A participação do RNA não codificante Dm1 de *Drosophila melanogaster* na proliferação celular: expressão e análise *in silico* com ORC2

Luiz Gustavo Gutierrez Ferreira[1] (PIC/UEM), Guilherme da Costa Patzsch[1] (Coorientador), Rafaela Marcondes Hasse[1], Giovana de Oliveira Gomes Kutschenko[1], Júlia Strey Bem[1], Flávio Augusto Vicente Seixas[2] (Coorientador), Maria Aparecida Fernandez (Orientadora)[1] E-mail: mafernandez@uem.br

[1]Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá - UEM, Maringá, 87020-900, PR, Brasil. [2]Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Campus Umuarama, 87506-370, PR, Brasil.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Bioquímica/Biologia Molecular

Palavras-chave: ncRNA, Y RNAs, Docking molecular

RESUMO

Os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs) são RNAs não codificantes presentes em invertebrados. Em *Drosophila melanogaster*, o sbRNA Dm1 ainda têm suas funções pouco conhecidas. Este trabalho investigou a associação do sbRNA Dm1 com a proliferação celular em células S2R+ e sua possível interação com a proteína do complexo de reconhecimento de origem, ORC2. A expressão de Dm1 foi avaliada por RT-qPCR ao longo de uma curva de crescimento, e a interação ORC2-Dm1 por *docking* molecular. Dm1 apresentou maior expressão em 48 horas, durante a fase proliferativa, e redução em 120 horas. O modelo de *docking* indicou interação com ORC2 por meio de 32 resíduos de nucleotídeos. Os resultados preliminares sugerem associação de Dm1 com a proliferação celular e possível interação com ORC2.

INTRODUÇÃO

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são moléculas funcionais que, embora não codifiquem proteínas, desempenham importantes funções celulares. Entre eles, destacam-se os Y RNAs de vertebrados e seus homólogos em invertebrados, os *stem-bulge RNAs* (sbRNAs), relacionados à replicação do DNA genômico (Kowalski & Krude, 2015). Em *Drosophila melanogaster*, foram identificados dois sbRNAs, denominados Dm1 e Dm2 (Duarte Junior et al., 2019). Entretanto, ainda são pouco conhecidas suas funções nesse organismo, especialmente sua relação com a replicação do DNA e suas interações com proteínas. A linhagem celular S2R+, derivada de células embrionárias de *D. melanogaster* e que expressa ambos os sbRNAs (Duarte Junior et al., 2019), constitui-se como um modelo adequado para investigar essa relação. Assim, este trabalho busca investigar a possível associação do sbRNA Dm1 com a replicação do DNA em células S2R+ e avaliar, por modelagem

molecular, sua possível interação com a proteína da subunidade 2 do complexo de reconhecimento de origem, ORC2.

MATERIAIS E MÉTODOS

As células embrionárias de *Drosophila melanogaster* (linhagem S2R+) foram cultivadas em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. O RNA foi extraído com NZYol (NZtech), avaliado quanto à concentração e pureza por NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific), considerando-se A260/A280 ≥ 1,8, e quanto à integridade por eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1%. As amostras selecionadas foram tratadas com DNAse I (New England Biolabs) e submetidas à síntese de DNA complementar utilizando kit da PHT Biotecnologia. A expressão de Dm1 foi analisada por RT-qPCR utilizando PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), com duplicatas técnicas e biológicas e snoRNA:U6 como normalizador. A expressão relativa foi calculada pelo método 2^-ΔCq (Schmittgen & Livak, 2008) e a estabilidade do normalizador avaliada pelo algoritmo geNorm (Hildyard & Wells, 2014). A modelagem molecular da interação ORC2-Dm1 foi realizada em parceria com o grupo do Prof. Dr. Flavio A. V. Seixas (UEM, Umuarama). A estrutura de ORC2 (UniProt Q24168) foi obtida por AlphaFold2, enquanto o sbRNA Dm1, composto por 85 nucleotídeos, foi utilizado nas simulações. O complexo ORC2-DNA (PDB 7JGS) foi utilizado como referência. O *docking* proteína-RNA foi realizado no servidor HDOCK, com as interações visualizadas no CCP4-MG.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de crescimento evidenciou as fases de adaptação (*lag*) (0–12 h), crescimento exponencial (*log*) (12–48 h) e platô (48–120 h) (Fig. 1). A análise preliminar da expressão de Dm1, limitada pela instabilidade do gene normalizador (*M-value* = 2,42), indicou baixa expressão em 6 horas, seguida de aumento em 24 horas e pico em 48 horas, com manutenção em 72 horas e redução em 120 horas (Fig. 2). Esse padrão, caracterizado pelo aumento da expressão durante o período de maior proliferação celular, é concordante com a hipótese de uma possível associação de Dm1 com a proliferação. O aumento entre 6 e 24 horas e o pico observado em 48 horas também indicaram a possibilidade de uma defasagem temporal entre o estado proliferativo e os níveis do ncRNA, considerando que alterações na dinâmica da expressão gênica podem apresentar diferenças temporais em relação ao estado celular (Liu et al., 2017).

A análise de *docking* entre Dm1 e ORC2 indicou, no modelo melhor ranqueado, interação por meio de 32 resíduos de nucleotídeos (Fig. 3 A e B), além de uma sobreposição do complexo ORC2–Dm1 com a estrutura de referência de ORC2 ligada a DNA (Fig. 3C). O *docking* molecular não permitiu, contudo, determinar com precisão quais nucleotídeos estão interagindo. Esses resultados fornecem um modelo estrutural para a investigação da possível interação entre o ncRNA e uma proteína envolvida na iniciação da replicação do DNA. Ademais, como

o *docking* foi realizado considerando os componentes como corpos rígidos, são necessárias simulações de dinâmica molecular para avaliar a estabilidade e as interações do complexo de forma mais realista.

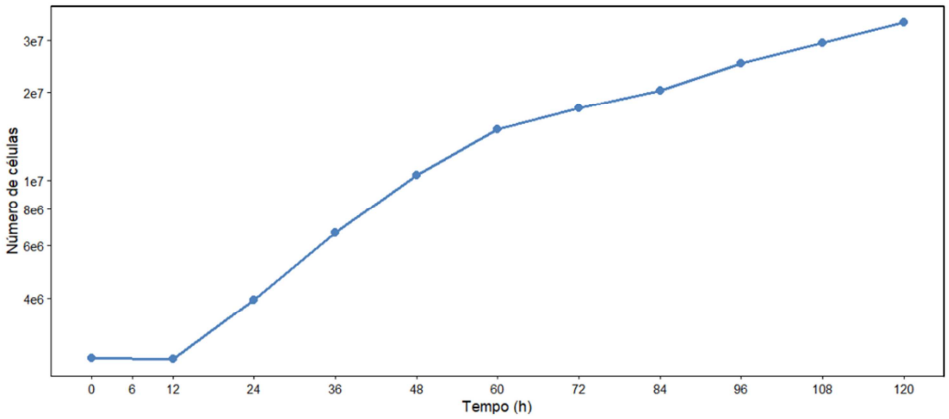


Figura 1. Curva de crescimento celular em função do tempo. Adaptação (lag) 0–12 h, crescimento exponencial (log) 12–48 h) e platô 48–120 h.

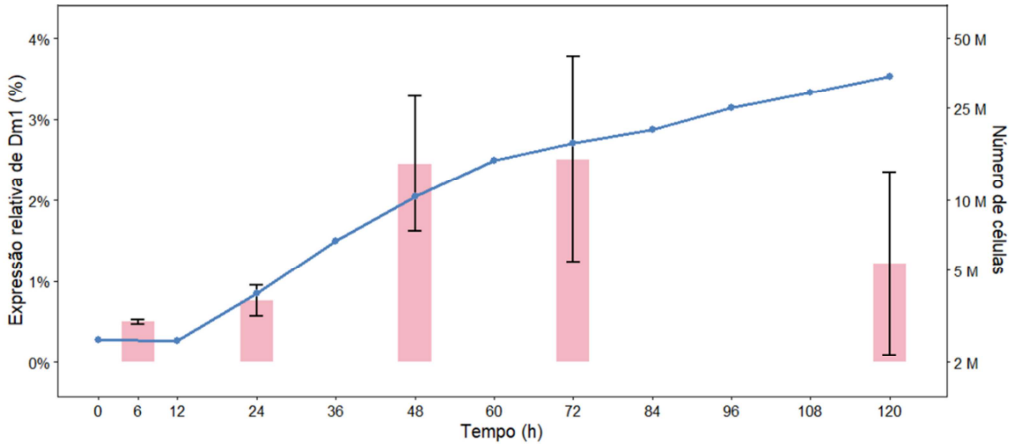


Figura 2. Expressão relativa de Dm1 plotado contra a curva de crescimento. Os resultados demonstram uma expressão acentuada entre os tempos de 48 e 72 horas.

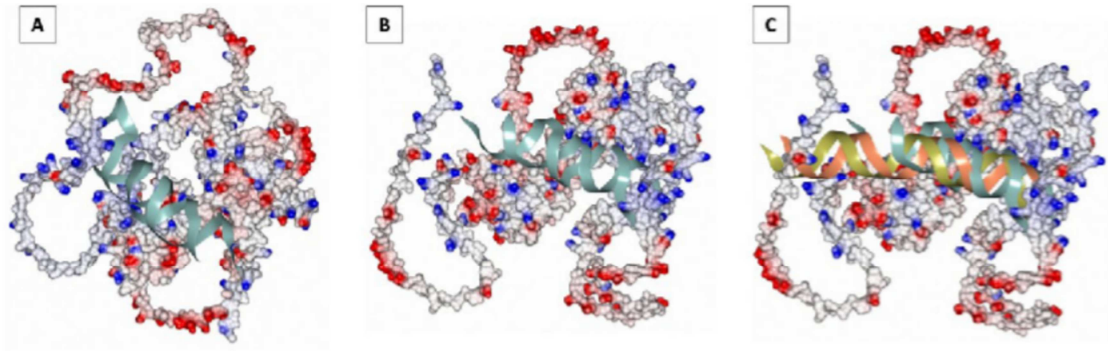


Figura 3. Modelos obtidos por docking molecular da interação entre Dm1 e ORC2. A e B: diferentes modelos da interação entre o sbRNA Dm1 e a proteína ORC2. C: sobreposição do complexo ORC2–Dm1 com a estrutura de referência de ORC2 ligada a DNA

Os resultados de expressão devem ser considerados preliminares, sendo necessários experimentos com maior resolução temporal e utilização de um gene normalizador estável ou quantificação absoluta. Além disso, simulações de dinâmica molecular serão necessários para determinar com precisão quais nucleotídeos de Dm1 interagem com a ORC2. Por fim, não foram realizadas análises estatísticas devido ao baixo número de réplicas ($n = 2$).

CONCLUSÕES

Apesar do caráter preliminar deste trabalho, existem evidências de que o ncRNA Dm1 talvez esteja, de fato, relacionado à proliferação e à replicação celular em células S2R+ de *Drosophila melanogaster*. Contudo, experimentos mais refinados serão necessários para que esta hipótese esteja devidamente embasada.

AGRADECIMENTOS

Sou especialmente grato ao mestrando Guilherme Patzsch, por todo apoio, cuidado e auxílio para com este projeto e com a minha formação. Agradeço também aos meus orientadores, por toda a experiência compartilhada durante a realização deste trabalho, e a todos os meus colegas de laboratório, pelo aprendizado conjunto.

REFERÊNCIAS

KOWALSKI, Madzia P.; KRUDE, Torsten. Functional roles of non-coding Y RNAs. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 66, p. 20-29, 2015.

DUARTE JUNIOR, Francisco Ferreira et al. Identification and characterization of stem-bulge RNAs in Drosophila melanogaster. **RNA biology**, v. 16, n. 3, p. 330-339, 2019.

HILDYARD, John C.W; WELLS, Dominic J. Identification and Validation of Quantitative PCR Reference Genes Suitable for Normalizing Expression in Normal and Dystrophic Cell Culture Models of Myogenesis. **PLOS Currents Muscular Dystrophy**, v.6, pag.2-23, 2014

LIU, Yin et al. Transcriptional landscape of the human cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 13, p. 3473–3478, 28 mar. 2017.

SCHMITTGEN, Thomas D; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, jun. 2008.