ANÁLISE MUTACIONAL DO PROMOTOR DO GENE DA MIOSTATINA

Mantovani, C.S. (carol_mantovani@yahoo.com.br); Grade, C.V.C. (carla_grade@hotmail.com); Sensiate, L.A.; Yusuf, F.; Brand-Saberi, B.; Alvares, L.E. (lealvare@unicamp.br)

INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

PIBIC/CNPQ

Palavras-chave: Miostatina - Promotor - Mutagênese sítio-dirigida - Fatores de transcrição

Introdução

A proteína **Miostatina** (GDF-8) **regula negativamente a deposição de musculatura esquelética** (Fig.1), e sua estrutura e função são evolutivamente **conservadas** em diversas espécies, incluindo humanos.

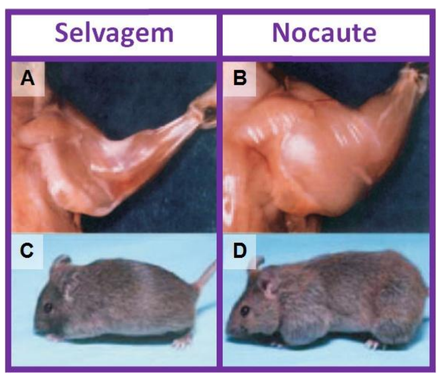


Fig.1. Camundongo selvagem (A, C) e nocauteado (B, D) para o gene da Miostatina. Adaptado de Rodgers (2008).

Nocaute do gene da *Miostatina*

↓

Hiperplasia e hipertrofia de fibras musculares

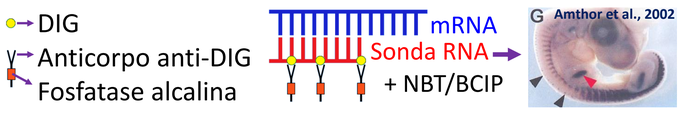
Sítios de ligação conservados para os **fatores de transcrição Meis, FXR, CREB e NFY** foram identificados no promotor basal da *Miostatina* (Fig. 2), que foi então clonado no vetor pGL3-Basic, *upstream* ao gene repórter da luciferase. Iniciou-se, então, este trabalho de análise mutacional, com o objetivo de compreender o **papel dos fatores de transcrição na regulação do promotor da Miostatina**, o que pode gerar dados importantes no desenvolvimento de ações terapêuticas para doenças musculares.

...CTGTAACAAAATACTGCTTGGTGACTTGTGACAGACAGGGTTTTAACCTCTGACAGCGAG
FXR MEIS
ATTCATTGTGGAGCAGGAGCCAATCATAGATCCTGACGACACTTGTCTCCTCTAAGTTGGA
NFY CREB
ATATAAAAAGCCACTTGGAATACAGTATACAGGACTCCCTGGCGTGGCAGGTT
TATA box

Fig.2. Sequência de parte do promotor do gene da *Miostatina* de camundongo e a localização dos sítios dos principais fatores de transcrição.

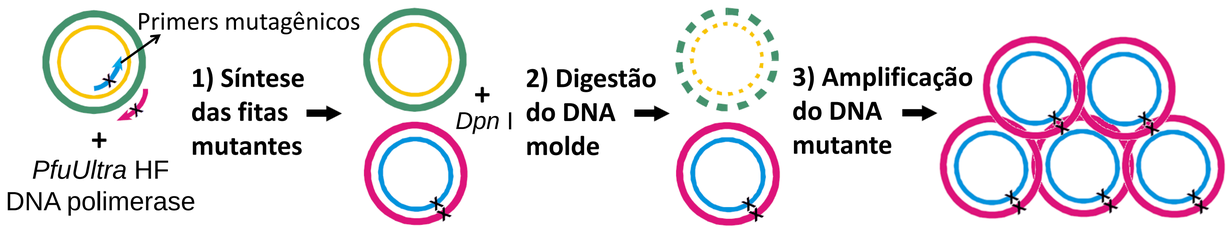
Metodologia

1) Hibridação *in situ* em embriões de galinha HH25 (pico de expressão da *Miostatina*) → estabelecer o padrão de expressão dos fatores de interesse.

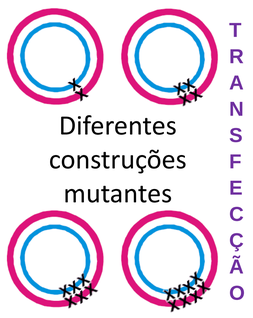


DIG é incorporado no preparo das sondas; NBT/BCIP é o substrato da fosfatase alcalina que gerará a marcação azulada.

2) Mutagênese sítio-dirigida *in vitro* (*QuikChange® Site-Directed Mutagenesis kit,* Agilent) → obtenção de construções de expressão com inativação dos sítios do promotor de maneira individual ou combinada.



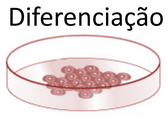
3) Ensaios *in vitro* de proliferação e diferenciação de mioblastos C_2C_{12} de camundongo.



CULTURA DE CÉLULAS C_2C_{12}

Proliferação

Diferenciação



RT-PCR
Verificação da presença dos transcritos das moléculas de interesse.
1. Extração de RNA
2. Preparo de cDNA
3. PCR

Medição da atividade do gene repórter da luciferase
Análise da atividade dos promotores mutados.
Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Resultados e Discussão

Hibridação *in situ*: CREB, NFY (ubíquos) e **Meis** são expressos em domínios semelhantes aos da *Miostatina*, relacionados ao desenvolvimento embrionário do tecido muscular esquelético (Fig.3).

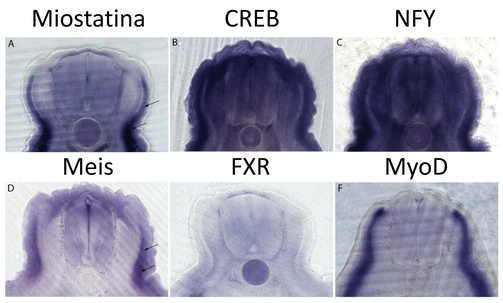


Fig.3. Cortes histológicos transversais na região entre membros de embriões de galinha HH25 após hibridação *in situ* em lâminas. MyoD: controle miogênico.

RT-PCR: Todos os transcritos foram encontrados, mas **FXR** é diferente daquele do fígado (Fig.4), o que indica que este é um transcrito alternativo com atividade ainda desconhecida nesse contexto.

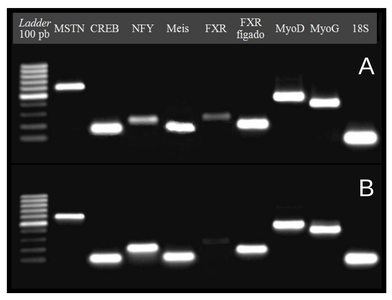


Fig.4. RT-PCR de células C_2C_{12} em **A)** Proliferação e **B)** Diferenciação. RNAr 18S: controle endógeno; MyoD e MyoG: controles miogênicos.

Atividade da luciferase nas construções mutantes:

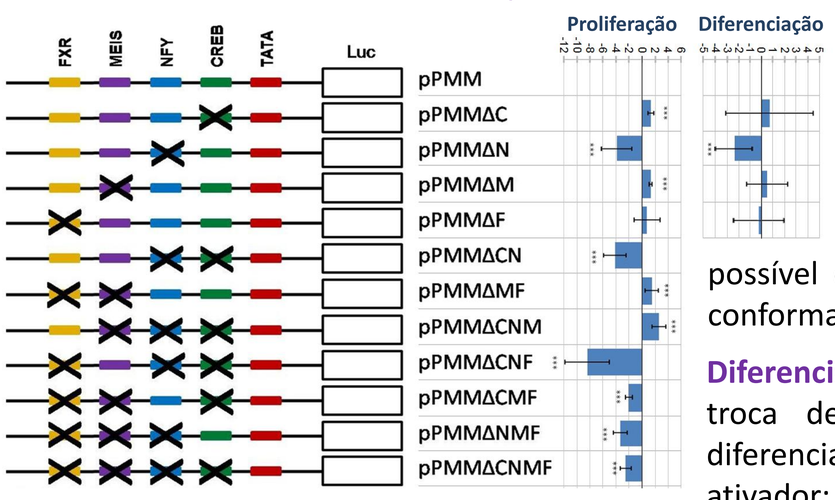


Fig.5. Atividade dos promotores mutados em mioblastos C_2C_{12} em proliferação e diferenciação. Os resultados estão representados em vezes (*fold change*), barras indicam médias ± desvio padrão. *** P<0,05 (teste t de Student).

Proliferação: Mutações simples indicam **NFY** como ativador e **CREB** e **Meis** como inibidores. **FXR** parece não ter papel significativo nesse contexto. Mutações múltiplas corroboram os resultados das simples, com exceção da ΔCMF, em que o NFY está sozinho no promotor e diminui sua atividade. Mas é possível que a ausência dos demais fatores altere a conformação do DNA, impedindo a atuação do NFY.

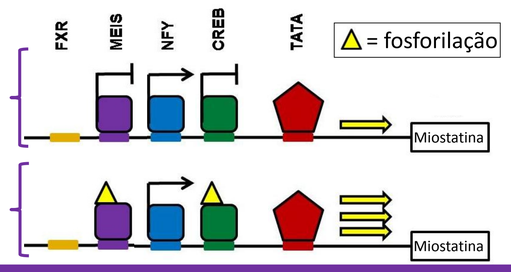
Diferenciação: Células respondem diferentemente à troca de meio, então células em proliferação e diferenciação se misturam. **NFY** permanece como ativador; **CREB** e **Meis** parecem aliviar a inibição, provavelmente porque são fosforilados pela PKA, perdendo seu papel inibitório. Mais experimentos são necessários para confirmação desse mecanismo, mas outros trabalhos demonstraram mecanismos similares.

Conclusões

NFY: papel de ativador do promotor na proliferação e na diferenciação;
CREB e **Meis:** durante a proliferação são inibidores; durante a diferenciação aliviam sua atividade inibidora, provavelmente por fosforilação mediada por PKA.
FXR: não tem efeito significativo sobre a atividade do promotor, provavelmente por causa de seus baixos níveis de expressão nos mioblastos e por ser mais atuante em outros tipos celulares, principalmente em organismos adultos.

→

Desenvolvimento da musculatura esquelética

Proliferação: baixos níveis de *Miostatina* → multiplicação dos mioblastos deve ser suficiente antes da interrupção de seus ciclos para iniciar a diferenciação.

Diferenciação: altos níveis de *Miostatina* → atuação como regulador negativo na formação de musculatura.