



## **DETECÇÃO DA PROTEÍNA DE REPARO kin17 ASSOCIADA À MATRIZ NUCLEAR EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA EM CAMUNDONGOS**

Lorena Gomes Polizelli<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/Uem), Anelise Cardoso Ramos<sup>1</sup> (Co autora), Maria Aparecida Fernandez<sup>1</sup> (Orientadora),  
e-mail: aparecidafernandez@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá<sup>1</sup> / Centro de Ciências Biológicas/  
Maringá, PR.

### **Ciências biológicas II/ Bioquímica**

**Palavras-chave:** Câncer, metabolismo do DNA, biomarcador

### **Resumo**

Por ser uma doença bastante variável em nível molecular, a incidência do melanoma, forma agressiva de câncer de pele, está aumentando de forma constante. Mutações nos genes de reparo do DNA podem conduzir a várias doenças, associadas ao desenvolvimento de tumores malignos. Dentre as proteínas associadas ao reparo do DNA, a kin17 é descrita com superexpressão em câncer de mama e associada a focos de replicação em células em cultura de mamíferos. Essa proteína está localizada associada à cromatina e a matriz nuclear, e entre as suas funções foram observados o seu envolvimento no processo de iniciação da replicação, recombinação e reparo do DNA em mamíferos. Desse modo, a alteração na expressão da proteína kin17 poderia estar relacionada a um fenótipo tumoral ou ser um pré-requisito para o seu aparecimento. Sequências denominadas S/MARs (Scaffold/Matrix Attachment Regions) promovem a associação do DNA à matriz nuclear e estão envolvidas na remodelação da cromatina e regulação da transcrição. Assim, a análise do proteoma da matriz pode ser considerada uma fonte na determinação de biomarcadores para o câncer.

### **Introdução**

Melanoma, um tumor maligno originado dos melanócitos, pode evoluir rapidamente de um lento crescimento até uma doença metastática agressiva com alta mortalidade (Jeffs, 2009). Regulação anormal ou de mutação nos genes de reparo do DNA podem conduzir a diversas doenças, frequentemente associadas com a predisposição e o elevado risco de



desenvolvimento de câncer, e isso ocorre devido ao fato de que as células estão constantemente submetidas a muitas lesões no DNA. Proteínas associadas ao reparo do DNA estão entre os alvos dos tumores malignos (Sarasin and Kauffman, 2008). Entre elas, a observação da proteína kin17 em câncer de mama (Zeng, 2011), a qual encontra-se superexpressa nesse tipo de tumor. A matriz nuclear tem uma identidade estrutural bastante dinâmica (Radulescu e Cleveland, 2010) e apresenta uma composição diversificada de RNAs e proteínas, e sua composição muda de acordo com o tipo de célula, fase do ciclo celular e câncer. Desse modo, a análise do proteoma da matriz nuclear é uma área de investigação promissora por ser fonte de determinação de biomarcadores para o câncer.

### **Materiais e métodos**

Para a detecção da proteína kin17, as células de melanoma de camundongo da linhagem B16F10-Nex2 e seus dois clones (B16F10-Nex2B e B16F10-Nex2D) foram cultivadas em meio RPMI-1640 medium, pH 7.2, e a Melan A, cultivada em meio RPMI-1640, pH 6.9, todas mantidas sob temperatura de 37°C e 8% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e foi feita a extração das proteínas da matriz nuclear conforme descrito em protocolo. Para análise das amostras, as proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e as proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Western Blot*). Após a retirada das membranas, foi realizada a etapa de bloqueio, e posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários, anti-kin17 K58 (SC-32769 - Santa Cruz Biotechnology) e anti-CTCF (diluições 1:5000) e secundários goat anti-mouse HRP Dako, P0447, e goat anti-rabbit (diluições 1:10.000).

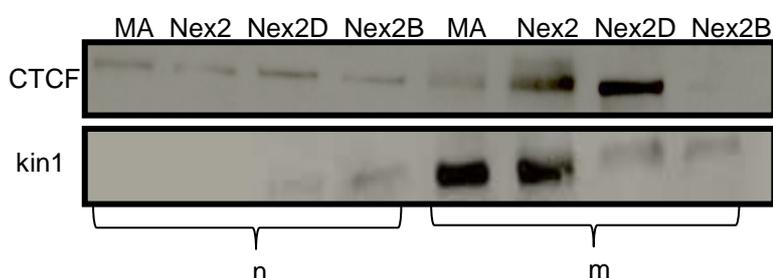
### **Resultados e Discussão**

Com relação à expressão do anticorpo Anti – CTCF policlonal de coelho (Anti – CTCF Polyclonal Antibody - Millipore), o resultado indicou que na fração nuclear, a proteína foi detectada em todas as linhagens celulares, com pouca diferença de detecção das amostras. Com relação à matriz nuclear, o sinal mais intenso encontrado foi detectado em Nex2 e Nex2D (metastática), apresentando menor detecção em MA e nenhuma em Nex2B (não metastática). Essa proteína pode atuar como ativadora ou repressora da transcrição, e dessa forma, está envolvida em diferentes aspectos da regulação dos genes. Com relação à proteína kin17, nossos resultados indicaram que no núcleo a proteína foi detectada com pouca intensidade apenas nas linhagens Nex2D e Nex2B. Por outro lado, a detecção da proteína na matriz nuclear teve mais intensidade nas linhagens MA e Nex2,



ou seja, apresentou uma atividade replicativa mais intensa, e pequena diferença de detecção das amostras em Nex2D e Nex2B, confirmando o descrito por Freitas, (2004), o qual relata a linhagem de células B16F10Nex2 heterogênea em relação a seu potencial metastático (Figura 1).

**Figura 1**



**Figura 1.** Frações nuclear (n) e da matriz nuclear (m) das proteínas CTCF e kin17 nas linhagens Melan A (MA), B16F10Nex2 (Nex2), B16F10Nex2D (Nex2D), B16F10Nex2B (Nex2B).

## Conclusões

A proteína kin17 foi encontrada no núcleo e matriz nuclear, o que suporta a participação da proteína na proliferação celular. Como as células não foram sincronizadas em relação a fase do ciclo celular, a intensidade de detecção das amostras está relacionada a uma maior ou menor proliferação. Desse modo, o estudo das células de melanoma são modelos para a identificação de alterações moleculares, visando identificar marcadores para o diagnóstico do câncer.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq, e ao Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF).

## Referências

FREITAS, Z. F. O.; RODRIGUES, E. G; OLIVEIRA, V.; CARMONA, A. K.; TRAVASSOS, L. R. Melanoma heterogeneity: differential, invasive, metastatic properties and profiles of cathepsin B, D and L activities in subclones of the B16F10-NEX2 cell line. **Melanoma Research**: 14 (5): 333-344, 2004.



JEFFS, A. R.; GLOVER, A. C.; SLOBBE, L. J.; WANG, L. H. E S. et al. A Gene Expression Signature of Invasive Potential in Metastatic Melanoma Cells. **PLoS ONE** 4(12): e8461. doi:10.1371/journal.pone.0008461, 2009.

RADULESCU, A. E. & CLEVELAND, D. W. NuMA after 30 years: the matrix revisited. **Trends Cell Biol** 20, 214-22, 2010.

SARASIN, A.; KAUFFMANN, A.; et al. Overexpression of DNA repair genes is associated with metastasis: A new hypothesis. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Volume 659, Issues 1–2, 49-55, 2008.

ZENG, T.; GAO, H.; YU, P.; HE, H.; OUYANG, X.; et al. Up-Regulation of Kin17 Is Essential for Proliferation of Breast Cancer. **PLoS ONE** 6(9): e25343. doi:10.1371/journal.pone.0025343, 2011.