

EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KIN NO PROCESSO DE AMPLIFICAÇÃO GÊNICA EM NÚCLEOS POLITÊNICOS DE *BRADYSIA HYGIDA*

Nivaldo Natalino Banho Junior (PIBIC/CNPq/FA/UEM), José Renato Pattaro Junior (Coautor) (PBC/UEM), Daniel Caligari (Coautor) (PIBIC/UEM), Maria Aparecida Fernandez (Orientador), e-mail: nivaldobanho.jr25@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Maringá-PR

Ciências Biológicas/Bioquímica/Biologia Molecular

Palavras-chave: Sciaridae, pufes de DNA, replicação do DNA.

Resumo

Em células das glândulas salivares de larvas de *Bradysia hygida* ocorre a formação de cromossomos politênicos que apresentam pufes de DNA, os quais são produtos da replicação adicional do DNA. Nessa área de atuação, foi realizada por nosso grupo de pesquisa a clonagem do gene da proteína KIN em *B. hygida*, *BhKIN*, pois em células humanas, a proteína KIN, *HsKIN*, é descrita como superexpressa na fase de replicação do DNA. O objetivo do presente projeto foi identificar a expressão da *BhKIN* nas glândulas salivares nas idades larvais denominadas E1 e E7, períodos os quais são, respectivamente, anterior e posterior à amplificação gênica e o processo de abertura dos principais pufes de DNA. Entretanto, não foi detectada nessas amostras a *BhKIN*, através da análise por *western blot*. Desse modo, são discutidas duas das prováveis dificuldades dessa não detecção: 1) a *BhKIN* expressa nessas idades larvais ocorre em taxa basal, sendo assim difícil sua detecção por *western blot*; 2) não foi possível a detecção da mesma devido a diferença da composição de aminoácidos e/ou estrutural dos segmentos da *BhKIN* em relação à *HsKIN*, moléculas utilizadas para a produção dos anticorpos disponíveis. Em conclusão, não foram detectadas as *BhKIN* em amostras de glândulas salivares de larvas de idades E1 e E7, o que poderia indicar o não envolvimento da expressão dessa proteína no processo de amplificação gênica. Entretanto, a análise com amostras em outras idades larvais e novas metodologias poderão ser testadas para verificar a possibilidade da detecção da expressão da *BhKIN*.

Introdução

Bradysia hygida é um inseto da Ordem Diptera, pertencente à família Sciaridae sendo um modelo biológico para o estudo de telômeros, politenia e amplificação gênica (SIMON et al., 2016). Esse sciarídeo apresenta um ciclo de vida de aproximadamente 36 dias a 20 °C com um desenvolvimento

holometábolo, sendo seu estádio larval composto por quatro ínstares delimitados por mudas (SIMON et al., 2016).

Segundo Simon et al. (2016) as larvas apresentam um par de glândulas salivares compostas de três regiões, S1, S2 e S3, formadas por uma única camada de células que passam por endomitose, células estas constituídas por 4 cromossomos politênicos, A, B, C, e X. A partir da idade E3 pode-se observar o aparecimento de pufes de DNA em cromossomos em sua maioria na região S1, ocorrendo expansões desde a idade E5 e atingindo seu tamanho máximo em E7 ou em períodos após essa idade (SIMON et al., 2016). Os pufes de DNA são regiões cromossômicas onde ocorre o processo de replicação gênica adicional e reiterada, estando diretamente envolvido com a síntese de proteínas e o aumento da taxa de transcrição de RNA (SIMON et al., 2016). Neste contexto, uma proteína ativada por estresse, KIN, é descrita como putativa de envolvimento com o processo de replicação, recombinação, reparo do DNA e tumorigênese em mamíferos (DESPRAS et al., 2003). A análise biofísica da proteína KIN humana, *HsKIN*, foi descrita por Pattaro Júnior et al. (2019) e o gene da proteína KIN de *B. hygida*, *BhKIN*, foi克隆ado por nosso grupo de pesquisa (MONTANHEIRO, 2018). Nessa área de atuação, esse estudo teve como objetivo detectar a expressão da proteína *BhKIN* no tecido glandular de *B. hygida* em seu período anterior à amplificação gênica, idade E1, e em seu período de abertura dos pufes de DNA, idade E7. Em resumo, esse projeto visou descrever a expressão da *BhKIN*, análise não reportada até o momento a nenhum inseto, assim como relacionar a essa proteína com o evento de amplificação gênica em *B. hygida*.

Materiais e métodos

A cultura de *Bradysia hygida* é mantida em nosso laboratório, em caixas de terra peneirada, em temperatura de 23 °C e as larvas são alimentadas por erva-mate fermentada, amido de milho e farinha de aveia.

Glândulas salivares foram dissecadas em tampão PBS 1x com pH 7,4 (mantidas a 4°C) de 40 larvas do 4º instar larval, sendo que 20 estavam no estádio E1 e as outras 20 no estádio E7. Em seguida, as amostras foram sonicadas (30% de amplitude utilizados). O anticorpo secundário foi o *Polyclonal goat anti-mouse HRP* (P0447/Dako). Para a revelação foi utilizado o kit *ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. O alinhamento de sequências da proteína *HsKIN* (CAA06462.1) e da *BhKIN* (MONTANHEIRO, 2018) foi realizado no software *Clustal Omega*, tendo como análise a sequência do domínio RecA e o motivo KOW da proteína, segmentos detectados pelos anticorpos primários utilizados., sendo 30 s ON e 30 s OFF em um total de tempo de 3 minutos; Thermo Fisher). Imediatamente a solução foi centrifugada por 10 min a 10.000 rpm à 4°C, e o sobrenadante de proteínas totais foi transferido para um novo tubo e suas concentrações de proteínas determinadas a 280 nm (Nanodrop2000 - Thermo Fisher). A integridade das amostras foi analisada por SDS-PAGE 12%

(SAMBROOK & RUSSELL, 2001), com marcador de peso molecular de proteínas *Full Range Rainbow* (GE Healthcare). Após o processo de eletroforese, o gel foi incubado por 40 min com solução de *Coomassie Blue R-350* (GE Healthcare) e descorado em solução com 10% ácido acético e 30% etanol. A transferência para uma membrana de nitrocelulose e a incubação, foi realizada segundo Sambrook & Russell (2001). Os anticorpos primários da Santa Cruz Biotechnology, Anti-KIN k58 (sc-32769), que reconhece o segmento RecA e/ou o anticorpo K36 (sc-32768), que reconhece o segmento KOW foram

Resultados e Discussão

Foi observada concentração de proteínas de 4,69 mg/mL na amostra da idade E1 e de 2,78 mg/mL na idade E7. As amostras foram submetidas à separação em SDS-PAGE 12% com concentração final de proteínas de 3 mg/mL⁻¹ para cada uma das amostras. Foi possível visualizar no gel a presença de bandas bem definidas e ausência de smear, indicando integridade e ausência de degradação nas amostras. Entretanto, não foi possível visualizar a detecção da *BhKIN* em nenhuma das amostras analisadas. Esse resultado pode ser relacionado a diversas dificuldades, sendo aqui discutidas duas principais: 1) a *BhKIN* não pode ser detectada nessas idades larvais analisadas, E1 e E7, pois a expressão ocorre em nível basal e é dificultada através de *western blot*; 2) não foi possível a detecção da *BhKIN* devido a diferença da composição de aminoácidos e/ou estrutural dos segmentos da *BhKIN* em relação à *HsKIN* de mamíferos, moléculas utilizadas para a produção dos anticorpos disponíveis.

<i>H. sapiens</i>	MGKSDFLTPKAIAINRIKSKGQLQKLWRWYCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQLLASEN	60
<i>B. hygida</i>	MGKAEVGTPKYLANKMKAKGLQKLWRWYCQMCQKQCRDENGFKCHCMSESHQRQLLFADN	60
	*****:.. *** :***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:***	
<i>H. sapiens</i>	PQQFMDYFSEEFRRNDFLELLRRRFRTGKRVHNINVNEYISHREHIMNATQWETLTDFTK	120
<i>B. hygida</i>	SGKYIYSFSKEFSDGFMEPLLRRRFRTGKRVSAKVYQEYISHKDHLHMNATRWLTLSDYVK	120
	: : ***:*** . :***:*****:***** * :***:*****:*****:*****:***:***:..	
<i>H. sapiens</i>	WLGRGGLCKVDETPKGWYIYIDRDPETIRRQLELEKKKKQ DLDDEEKTAKFIEEQVRGG	180
<i>B. hygida</i>	WLGRSGQCVVDETEKGWFIAYIDRSPEVLEQQQKIRAKE KDKDDEERHMEFINQQVERN	180
	*****: * * ***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:*	
<i>H. sapiens</i>	LEGKE-QEVPTFTELSRRENDEEKVTFNLSKGACSSSGATSSKSSTLGPSALKTIG ----	234
<i>B. hygida</i>	KKDAHSSKDVE EAFKRDNEDETVKM EIKASRVK-----SILIKPIKVEKRSAHDD	234
	: : .. *:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
<i>H. sapiens</i>	SSASVKRKESSQSTSKEKKKKSALEIMEIEEEKK--RTARTDYWLQPEIIVKIITKK	293
<i>B. hygida</i>	DTRSV-RSEKKYKPSSMKDDGKKLISALDEIIKIEYYKEKEANRKDWLSEGIVVKKLITKG	293
	: : ** *.*... . : . *: . ** *****:***:***:***: . : * . ***:***	
<i>H. sapiens</i>	LGEKYHKKKAIVKEVIDKYTAVVKMIDSGDKLKLQDQTHLETVI PAPGKRLVLNGGYRGN	353
<i>B. hygida</i>	LGDKEYKQKGVVVEIDKYRAKVKMLETGEKVKIDQAHAEVTI PAVGKLIRVLNGAYRGC	353
	::***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***	
<i>H. sapiens</i>	EGTLESINEKTFSATIVIETGPLKGRRVEGIQYEDISKLA -- 393	
<i>B. hygida</i>	NATLSSLDEDNFCVSIE IASGPLKGRVVKNIQYEDVSKLFQE 395	
	: : ** *:***:***:***: . : . ***:***:***:***:***:***:***:***	

Figura 1. Alinhamento das proteínas KIN humana e de *Bradysia hygida*. A análise foi realizada com o software Clustal Omega e as amostras de *HsKIN* (CAA06462.1) e da *BhKIN* (MONTANHEIRO, 2018), sendo que o domínio RecA (vermelho) e o motivo KOW (roxos) são os segmentos detectados pelos anticorpos primários utilizados.

Em relação ao ítem 1, a utilização de metodologias, como o RT-qPCR para a detecção de mRNAs de *BhKIN* deverá ser então realizada. Em relação ao item 2, a razão de identidade dos aminoácidos dos segmentos RecA e KOW, local de afinidade dos anticorpos k58 e k36, respectivamente, das sequências codificadoras das proteínas *BhKIN* e *HsKIN*, foi realizada, Figura 1. A identidade de apenas 37,5% no epitopo específico do segmento RecA (Figura 1, em vermelho) e 51% do segmento KOW (Figura 1, em roxo) pode indicar grandes modificações na estrutura tridimensional da proteína, dificultando a interação do anticorpo com a proteína *BhKIN*, impossibilitando então a utilização desses anticorpos.

Conclusões

Por meio da metodologia aplicada não foi possível detectar a *BhKIN*, logo pode-se propor que esta proteína não é expressa nos instares larvais analisados ou que não foi possível sua detecção devido a inespecificidade do anticorpo primário usado no procedimento metodológico. Novas análises com amostras em outras idades larvais e com metodologias distintas (como a técnica de RT-qPCR) poderão permitir a detecção, ainda que reduzida, da expressão da *BhKIN*.

Agradecimentos

CNPq pelo auxílio financeiro, do meu coorientador José Renato Pattaro Júnior e da minha orientadora Profª Drª Maria Aparecida Fernandez por toda orientação e auxílio na realização do trabalho.

Referências

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CREMINON, C. ; ROUILLARD, D.; ANGULO, J. F.; BIARD, D. S. Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research**, v.159, p.748-58, 2003.

MONTANHEIRO, I. R. **Clonagem e sequenciamento do gene KIN em *Bradysia hygida* (Diptera:Sciaridae)**. 2018. 27f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

PATTARO JUNIOR, J. R.; CARUSO, I. P.; LIMA NETO, Q. A. DE; DUARTE JUNIOR, F. F.; RANDO, F. S.; GERHARDT, E. C. M.; FERNANDEZ, M. A.; SEIXAS, F. A. V. Biophysical Characterization and Molecular Phylogeny of Human KIN Protein. **European Biophysics Journal with Biophysics Letters**, v.48, p.645-657, 2019.



SAMBROOK J.; RUSSELL D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

SIMON C. R; SIVIERO F.; MONESI N. Beyond DNA Puffs: What Can We Learn From Studying Sciarids? **Genesis**, V.54, n.7, p. 361-378, 2016.