

TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS Cnn21 DE *Drosophila melanogaster* COM A PROTEÍNA KIN17

Ailson Francisco dos Santos Lima (PIBIC/FA/UEM), Dr^a Fabiana dos Santos Rando (Co-orientadora), Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez (Orientadora)
E-mail: limailson@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas/Maringá.

Colégio de Ciências da Vida/ Ciências Biológicas/ Ciências Biológicas I

Palavras-chave: Padronização de metodologia, *Western blot*, proteína de reparo, expressão de gene clonado

Resumo

Muitos estudos têm relacionado a proteína kin17 com a replicação e o reparo do DNA em mamíferos, indicando sua importância em diversos tipos celulares. Um exemplo são as células cancerígenas que apresentam elevado nível de expressão da kin17, eventos de replicação do DNA e consequentemente de divisão celular. Essa proteína também está associada ao processo de *splicing* de RNA mensageiros em mamíferos e insetos, como a *Drosophila melanogaster*. A homologia de eventos metabólicos aos de humanos, *Drosophila melanogaster* se apresenta como um modelo para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados à expressão gênica. Foram analisados diferentes clones do gene da proteína Kin17, contendo segmentos específicos desse gene, para certificação dos clones. Células de *D. melanogaster*, linhagem Cnn21, foram transfectadas com gene completo de kin17 e foram realizadas análises da expressão exógena por *western blot*. Nossos resultados demonstraram que transfecção foi realizada com sucesso, permitindo futuras análises sobre a função do gene da Kin17 em células de *D. melanogaster*.

Introdução

Em *Drosophila melanogaster*, o gene Kin17 está localizado no cromossomo 3 e codifica para uma proteína de 390 aminoácidos com massa molecular aproximadamente 45 kDa e ponto isoelétrico 9,3 semelhantes à kin17 de mamíferos (ANGULO, 1991). O gene está anotado no banco de dados de Flybase com o código CG5649. Uma série de estudos demonstrou a participação da kin17 em processos nucleares em mamíferos, principalmente na replicação e no reparo do DNA. Células transfectadas com RNA antisense da kin17 apresentam taxa reduzida de síntese de DNA, acúmulo de células na fase S do ciclo celular e maior sensibilidade à mutagênese (BIARD, 2002; DESPRAS, 2003). Em contrapartida, a

superexpressão da proteína em diferentes linhagens celulares inibe a proliferação celular (KANNOUCHE & ANGULO, 1999). A kin17 está associada ao complexo multiproteico de replicação do DNA, em conjunto com proteínas como a RPA70 (human replication protein A), PCNA (proliferating cell nuclear antigen) e DNA polimerase α . Complexos multiproteicos isolados de células HeLa capazes de realizar replicação do DNA *in vitro* apresentam atividade reduzida quando a kin17 é inibida por imunodepleção. A kin17 participa do processamento de RNA mensageiros, dado que está associada aos eventos de *splicing* em *D. melanogaster* (HEROLD, 2009). Recentemente em nosso grupo de pesquisa, visando uma melhor compreensão da função da kin17 em *Drosophila*, foram gerados vetores a partir do plasmídeo pAc5.1 para a expressão do gene completo e de formas truncadas da mesma. Tendo em vista a importância do conhecimento sobre os mecanismos de envolvimento da proteína kin17 nos processos de replicação, recombinação e reparo do DNA, objetivou-se a padronização da metodologia da transfecção de células da linhagem Cnn21 de *D. melanogaster* com o gene Kin 17 completo (FL) para viabilizar estudos futuros com deleções desse gene.

Materiais e métodos

Os plasmídeos pAc5.1/V5HisA contendo o gene completo da proteína kin17 *D. melanogaster* e os com deleções foram purificados utilizando o sistema HiSpeed Midi Kit (QIAGEN). A integridade dos insertos foi analisada via PCR com iniciadores para a região do sítio de múltipla clonagem. As células da linhagem Cnn21 foram cultivadas com meio M3 Shield & Sang (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A experimentação de transfecção foi realizada com amostras de proteínas de células sem transfecção, **ST** (controle negativo para detecção da expressão somente da proteína Kin17 endógena; com transfecção de amostra com pool de siRNAs AllStar, Invitrogen, **AS** (controle negativo da transfecção, somente deve ser detectado a expressão da proteína Kin17 endógena); amostras de proteínas de células transfectadas com o gene Kin17 completo (FL), sendo que poderá ser detectado nessas amostras a expressão das proteínas do gene endógeno e exógeno, dependendo do anticorpo utilizado. A reação de transfecção foi realizada utilizando o kit Effectene (QIAGEN). As amostras foram submetidas a processamento pelo método de *Western blot* e os sinais de quimioluminescência capturadas no equipamento Image Quant LAS 500 (GE Healthcare).

Resultados e Discussão

As construções no plasmídeo pAc5.1/HisV5 foram amplificadas via PCR (Figura 1), sendo que os fragmentos foram compatíveis com diversas deleções do gene Kin17 (realizado em trabalho anterior no laboratório). O plasmídeo com o gene completo denominado FL (1355pb); e os seguintes

foram denominados CI (1178 pb); CII (794 pb); CIV (1205 pb); CV (866 pb). Os resultados da expressão da proteína kin17 endógena e exógena (pela transfecção do plasmídeo FL podem ser visualizados na Figura 2. Observa-se que o FL foi efetivamente expresso em células Cnn21 com uma banda de aproximadamente 47KDa, mas com duas frações as quais podem ser derivadas de uma difusão não esperada da proteína durante a corrida e/ou transferência.

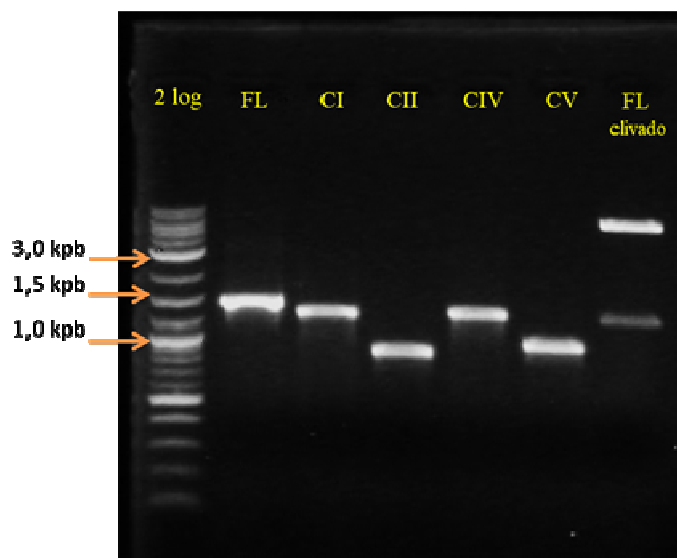


Figura 1 – Determinação da clonagem do gene Kin17 completo e com deleções (descrição no texto acima).

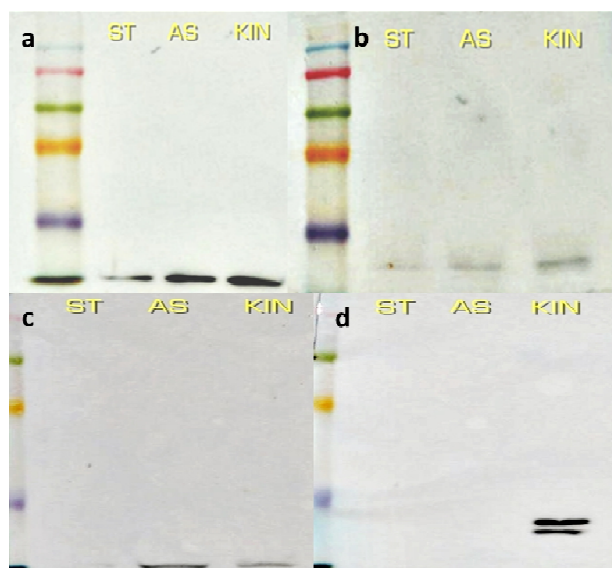


Figura 2 – Análise da transfecção e expressão do gene Kin17 endógeno e exógeno. **(a)** e **(c)**, é referente ao controle, com detecção por anticorpos anti-fibrilarina; **(b)** detecção pelo anticorpo anti-kin17, o qual detecta a proteína expressa pelo gene endógeno e na amostra KIN é a somatória da expressão do gene endógeno e também do transfectado; **(d)** detecção

pelo anticorpo anti-V5, onde somente a expressão do gene exógeno Kin17 é detectado. **ST**, amostra de proteínas de células controle, sem transfecção; **AS**, amostra de células transfectadas com o pool de siRNAs AllStar (Invitrogen), o qual é utilizado como controle negativo do processo de transfecção e **KIN** amostra de proteínas de células transfectadas com o gene completo da kin17 (plasmídeo FL).

Conclusões

Os plasmídeos pAc5.1/V5HisA contendo os insertos foram certificados quanto ao seu fragmento clonado. A expressão de kin17 exógena foi observada através de *Western blot*, o que possibilita a execução de trabalhos futuros para elucidar os mecanismos moleculares relacionados ao funcionamento desta proteína. Novos estudos serão necessários para elucidar o papel dos motivos funcionais de kin17 em suas funções celulares.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, COMCAP/UEM e a toda a equipe do LORF pela ajuda nos trabalhos desenvolvidos.

Referências

ANGULO, J. F.; ROUER, E.; MAZIN, A.; MATTEI, M. G.; TISSIER, A.; HORELLOU, P.; BENAROUS, R.; DEVORET, R. Identification and expression of the cDNA of KIN17, a zinc-finger gene located on mouse chromosome 2, encoding a new DNA-binding protein. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 5117-5123, 1991.

BIARD, D. S. F.; MICCOLI, L.; DESPRAS, E.; FROBERT, Y.; CRÉMINON, C.; ANGULO, J. F. Ionizing radiation triggers chromatin-bound kin17 complex formation in human cells. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 277, p. 19156-19165, 2002.

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CRÉMINON, C.; ROUILLARD, D.; ANGULO, J. F.; BIARD, D. S. F. Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research**, v. 159, p. 748-758, 2003.

HEROLD, N.; WILL, C. L.; WOLF, E.; KASTNER, B.; URLAUB, H.; LÜHRMANN, R. Conservation of the protein composition and electron microscopy structure of *Drosophila melanogaster* and human spliceosomal complexes. **Molecular and Cellular Biology**. v. 29, p. 281-301, 2009.

KANNOUCHE, P.; ANGULO, J. F. Overexpression of kin17 protein disrupts nuclear morphology and inhibits the growth of mammalian cells. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 3215-3224, 1999.