão HSB (50 mM TRIS-HCl pH7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% Triton x-100; coquetel inibidor de proteases e 12,5 mM de β -glicerofosfato) e incubada por 10 minutos no gelo. Após a incubação, ambas as frações foram centrifugadas a 14000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e as proteínas foram dosadas com o kit BCA Protein Assay Kit Pierce™. Este protocolo foi realizado a fim de enriquecer a fração nuclear do extrato.

Imunoprecipitação

A resina *anti-flag® M2 affinity gel* (Sigma), foi lavada por três vezes com tampão TBS (150 mM NaCl; 20 mM Tris) e centrifugada a 800 g por 1 minuto a 4 °C.

A fração nuclear (aproximadamente 630ug de proteínas) foi incubada com 40 ul da resina em um volume final de 1 ml de tampão HSB sob agitação a 4 °C. No dia seguinte, o sobrenadante foi retirado através de centrifugação a 800 g por 1 minuto a 4 °C e a resina foi lavada em tampão TBS. Em seguida a resina foi incubada com 3X *FLAG® Peptide* (Sigma), na concentração final de 150 ng/ul, para a eluição dos complexos formados entre o COUPTF-II e outras proteínas.

Preparação das amostras

As proteínas eluídas nas imunoprecipitação (IP) foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina de acordo com o protocolo de Villén & Gygi (2008) (VILLEN et al., 2008). Os peptídeos foram ressuspensos em ácido fórmico a 0,1% e analisados no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) acoplado com cromatografia líquida de ultra-performance (LC-MS/MS). Os 20 íons mais intensos, com carga ≥ 2 , foram fragmentados por CID (Collision-induced dissociation). Arquivos do tipo Raw Data Analysis: a lista de picos (msf) será gerada pelo programa Proteome Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific), utilizando Sequest, e buscas contra o Human International Protein Database (IPI) v. 3.86 (91522 sequências; 36630302 resíduos, Julho 2011).

A análise por espectrometria de massas foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas – LNBio – CNPEM.

Figura 7. Construção plasmideal contendo o FLAG, o receptor nuclear COUP-TFII (NR2F2) e uma proteína fluorescente Venus.

4 RESULTADOS

4.1 Screening de receptores nucleares por transativação celular

Vários sítios de reconhecimento para ligação de fatores de transcrição são encontrados na região promotora do gene SMyHC3 (WANG et al., 2001; WANG et al., 1998; 1996). Inicialmente, foi observado que o promotor do gene SMyHC3 continha uma região de 160 pb, denominada domínio regulatório atrial (ARD1), que agia como um enhancer atrial-específico em cultura de cardiomiócitos. Uma análise dessa região identificou elementos como HF-1A, M-CAT, E-Box, um elemento dual de resposta ao receptor de vitamina D ou ao receptor de ácido retinóico (VDRE/RARE) e um elemento GATA. Análises deletacionais desse domínio indicaram que o elemento dual VDRE/RARE, presente em uma região de 72 pb dentro do ARD1, era responsável pela regulação negativa da expressão atrial-específica do promotor (WANG et al., 1998).

Uma inspeção minuciosa no contexto de camundongos transgênicos, os quais continham o promotor de 840 pb com o fragmento de 72 pb distais deletados ligado ao gene repórter da fosfatase alcalina (768-HAP) revelou que a expressão do repórter era liberada nos ventrículos enquanto encontrava-se inibida nos átrios. Esses resultados revelam a presença tanto de um elemento negativo, que reprime a expressão nos ventrículos, quanto de um elemento positivo, que ativa a expressão atrial. Através de ensaios de mutação dessa região, foi observado a existência de outros sítios potenciais de ligação a receptores nucleares, além da região que continha o elemento dual VDRE/RARE, descrito por Wang et al., 1996, essa região foi denominada Elemento Complexo de Resposta a Receptores Nucleares (ECRRN) (MATOS, 2002).

A partir dessas informações, concluímos que o promotor atrial pode ser regulado por receptores nucleares. Além disso, sabe-se que uma das funções dos receptores nucleares é modular a expressão de genes-alvo envolvidos no desenvolvimento. Com o objetivo de entender a regulação do promotor do gene SMyHC3, através de receptores nucleares elaboramos um ensaio baseado em células para verificar quais deles seriam capazes de ativar o promotor SMyHC3 (840 pb).

Os receptores nucleares são capazes de formar homodímeros, ou seja, um complexo com dois receptores nucleares iguais, ou heterodímeros com o RXR (receptor de ácido retinóico α), como RAR/RXR e VDR/RXR. Os homodímeros e heterodímeros

ligam-se em elementos de DNA que estão orientados como palíndromos, repetições diretas, ou até mesmo repetições invertidas (AMOUTZIAS et al., 2007). A heterodimerização de receptores como TR, RAR ou VDR com RXR pode aumentar a eficiência de ligação ao DNA e a atividade transcricional (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Uma vez que o transgene SMyHC3 é regulado por ácido retinóico (XAVIER-NETO et al., 1999), co-transfectamos o promotor de 840 pb do SMyHC3 dirigindo a expressão da luciferase (840-LUC), juntamente com plasmídeos que codificam RAR e o seu heterodímero RXR, para avaliar se os efetores da sinalização por ácido retinóico são capazes de ativar o promotor. Além disto, transfectamos também somente RXR ou VDR com RXR. Observamos que não houve aumento da atividade do repórter, mesmo na presença dos seus respectivos ligantes (ácido all-trans retinóico, ácido 9-cis retinóico e vitamina D).

Os receptores nucleares podem se ligar ao DNA através elementos de resposta a receptores nucleares que consistem em duas hexádes de nucleotídeos, cujo consenso é 5'-PuGGTCA-3' (Pu = A ou G), que podem ser configuradas em uma variedade de motivos funcionais. Múltiplas combinações dois a dois podem formar palíndromos, palíndromos invertidos ou repetições diretas (direct repeats ou DRs) das sequências consensuais.

Como controle do experimento, as células foram co-transfectadas com os elementos responsivos DR1, para RAR/RXR ou RXR (na presença ou não de ácido all-trans retinóico ou ácido 9-cis retinóico, respectivamente) e DR3 para VDR/RXR (na presença ou não de vitamina D). Os controles apresentaram atividade de transcrição normal (Figura 8, 9 e 10).

Figura 8. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com os receptores nucleares RAR/RXR. O elemento responsivo DR1 e o promotor 840-LUC foram transfectados com os receptores RAR/RXR (com ou sem ácido all-trans retinóico). Observe que RAR em heterodímero com RXR não é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=7$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 9. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear RXR. O elemento responsivo DR1 e o promotor 840-LUC foram transfectados com o receptor RXR (com ou sem ácido 9-cis retinóico). Observe que RXR não é capaz de ativar o promotor

SMyHC3 (840-LUC), $n=5$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 10. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR3 e o promotor SMyHC3 com os receptores nucleares VDR/RXR. O elemento responsivo DR3 e o promotor 840-LUC foram transfectados com os receptores VDR/RXR (com ou sem vitamina D). Observe que VDR/RXR não é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=9$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Inicialmente, achava-se que o promotor SMyHC3 era ativado por AR através de seus efetores, os receptores nucleares RXR e RAR (CHAMBON, 1996). Porém, estudos anteriores mostraram que o heterodímero RAR/RXR liga-se com pouca eficiência ao promotor em ensaios de gel shift (SAMPAIO, 2010) e como evidenciado neste trabalho, os ensaios de transativação celular mostram que não há expressão do repórter quando co-transfectado com RAR/RXR. Assim, o ácido retinóico estaria agindo de maneira indireta através de outro regulador.

Para analisar quais outros possíveis receptores nucleares poderiam regular o promotor do gene SMyHC3, plasmídeos que codificam PPAR α (figura 11), PPAR β (figura 12) e TR β (figura 13), foram co-transfectados com o promotor 840-LUC, e estimularam a atividade do repórter em aproximadamente cinco vezes, na ausência de seus respectivos ligantes, fenofibrato, GW0742 e T3. Já o PPAR γ na presença de seu ligante, rosiglitazona, também ativa o repórter em aproximadamente cinco vezes (figura

14). O receptor nuclear TR α (figura 15) na ausência de T3 estimula o promotor em aproximadamente seis vezes. Outro receptor nuclear que ativou o promotor na ausência do seu ligante foi o receptor de andrógenos. Na ausência de testosterona o promotor foi ativado em aproximadamente duas vezes, enquanto o receptor de andrógenos na presença de testosterona diminuiu essa ativação (figura 16).

Figura 11. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear PPAR α . O elemento responsivo DR1 e o promotor 840-LUC foram transfectados com o receptor PPAR α (com ou sem fenofibrato). Observe que o PPAR α na ausência de seu ligante é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=11$, ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 12. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear PPAR β . O elemento responsivo DR1 e o promotor 840-LUC foram transfectados com o receptor PPAR β (com ou sem GW0742). Observe que o PPAR β na ausência de seu ligante é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=8$, * $p<0,05$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 13. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo F2 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear TR β . O elemento responsivo F2 e o promotor 840-LUC foram transfectados com o receptor TR β (com ou sem T3). Observe que o TR β na ausência de seu ligante é capaz de ativar o

promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=8$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 14. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear PPARγ. O elemento responsivo DR1 e o promotor 840-LUC foram transfectados com o receptor PPARγ (com ou sem rosiglitazona). Observe que o PPARγ na presença de seu ligante é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=10$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 15. Ensaio de transativação celular do elemento responsivo DR1 e o promotor SMyHC3 com o receptor nuclear TRα. O elemento responsivo DR1 e o promotor 840-LUC foram transfectados com o receptor TRα (com ou sem T3). Observe que o TRα na ausência de seu ligante é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), porém não é estatisticamente significativa, $n=12$, *** $p<0,001$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 16. Ensaio de transativação celular do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear de andrógenos, AR. O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor AR (com ou sem testosterona). Observe que o AR na ausência de seu ligante é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=4$, * $p<0,5$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

A co-transfecção do 840-LUC juntamente com os plasmídeos que codificam ROR α , Rev-Erb β ou ERR α , não estimulou a atividade do repórter (figura 17, 18, 19).

Figura 17. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear ROR α . O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor ROR α . Observe que o ROR α não é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), n=8, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 18. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear Rev-Erb β . O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor Rev-Erb β . Observe que o Rev-Erb β não é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), n=8, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 19. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear ERRα. O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor ERRα. Observe que o ERRα não é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), $n=$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

O rastreamento por transativação no contexto celular revelou que outros receptores nucleares ativam o promotor SMyHC3, evidenciando a presença do elemento complexo de resposta a receptores nucleares e a importância dos receptores nucleares na expressão atrial-específica do gene SMyHC3.

Tabela 2. Resumo dos receptores nucleares ativadores e não-ativadores do promotor SMyHC3

Receptores Nucleares Ativadores		Receptores Nucleares Não-Ativadores
840 + RN	840 + RN + LIG	840 + RN
PPARα	-	RARα/RXRα
PPARβ	-	RXRα
-	PPARγ	VDRα/RXRα
TRα	-	RORα
TRβ	-	REV-ERBβ
COUP-TFII	-	ERRα
AR	-	-

4.2 O rastreamento de receptores nucleares revelou um novo candidato: COUP-TFII

Para testar outro receptor nuclear como candidato para regular o promotor SMyHC3, fizemos uma nova inspeção computacional da sequência de 32 pb revelando sítios putativos de ligação para COUP-TFII. Uma busca na literatura mostrou que COUP-TFII poderia ser um bom candidato para regulação atrial específica do gene SMyHC3, uma vez que sua deleção em camundongos provoca morte embrionária e defeitos na formação dos átrios (PEREIRA et al., 1999).

Para testar o envolvimento deste receptor na regulação do promotor SMyHC3, nós transfectamos células HEK293T com o 840-LUC, na presença do plasmídeo de expressão de COUP-TFII. A figura 20 mostra que COUP-TFII ativa aproximadamente quatro vezes o promotor de 840-LUC.

Figura 20. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear COUP-TFII. O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor COUP-TFII. Observe que COUP-TFII full length é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), n=13, *** p<0,001, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

4.2.1 Domínios de ligação do COUP-TFII

Após a observação de que o receptor nuclear órfão, COUP-TFII, estimula a atividade do gene repórter, queríamos saber qual domínio de ligação deste receptor interagia com o promotor do gene SMYHC3. Para isso quatro construções foram utilizadas. Uma contendo o domínio de ligação ao DNA (DBD, resíduos 74-150), uma contendo o domínio de ligação ao ligante (LBD, resíduos 150-414), uma contendo os dois domínios, o de ligação ao DNA e o de ligação ao ligante sem o N-terminal (DL, resíduos 74-414) e uma full length (figura 21).

Figura 21. Construções do COUP-TFII utilizadas nos experimentos de transativação celular. A construção completa está inserida no vetor pCDNA3.1. Abaixo dela, estão indicadas as construções DBD (aa 74-150), LBD (aa 150-414) e DBD-LBD (aa 74-414), todas elas inseridas em vetores de expressão de mamíferos pCDNA3.1.

A construção COUP-TFII DL também ativou o promotor, porém em uma menor taxa, indicando que a presença do domínio N-terminal é bastante importante nesta ativação, já que possui a função de ativação independente de ligante (AF-1). A construção COUP-TFII LBD também ativa o promotor, fato bastante interessante que

indica a possibilidade de haver interação deste receptor com outros fatores que contribuem na ativação do promotor SMyHC3 (figura 22).

Figura 22. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 com o receptor nuclear COUP-TFII. O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor COUP-TFII. Observe que COUP-TFII full length é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC) assim como a construção COUP-TFII LBD, $n=13$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

4.3 Elemento complexo de resposta a receptores nucleares (ECRRN)

Uma análise do fragmento de 72 pb revelou um fragmento que continha sequências típicas de um elemento de resposta a receptores nucleares, o Elemento Complexo de Resposta a Receptores Nucleares (ECRRN).

Para verificar, *in vivo*, se o ECRRN é necessário para a ativação do promotor pelo receptor nuclear COUP-TFII, fizemos uma mutação deletional dos 32 pb (Δ ECRRN) do SMyHC3 (figura 2 e 23).

Figura 23. Alinhamento da sequência *wild-type* do promotor de 840 pb *versus* a sequência do promotor mutado, evidenciando a deleção da região de 32 pb, o ECRRN.

Como controle transfectamos novamente o promotor 840-LUC com o plasmídeo que codifica o COUP-TFII full-length, mostrando uma ativação de aproximadamente 2-4 vezes.

De acordo com o esperado, o Δ ECRRN não foi ativado significativamente pelo COUP-TFII full-length quando comparado com o controle, mostrando que a expressão atrial-específica do promotor do SMyHC3 por COUP-TFII requer a presença desta região de 32 pb (figura 24).

Figura 24. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 e o seu mutante delecional Δ ECRRN com o receptor nuclear COUP-TFII. O promotor 840-LUC e o seu mutante delecional Δ ECRRN foram transfectados com o receptor COUP-TFII. Observe que COUP-TFII é capaz de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC), porém, não ativa o Δ ECRRN, n=13, *** p<0,001, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Após a caracterização deste elemento junto com a importância dos receptores nucleares durante o desenvolvimento, principalmente na regulação do promotor atrial SMyHC3, o screening por transativação celular mostrou que receptores nucleares ativam o promotor, sugeriu um novo regulador para o gene, o receptor nuclear órfão COUP-TFII e evidenciou que a expressão atrial-específica do promotor do SMyHC3 por COUP-TFII requer a presença do ECRRN.

4.4 Espectrometria de massas

De acordo com os nossos resultados, sabe-se que o receptor nuclear órfão COUP-TFII está relacionado com a expressão atrial-específica do gene SMyHC3 (SAMPAIO, 2010) e que essa expressão está ligada diretamente com a sinalização por ácido retinóico (XAVIER-NETO et al., 1999). Porém, como observado nesse trabalho, experimentos de transativação celular com os efetores de ácido retinóico, RAR/RXR, não ativaram o promotor do gene SMyHC3 enquanto houve ativação pelo receptor nuclear COUP-TFII full-length e também somente pelo seu domínio de ligação ao ligante (LBD), evidenciando que além da ação do ácido retinóico ser indireta, ele pode interagir com outras proteínas para ativar o promotor.

Com o objetivo de identificar potenciais parceiros de interação proteína-proteína de COUP-TFII utilizamos uma abordagem proteômica para a caracterização de interactores de COUP-TFII por meio de imunoprecipitação de pCSII-EF-Flag-Nr2f2-IRES2-Venus (COUP-TFII-FLAG) (figura 25) que nos revelou potenciais parceiros de COUP-TFII nas redes regulatórias do desenvolvimento atrial.

Figura 25. Confirmações por Western Blot para a Espectrometria de Massas (A) Western Blot para confirmação da localização do COUP-TFII no extrato nuclear. (B) Western Blot do extrato nuclear para confirmar a presença da proteína COUP-TFII-FLAG na amostra e a proteína GFP-FLAG na amostra controle antes de incubar com a resina (input) e após a eluição da imunoprecipitação com FLAG. (C) Western Blot do extrato nuclear e citosólico da linhagem superexpressando COUP-TFII-FLAG para confirmar a separação correta das frações.

As proteínas representadas na figura 26 e na tabela 2 foram identificadas especificamente em células transfectadas com COUPTF-II-FLAG em pelo menos dois de três ensaios de expressão independentes (replicatas biológicas) (tabela 3). Nenhuma das proteínas descritas abaixo foi identificada nos controles (células transfectadas com eGFP-FLAG).

Uma análise preliminar do material mostra que as proteínas imunoprecipitadas com COUPTF-II-FLAG fazem parte de complexos remodeladores de cromatina, complexos de histona acetiltransferase e histona desacetilase, fatores de transcrição gerais, ativadores e repressores de fatores de transcrição do tipo receptores nucleares.

Tabela 3. Proteínas de maior relevância imunoprecipitadas com COUP-TFII-FLAG por espectrometria de massas.

UniProt	Símbolo	Gene	Localização	Tipo
Remodeladores de Cromatina				
Q9H4L7	SMARCAD1	SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1	núcleo	enzima
O60264	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	núcleo	regulador da transcrição
Q13185	CBX3	chromobox homolog 3	núcleo	regulador da transcrição
Q66X93	RANGAP1	Ran GTPase-activating protein 1	núcleo	enzima
P61964	WDR5	WD repeat domain 5	núcleo	enzima
O15047	SETD1A	SET domain containing 1A	núcleo	canal iônico
Acetilação e Desacetilação de Histonas				
O14929	HAT1	histone acetyltransferase 1	núcleo	enzima
Q9Y4A5	TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein	núcleo	regulador da transcrição
Q9NV56	MRGBP	MRG/MORF4L binding protein	núcleo	outros
Q92688	ANP32B	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	núcleo	outros

Q92769	HDAC2	histone deacetylase 2	núcleo	regulador da transcrição
Q16576	RBBP7	retinoblastoma binding protein 7	núcleo	regulador da transcrição
Fatores de Transcrição Gerais				
Q15369	TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	núcleo	regulador da transcrição
Q15370	TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)	núcleo	regulador da transcrição
Q5VWG9	TAF3	TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 140kDa	núcleo	regulador da transcrição
O43719	HTATSF1	HIV-1 Tat specific factor 1	núcleo	regulador da transcrição
P20290	BTF3	basic transcription factor 3	núcleo	regulador da transcrição
Repressores da Transcrição				
Q13148	TARDBP	TAR DNA binding protein	núcleo	regulador da transcrição
O15226	NKRF	NFKB repressing factor	núcleo	regulador da transcrição
P42669	PURA	purine-rich element binding protein A	núcleo	regulador da transcrição

P09543	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	citoplasma	outros
Ativadores da Transcrição				
Q4V8F5	TADA3	transcriptional adaptor 3	núcleo	regulador da transcrição
Q9BQG0	MYBBP1A	MYB binding protein (P160) 1a	núcleo	regulador da transcrição
Q9Y4B4	RAD54L2	RAD54-like 2 (S. cerevisiae)	núcleo	regulador da transcrição
Q14498	RBM39	RNA binding motif protein 39	núcleo	regulador da transcrição
P62195	PSMC5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	núcleo	regulador da transcrição
P52732	KIF11	kinesin family member 11	núcleo	outros
Q8IZL8	PELP1	proline, glutamate and leucine rich protein 1	núcleo	outros
O60341	KDM1A	lysine (K)-specific demethylase 1A	núcleo	enzima
Outros Fatores de Transcrição Específicos				
Q6ZNB6	NFXL1	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1	núcleo	regulador da transcrição
Q12906	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	núcleo	regulador da transcrição

Q86UE4	MTDH	metadherin	citoplasma	regulador da transcrição
Q9HCU5	PREB	prolactin regulatory element binding	núcleo	regulador da transcrição
P02340	TP53	tumor protein p53	núcleo	regulador da transcrição
Q91X20	ASH2L	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	núcleo	regulador da transcrição
Q01844	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	núcleo	outros
Reguladores do Ciclo Celular				
Q99623	PHB2	prohibitin 2	citoplasma	regulador da transcrição
P35232	PHB	prohibitin	núcleo	regulador da transcrição
P63208	SKP1/SKP1P2	S-phase kinase-associated protein 1	núcleo	regulador da transcrição
P06748	NPM1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	núcleo	regulador da transcrição
Splicing de mRNA				
P35637	FUS	fused in sarcoma	núcleo	regulador da transcrição

Q01130	SRSF2	serine/arginine-rich splicing factor 2	núcleo	regulador da transcrição
Q7RTV0	PHF5A	PHD finger protein 5A	núcleo	regulador da transcrição
Zinc Finger				
O95218	ZRANB2	zinc finger, RAN-binding domain containing 2	núcleo	regulador da transcrição
Q5BKZ1	ZNF326	zinc finger protein 326	núcleo	regulador da transcrição
Q9Y2X9	ZNF281	zinc finger protein 281	núcleo	regulador da transcrição
Reparo e replicação do DNA				
P35251	RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	núcleo	regulador da transcrição
Q9Y230	RUVEL2	RuvB-like 2 (E. coli)	núcleo	regulador da transcrição
Proteínas Ribossomais				
P18124	RPL7	ribosomal protein L7	núcleo	regulador da transcrição
Q8IWA0	WDR75	WD repeat domain 75	núcleo	outros
Q969X6	CIRH1A	cirrhosis, autosomal recessive 1A	núcleo	outros

(cirhin)				
Q9BVP2	GNL3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	núcleo	outros
Q9BQ67	GRWD1	glutamate-rich WD repeat containing 1	núcleo	outros
Fatores da RNA Polymerase III				
Q12789	GTF3C1	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	núcleo	regulador da transcrição
Q9Y5Q9	GTF3C3	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa	núcleo	regulador da transcrição
Q9UKN8	GTF3C4	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa	núcleo	regulador da transcrição
Q9Y5Q8	GTF3C5	general transcription factor IIIC, polypeptide 5, 63kDa	núcleo	regulador da transcrição

Uma análise das proteínas identificadas no interactoma de COUP-TFII (figura 26) segundo um referencial centrado em receptores nucleares como: receptor de andrógeno (AR), receptor de estrógeno (ER), receptor de glucocorticóides (GR), receptor de ácido retinóide X (RXR), fator nuclear de hepatócitos número quatro (HNF-4) e receptor de aryl hidrocarbonetos (AHR), indicam que COUP-TF-II possui poucos interactores associados especificamente a ele e que a maioria de suas interações em HEK293T corresponde a interações previamente mapeadas para outros receptores nucleares, notadamente GR e AR. Também observamos nodos importantes para o metabolismo e divisão celular como p53 e c-Myc. Foi observado que exceto para o próprio COUP-TF (COUP-TFII e COUP-TFI), todas as proteínas identificadas são alvos diretos de GR, AR e p53. Na figura 26, as proteínas localizadas nos nodos acima da linha vermelha foram identificadas somente na literatura, já aquelas localizadas abaixo da linha vermelha foram identificadas também através da imunoprecipitação de COUP-TFII-FLAG.

Figura 26. Proteínas interactoras de COUP-TFII. Uma visão das proteínas identificadas no interactoma de COUP-TFII (marcadas por um círculo em vermelho) segundo um referencial centrado em receptores nucleares. Também estão representados nodos importantes para o metabolismo e divisão celular como p53 e c-Myc. A maioria de suas interações corresponde a interações previamente mapeadas para outros receptores nucleares, notadamente GR e AR.

Os resultados da análise proteômica de COUP-TFII produziram consequências importantes para nossa investigação. Devido a sua presença como um ponto focal importante para muitas das proteínas que interagem com COUP-TFII em células HEK293T nós testamos a participação do receptor de andrógeno isoladamente ou em conjunto com o promotor do gene SMyHC3 (figura 27). Observamos que o promotor é

ativado em aproximadamente três vezes na presença de COUP-TFII e o receptor de andrógenos isolados. Porém, quando associados, COUP-TFII e o receptor de andrógenos, ativam o promotor em seis vezes. Para verificar se estes receptores ativavam o promotor através da sua ligação ao ECRRN, foi clonado um promotor mínimo fusionado a sequencia ECRRN (TK mínimo - ECRRN). Nestes experimentos observamos que a construção TK-ECRRN também só é estimulada na presença simultânea de COUP-TFII e o receptor de andrógenos, enquanto que o promotor TK mínimo não responde a nenhum dos fatores de transcrição empregados isoladamente ou em conjunto (figura 28). Este resultado é consistente com nossa ideia de que a regulação da expressão atrial do promotor SMyHC3 é predominantemente efetuada na esfera de interações proteína-proteína após, presumivelmente, a ligação de um receptor nuclear (COUP-TF-II ou o próprio receptor de andrógenos) ao ECRRN.

Figura 27. Ensaio de transativação do promotor SMyHC3 e os receptores nucleares COUP-TFII e o receptor de andrógenos. O promotor 840-LUC foi transfectado com o receptor COUP-TFII, o receptor de andrógenos e COUP-TFII + receptor de andrógenos. Observe que COUP-TFII e o receptor de andrógenos são capazes de ativar o promotor SMyHC3 (840-LUC) em duas vezes, porém, associados. COUP-TFII e o receptor de andrógenos, ativam o promotor em seis vezes, $n=4$, *** $p<0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

Figura 28. Papel da sequencia ECRRN na transativação dos promotores mínimos TK e TK fusionado ao ECRRN (TK-ECRRN) por receptores nucleares COUPTF-II e receptor de andrógenos. A construção PGL2_TK_ECRN foi transfectada com o receptor COUP-TFII, o receptor de andrógenos e COUP-TFII + receptor de andrógenos. Observe que COUP-TFII e o receptor de andrógenos não são capazes de ativar a construção, porém, quando associados COUP-TFII e o receptor de andrógenos, ativam o promotor em duas vezes, $n = 4$, *** $p < 0,001$, os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um caminho seguida pelo teste de Bonferroni como um teste *post-hoc*.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento embrionário requer um sofisticado controle da expressão gênica. Este controle inclui uma rede complexa de proteínas que se ligam às regiões regulatórias de genes, que dependendo do tipo celular serão ativados ou inibidos em estágios e tecidos específicos. Esta regulação gênica gera, em última análise, os diferentes padrões de expressão que darão características bioquímicas, genéticas e fisiológicas de cada tipo celular.

Estrutura do promotor do gene SMyHC3

Para entender melhor as bases moleculares da diferenciação dos tipos celulares cardíacos é necessário o estudo de marcadores para cada tipo celular, como o atrial e o ventricular. Um dos marcadores da linhagem atrial é um gene que codifica uma isoforma lenta da cadeia pesada de miosina, a SMyHC3 (WANG et al., 1996; XAVIER-NETO et al., 1999).

Através de estudos anteriores (WANG et al., 1996) foi definido que os elementos controladores da expressão atrial-específica de SMyHC3 encontravam-se dentro de uma região de 160 pb, denominada domínio regulatório atrial 1 (ARD1). Estes estudos mostraram que os principais elementos controladores do gene SMyHC3 estavam contidos em um fragmento de 72 pb mais distais (5') do promotor de 840 pb (NIKOVITS et al., 1996; WANG et al., 1998; 1996; XAVIER-NETO et al., 1999). Mais especificamente, foi determinado um elemento dual de resposta à vitamina D e/ou ao ácido retinóico (VDRE/RARE) como um elemento controlador negativo da expressão do gene nos ventrículos (WANG et al., 1998).

Uma análise mais detalhada do fragmento de 72 pb mais distais do promotor SMyHC3 mostrou que, diferente do proposto por Wang, et al. (1998), o elemento dual VDRE/RARE está localizado em uma sequência mais complexa, onde podem ser encontrados outros possíveis elementos semelhantes de ligação à receptores nucleares. Esta sequência, onde está inserido o elemento dual é formada por 32 pb e foi denominada Elemento Complexo de Resposta a Receptores Nucleares (ECRRN) (MATOS, 2002).

Análises de modelagem molecular revelaram que o ECRRN compreende três sítios de ligação, as héxades A, B e C. Estas héxades suportam três modos exclusivos

de ligação: distal (A+B), proximal (B+C) e espaçado (A+C). Algumas funções câmara-específicas foram descobertas por mutações no contexto de camundongos transgênicos nestas sequências. Em geral, mutações sítio-dirigidas no ECRRN sugerem uma característica interessante da regulação de SMyHC3 por receptores nucleares, isto é, que a ligação de cada monômero de um receptor a sua héxade correspondente pode ser responsável por um aspecto diferente da função do promotor. Por exemplo, a mutação da héxade B, sítio de ligação 5' no modo proximal, revela um elemento que reprime um padrão de intensa expressão em mosaico, típico de pequenas regiões nos ventrículos (principalmente ventrículo esquerdo) e via de efluxo. Em contraste, mutações na héxade C, no sítio de ligação 3' do modo proximal, revela um regulador dual que reprime uma forma de expressão fraca e homogênea nos ventrículos e trato de efluxo e, simultaneamente estimula a transcrição nos átrios (MATOS, 2002).

Análises preliminares do ECRRN como regulador da especificidade atrial do gene SMyHC3 sugeriam o elemento de resposta ao ácido retinóico como o candidato a desempenhar o papel de repressor ventricular e ativador atrial (MATOS, 2002). Esta hipótese é consistente com o papel do ácido retinóico no processo de padronização influxo/efluxo cardíaca (HOCHGREB et al., 2003; MOSS et al., 1998; NIEDERREITHER et al., 1999), hipótese esta que é apoiada pela observação de que perturbações na sinalização pelo ácido retinóico produzem efeitos claros sobre a expressão de um transgene SMyHC3-HAP em camundongos.

A sinalização via ácido retinóico durante o desenvolvimento cardíaco

Os mecanismos que comunicam a sinalização por ácido retinóico na padronização do coração em animais foram identificados (HOCHGREB et al., 2003). Basicamente, o gene da RALDH2 é expresso na forma de uma onda caudorostral que separa o campo cardíaco em precursores anteriores (ventriculares) e posteriores (atriais) (HOCHGREB et al., 2003). Como demonstrado por Moss, et al. (1998), em hibridizações in situ, a RALDH2, uma enzima chave na etapa de síntese de ácido retinóico, é expressa na região mais posterior do coração que originará os precursores atriais. Utilizando camundongos nocaute para o gene da RALDH2, Niederreither, et al.

(1999) demonstraram a importância do gene RALDH2 para o desenvolvimento, incluindo a correta formação cardíaca. Os embriões dos camundongos desenvolveram um tubo cardíaco, o qual não apresentava o átrio e possuía uma câmara ventricular anormalmente aumentada (NIEDERREITHER et al., 2001)

O fato de que o ácido retinóico regula o promotor SMyHC3 foi sugerido por Xavier-Neto, et al. (1999), quando ligaram o promotor do gene ao gene-repórter da fosfatase alcalina (HAP) e observaram que este fragmento direcionava a expressão do gene-repórter no átrio dos camundongos desde o início do desenvolvimento (11). Com inibição da síntese de ácido retinóico, pode-se observar deleção do átrio e redução da expressão cardíaca do transgene SMyHC3, enquanto o tratamento com ácido retinóico exógeno aumenta a expressão de HAP, expande o compartimento sino-atrial e há expressão ectópica do transgene na região que daria origem aos ventrículos (XAVIER-NETO et al., 1999).

As unidades funcionais da via de transdução de sinal por ácido retinóico durante o desenvolvimento que controlam a expressão de vários genes-alvo são os seus efetores RAR/RXR (LEID et al., 1992; MARK et al., 2006). Assim, foram realizados ensaios de transativação celular para demonstrar a participação dos efetores da sinalização por ácido retinóico, RAR e RXR, na regulação do promotor do gene SMyHC3. Resultados obtidos em ensaios de competição mostraram que o ECRRN é capaz de ligar-se especificamente aos receptores de RAR/RXR, embora com uma afinidade menor que aquela mostrada para o elemento natural de resposta a estes receptores, o RARE β 2. A competição do ECRRN é menor que 50% mesmo na presença de excesso molar de 100x de sondas não radioativas. Esses dados sugerem que outros elementos podem estar envolvidos nesta ligação, ou mesmo que o ácido retinóico teria uma participação indireta na regulação deste promotor.

Para estabelecer o papel dos receptores nucleares em um contexto celular, foram realizados ensaios de transativação celular tanto com RAR/RXR (figura 8) como com VDR/RXR (figura 9) e somente com RXR (figura 10). Foi observado que estes receptores não transativaram o promotor do SMyHC3 em células HEK293T, mesmo na presença de seus respectivos ligantes, ácido retinóico *all-trans*, vitamina D e ácido retinóico 9-cis.

Os receptores nucleares e os seus correpressores

O modo clássico de transcrição gênica por receptores nucleares é que os mesmos encontram-se ligados à correpressores tais como NCoR e SMRT, os quais, por sua vez, possuem uma atividade enzimática intrínseca ou recrutam complexos com atividade de histona desacetilase (HDAC) (GLASS; ROSENFELD, 2000). Durante a ligação do ligante, as mudanças conformacionais dos receptores provocariam a liberação dos correpressores e o recrutamento de coativadores da transcrição, tais como as proteínas da família p160, SCR1, p300/CBP, as quais possuem atividade de remodelamento e modificação da cromatina, liberando-a do estado repressivo (GLASS; ROSENFELD, 2000).

A partir dessa informação, foram realizados ensaios de transativação celular, e foi verificado a participação dos coativadores, p300, CBP e GRIP1, juntamente com os receptores nucleares RAR/RXR e VDR/RXR. De acordo com a literatura, a deleção do gene p300 mostra que ele é essencial para o desenvolvimento embrionário e que a sua ausência perturba o desenvolvimento cardíaco, podendo ser um candidato a atuar em conjunto com os receptores nucleares (YAO et al., 1998). No entanto, ensaios realizados com estes coativadores em conjunto com os receptores nucleares mostraram que não houve participação efetiva dos mesmos (SAMPAIO, 2010).

Todos estes dados em conjunto além da existência de um elemento complexo de resposta a receptores nucleares nos levaram a buscar novos elementos que poderiam regular o promotor do gene SMyHC3.

Rastreamento de receptores nucleares

Um das classes de reguladores transcricionais mais abundantes em animais (metazoários) é a dos receptores nucleares. Eles têm grande importância na sinalização intracelular, e fazem com que sinais intra e extracelulares iniciem e regulem os programas de expressão gênica. Os programas genéticos que são modulados por receptores nucleares afetam virtualmente todos os aspectos da vida de um organismo multicelular, cobrindo diversos aspectos como, por exemplo, embriogenese, homeostase e reprodução, ou crescimento e morte celular (LAUDET; GRONEMEYER, 2002).

De acordo com as atividades dos receptores nucleares como reguladores transcricionais e com os dados obtidos a partir de ensaios com RAR/RXR e VDR/RXR, que nos revelaram a ausência de ativação do promotor, realizamos um rastreamento por transativação celular com os receptores nucleares, na tentativa de para estabelecer quais receptores nucleares poderiam ativar o promotor em um contexto celular.

Inicialmente, foram testados os receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR). Os PPARs pertencem à superfamília de receptores nucleares e três subtipos diferentes foram identificados, PPAR α , PPAR β e PPAR γ . Baseado nas funções fisiológicas das isoformas de PPAR espera-se que estes receptores tenham um papel importante na reprodução e no desenvolvimento. A regulação da expressão espacial e temporal de cada isoforma é crítica durante o desenvolvimento e pode influenciar as respostas de um embrião exposto a agonistas exógenos de PPAR (ABBOTT, 2009).

No embrião de camundongo, PPAR α , é detectado no coração aos 11 e 13 dias pós-coito (dpc). Já o PPAR β , é encontrado no coração de embriões de rato aos 13,5dpc, com um aumento na expressão aos 15,5dpc e 18,5dpc. Em embriões de camundongo encontra-se PPAR β aos 15dpc e no coração adulto. O PPAR γ é altamente expresso aos 13dpc em embriões de camundongo (ABBOTT, 2009).

Para testar se os PPARs regulam o promotor do gene SMYHC3, transfectamos os receptores nucleares PPAR α , PPAR β e PPAR γ , com os seus respectivos ligantes, fenofibrato, GW0742 e rosiglitazona. Observamos que há ativação do promotor pelo PPAR α (figura 11) e PPAR β (figura 12) na ausência de fenofibrato e GW0742, respectivamente. Já o PPAR γ (figura 14) ativou o promotor na presença de rosiglitazona.

Outro receptor essencial para o desenvolvimento é o receptor de hormônio tireoidiano (TR). Os TRs são fatores de transcrição dependentes de ligantes que pertencem à superfamília de receptores nucleares. Os TRs são codificados por dois genes: TR α e TR β . O ligante natural dos TRs é o hormônio tireoidiano (T3), que também é conhecido por ter um papel importante no desenvolvimento e funcionamento cardíaco. Durante o período neonatal esse hormônio participa da maturação cardíaca trocando a regulação fetal pela regulação adulta através de proteínas miocárdicas

essenciais como, por exemplo, a miosina de cadeia pesada (MHC) (PASCUAL; ARANDA, 2013).

Para avaliar se os TRs seriam bons candidatos à regulação do promotor atrial, transfectamos as duas isoformas deste receptor, o TR α e o TR β , com o seu ligante natural. Verificamos que tanto a isoforma α (figura 15), quanto a isoforma β (figura 13), ativaram o promotor na ausência de ligante.

Outro receptor nuclear testado no screening foi o receptor de andrógenos. Os andrógenos medeiam uma série de respostas fisiológicas e de desenvolvimento. Eles são especificamente importantes na diferenciação sexual masculina e maturação sexual na puberdade, manutenção da espermatogênese, e regulação das gonadotrofinas masculinas (HEINLEIN; CHANG, 2002).

O receptor de andrógeno (AR) também é membro da superfamília de receptores nucleares e age como um fator de transcrição dependente de ligante. O AR modula a expressão de genes através do recrutamento de vários complexos correguladores, modula a indução da reorganização da cromatina, e modificações epigenéticas de histonas em genes-alvo. A desregulação da sinalização por andrógenos perturba o desenvolvimento reprodutivo normal além de várias condições patológicas (MATSUMOTO et al., 2013). O AR tem sido encontrado em interações com alguns fatores de transcrição incluindo AP-1, Smad3, NF- κ B, SRY e fatores de transcrição da família de Ets. Normalmente AR funciona como homodímero, no entanto, foi visto que ele heterodimeriza com receptores nucleares como, por exemplo, o receptor de estrógeno, receptor de glicocorticoide, receptor órfão testicular 4 (HEINLEIN; CHANG, 2002) e COUP-TFII (SONG et al., 2012).

O AR foi também transfectado a fim de testar se ele era capaz de ativar o promotor no contexto celular. Transfectamos o AR com o seu respectivo ligante, a testosterona. Observamos que o AR (figura 16) ativa o promotor na ausência de seu ligante, quando a testosterona está presente a ativação é reduzida. Isso sugere que o sítio do ECRRN pode conter elementos que necessitam a interação entre receptores nucleares.

Outros receptores que foram incluídos no screening foram os receptores ROR α (figura 17), Rev-Erb β (figura 18) e ERR α (figura 19). Nenhum destes foi capaz de ativar o promotor.

Um novo candidato à regulação do promotor SMyHC3: COUP-TFII

Um dos receptores nucleares que poderia ser o provável candidato à regular o promotor do gene SMyHC3 seria o receptor nuclear órfão NR2F2, o COUP-TFII (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors). Ele pertence à subfamília NR2F, e dos receptores órfãos, ele é o mais estudado (KRUSE et al., 2008). De acordo com a literatura COUP-TFII está ligado intimamente com a identidade atrial durante o desenvolvimento (WU et al., 2013).

Em mamíferos, o COUP-TFII regula muitos processos biológicos, incluindo angiogênese, desenvolvimento neural, organogênese, determinação celular, homeostasia metabólica, ritmo circadiano e desenvolvimento atrial (KRUSE et al., 2008; PEREIRA et al., 1999). Está presente no mesênquima de órgãos internos como glândulas salivares, septo nasal, língua, também expresso no átrio, pulmão, estômago, pâncreas e bastante expresso no sistema nervoso (PEREIRA et al., 1995; QIU et al., 1994).

Camundongos nocautes para COUP-TFII apresentam defeitos na angiogênese e no desenvolvimento cardíaco, e morrem antes de 10.5dpc devido a crescimento retardado da cabeça e problemas no coração, principalmente no átrio, seio venoso e nas veias cardinais (PEREIRA et al., 1995). O COUP-TFII também regula a identidade dos vasos coronários, governa a linfangiogênese e confere identidade das veias, sendo observado, por exemplo, que a remoção do COUP-TFII nas células epiteliais faz com que as veias adquiram características de artéria (PEREIRA et al., 1999).

Para identificar possíveis ligantes para COUP-TFII, Kruse et al. (2008), fez um screening com esteroides e retinóides para verificar a habilidade deles promoverem o recrutamento de um coativador, SRC-3-1, através de COUP-TFII. Ambos, ácido retinóico 9-cis e all-trans aumentaram a interação do coativador SRC-3-1, enquanto vários esteroides mostraram um efeito pequeno. Em paralelo, ambos 9-cis e all-trans ativaram COUP-TFII em ensaios com repórter de luciferase. Porém, as concentrações

de ácido retinóico requeridas para essa ativação são de 10 a 100 vezes maior que os níveis fisiológicos, mas ainda assim estes resultados estabelecem que COUP-TFII é um receptor ativado por ligante e demonstra que tanto 9-cis e all-trans podem servir como ligantes de baixa afinidade para COUP-TFII (KRUSE et al., 2008).

Dados preliminares de tratamento de embriões com ácido retinóico e análises da expressão de COUP-TFII mostram que, quando submetidos ao ácido retinóico, os embriões manifestam um aumento geral na expressão de COUP-TFII. Estes dados sugerem um pequeno aumento da expressão de COUP-TFII no coração (SAMPAIO, 2010).

Recentemente, foi demonstrado por Wu et al. (2013), através de dados de transcriptoma, que COUP-TFII confere identidade atrial através de ligação direta e modulação da expressão de um amplo espectro de genes que têm impacto no desenvolvimento e funcionamento atrial. A remoção de COUP-TFII em cardiomiócitos é suficiente para produzir um átrio ventricularizado, no qual miócitos estão aumentados, desenvolvimento de túbulos T organizados, adquirem propriedades elétricas ventriculares, e exibem um perfil molecular que lembra o dos miócitos ventriculares. Isso sugere a mudança da identidade atrial para ventricular. Ainda, a remoção de COUP-TFII somente afetou a especificação atrial sem interferir na morfologia e função ventricular, indicando que COUP-TFII é um fator crucial na identidade atrial. Porém, a especificação dos ventrículos requer a ativação de genes ventriculares além da supressão de genes atriais (WU et al., 2013).

Alguns estudos mostram que um gene ventricular, Hey2, suprime vários genes atriais como, por exemplo, MLC1a, MLC2a, Sln, Gja5 e Nppa, porém não tem efeito na expressão ventricular de MLC1v, MLC2v, e Pln, sugerindo que ele é requerido para a completa diferenciação dos fenótipos de câmara cardíaca, mas que a sua ausência não é suficiente para conferir identidade atrial. Por sua vez, COUP-TFII é necessário para conferir características atriais enquanto suprime características ventriculares, sendo essencial para a determinação da identidade atrial/ventricular (WU et al., 2013).

De acordo com estes estudos, é possível notar que o COUP-TFII é um receptor nuclear crítico durante o desenvolvimento, diferenciação de diversos tecidos e identidade atrial. Assim, na busca do entendimento dos processos de padronização

cardíaca envolvendo o COUP-TFII, ácido retinóico e o gene SMyHC3 testamos o receptor nuclear órfão COUP-TFII.

Para verificar a participação deste receptor na regulação do promotor SMyHC3, foram realizados experimentos de transativação celular, que demonstraram que COUP-TFII (figura 20) é um ativador da transcrição dirigida pelo promotor de 840 pb deste gene sugerindo que ele é um candidato potencial como regulador da expressão gênica do SMyHC3.

Ativação do promotor SMyHC3 pelos domínios de ligação do receptor nuclear COUP-TFII

Após a observação de que o receptor nuclear órfão, COUP-TFII, estimula a atividade do gene repórter, observamos quais domínios de ligação deste receptor interagem com o promotor do gene SMyHC3. A construção COUP-TFII DL, que continha o DBD e o LBD, também ativou o promotor, porém em uma menor taxa, indicando que a presença do domínio N-terminal é bastante importante nesta ativação, já que possui a função de ativação independente de ligante (AF-1). A construção COUP-TFII LBD também ativa o promotor (figura 22), fato bastante interessante que indica a possibilidade de haver interação deste receptor com outros fatores que contribuem na ativação do promotor SMyHC3 uma vez que o DBD é a única região capaz de se ligar ao DNA. Já o LBD é um domínio multifuncional que, em adição à ligação ao ligante, medeia a homo- e heterodimerização, interação com outras proteínas, atividade transcricional dependente de ligante, e em alguns casos, a repressão transcricional reversível (ARANDA; PASCUAL, 2001).

A ativação do promotor por COUP-TFII requer a presença do ECRRN

De acordo com análises computacionais de elementos putativos regulatórios, foi revelado um sítio de ligação para COUP-TFII dentro da região do ECRRN. Para testar se o receptor nuclear COUP-TFII liga-se no elemento complexo de resposta a receptores nucleares, o ECRRN, transfectamos COUP-TFII junto com o promotor com o ECRRN deletado (Δ ECRRN). Como esperado, o Δ ECRRN não foi ativado significativamente pelo COUP-TFII *full-length* (figura 24) quando comparado com o

controle, mostrando que a expressão atrial-específica do promotor do SMyHC3 por COUP-TFII requer a presença desta região de 32 pb.

Como observado, o promotor do gene SMyHC3 foi ativado pelo receptor nuclear COUP-TFII full-length e também somente pelo seu domínio de ligação ao ligante (LBD), evidenciando que além da ação do ácido retinóico ser indireta, ele pode interagir com outras proteínas para ativar o promotor.

Análise proteômica dos parceiros de interação de COUP-TFII: interactores pertencentes a complexos reguladores da transcrição

Para identificar potenciais parceiros de interação proteína-proteína de COUP-TFII foi utilizada uma abordagem proteômica para a caracterização de interactores de COUP-TFII por meio de imunoprecipitação de pCSII-EF-Flag-Nr2f2-IRES2-Venus (COUP-TFII-FLAG) que nos revelou potenciais parceiros de COUP-TFII nas redes regulatórias do desenvolvimento atrial.

Uma análise preliminar do material mostra que as proteínas imunoprecipitadas com COUP-TFII-FLAG fazem parte de complexos remodeladores de cromatina, complexos de histona acetiltransferase e histona desacetilase, fatores de transcrição gerais, ativadores e repressores de fatores de transcrição. Muitas destas proteínas fazem parte de complexos reguladores da transcrição. Indicando a atividade de COUP-TFII como um fator de transcrição.

Membros da família dos receptores nucleares regulam a transcrição através de diversos mecanismos. Os receptores nucleares podem ativar ou reprimir genes-alvo pela ligação direta a um elemento de resposta no DNA como homo- ou heterodímeros ou pela ligação a outras classes de fatores de transcrição que se ligam ao DNA (GLASS; ROSENFELD, 2000). A ativação transcricional por receptores nucleares envolve múltiplos fatores que agem tanto de uma maneira sequencial como combinatorial para reorganizar a cromatina (POLLARD; PETERSON, 1998), recrutar e modificar fatores basais e a RNA polimerase II (GLASS; ROSENFELD, 2000). Duas classes gerais de fatores de remodelamento de cromatina foram identificadas e parecem ter papéis críticos na ativação transcricional por receptores nucleares: os complexos remodeladores de

nucleossomos dependentes de ATP, e fatores que contem atividade de acetilação de histonas (KINGSTON; NARLIKAR, 1999).

Os receptores nucleares e a cromatina: acetilação e desacetilação

Alguns estudos revelaram que há uma ligação forte entre a acetilação de histonas, remodelamento de cromatina, e a regulação gênica (STRUHL, 1998; TYLER; KADONAGA, 1999). Os níveis relativos de acetilação de histonas são determinados pela atividade enzimática de histona acetiltransferases (HAT) e histona desacetilases (HDAC) (ARANDA; PASCUAL, 2001). As histonas em um estado hiperacetilado fazem com que o genoma seja mais ativamente transcrito que um estado hipoacetilado (PAZIN; KADONAGA, 1997b). Essas enzimas não tem preferência por uma sequencia especifica de DNA. Porém, elas se associam à coativadores e correpressores, que são trazidos para o DNA através da ligação a fatores de transcrição sequencia-especificos (ARANDA; PASCUAL, 2001). O recrutamento específico de complexos com atividade enzimática de histona acetiltransferase a um promotor tem um papel crítico em liberar a cromatina do estado repressivo durante a transcrição (PAZIN; KADONAGA, 1997b; a; STRUHL, 1999). Esse conceito é suportado por achados que mostram que coativadores como p/CAF, CREB-binding protein (CBP), adenovirus E1A-binding protein p300, e TAF_{II}250 possuem atividade intrínseca de histona acetiltransferase (MIZZEN et al., 1996; OGRYZKO et al., 1998; OGRYZKO et al., 1996; PAZIN; KADONAGA, 1997b).

A regulação dos eventos de ativação pode envolver a troca de complexos contendo atividade de histona desacetilase por aqueles que contem atividade histona acetiltransferase (GLASS; ROSENFELD, 2000). Isso mostra que na maioria dos casos as acetiltransferases não são diretamente recrutadas por receptores nucleares, mas se associam a coativadores que exibem maior afinidade por este receptor (GLASS; ROSENFELD, 2000).

Foi observado que a ligação de receptores nucleares hormonais na cromatina altera a sua estrutura como, por exemplo, o receptor de glicocorticoide que pode perturbar os nucleossomos na ausência da replicação do DNA, e esse nucleossomo rapidamente se reorganiza após a retirada do hormônio (REIK et al., 1991). Em outros modelos, a ligação de receptores nucleares não modifica a estrutura da cromatina,

porém produz mais mudanças que levam a uma maior acessibilidade a outros fatores de transcrição (PINA et al., 1990).

A ligação do ligante ao seu receptor nuclear causa o recrutamento de complexos coativadores que contem ao menos os coativadores da família p160, CBP/p300, e PCAF. Todas essas proteínas possuem atividade histona acetiltransferase que permite a descompactação da cromatina e ativação do gene (ARANDA; PASCUAL, 2001). In vivo isso é demonstrado com o aumento da indução de genes-alvo do receptor nuclear após o tratamento com o seu ligante (CHEN et al., 1999). Isso confirma que a hiperacetilação de histonas é um passo crítico na sinalização hormonal via receptor nuclear.

Em contraste, correpressores e enzimas com atividade de desacetilase de histonas estão envolvidos na regulação negativa de receptores dependentes de ligantes. Na ausência de ligante, o receptor nuclear está associado aos complexos correpressores. Os correpressores, como SMRT/NCOR, recrutam as histonas desacetilases diretamente ou não através de outras proteínas. A desacetilação de histonas leva a compactação da cromatina e consequente repressão da transcrição (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Os receptores nucleares e a cromatina: remodeladores de cromatina

Outro mecanismo que reduz o bloqueio da transcrição causado pela estrutura nucleossomal é a sua ruptura por remodeladores de cromatina dependentes de ATP. A função fundamental desses remodeladores é a mobilização de nucleossomos através da alteração do contato DNA-histona. Os complexos remodeladores de cromatina incluem uma subunidade ATPase com um motivo NTP-binding conservado junto com outros polipeptídeos. Existem ao menos três subfamílias de subunidades ATPase: SWI/SNF, Mi-2/CDH, e ISWI/SNFI2 (TYLER; KADONAGA, 1999). Os fatores remodeladores utilizam energia derivada da hidrólise de ATP para catalizar a mobilização do nucleossomo, que é a mudança da posição do octamero de histona em relação ao DNA. Essa mudança facilita o acesso e o funcionamento de componentes chave do aparato transcricional. Os ativadores que podem se ligar ao DNA na cromatina recrutam um complexo remodelador ao promotor que facilita a ligação de outros fatores, os quais os sítios de ligação não estavam expostos (ARANDA; PASCUAL, 2001).

O complexo SWI/SNF parece implicar na regulação transcricional por receptores nucleares (FRYER; ARCHER, 1998; MUCHARDT; YANIV, 1993), e tem sido mostrado que receptores como GR e ER podem interagir com o complexo SWI/SNF de uma maneira dependente de ligante (NEELY et al., 1999). Além disso, esse complexo parece ser importante para a estimulação transcricional por GR, ao menos em leveduras, uma vez que leveduras carregando mutações em genes do complexo SWI é incapaz de suportar a transativação dependente de GR, enquanto em uma levedura selvagem, os glicocorticoides podem transativar um gene-repórter na presença de receptor cotransfectado (YOSHINAGA et al., 1992).

Sabe-se que os receptores nucleares podem se ligar aos seus elementos de resposta com a cromatina empacotada em células de mamíferos, e essa ligação do receptor ao DNA, de fato, facilita o acesso do fator à cromatina de uma maneira dependente de ATP (SABBADINI et al., 1999).

A modificação das histonas e a atividade de histonas acetiltransferase podem ser requeridas tanto para desestabilizar a cromatina quanto para agir em um passo subsequente a desestabilização. O remodelamento da cromatina por maquinarias dependentes de ATP precedem a ação das histonas acetiltransferase na resposta transcricional à receptores nucleares (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Análise proteômica dos parceiros de interação de COUP-TFII: interactores pertencentes às vias de transdução de sinal de receptores nucleares GR e AR.

Uma análise das proteínas identificadas no interactoma de COUP-TFII (figura 26) indicam que COUP-TFII possui poucos interactores associados especificamente a ele e que a maioria de suas interações corresponde a interações previamente mapeadas para outros receptores nucleares, notadamente GR e AR.

De acordo com a literatura, o receptor nuclear GR se associa com outros fatores de transcrição através de interações proteína-proteína e mutuamente reprime ou estimula cada atividade transcricional. Em 2004, Martino et al., observaram que GR interage fisicamente com COUP-TFII, que têm um papel fundamental no metabolismo de glicose, colesterol e xenobióticos, assim como no desenvolvimento. O GR estimula a transativação induzida por COUP-TFII pela atração de cofatores via AF-1 enquanto

COUP-TFII reprime a atividade transcricional governada por GR pela ligação de co-repressores ao seu domínio C-terminal, como o SMRT e NCoR. Essa interação tem um papel importante na gliconeogênese, metabolismo de lipoproteínas, liberação enzimática de compostos clinicamente importantes e compostos químicos bioativos. Assim sendo, os glicocorticoides exercem suas funções parcialmente através da interação com COUP-TFII (DE MARTINO et al., 2004).

Recentemente, também foi observada a interação de COUP-TFII com o receptor de andrógenos, o AR. Em 2012, Song, et al., demonstraram que COUP-TFII regulava negativamente a transativação de AR em câncer de próstata. Ainda, concluiu que COUP-TFII modulava a função do AR no câncer de próstata por afetar a proliferação celular dependente de andrógenos. Além disso, mostrou que COUP-TFII interage diretamente com AR e interfere com a interação N/C terminal de AR, devido à formação de heterodímeros de COUP-TFII com AR (SONG et al., 2012).

De acordo com os dados obtidos por espectrometria de massas observamos também o AR como um ponto focal importante para muitas das proteínas que interagem com COUP-TFII em células HEK293T. Verificamos então a participação de AR isoladamente ou em conjunto com o promotor do gene SMYHC3 (figura 26). O promotor é ativado por COUP-TFII e AR isoladamente aproximadamente duas vezes. Porém, quando associados, COUP-TFII e AR, ativam o promotor em seis vezes.

Sabe-se que COUP-TFs podem ter ações tanto repressoras quanto ativadoras. Geralmente COUP-TFs são considerados repressores da transcrição por outros receptores nucleares como RAR, TR, VDR, PPAR e fator nuclear de hepatócitos 4 (HNF4). Basicamente através de quatro mecanismos de ação eles têm ação repressora: competição pela ocupação de sítios de ligação; competição por RXR; repressão ativa; e transrepressão. Já as ações ativadoras de COUP-TFs funcionam para vários tipos de genes e podem ser feitas através de três mecanismos: ligação a um elemento de resposta a receptor nuclear no DNA ativando o gene diretamente; ligação a um elemento de DNA ativando indiretamente a expressão; e ativação da expressão através da interação proteína-proteína com um fator de ligação ao DNA (PARK et al., 2003).

Através da ligação de um promotor mínimo fusionado a sequencia ECRRN (TK mínimo – ECRRN) observamos que TK-ECRRN também foi estimulado na presença

simultânea de COUP-TFII e AR, enquanto que o promotor TK mínimo não responde a nenhum dos fatores de transcrição empregados isoladamente ou em conjunto (Figura 28). Este resultado é consistente com nossa ideia de que a regulação da expressão atrial do promotor SMyHC3 é predominantemente efetuada na esfera de interações proteína-proteína após, presumivelmente, a ligação de um receptor nuclear (COUP-TF-II ou o próprio AR) ao ECRRN.

Em resumo, para entender a regulação de genes câmara-específicos, uma das ferramentas de grande importância é o promotor do gene SMyHC3, pois no contexto de camundongos transgênicos essa região promotora revela uma expressão atrial-específica desde o início do desenvolvimento. Como mostrado por resultados anteriores do nosso grupo, sabe-se da participação do ácido retinóico como o regulador da expressão deste promotor atrial. Porém, os dados demonstrados anteriormente por nosso grupo e resultados deste trabalho sugerem que o ácido retinóico pode agir de maneira indireta na regulação da expressão do SMyHC3 durante a diferenciação cardíaca. Após a identificação do elemento complexo de resposta a receptores nucleares, foi observado que outros candidatos ativaram o promotor. Destes candidatos, um potencial ativador do gene poderia ser o receptor nuclear órfão COUP-TFII, um receptor necessário para a morfogênese atrial e cuja expressão possui restrição à câmara atrial. Ensaio de transativação com o promotor sem a região do ECRRN mostraram que COUP-TFII não ativa o gene-repórter, enquanto que ativa o promotor quando o mesmo está íntegro. Verificamos que, além do COUP-TFII com todos os seus domínios de ligação, o COUP-TFII LBD também ativa o promotor, indicando a possibilidade de haver interação deste receptor com outros fatores que contribuem na ativação do promotor. Ensaio de espectrometria de massas para a identificação destes possíveis parceiros mostraram a presença de interactores das vias de transdução de sinal de receptores de glucocorticóides (GR) e de receptores de andrógeno (AR). Ensaio de transativação celular mostraram que o promotor é ativado significativamente na presença de COUP-TFII e receptor de andrógeno. Um ensaio ainda mais restritivo para a região do ECRRN também mostrou que ela é ativada na presença dos dois receptores simultaneamente.

Os dados da literatura e os resultados obtidos com este trabalho sugerem que a regulação do promotor atrial do gene SMyHC3, necessária para a determinação atrial, pode ser mediada por COUP-TFII, receptor de andrógenos e a via de sinalização de ácido retinóico.

6 CONCLUSÕES

- Ensaios de transativação celular demonstraram que neste contexto, RAR/RXR ou VDR/RXR não são capazes de ativar o promotor SMyHC3 ligado ao gene-repórter da luciferase, mesmo na presença de ácido retinóico ou vitamina D, respectivamente.
- Receptores nucleares como ROR α , REV-ERB β e ERR α , não ativam o promotor do gene no contexto celular.
- Através do rastreamento de receptores nucleares por transativação celular, observamos que os receptores nucleares PPAR α e PPAR β na ausência de seus respectivos ligantes, fenofibrato e GW0742, ativam o promotor do gene. Já o PPAR γ , ativa o promotor na presença de seu ligante, rosiglitazona.
- Os receptores nucleares TR α e TR β ativam o promotor na presença de seu ligante, T3, no contexto de transativação celular.
- O receptor nuclear AR, ativa o promotor na ausência de testosterona.
- Ensaios de transativação celular revelam que outro receptor nuclear, COUP-TFII, também é capaz de transativar o promotor atrial-específico do gene SMyHC3.
- Através de construções variadas do receptor nuclear COUP-TFII, uma *full-length*, uma somente com o domínio de ligação ao DNA (DBD), uma com o domínio de ligação ao ligante (LBD) e outra com o DBD e LBD sem o N-terminal, observamos a ativação do promotor pela construção *full-length* e também pela construção LBD.
- Ensaios de transativação celular com promotor Δ ECRRN cotransfectado com COUP-TFII não mostram atividade do gene-repórter.

- Uma abordagem proteômica, através de experimentos de espectrometria de massas, revela que as proteínas imunoprecipitadas com COUP-TFII-FLAG fazem parte de complexos remodeladores de cromatina, complexos de acetilação e desacetilação de histonas, fatores de transcrição gerais, ativadores e repressores de fatores de transcrição.
- Uma análise das proteínas encontradas a partir da espectrometria de massas revela que, em sua maioria, elas fazem parte de interactores das vias de sinalização por receptores de glicocorticoides (GR) e receptores de andrógenos (AR).
- Ensaios de transativação celular mostram uma ativação de duas vezes do promotor tanto pelo receptor nuclear COUP-TFII quanto por AR. Porém, quando associados, os dois receptores nucleares ativam o promotor em seis vezes.
- A partir da construção do ECRRN dirigido pelo promotor mínimo TK, observamos a ativação do gene-repórter quando cotransfectado com COUP-TFII e AR, simultaneamente.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ABBOTT, B. D. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. **Reprod Toxicol**, v. 27, n. 3-4, p. 246-257, Jun 2009.
- AMOUTZIAS, G. D. et al. A protein interaction atlas for the nuclear receptors: properties and quality of a hub-based dimerisation network. **BMC Syst Biol**, v. 1, p. 34, 2007.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, Jul 2001.
- CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J**, v. 10, n. 9, p. 940-954, Jul 1996.
- CHEN, H. et al. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. **Cell**, v. 98, n. 5, p. 675-686, Sep 1999.
- CHEN, J. D.; EVANS, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 454-457, Oct 1995.
- CHEN, Z. P. et al. Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 41, p. 25770-25776, Oct 1994.
- COONEY, A. J. et al. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTCA response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 9, p. 4153-4163, Sep 1992.
- DE MARTINO, M. U. et al. Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocorticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1024, p. 72-85, Jun 2004.
- DUESTER, G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 14, p. 4315-4324, Jul 2000.
- DUESTER, G. Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. **Chem Biol Interact**, v. 130-132, n. 1-3, p. 469-480, Jan 2001.
- FENG, W. et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1747-1749, Jun 1998.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

FRYER, C. J.; ARCHER, T. K. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 88-91, May 1998.

GLASS, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocr Rev**, v. 15, n. 3, p. 391-407, Jun 1994.

GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev**, v. 14, n. 2, p. 121-141, Jan 2000.

GRONEMEYER, H.; LAUDET, V. Transcription factors 3: nuclear receptors. **Protein Profile**, v. 2, n. 11, p. 1173-1308, 1995.

HARVEY, R. P. Patterning the vertebrate heart. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 7, p. 544-556, Jul 2002.

HEERY, D. M. et al. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 733-736, Jun 1997.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocr Rev**, v. 23, n. 2, p. 175-200, Apr 2002.

HOCHGREB, T. et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. **Development**, v. 130, n. 22, p. 5363-5374, Nov 2003.

HORLEIN, A. J. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 397-404, Oct 1995.

KASTNER, P. et al. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. **Development**, v. 124, n. 23, p. 4749-4758, Dec 1997.

KATO, S. et al. Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 5858-5867, Nov 1995.

KINGSTON, R. E.; NARLIKAR, G. J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. **Genes Dev**, v. 13, n. 18, p. 2339-2352, Sep 1999.

KOSTETSKII, I. et al. Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation. **Dev Biol**, v. 206, n. 2, p. 206-218, Feb 1999.

KRAICHELY, D. M.; NAKAI, Y. D.; MACDONALD, P. N. Identification of an autonomous transactivation domain in helix H3 of the vitamin D receptor. **J Cell Biochem**, v. 75, n. 1, p. 82-92, Oct 1999.

KRUSE, S. W. et al. Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. **PLoS Biol**, v. 6, n. 9, p. e227, Sep 2008.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. General organization of nuclear receptors. In:_____ (Ed.). **The Nuclear Receptors Facts Book**. San Diego: Academic Press, 2002. cap. 1, p.462. ISBN 0-12-437735-4.

LEID, M. et al. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. **Cell**, v. 68, n. 2, p. 377-395, Jan 1992.

MADER, S. et al. Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. **J Biol Chem**, v. 268, n. 1, p. 591-600, Jan 1993.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, Dec 1995.

MANNER, J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. **Anat Rec**, v. 259, n. 3, p. 248-262, Jul 2000.

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; CHAMBON, P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 46, p. 451-480, 2006.

MATOS, T. G. D. F. **Identificação de elementos regulatórios que controlam a expressão atrial-específica do transgene SMyHC3-HAP em camungongos**. 2002. 144 f. (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATSUMOTO, T. et al. The androgen receptor in health and disease. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 201-224, 2013.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 321-344, Jun 1999.

MIZZEN, C. A. et al. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1261-1270, Dec 1996.

MOSS, J. B. et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. **Dev Biol**, v. 199, n. 1, p. 55-71, Jul 1998.

MUCHARDT, C.; YANIV, M. A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. **EMBO J**, v. 12, n. 11, p. 4279-4290, Nov 1993.

NEELY, K. E. et al. Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. **Mol Cell**, v. 4, n. 4, p. 649-655, Oct 1999.

NIEDERREITHER, K. et al. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. **Mech Dev**, v. 62, n. 1, p. 67-78, Feb 1997.

NIEDERREITHER, K. et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. **Nat Genet**, v. 21, n. 4, p. 444-448, Apr 1999.

NIEDERREITHER, K. et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. **Development**, v. 128, n. 7, p. 1019-1031, Apr 2001.

NIKOVITS, W., JR. et al. Isolation and characterization of an avian slow myosin heavy chain gene expressed during embryonic skeletal muscle fiber formation. **J Biol Chem**, v. 271, n. 29, p. 17047-17056, Jul 1996.

OGRYZKO, V. V. et al. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. **Cell**, v. 94, n. 1, p. 35-44, Jul 1998.

OGRYZKO, V. V. et al. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. **Cell**, v. 87, n. 5, p. 953-959, Nov 1996.

PARK, J. I.; TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. **Keio J Med**, v. 52, n. 3, p. 174-181, Sep 2003.

PASCUAL, A.; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 7, p. 3908-3916, Jul 2013.

PAZIN, M. J.; KADONAGA, J. T. SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? **Cell**, v. 88, n. 6, p. 737-740, Mar 1997a.

PAZIN, M. J.; KADONAGA, J. T. What's up and down with histone deacetylation and transcription? **Cell**, v. 89, n. 3, p. 325-328, May 1997b.

PEREIRA, F. A. et al. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 53, n. 1-6, p. 503-508, Jun 1995.

PEREIRA, F. A. et al. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. **Genes Dev**, v. 13, n. 8, p. 1037-1049, Apr 1999.

PERLMANN, T. et al. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. **Genes Dev**, v. 7, n. 7B, p. 1411-1422, Jul 1993.

PINA, B.; BRUGGEMEIER, U.; BEATO, M. Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. **Cell**, v. 60, n. 5, p. 719-731, Mar 1990.

PLAGEMAN, T. F., JR.; YUTZEY, K. E. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 19026-19034, Apr 2004.

POLLARD, K. J.; PETERSON, C. L. Chromatin remodeling: a marriage between two families? **Bioessays**, v. 20, n. 9, p. 771-780, Sep 1998.

QIU, Y. et al. Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4451-4455, May 1994.

REICHARDT, H. M. et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. **Cell**, v. 93, n. 4, p. 531-541, May 1998.

REIK, A.; SCHUTZ, G.; STEWART, A. F. Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. **EMBO J**, v. 10, n. 9, p. 2569-2576, Sep 1991.

RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annu Rev Med**, v. 46, p. 443-453, 1995.

ROBINSON-RECHAVI, M.; ESCRIVA GARCIA, H.; LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 4, p. 585-586, Feb 2003.

ROSENTHAL, N.; XAVIER-NETO, J. From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 742-746, Dec 2000.

SABBADINI, M. G. et al. Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus patients without overt neuropsychiatric manifestations. **Lupus**, v. 8, n. 1, p. 11-19, 1999.

SAMPAIO, A. C. **Regulação molecular da expressão atrial-específica do gene SMyHC3**. 2010. 122 f. (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SHAO, D.; LAZAR, M. A. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. **J Clin Invest**, v. 103, n. 12, p. 1617-1618, Jun 1999.

SIMÕES-COSTA, M. S. et al. The evolutionary origin of cardiac chambers. **Dev Biol**, v. 277, n. 1, p. 1-15, Jan 2005.

SONG, C. H. et al. The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II negatively regulates the transactivation of androgen receptor in prostate cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49026, 2012.

STRUHL, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. **Genes Dev**, v. 12, n. 5, p. 599-606, Mar 1998.

STRUHL, K. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 1-4, Jul 1999.

TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. **Endocr Rev**, v. 18, n. 2, p. 229-240, Apr 1997.

TYLER, J. K.; KADONAGA, J. T. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. **Cell**, v. 99, n. 5, p. 443-446, Nov 1999.

UMESONO, K. et al. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. **Nature**, v. 336, n. 6196, p. 262-265, Nov 1988.

UMESONO, K. et al. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1255-1266, Jun 1991.

VILLEN, J.; BEAUSOLEIL, S. A.; GYGI, S. P. Evaluation of the utility of neutral-loss-dependent MS3 strategies in large-scale phosphorylation analysis. **Proteomics**, v. 8, n. 21, p. 4444-4452, Nov 2008.

WANG, G. F. et al. Irx4 forms an inhibitory complex with the vitamin D and retinoic X receptors to regulate cardiac chamber-specific slow MyHC3 expression. **J Biol Chem**, v. 276, n. 31, p. 28835-28841, Aug 2001.

WANG, G. F. et al. A positive GATA element and a negative vitamin D receptor-like element control atrial chamber-specific expression of a slow myosin heavy-chain gene during cardiac morphogenesis. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 10, p. 6023-6034, Oct 1998.

WANG, G. F. et al. Atrial chamber-specific expression of the slow myosin heavy chain 3 gene in the embryonic heart. **J Biol Chem**, v. 271, n. 33, p. 19836-19845, Aug 1996.

WILSON, J. G.; ROTH, C. B.; WARKANY, J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. **Am J Anat**, v. 92, n. 2, p. 189-217, Mar 1953.

WU, S. P. et al. Atrial identity is determined by a COUP-TFII regulatory network. **Dev Cell**, v. 25, n. 4, p. 417-426, May 2013.

XAVIER-NETO, J. et al. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. **Development**, v. 126, n. 12, p. 2677-2687, Jun 1999.

XAVIER-NETO, J. et al. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. **Genesis**, v. 31, n. 3, p. 97-104, Nov 2001.

XAVIER-NETO, J. et al. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. **Dev Biol**, v. 219, n. 1, p. 129-141, Mar 2000.

YAO, T. P. et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 361-372, May 1998.

YOSHINAGA, S. K. et al. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. **Science**, v. 258, n. 5088, p. 1598-1604, Dec 1992.

YUTZEY, K. E.; BADER, D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages during early heart development. **Circ Res**, v. 77, n. 2, p. 216-219, Aug 1995.

YUTZEY, K. E.; RHEE, J. T.; BADER, D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. **Development**, v. 120, n. 4, p. 871-883, Apr 1994.

ZHAO, D. et al. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. **Eur J Biochem**, v. 240, n. 1, p. 15-22, Aug 1996.

APÊNDICE

Tabela 1. Proteínas imunoprecipitadas com COUP-TFII-FLAG e identificadas por Espectrometria de Massas.

ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
A1L0T0	ILVBL	ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like	Cytoplasm	enzyme
A5A6H9	BCKDHA	branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide	Cytoplasm	enzyme
A5A6P1	PHGDH	phosphoglycerate dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme
A6NHL2	TUBAL3	tubulin, alpha-like 3	unknown	enzyme
O00148	DDX39A	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39A	Nucleus	enzyme
O00483	NDUFA4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4, 9kDa	Cytoplasm	enzyme
O08582	GTPBP1	GTP binding protein 1	Cytoplasm	enzyme
O14929	HAT1	histone acetyltransferase 1	Nucleus	enzyme
O15269	SPTLC1	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1	Cytoplasm	enzyme
O43143	DHX15	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	Nucleus	enzyme
O43169	CYB5B	cytochrome b5 type B (outer mitochondrial membrane)	Cytoplasm	enzyme
O60231	DHX16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	Nucleus	enzyme
O60313	OPA1	optic atrophy 1 (autosomal dominant)	Cytoplasm	enzyme
O60341	KDM1A	lysine (K)-specific demethylase 1A	Nucleus	enzyme
O60762	DPM1	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit	Cytoplasm	enzyme
O60832	DKC1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	Nucleus	enzyme
O75643	SNRNP200	small nuclear ribonucleoprotein 200kDa (U5)	Nucleus	enzyme
O75947	ATP5H	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d	unknown	enzyme
O95470	SGPL1	sphingosine-1-phosphate lyase 1	Cytoplasm	enzyme
O95573	ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3	Cytoplasm	enzyme

O95674	CDS2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	Cytoplasm	enzyme
O95831	AIFM1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1	Cytoplasm	enzyme
P00403	MT-CO2	cytochrome c oxidase subunit II	Cytoplasm	enzyme
P04181	OAT	ornithine aminotransferase	Cytoplasm	enzyme
P04843	RPN1	ribophorin I	Cytoplasm	enzyme
P04844	RPN2	ribophorin II	Cytoplasm	enzyme
P05455	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	Nucleus	enzyme
P06802	ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	Plasma Membrane	enzyme
P07919	UQCRH	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	Cytoplasm	enzyme
P08134	RHOC	ras homolog family member C	Plasma Membrane	enzyme
P08574	CYC1	cytochrome c-1	Cytoplasm	enzyme
P08754	GNAI3	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3	Cytoplasm	enzyme
P09543	CNP	2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase	Cytoplasm	enzyme
P09622	DLD	dihydrolipoamide dehydrogenase	Cytoplasm	enzyme
P09874	PARP1	poly (ADP-ribose) polymerase 1	Nucleus	enzyme
P09884	POLA1	polymerase (DNA directed), alpha 1, catalytic subunit	Nucleus	enzyme
P10599	TXN	thioredoxin	Cytoplasm	enzyme
P11177	PDHB	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	Cytoplasm	enzyme
P13010	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)	Nucleus	enzyme
P13995	MTHFD2	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	Cytoplasm	enzyme
P17812	CTPS1	CTP synthase 1	Nucleus	enzyme
P19387	POLR2C	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide C, 33kDa	Nucleus	enzyme
P19388	POLR2E	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E, 25kDa	Nucleus	enzyme
P21912	SDHB	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)	Cytoplasm	enzyme

P21953	BCKDHB	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	Cytoplasm	enzyme
P22695	UQCRC2	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	Cytoplasm	enzyme
P24752	ACAT1	acetyl-CoA acetyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme
P26599	PTBP1	polypyrimidine tract binding protein 1	Nucleus	enzyme
P27708	CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase	Cytoplasm	enzyme
P29372	MPG	N-methylpurine-DNA glycosylase	Nucleus	enzyme
P30837	ALDH1B1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1	Cytoplasm	enzyme
P31040	SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	Cytoplasm	enzyme
P31930	UQCRC1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	Cytoplasm	enzyme
P32119	PRDX2	peroxiredoxin 2	Cytoplasm	enzyme
P32322	PYCR1	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	Cytoplasm	enzyme
P33992	MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	Nucleus	enzyme
P33993	MCM7	minichromosome maintenance complex component 7	Nucleus	enzyme
P36578	RPL4	ribosomal protein L4	Cytoplasm	enzyme
P39656	DDOST	dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase	Cytoplasm	enzyme
P40938	RFC3	replication factor C (activator 1) 3, 38kDa	Nucleus	enzyme
P40939	HADHA	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	Cytoplasm	enzyme
P43246	MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)	Nucleus	enzyme
P46977	STT3A	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A (S. cerevisiae)	Plasma Membrane	enzyme
P50570	DNM2	dynamamin 2	Plasma Membrane	enzyme
P51648	ALDH3A2	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	Cytoplasm	enzyme

P52701	MSH6	mutS homolog 6 (E. coli)	Nucleus	enzyme
P54136	RARS	arginyl-tRNA synthetase	Cytoplasm	enzyme
P54803	GALC	galactosylceramidase	Cytoplasm	enzyme
P55072	VCP	valosin containing protein	Cytoplasm	enzyme
P55084	HADHB	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), beta subunit	Cytoplasm	enzyme
P56192	MARS	methionyl-tRNA synthetase	Cytoplasm	enzyme
P61964	WDR5	WD repeat domain 5	Nucleus	enzyme
P62826	RAN	RAN, member RAS oncogene family	Nucleus	enzyme
P62834	RAP1A	RAP1A, member of RAS oncogene family	Cytoplasm	enzyme
P62879	GNB2	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	Plasma Membrane	enzyme
P63096	GNAI1	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	Plasma Membrane	enzyme
P63104	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Cytoplasm	enzyme
P84095	RHOG	ras homolog family member G	Cytoplasm	enzyme
P97379	G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2	Nucleus	enzyme
Q06265	EXOSC9	exosome component 9	Nucleus	enzyme
Q06830	PRDX1	peroxiredoxin 1	Cytoplasm	enzyme
Q08211	DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9	Nucleus	enzyme
Q08J23	NSUN2	NOP2/Sun RNA methyltransferase family, member 2	Nucleus	enzyme
Q12797	ASPH	aspartate beta-hydroxylase	Cytoplasm	enzyme
Q13283	G3BP1	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1	Nucleus	enzyme
Q13405	MRPL49	mitochondrial ribosomal protein L49	Cytoplasm	enzyme
Q13724	MOGS	mannosyl-oligosaccharide glucosidase	Cytoplasm	enzyme
Q15029	EFTUD2	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	Nucleus	enzyme
Q15125	EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)	Cytoplasm	enzyme
Q16718	NDUFA5	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5, 13kDa	Cytoplasm	enzyme

Q2KJ93	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	Cytoplasm	enzyme
Q53GQ0	HSD17B12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	Cytoplasm	enzyme
Q5HYI8	RABL3	RAB, member of RAS oncogene family-like 3	unknown	enzyme
Q5T447	HECTD3	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 3	Cytoplasm	enzyme
Q62671	UBR5	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5	Nucleus	enzyme
Q66X93	SND1	staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	Nucleus	enzyme
Q6UB35	MTHFD1L	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1-like	Cytoplasm	enzyme
Q6ZV29	PNPLA7	patatin-like phospholipase domain containing 7	unknown	enzyme
Q7L2E3	DHX30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30	Nucleus	enzyme
Q86UL3	AGPAT6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid acyltransferase, zeta)	Cytoplasm	enzyme
Q86VU5	COMTD1	catechol-O-methyltransferase domain containing 1	Plasma Membrane	enzyme
Q86WJ1	CHD1L	chromodomain helicase DNA binding protein 1-like	Nucleus	enzyme
Q8IX18	DHX40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40	unknown	enzyme
Q8IYK8	REM2	RAS (RAD and GEM)-like GTP binding 2	Plasma Membrane	enzyme
Q8N2K0	ABHD12	abhydrolase domain containing 12	unknown	enzyme
Q8N6R0	METTL13	methyltransferase like 13	unknown	enzyme
Q8NBQ5	HSD17B11	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 11	Cytoplasm	enzyme
Q8NF37	LPCAT1	lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	Cytoplasm	enzyme
Q8TED1	GPX8	glutathione peroxidase 8 (putative)	unknown	enzyme
Q8WVX9	FAR1	fatty acyl CoA reductase 1	Cytoplasm	enzyme
Q92878	RAD50	RAD50 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme
Q96B26	EXOSC8	exosome component 8	Nucleus	enzyme
Q96BM9	ARL8A	ADP-ribosylation factor-like 8A	Cytoplasm	enzyme
Q96JJ7	TMX3	thioredoxin-related transmembrane protein 3	Cytoplasm	enzyme
Q99575	POP1	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme

Q99714	HSD17B10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10	Cytoplasm	enzyme
Q9BQB6	VKORC1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1	Cytoplasm	enzyme
Q9BT22	ALG1	asparagine-linked glycosylation 1, beta-1,4-mannosyltransferase homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Cytoplasm	enzyme
Q9BZE1	MRPL37	mitochondrial ribosomal protein L37	Cytoplasm	enzyme
Q9BZE4	GTPBP4	GTP binding protein 4	Nucleus	enzyme
Q9H0D6	XRN2	5'-3' exoribonuclease 2	Nucleus	enzyme
Q9H2U1	DHX36	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	Cytoplasm	enzyme
Q9H4L7	SMARCAD1	SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box 1	Nucleus	enzyme
Q9H845	ACAD9	acyl-CoA dehydrogenase family, member 9	Cytoplasm	enzyme
Q9H9J2	MRPL44	mitochondrial ribosomal protein L44	Cytoplasm	enzyme
Q9HCC0	MCCC2	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2 (beta)	Cytoplasm	enzyme
Q9NP92	MRPS30	mitochondrial ribosomal protein S30	Cytoplasm	enzyme
Q9NR30	DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21	Nucleus	enzyme
Q9NRP0	OSTC	oligosaccharyltransferase complex subunit	Cytoplasm	enzyme
Q9NTX5	ECHDC1	enoyl CoA hydratase domain containing 1	Cytoplasm	enzyme
Q9NUQ7	UFSP2	UFM1-specific peptidase 2	unknown	enzyme
Q9NVP1	DDX18	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 18	Nucleus	enzyme
Q9NX14	NDUFB11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11, 17.3kDa	Cytoplasm	enzyme
Q9NXS2	QPCTL	glutamyl-peptide cyclotransferase-like	Cytoplasm	enzyme
Q9NZ01	TECR	trans-2,3-enoyl-CoA reductase	Plasma Membrane	enzyme
Q9UBM7	DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	Cytoplasm	enzyme
Q9UJX2	CDC23	cell division cycle 23 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	enzyme
Q9UJX4	ANAPC5	anaphase promoting complex subunit 5	Nucleus	enzyme
Q9UJX5	ANAPC4	anaphase promoting complex subunit 4	Nucleus	enzyme

Q9UL25	RAB21	RAB21, member RAS oncogene family	Cytoplasm	enzyme
Q9UMS4	PRPF19	PRP19/PSO4 pre-mRNA processing factor 19 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	enzyme
Q9UNE7	STUB1	STIP1 homology and U-box containing protein 1, E3 ubiquitin protein ligase	Cytoplasm	enzyme
Q9Y305	ACOT9	acyl-CoA thioesterase 9	Cytoplasm	enzyme
Q9Y3B2	EXOSC1	exosome component 1	Nucleus	enzyme
Q9Y3E5	PTRH2	peptidyl-tRNA hydrolase 2	Cytoplasm	enzyme
Q9Y3I0	C22orf28	chromosome 22 open reading frame 28	Cytoplasm	enzyme
Q9Z1K5	ARIH1	ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)	Cytoplasm	enzyme
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
Q12904	AIMP1	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1	Extracellular Space	cytokine
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O15047	SETD1A	SET domain containing 1A	Nucleus	ion channel
P45880	VDAC2	voltage-dependent anion channel 2	Cytoplasm	ion channel
Q13586	STIM1	stromal interaction molecule 1	Plasma Membrane	ion channel
Q9NY12	GAR1	GAR1 ribonucleoprotein homolog (yeast)	Nucleus	ion channel
Q9Y277	VDAC3	voltage-dependent anion channel 3	Cytoplasm	ion channel
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O76094	SRP72	signal recognition particle 72kDa	Nucleus	kinase
P06493	CDK1	cyclin-dependent kinase 1	Nucleus	kinase
P10644	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha	Cytoplasm	kinase
P19139	CSNK2A1	casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	Cytoplasm	kinase
P19525	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	Cytoplasm	kinase
P22392	NME2	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2	Nucleus	kinase
P23458	JAK1	Janus kinase 1	Cytoplasm	kinase
P42356	PI4KA	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha	Cytoplasm	kinase
P52429	DGKE	diacylglycerol kinase, epsilon 64kDa	Cytoplasm	kinase

P67870	CSNK2B	casein kinase 2, beta polypeptide	Cytoplasm	kinase
P78527	PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	Nucleus	kinase
Q13232	NME3	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 3	Cytoplasm	kinase
Q53H12	AGK	acylglycerol kinase	Cytoplasm	kinase
Q8IZ69	TRMT2A	tRNA methyltransferase 2 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	unknown	kinase
Q8NI60	ADCK3	aarF domain containing kinase 3	Cytoplasm	kinase
Q96SB4	SRPK1	SRSF protein kinase 1	Nucleus	kinase
Q9BRS2	RIOK1	RIO kinase 1	unknown	kinase
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
P10589	NR2F1	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor
P24468	NR2F2	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	Nucleus	ligand-dependent nuclear receptor
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O14967	CLGN	calmegin	Cytoplasm	peptidase
P35998	PSMC2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 2	Nucleus	peptidase
P51784	USP11	ubiquitin specific peptidase 11	Nucleus	peptidase
P55786	NPEPPS	aminopeptidase puromycin sensitive	Cytoplasm	peptidase
P62191	PSMC1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 1	Nucleus	peptidase
P62333	PSMC6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 6	Nucleus	peptidase
Q14204	DYNC1H1	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1	Cytoplasm	peptidase
Q14694	USP10	ubiquitin specific peptidase 10	Cytoplasm	peptidase
Q70CQ3	USP30	ubiquitin specific peptidase 30	unknown	peptidase
Q8N163	KIAA1967	KIAA1967	Cytoplasm	peptidase
Q93008	USP9X	ubiquitin specific peptidase 9, X-linked	Plasma Membrane	peptidase
Q93009	USP7	ubiquitin specific peptidase 7 (herpes virus-associated)	Nucleus	peptidase
Q969V3	NCLN	nicalin	Cytoplasm	peptidase
Q96TA2	YME1L1	YME1-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	Cytoplasm	peptidase
Q9H4L4	SEN3	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3	Nucleus	peptidase

Q9UBC5	MYO1A	myosin IA	Cytoplasm	peptidase
Q9Y4W6	AFG3L2	AFG3 ATPase family member 3-like 2 (S. cerevisiae)	Cytoplasm	peptidase
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O00743	PPP6C	protein phosphatase 6, catalytic subunit	Nucleus	phosphatase
O15355	PPM1G	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1G	Nucleus	phosphatase
O75688	PPM1B	protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1B	Cytoplasm	phosphatase
P30153	PPP2R1A	protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha	Cytoplasm	phosphatase
P36873	PPP1CC	protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isozyme	Cytoplasm	phosphatase
P62714	PPP2CB	protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyme	Cytoplasm	phosphatase
Q01105	SET	SET nuclear oncogene	Nucleus	phosphatase
Q3ZCQ8	TIMM50	translocase of inner mitochondrial membrane 50 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	phosphatase
Q8WUK0	PTPMT1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	Cytoplasm	phosphatase
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O15226	NKRF	NFKB repressing factor	Nucleus	transcription regulator
O43719	HTATSF1	HIV-1 Tat specific factor 1	Nucleus	transcription regulator
O60264	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	Nucleus	transcription regulator
O95218	ZRANB2	zinc finger, RAN-binding domain containing 2	Nucleus	transcription regulator
P02340	TP53	tumor protein p53	Nucleus	transcription regulator
P06748	NPM1	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	Nucleus	transcription regulator
P18124	RPL7	ribosomal protein L7	Nucleus	transcription regulator
P20290	BTF3	basic transcription factor 3	Nucleus	transcription regulator
P35232	PHB	prohibitin	Nucleus	transcription regulator
P35251	RFC1	replication factor C (activator 1) 1, 145kDa	Nucleus	transcription regulator
P35637	FUS	fused in sarcoma	Nucleus	transcription regulator

P42669	PURA	purine-rich element binding protein A	Nucleus	transcription regulator
P62195	PSMC5	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 5	Nucleus	transcription regulator
P63208	SKP1/SKP1P2	S-phase kinase-associated protein 1	Nucleus	transcription regulator
Q01130	SRSF2	serine/arginine-rich splicing factor 2	Nucleus	transcription regulator
Q07666	KHDRBS1	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1	Nucleus	transcription regulator
Q12789	GTF3C1	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	Nucleus	transcription regulator
Q12906	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	Nucleus	transcription regulator
Q13148	TARDBP	TAR DNA binding protein	Nucleus	transcription regulator
Q13185	CBX3	chromobox homolog 3	Nucleus	transcription regulator
Q14498	RBM39	RNA binding motif protein 39	Nucleus	transcription regulator
Q15369	TCEB1	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 1 (15kDa, elongin C)	Nucleus	transcription regulator
Q15370	TCEB2	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2 (18kDa, elongin B)	Nucleus	transcription regulator
Q16576	RBBP7	retinoblastoma binding protein 7	Nucleus	transcription regulator
Q4V8F5	TADA3	transcriptional adaptor 3	Nucleus	transcription regulator
Q5BKZ1	ZNF326	zinc finger protein 326	Nucleus	transcription regulator
Q5VWG9	TAF3	TAF3 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 140kDa	Nucleus	transcription regulator
Q6ZNB6	NFXL1	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1	Nucleus	transcription regulator
Q7RTV0	PHF5A	PHD finger protein 5A	Nucleus	transcription regulator
Q86UE4	MTDH	metadherin	Cytoplasm	transcription regulator
Q8NB46	ANKRD52	ankyrin repeat domain 52	Nucleus	transcription regulator
Q8WVM0	TFB1M	transcription factor B1, mitochondrial	Cytoplasm	transcription regulator
Q91X20	ASH2L	ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	Nucleus	transcription regulator

Q92769	HDAC2	histone deacetylase 2	Nucleus	transcription regulator
Q96P47	AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3	Nucleus	transcription regulator
Q99623	PHB2	prohibitin 2	Cytoplasm	transcription regulator
Q9BQG0	MYBBP1A	MYB binding protein (P160) 1a	Nucleus	transcription regulator
Q9HCU5	PREB	prolactin regulatory element binding	Nucleus	transcription regulator
Q9UKN8	GTF3C4	general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa	Nucleus	transcription regulator
Q9Y230	RUVBL2	RuvB-like 2 (E. coli)	Nucleus	transcription regulator
Q9Y2X9	ZNF281	zinc finger protein 281	Nucleus	transcription regulator
Q9Y4A5	TRRAP	transformation/transcription domain-associated protein	Nucleus	transcription regulator
Q9Y4B4	RAD54L2	RAD54-like 2 (S. cerevisiae)	Nucleus	transcription regulator
Q9Y5Q8	GTF3C5	general transcription factor IIIC, polypeptide 5, 63kDa	Nucleus	transcription regulator
Q9Y5Q9	GTF3C3	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa	Nucleus	transcription regulator
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O60841	EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B	Cytoplasm	translation regulator
O88477	IGF2BP1	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1	Cytoplasm	translation regulator
P08865	RPSA	ribosomal protein SA	Cytoplasm	translation regulator
P20042	EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 beta, 38kDa	Cytoplasm	translation regulator
P29692	EEF1D	eukaryotic translation elongation factor 1 delta (guanine nucleotide exchange protein)	Cytoplasm	translation regulator
P41091	EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa	Cytoplasm	translation regulator
P46781	RPS9	ribosomal protein S9	Cytoplasm	translation regulator
P49411	TUFM	Tu translation elongation factor, mitochondrial	Cytoplasm	translation regulator
P62263	RPS14	ribosomal protein S14	Cytoplasm	translation regulator
P62266	RPS23	ribosomal protein S23	Cytoplasm	translation regulator

Q13144	EIF2B5	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon, 82kDa	Cytoplasm	translation regulator
Q14011	CIRBP	cold inducible RNA binding protein	Nucleus	translation regulator
Q8N983	MRPL43	mitochondrial ribosomal protein L43	Cytoplasm	translation regulator
Q92616	GCN1L1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)	Cytoplasm	translation regulator
Q9BY44	EIF2A	eukaryotic translation initiation factor 2A, 65kDa	Cytoplasm	translation regulator
Q9BYD2	MRPL9	mitochondrial ribosomal protein L9	Cytoplasm	translation regulator
Q9UI10	EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta, 67kDa	Cytoplasm	translation regulator
Q9Y450	HBS1L	HBS1-like (S. cerevisiae)	Cytoplasm	translation regulator
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O00203	AP3B1	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit	Cytoplasm	transporter
O00410	IPO5	importin 5	Nucleus	transporter
O00505	KPNA3	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)	Nucleus	transporter
O14579	COPE	coatamer protein complex, subunit epsilon	Cytoplasm	transporter
O14828	SCAMP3	secretory carrier membrane protein 3	Cytoplasm	transporter
O14925	TIMM23	translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)	Cytoplasm	transporter
O14980	XPO1	exportin 1 (CRM1 homolog, yeast)	Nucleus	transporter
O15397	IPO8	importin 8	Nucleus	transporter
O60684	KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	Nucleus	transporter
O75694	NUP155	nucleoporin 155kDa	Nucleus	transporter
O95347	SMC2	structural maintenance of chromosomes 2	Nucleus	transporter
O95373	IPO7	importin 7	Nucleus	transporter
O95793	STAU1	staufen, RNA binding protein, homolog 1 (Drosophila)	Cytoplasm	transporter
P05023	ATP1A1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide	Plasma Membrane	transporter
P08195	SLC3A2	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	Plasma Membrane	transporter

P12236	SLC25A6	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	Cytoplasm	transporter
P16615	ATP2A2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Cytoplasm	transporter
P22292	SLC25A11	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	Cytoplasm	transporter
P25705	ATP5A1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	Cytoplasm	transporter
P28288	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	Cytoplasm	transporter
P35579	MYH9	myosin, heavy chain 9, non-muscle	Cytoplasm	transporter
P35613	BSG	basigin (Ok blood group)	Plasma Membrane	transporter
P36542	ATP5C1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	Cytoplasm	transporter
P46459	NSF	N-ethylmaleimide-sensitive factor	Cytoplasm	transporter
P48047	ATP5O	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	Cytoplasm	transporter
P52292	KPNA2	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	Nucleus	transporter
P52294	KPNA1	karyopherin alpha 1 (importin alpha 5)	Nucleus	transporter
P53007	SLC25A1	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1	Plasma Membrane	transporter
P53621	COPA	coatamer protein complex, subunit alpha	Cytoplasm	transporter
P53985	SLC16A1	solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	Plasma Membrane	transporter
P54709	ATP1B3	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3 polypeptide	Plasma Membrane	transporter
P55735	SEC13	SEC13 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Cytoplasm	transporter
P56134	ATP5J2	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit F2	Cytoplasm	transporter
P60468	SEC61B	Sec61 beta subunit	Cytoplasm	transporter
P61221	ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	Cytoplasm	transporter

P63010	AP2B1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	Cytoplasm	transporter
Q00325	SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3	Cytoplasm	transporter
Q00839	HNRNPU	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	Nucleus	transporter
Q01650	SLC7A5	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5	Plasma Membrane	transporter
Q13428	TCOF1	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	Nucleus	transporter
Q13445	TMED1	transmembrane emp24 protein transport domain containing 1	Extracellular Space	transporter
Q14683	SMC1A	structural maintenance of chromosomes 1A	Nucleus	transporter
Q14974	KPNB1	karyopherin (importin) beta 1	Nucleus	transporter
Q15758	SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	Plasma Membrane	transporter
Q64542	ATP2B4	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 4	Plasma Membrane	transporter
Q6P1M0	SLC27A4	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	Plasma Membrane	transporter
Q6P4A7	SFXN4	sideroflexin 4	Cytoplasm	transporter
Q8TEM1	NUP210	nucleoporin 210kDa	Nucleus	transporter
Q8TEX9	IPO4	importin 4	Nucleus	transporter
Q92973	TNPO1	transportin 1	Nucleus	transporter
Q96A65	EXOC4	exocyst complex component 4	Cytoplasm	transporter
Q96CW1	AP2M1	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit	Cytoplasm	transporter
Q96KP1	EXOC2	exocyst complex component 2	Cytoplasm	transporter
Q96NB2	SFXN2	sideroflexin 2	Cytoplasm	transporter
Q99442	SEC62	SEC62 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	transporter
Q99523	SORT1	sortilin 1	Cytoplasm	transporter
Q99653	CHP1	calcineurin-like EF hand protein 1	Cytoplasm	transporter
Q9BQT8	SLC25A21	solute carrier family 25 (mitochondrial oxoadipate carrier), member 21	Cytoplasm	transporter
Q9H936	SLC25A22	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier: glutamate), member 22	Cytoplasm	transporter
Q9HAV4	XPO5	exportin 5	Nucleus	transporter
Q9HC21	SLC25A19	solute carrier family 25 (mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier), member 19	Cytoplasm	transporter

Q9NS69	TOMM22	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	Cytoplasm	transporter
Q9NTJ3	SMC4	structural maintenance of chromosomes 4	Nucleus	transporter
Q9UBF2	COPG2	coatamer protein complex, subunit gamma 2	Cytoplasm	transporter
Q9UBX3	SLC25A10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10	Cytoplasm	transporter
Q9UG63	ABCF2	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 2	Cytoplasm	transporter
Q9UGP8	SEC63	SEC63 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	transporter
Q9UJS0	SLC25A13	solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 13	Cytoplasm	transporter
Q9Y5L4	TIMM13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	Cytoplasm	transporter
Q9Y678	COPG1	coatamer protein complex, subunit gamma 1	Cytoplasm	transporter
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
O00264	PGRMC1	progesterone receptor membrane component 1	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P01889	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	Plasma Membrane	transmembrane receptor
P10319	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	Plasma Membrane	transmembrane receptor
ID	Símbolo	Entrez Gene	Localização	Tipo
A0AVF1	TTC26	tetratricopeptide repeat domain 26	Extracellular Space	other
A0FGR8	ESYT2	extended synaptotagmin-like protein 2	unknown	other
A4D1E9	GTPBP10	GTP-binding protein 10 (putative)	Cytoplasm	other
A5A6M4	EIF3L	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L	Cytoplasm	other
A5YKK6	CNOT1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	Cytoplasm	other
O00139	KIF2A	kinesin heavy chain member 2A	Cytoplasm	other
O00193	C11orf58	chromosome 11 open reading frame 58	unknown	other
O14524	TMEM194A	transmembrane protein 194A	unknown	other
O14654	IRS4	insulin receptor substrate 4	Cytoplasm	other
O14893	GEMIN2	gem (nuclear organelle) associated protein 2	Nucleus	other

O15084	ANKRD28	ankyrin repeat domain 28	Cytoplasm	other
O15116	LSM1	LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
O15173	PGRMC2	progesterone receptor membrane component 2	Nucleus	other
O15258	RER1	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Cytoplasm	other
O15260	SURF4	surfeit 4	Cytoplasm	other
O15446	CD3EAP	CD3e molecule, epsilon associated protein	Nucleus	other
O35130	EMG1	EMG1 nucleolar protein homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
O43242	PSMD3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 3	Cytoplasm	other
O43390	HNRNPR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	Nucleus	other
O43809	NUDT21	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21	Nucleus	other
O43913	ORC5	origin recognition complex, subunit 5	Nucleus	other
O60506	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	Nucleus	other
O60783	MRPS14	mitochondrial ribosomal protein S14	Cytoplasm	other
O75179	ANKRD17	ankyrin repeat domain 17	Nucleus	other
O75419	CDC45	cell division cycle 45 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
O75533	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	Nucleus	other
O75607	NPM3	nucleophosmin/nucleoplasmin 3	Nucleus	other
O75677	RFPL1/RFPL3	ret finger protein-like 3	unknown	other
O75934	BCAS2	breast carcinoma amplified sequence 2	Nucleus	other
O75940	SMNDC1	survival motor neuron domain containing 1	Nucleus	other
O88487	DYNC1I2	dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 2	Cytoplasm	other
O94874	UFL1	UFM1-specific ligase 1	Cytoplasm	other
O94905	ERLIN2	ER lipid raft associated 2	Plasma Membrane	other
O95104	SCAF4	SR-related CTD-associated factor 4	Nucleus	other
O95232	LUC7L3	LUC7-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
O95400	CD2BP2	CD2 (cytoplasmic tail) binding protein 2	Cytoplasm	other

O95757	HSPA4L	heat shock 70kDa protein 4-like	Cytoplasm	other
P05386	RPLP1	ribosomal protein, large, P1	Cytoplasm	other
P08240	SRPR	signal recognition particle receptor (docking protein)	Cytoplasm	other
P08579	SNRPB2	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B	Nucleus	other
P08621	SNRNP70	small nuclear ribonucleoprotein 70kDa (U1)	Nucleus	other
P09001	MRPL3	mitochondrial ribosomal protein L3	Cytoplasm	other
P09012	SNRPA	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	Nucleus	other
P09132	SRP19	signal recognition particle 19kDa	Cytoplasm	other
P09234	SNRPC	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	Nucleus	other
P09661	SNRPA1	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	Nucleus	other
P0CW22	RPS17/RPS17L	ribosomal protein S17	Cytoplasm	other
P13489	RNH1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	Cytoplasm	other
P14115	RPL27A	ribosomal protein L27a	Nucleus	other
P15880	RPS2	ribosomal protein S2	Cytoplasm	other
P17987	TCP1	t-complex 1	Cytoplasm	other
P18077	RPL35A	ribosomal protein L35a	Cytoplasm	other
P18621	RPL17	ribosomal protein L17	Cytoplasm	other
P22087	FBL	fibrillarin	Nucleus	other
P23258	TUBG1	tubulin, gamma 1	Cytoplasm	other
P25398	RPS12	ribosomal protein S12	Cytoplasm	other
P26368	U2AF2	U2 small nuclear RNA auxiliary factor 2	Nucleus	other
P26373	RPL13	ribosomal protein L13	Cytoplasm	other
P27348	YWHAQ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	Cytoplasm	other
P27546	MAP4	microtubule-associated protein 4	Cytoplasm	other
P30260	CDC27	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
P31689	DNAJA1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	Nucleus	other
P31942	HNRNPH3	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (2H9)	Nucleus	other
P32969	RPL9	ribosomal protein L9	Cytoplasm	other
P34932	HSPA4	heat shock 70kDa protein 4	Cytoplasm	other
P35249	RFC4	replication factor C (activator 1) 4, 37kDa	Nucleus	other

P37108	SRP14	signal recognition particle 14kDa (homologous Alu RNA binding protein)	Cytoplasm	other
P39019	RPS19	ribosomal protein S19	Cytoplasm	other
P39023	RPL3	ribosomal protein L3	Cytoplasm	other
P39687	ANP32A	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	Nucleus	other
P42285	SKIV2L2	superkiller viralicidic activity 2-like 2 (S. cerevisiae)	Nucleus	other
P42677	RPS27	ribosomal protein S27	Cytoplasm	other
P42695	NCAPD3	non-SMC condensin II complex, subunit D3	Nucleus	other
P42704	LRPPRC	leucine-rich pentatricopeptide repeat containing	Cytoplasm	other
P42766	RPL35	ribosomal protein L35	Cytoplasm	other
P43243	MATR3	matrin 3	Nucleus	other
P43307	SSR1	signal sequence receptor, alpha	Cytoplasm	other
P46060	RANGAP1	Ran GTPase activating protein 1	Nucleus	other
P46777	RPL5	ribosomal protein L5	Cytoplasm	other
P46778	RPL21	ribosomal protein L21	Cytoplasm	other
P46779	RPL28	ribosomal protein L28	Cytoplasm	other
P46782	RPS5	ribosomal protein S5	Cytoplasm	other
P46783	RPS10	ribosomal protein S10	Cytoplasm	other
P46940	IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1	Cytoplasm	other
P47914	RPL29	ribosomal protein L29	Cytoplasm	other
P48444	ARCN1	archain 1	Cytoplasm	other
P49207	RPL34	ribosomal protein L34	Cytoplasm	other
P49368	CCT3	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	Cytoplasm	other
P49458	SRP9	signal recognition particle 9kDa	Cytoplasm	other
P50914	RPL14	ribosomal protein L14	Cytoplasm	other
P51398	DAP3	death associated protein 3	Cytoplasm	other
P51571	SSR4	signal sequence receptor, delta	Cytoplasm	other
P52272	HNRNPM	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Nucleus	other
P52597	HNRNPF	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Nucleus	other
P52732	KIF11	kinesin family member 11	Nucleus	other
P52815	MRPL12	mitochondrial ribosomal protein L12	Cytoplasm	other
P55209	NAP1L1	nucleosome assembly protein 1-like 1	Nucleus	other
P55795	HNRNPH2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H')	Nucleus	other
P57088	TMEM33	transmembrane protein 33	Cytoplasm	other
P61247	RPS3A	ribosomal protein S3A	Cytoplasm	other

P61254	RPL26	ribosomal protein L26	Cytoplasm	other
P61313	RPL15	ribosomal protein L15	Cytoplasm	other
P61353	RPL27	ribosomal protein L27	Cytoplasm	other
P61513	RPL37A	ribosomal protein L37a	Cytoplasm	other
P62081	RPS7	ribosomal protein S7	Cytoplasm	other
P62244	RPS15A	ribosomal protein S15a	Cytoplasm	other
P62249	RPS16	ribosomal protein S16	Cytoplasm	other
P62269	RPS18	ribosomal protein S18	Cytoplasm	other
P62280	RPS11	ribosomal protein S11	Cytoplasm	other
P62314	SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa	Nucleus	other
P62318	SNRPD3	small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa	Nucleus	other
P62699	YPEL5	yippee-like 5 (Drosophila)	unknown	other
P62701	RPS4X	ribosomal protein S4, X-linked	Cytoplasm	other
P62750	RPL23A	ribosomal protein L23a	Cytoplasm	other
P62753	RPS6	ribosomal protein S6	Cytoplasm	other
P62829	RPL23	ribosomal protein L23	Cytoplasm	other
P62847	RPS24	ribosomal protein S24	Cytoplasm	other
P62851	RPS25	ribosomal protein S25	Cytoplasm	other
P62857	RPS28	ribosomal protein S28	Cytoplasm	other
P62888	RPL30	ribosomal protein L30	Cytoplasm	other
P62899	RPL31	ribosomal protein L31	unknown	other
P62906	RPL10A	ribosomal protein L10a	Nucleus	other
P62910	RPL32	ribosomal protein L32	Cytoplasm	other
P62913	RPL11	ribosomal protein L11	Cytoplasm	other
P62917	RPL8	ribosomal protein L8	Cytoplasm	other
P62979	RPS27A	ribosomal protein S27a	Cytoplasm	other
P70295	AUP1	ancient ubiquitous protein 1	Cytoplasm	other
P78316	NOP14	NOP14 nucleolar protein	Nucleus	other
P82650	MRPS22	mitochondrial ribosomal protein S22	Cytoplasm	other
P82663	MRPS25	mitochondrial ribosomal protein S25	Cytoplasm	other
P82664	MRPS10	mitochondrial ribosomal protein S10	Cytoplasm	other
P82673	MRPS35	mitochondrial ribosomal protein S35	Cytoplasm	other
P82675	MRPS5	mitochondrial ribosomal protein S5	Cytoplasm	other
P82912	MRPS11	mitochondrial ribosomal protein S11	Cytoplasm	other
P82930	MRPS34	mitochondrial ribosomal protein S34	Cytoplasm	other
P82933	MRPS9	mitochondrial ribosomal protein S9	Cytoplasm	other
P83731	RPL24	ribosomal protein L24	Cytoplasm	other
P83881	RPL36A/RPL36A-	ribosomal protein L36a	Cytoplasm	other

	HNRNPH2			
P84098	RPL19	ribosomal protein L19	Cytoplasm	other
P84103	SRSF3	serine/arginine-rich splicing factor 3	Nucleus	other
Q01844	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	Nucleus	other
Q02543	RPL18A	ribosomal protein L18a	Cytoplasm	other
Q02878	RPL6	ribosomal protein L6	Cytoplasm	other
Q04837	SSBP1	single-stranded DNA binding protein 1, mitochondrial	Cytoplasm	other
Q07020	RPL18	ribosomal protein L18	Cytoplasm	other
Q07065	CKAP4	cytoskeleton-associated protein 4	Cytoplasm	other
Q09161	NCBP1	nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa	Nucleus	other
Q10570	CPSF1	cleavage and polyadenylation specific factor 1, 160kDa	Nucleus	other
Q12874	SF3A3	splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa	Nucleus	other
Q12899	TRIM26	tripartite motif containing 26	Cytoplasm	other
Q13042	CDC16	cell division cycle 16 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
Q13084	MRPL28	mitochondrial ribosomal protein L28	Cytoplasm	other
Q13200	PSMD2	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 2	Cytoplasm	other
Q13435	SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa	Nucleus	other
Q13576	IQGAP2	IQ motif containing GTPase activating protein 2	Cytoplasm	other
Q13601	KRR1	KRR1, small subunit (SSU) processome component, homolog (yeast)	Nucleus	other
Q13895	BYSL	bystin-like	Cytoplasm	other
Q14257	RCN2	reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain	Cytoplasm	other
Q14318	FKBP8	FK506 binding protein 8, 38kDa	Cytoplasm	other
Q14684	RRP1B	ribosomal RNA processing 1 homolog B (S. cerevisiae)	Nucleus	other
Q15427	SF3B4	splicing factor 3b, subunit 4, 49kDa	Nucleus	other
Q15428	SF3A2	splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa	Nucleus	other
Q15554	TERF2	telomeric repeat binding factor 2	Nucleus	other
Q16531	DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa	Nucleus	other
Q16540	MRPL23	mitochondrial ribosomal protein L23	Cytoplasm	other

Q16891	IMMT	inner membrane protein, mitochondrial	Cytoplasm	other
Q1KMD3	HNRNPUL2	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2	Nucleus	other
Q29RF7	PDS5A	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog A (S. cerevisiae)	Nucleus	other
Q2YDI5	MRPL48	mitochondrial ribosomal protein L48	Cytoplasm	other
Q5H9R7	PPP6R3	protein phosphatase 6, regulatory subunit 3	Cytoplasm	other
Q5JTH9	RRP12	ribosomal RNA processing 12 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
Q5RKV6	EXOSC6	exosome component 6	Nucleus	other
Q5SRE5	NUP188	nucleoporin 188kDa	Nucleus	other
Q5SY16	NOL9	nucleolar protein 9	Nucleus	other
Q5UIP0	RIF1	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	Nucleus	other
Q5VV42	CDKAL1	CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	unknown	other
Q62095	Ddx3y	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	Cytoplasm	other
Q6IAN0	DHRS7B	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B	unknown	other
Q6NVV1	RPL13AP3	ribosomal protein L13a pseudogene 3	unknown	other
Q6P2Q9	PRPF8	PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (S. cerevisiae)	Nucleus	other
Q6UXN9	WDR82	WD repeat domain 82	Nucleus	other
Q70UQ0	IKBIP	IKBKB interacting protein	Cytoplasm	other
Q7L0Y3	TRMT10C	tRNA methyltransferase 10 homolog C (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other
Q7Z2W4	ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	Plasma Membrane	other
Q7Z2W9	MRPL21	mitochondrial ribosomal protein L21	Cytoplasm	other
Q7Z5K2	WAPAL	wings apart-like homolog (Drosophila)	Nucleus	other
Q80TR8	VPRBP	Vpr (HIV-1) binding protein	Nucleus	other
Q8IUX1	TMEM126B	transmembrane protein 126B	unknown	other
Q8IWA0	WDR75	WD repeat domain 75	Nucleus	other
Q8IWS0	PHF6	PHD finger protein 6	Nucleus	other
Q8IXM3	MRPL41	mitochondrial ribosomal protein L41	Cytoplasm	other
Q8IYU8	EFHA1	EF-hand domain family, member A1	Cytoplasm	other
Q8IZL8	PELP1	proline, glutamate and leucine rich protein 1	Nucleus	other

Q8K3W0	BRE	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)	Cytoplasm	other
Q8N0U8	VKORC1L1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1-like 1	unknown	other
Q8N1F7	NUP93	nucleoporin 93kDa	Nucleus	other
Q8N1G4	LRRC47	leucine rich repeat containing 47	unknown	other
Q8N2C3	DEPDC4	DEP domain containing 4	unknown	other
Q8N4Q1	CHCHD4	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 4	Cytoplasm	other
Q8N5K1	CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2	Cytoplasm	other
Q8N5N7	MRPL50	mitochondrial ribosomal protein L50	Cytoplasm	other
Q8NC60	NOA1	nitric oxide associated 1	Cytoplasm	other
Q8NFK8	TOR1AIP2	torsin A interacting protein 2	Cytoplasm	other
Q8NI27	THOC2	THO complex 2	Nucleus	other
Q8TAE8	GADD45GIP1	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1	Nucleus	other
Q8WVV9	HNRPLL	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	unknown	other
Q8WWC4	C2orf47	chromosome 2 open reading frame 47	unknown	other
Q922K7	NOP2	NOP2 nucleolar protein	Nucleus	other
Q92552	MRPS27	mitochondrial ribosomal protein S27	Cytoplasm	other
Q92598	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Cytoplasm	other
Q92665	MRPS31	mitochondrial ribosomal protein S31	Cytoplasm	other
Q92688	ANP32B	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B	Nucleus	other
Q92974	ARHGEF2	Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	Cytoplasm	other
Q969X6	CIRH1A	cirrhosis, autosomal recessive 1A (cirhin)	Nucleus	other
Q96A33	CCDC47	coiled-coil domain containing 47	Extracellular Space	other
Q96A35	MRPL24	mitochondrial ribosomal protein L24	Cytoplasm	other
Q96AG4	LRRC59	leucine rich repeat containing 59	Cytoplasm	other
Q96DH6	MSI2	musashi RNA-binding protein 2	Cytoplasm	other
Q96DI7	SNRNP40	small nuclear ribonucleoprotein 40kDa (U5)	Nucleus	other
Q96E39	RBMXL1	RNA binding motif protein, X-linked-like 1	Nucleus	other

Q96EL3	MRPL53	mitochondrial ribosomal protein L53	Cytoplasm	other
Q96EY1	DNAJA3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3	Cytoplasm	other
Q96EY7	PTCD3	pentatricopeptide repeat domain 3	Cytoplasm	other
Q96HR8	NAF1	nuclear assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae)	Cytoplasm	other
Q96KR1	ZFR	zinc finger RNA binding protein	Nucleus	other
Q96S59	RANBP9	RAN binding protein 9	Nucleus	other
Q99459	CDC5L	CDC5 cell division cycle 5-like (S. pombe)	Nucleus	other
Q99460	PSMD1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1	Cytoplasm	other
Q99547	MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	Nucleus	other
Q99615	DNAJC7	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7	Cytoplasm	other
Q99733	NAP1L4	nucleosome assembly protein 1-like 4	unknown	other
Q9BQ61	C19orf43	chromosome 19 open reading frame 43	Nucleus	other
Q9BQ67	GRWD1	glutamate-rich WD repeat containing 1	Nucleus	other
Q9BQC6	MRP63	mitochondrial ribosomal protein 63	Cytoplasm	other
Q9BRJ2	MRPL45	mitochondrial ribosomal protein L45	Cytoplasm	other
Q9BRJ7	NUDT16L1	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16-like 1	Cytoplasm	other
Q9BRP8	WIBG	within bgcn homolog (Drosophila)	Nucleus	other
Q9BRX2	PELO	pelota homolog (Drosophila)	Nucleus	other
Q9BSD7	NTPCR	nucleoside-triphosphatase, cancer-related	unknown	other
Q9BTT0	ANP32E	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	Nucleus	other
Q9BTT6	LRRC1	leucine rich repeat containing 1	Cytoplasm	other
Q9BUJ2	HNRNPUL1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	Nucleus	other
Q9BV38	WDR18	WD repeat domain 18	Nucleus	other
Q9BV44	THUMPD3	THUMP domain containing 3	unknown	other
Q9BVP2	GNL3	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)	Nucleus	other
Q9BWF3	RBM4	RNA binding motif protein 4	Nucleus	other
Q9BYD1	MRPL13	mitochondrial ribosomal protein L13	Cytoplasm	other

Q9BYD3	MRPL4	mitochondrial ribosomal protein L4	Cytoplasm	other
Q9BYD6	MRPL1	mitochondrial ribosomal protein L1	Cytoplasm	other
Q9BYN8	MRPS26	mitochondrial ribosomal protein S26	Cytoplasm	other
Q9BZF1	OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8	Cytoplasm	other
Q9GZT3	SLIRP	SRA stem-loop interacting RNA binding protein	Cytoplasm	other
Q9H1A4	ANAPC1/ANAPC1P 1	anaphase promoting complex subunit 1	Nucleus	other
Q9H2W6	MRPL46	mitochondrial ribosomal protein L46	Cytoplasm	other
Q9H583	HEATR1	HEAT repeat containing 1	Nucleus	other
Q9H6S0	YTHDC2	YTH domain containing 2	unknown	other
Q9H857	NT5DC2	5'-nucleotidase domain containing 2	unknown	other
Q9HD33	MRPL47	mitochondrial ribosomal protein L47	Cytoplasm	other
Q9JLI8	SART3	squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3	Nucleus	other
Q9NNW5	WDR6	WD repeat domain 6	Cytoplasm	other
Q9NQ50	MRPL40	mitochondrial ribosomal protein L40	Cytoplasm	other
Q9NTI5	PDS5B	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
Q9NTK5	OLA1	Obg-like ATPase 1	Cytoplasm	other
Q9NU22	MDN1	MDN1, midasin homolog (yeast)	Nucleus	other
Q9NV56	MRGBP	MRG/MORF4L binding protein	Nucleus	other
Q9NVH0	EXD2	exonuclease 3'-5' domain containing 2	unknown	other
Q9NVI1	FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	Nucleus	other
Q9NVI7	ATAD3A/ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3A	Nucleus	other
Q9NVS2	MRPS18A	mitochondrial ribosomal protein S18A	Cytoplasm	other
Q9NWU5	MRPL22	mitochondrial ribosomal protein L22	Cytoplasm	other
Q9NWW 5	CLN6	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6, late infantile, variant	Cytoplasm	other
Q9NX58	LYAR	Ly1 antibody reactive	Plasma Membrane	other
Q9NX63	CHCHD3	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	Cytoplasm	other
Q9NXF1	TEX10	testis expressed 10	Nucleus	other
Q9NXG2	THUMPD1	THUMP domain containing 1	unknown	other

Q9P015	MRPL15	mitochondrial ribosomal protein L15	Cytoplasm	other
Q9P035	PTPLAD1	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	Cytoplasm	other
Q9P0L0	VAPA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A, 33kDa	Plasma Membrane	other
Q9P0M9	MRPL27	mitochondrial ribosomal protein L27	Cytoplasm	other
Q9P258	RCC2	regulator of chromosome condensation 2	Nucleus	other
Q9P2M1	LRP2BP	LRP2 binding protein	Cytoplasm	other
Q9QZS0	COL4A3	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	Extracellular Space	other
Q9UBD5	ORC3	origin recognition complex, subunit 3	Nucleus	other
Q9UBW7	ZMYM2	zinc finger, MYM-type 2	Nucleus	other
Q9UFG5	C19orf25	chromosome 19 open reading frame 25	unknown	other
Q9UHB9	SRP68	signal recognition particle 68kDa	Nucleus	other
Q9UHX1	PUF60	poly-U binding splicing factor 60KDa	Nucleus	other
Q9UJF2	RASAL2	RAS protein activator like 2	Extracellular Space	other
Q9UJX3	ANAPC7	anaphase promoting complex subunit 7	Nucleus	other
Q9UJZ1	STOML2	stomatin (EPB72)-like 2	Plasma Membrane	other
Q9UL15	BAG5	BCL2-associated athanogene 5	Cytoplasm	other
Q9ULX6	AKAP8L	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like	Nucleus	other
Q9UNF1	MAGED2	melanoma antigen family D, 2	Plasma Membrane	other
Q9UNL2	SSR3	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)	Cytoplasm	other
Q9UPN7	PPP6R1	protein phosphatase 6, regulatory subunit 1	Cytoplasm	other
Q9UPT8	ZC3H4	zinc finger CCCH-type containing 4	unknown	other
Q9UQ35	SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2	Nucleus	other
Q9UQE7	SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	Nucleus	other
Q9WUK4	RFC2	replication factor C (activator 1) 2, 40kDa	Nucleus	other
Q9Y291	MRPS33	mitochondrial ribosomal protein S33	Cytoplasm	other

Q9Y2Q9	MRPS28	mitochondrial ribosomal protein S28	Cytoplasm	other
Q9Y2R5	MRPS17	mitochondrial ribosomal protein S17	Cytoplasm	other
Q9Y2R9	MRPS7	mitochondrial ribosomal protein S7	Cytoplasm	other
Q9Y2W6	TDRKH	tudor and KH domain containing	Cytoplasm	other
Q9Y314	NOSIP	nitric oxide synthase interacting protein	Cytoplasm	other
Q9Y383	LUC7L2	LUC7-like 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	unknown	other
Q9Y3B4	SF3B14	splicing factor 3B, 14 kDa subunit	Nucleus	other
Q9Y3B7	MRPL11	mitochondrial ribosomal protein L11	Cytoplasm	other
Q9Y3D0	FAM96B	family with sequence similarity 96, member B	Cytoplasm	other
Q9Y3D3	MRPS16	mitochondrial ribosomal protein S16	Cytoplasm	other
Q9Y3D7	PAM16	presequence translocase-associated motor 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	Cytoplasm	other
Q9Y3D9	MRPS23	mitochondrial ribosomal protein S23	Cytoplasm	other
Q9Y4P3	TBL2	transducin (beta)-like 2	Plasma Membrane	other
Q9Y4W2	LAS1L	LAS1-like (<i>S. cerevisiae</i>)	Nucleus	other
Q9Y5A9	YTHDF2	YTH domain family, member 2	unknown	other
Q9Y5M8	SRPRB	signal recognition particle receptor, B subunit	Cytoplasm	other
Q9Y676	MRPS18B	mitochondrial ribosomal protein S18B	Cytoplasm	other
Q9Y6C9	MTCH2	mitochondrial carrier 2	Cytoplasm	other
Q9Y6G9	DYNC1LI1	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1	Cytoplasm	other