

TÓPICOS EM PROTEÔMICA: ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA EM LINHAGENS CELULARES E BIOINFORMÁTICA ESTRUTURAL

Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez
Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
Doutorando Quirino Alves de Lima Neto
Doutoranda Vanessa Pinatto Gaspar
Doutorando Douglas Vinícius Bassalobre de Freitas
Doutoranda Fabiana dos Santos Rando
Doutoranda Kátya Jaqueline Ribeiro Passos
Doutoranda Alana Lúcia Oro
Mestranda Anelise Cardoso
Mestrando Cidnei Marschalk

INTRODUÇÃO

O papel da proteína kin17 no metabolismo do DNA

A proteína kin17 foi descoberta em 1989 em cultura de células da linhagem FR 3T3 de rato, devido à reação cruzada com anticorpos policlonais dirigidos contra a proteína RecA de *Escherichia coli* (Angulo et al., 1989), a qual participa do reparo recombinacional do DNA e na regulação de genes da resposta SOS. Tal resposta acontece na presença de grande quantidade de danos letais no DNA, resultando na ativação de aproximadamente 20 genes envolvidos no reparo e na recombinação do DNA (Anderson e Kowalczykowski, 1998). Tal reação cruzada ocorre devido à presença de uma região conservada de 40 aminoácidos (posições 162-201) (**RH**, Figura 1) que apresenta homologia de 49% com a extremidade C-terminal da RecA, a qual atua na regulação da ligação ao DNA (Angulo et al., 1991). Adicionalmente, a kin17 apresenta um sinal de localização nuclear (**NLS**, Figura 1) e um motivo dedo de zinco de ligação ao DNA (**ZF**, Figura 1), ambos homólogos àqueles observados na proteína de reparo poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) (Mazin et al. 1994). Recentemente, um motivo KOW foi identificado entre os aminoácidos 330 e 363, sendo confirmado por análise de cristalografia da extremidade C-terminal da kin17 (le Maire et al., 2006). Tais motivos estão relacionados com interações proteína-RNA e proteína-proteína nos processos de metabolismo do RNA (Steiner et al., 2002).

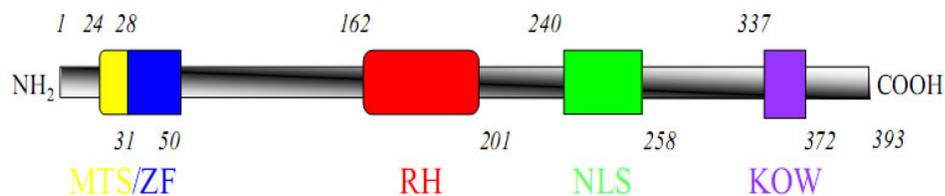


Figura 1. Domínios funcionais da proteína kin17. **MTS**: sinal putativo de localização mitocondrial; **ZF**: dedo de zinco; **RH**: domínio de homologia à proteína RecA de *E. coli*; **NLS**: sinal de localização nuclear; **KOW**: motivo KOW. Extraído de Despras, 2006.

O gene KIN17 está situado no cromossomo 2 em murinos e no braço curto do cromossomo 10 em humanos, codificando para uma proteína de aproximadamente 45 kDa e ponto isoelétrico de 9,3 (Angulo et al., 1991; Kannouche et al., 2000). O gene é conservado filogeneticamente em eucariotos, visto que foram identificados ortólogos em organismos diversos como o vegetal *Arabidopsisthaliana*, o inseto díptero *Drosophilamelanogaster*, o nematóide *Brugiamalayi* e a levedura *Schizosaccharomycespombe* (Despraset al., 2003).

Uma série de estudos identificaram o papel da kin17 em processos nucleares, principalmente na replicação e no reparo do DNA. Células transfectadas com RNA antisenso da kin17, apresentando assim baixos níveis da proteína, apresentam taxa reduzida de síntese de DNA, acúmulo na fase S e são mais sensíveis à mutagênese (Biardet al., 2002; Despras et al., 2003). Em contrapartida, a superexpressão da proteína resulta em inibição da proliferação celular (Kannouche e Angulo, 1999), indicando que o nível da expressão da kin17 deve ser estritamente regulado para o funcionamento adequado do ciclo celular. Agentes mutagênicos como radiação ionizante e luz ultravioleta induzem uma resposta tardia da kin17, resultando em aumento da expressão e alteração da localização nuclear (Kannouche et al., 2000; Biard et al., 2002).

Recentemente, foi constatado que a kin17 está associada ao complexo multiprotéico de replicação do DNA, em conjunto com outras proteínas como a RPA70 (*human replication protein A*), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) e DNA polimerase α . Além disso, tal proteína associa-se diretamente a certas regiões de origens de replicação. Complexos multiprotéicos isolados de células HeLa (provenientes de carcinoma cervical humano) capazes de realizar replicação do DNA *in vitro* apresentam atividade reduzida quando a kin17 é inibida por imunodepleção (Miccoli et al., 2005).

Em muitas linhagens celulares derivadas de tumores, foi constatado um alto nível de expressão da kin17 (Kannouche et al., 2000; Despras et al., 2003), assim como em tecidos tumorais de pacientes de câncer de mama (Zeng et al., 2011). Este último estudo apontou que a kin17 pode ser um potencial alvo no tratamento desse tipo de câncer, e correlacionou a expressão dessa proteína com fatores de regulação do ciclo celular, como a ciclina D1 e o ERK1/2 (*extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*).

Os dados obtidos até o momento sugerem que a kin17 pode atuar como um elo de ligação entre processos de replicação e reparo do DNA, impedindo a parada do ciclo celular devido a presença de lesões não reparadas no DNA. Além disso, a proteína kin17 também é parte do spliceossomo (Rappilberet et al., 2002) e pode ser capaz de se associar diretamente a moléculas de mRNA durante a espermatogênese, demonstrando que a proteína apresenta um papel no processamento do RNA. Tais processos podem ser regulados pela presença do motivo KOW (Pinon-Lataillade et al., 2004).

ROTEIRO DE AULA PRÁTICA

Análise da expressão protéica em linhagens celulares

Objetivos: Obter extratos de proteínas citoplasmáticas e nucleares (associadas e não-associadas à cromatina) de linhagens celulares tumorais e não-tumorais. Detectar por western blot a proteína de reparo kin17 nos diferentes extratos, de modo a comparar o nível de expressão da proteína entre as diferentes linhagens celulares utilizadas e as respectivas frações celulares isoladas.

1. Cultura de células

- As células tumorais, de melanoma utilizadas no experimento serão uma sublinhagem da linhagem B16F10, isolada na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), do Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Freitas et al., 2004) e gentilmente doadas pela Professora Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues, denominada B16F10-10CR. Elas serão cultivadas em meio RPMI-1640, pH 7.2, suplementado com HEPES 10mM, bicarbonato de sódio 24mM, gentamicina 40mg/ml e soro fetal bovino 10% (Freitas et al., 2004).

- A linhagem não-tumoral utilizada no experimento será de fibroblastos de pulmão de hamster Chinês, linhagem GMA32, os quais serão cultivados em meio mínimo essencial

- MEM, como previamente descrito (Debatisse, 1982). Essas células foram gentilmente cedidas pela Dra. Michelle Debatisse (Institut Curie, Paris, França).

2. Fracionamento da cromatina

- Lavar aproximadamente 7×10^6 células em PBS 1X;
- Ressuspender as células em 250 μ l de **Buffer A**;
- Adicionar Triton X-100 a uma concentração final de 0,1% (5 μ l de uma solução 5%) e incubar por 5 minutos no gelo;
- Centrifugar por 4 minutos a 1300g e 4°C;
- O sobrenadante é a fração citoplasmática de proteínas (**S1**). Retirar o sobrenadante, transferir para um tubo de 1,5 ml novo e armazenar a -20°C (freezer);
- O precipitado é a fração nuclear de proteínas (**P1**). Lavar **P1** com 200 μ l de **Buffer A**, centrifugando por 4 minutos a 1300g e 4°C;
- Retirar o sobrenadante e armazenar a -20°C (**S1a**);
- Ressuspender **P1** em 175 μ l de **Buffer B** para a lise dos núcleos e incubar por 10 minutos no gelo;
- Centrifugar por 4 minutos a 1700g e 4°C;
- O sobrenadante é a fração de proteínas nucleares solúveis (**S2**). Retirar o sobrenadante e armazenar a -20°C;
- O precipitado é a cromatina (**P2**). Ressuspender em 175 μ l de Buffer B (pode ser um pouco difícil, seja cuidadoso);
- Centrifugar por 1 minuto a 10000g e 4°C;
- Ressuspender em 150 μ l de tampão de amostra para proteínas 1X (B7709S da Biolabs já preparado com DTT);
- Adicionar 2,5 μ l de Benzonasenuclease e incubar por 30 minutos à temperatura ambiente;
- Ferver a 95-100°C por 5 minutos.

Buffer A: Hepes pH 7,9 10 mM; KCl 10 mM; MgCl₂ 1,5 mM; sacarose 0,34 M; glicerol 10%; DTT 1 mM. Adicionar 1 μ l de inibidor de protease para cada 100 μ l de tampão.

Buffer B: EDTA 3 mM; EGTA 0,2mM; 1 mM DTT. Adicionar 1 μ l de inibidor de protease para cada 100 μ l de tampão.

2. Eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

2.1 Fundamentos da eletroforese

Eletroforese pode ser definida como “o movimento de moléculas eletricamente carregadas, pela aplicação de um campo elétrico, através de um suporte”. Como a velocidade em que as moléculas se movem em um campo elétrico depende de suas cargas, forma e tamanho, a eletroforese tem sido amplamente estudada como ferramenta para separação molecular. Como ferramenta analítica, a eletroforese é simples e relativamente rápida. É usada para análise, separação e purificação de moléculas grandes como proteínas e ácidos nucleicos, mas também pode ser adaptada para a separação de moléculas mais simples (desde que carregadas) como açúcares simples, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e até mesmo íons. Métodos de detecção de alta sensibilidade têm sido desenvolvidos para monitorar e analisar separações eletroforéticas.

A eletroforese de macromoléculas normalmente é realizada aplicando-se uma fina camada de amostra em uma solução estabilizada em uma matriz porosa. Sob a influência de uma voltagem aplicada, os diferentes tipos de moléculas presentes em uma amostra movem-se através da matriz com velocidades diferentes. Ao fim da separação, as moléculas de tamanho diferentes são detectadas em diferentes posições na matriz. Diferentes tipos de matriz podem ser utilizados, desde papel, acetato de celulose, géis compostos por agarose ou poliacrilamida. Nos géis de poliacrilamida e agarose, a matriz pode ser tamanho-seletiva no processo de separação, controlando-se a concentração dos componentes do gel. Ao final da separação, as bandas podem ser coradas com diferentes tipos de produtos (Ex. brometo de etídio para DNA, Coomassie Brilliant Blue para proteínas), visualizadas e escaneadas por diferentes processos. No SDS-PAGE, as amostras de proteínas migram em uma condição desnaturante, pela ação do detergente SDS (dodecilsulfato de sódio) e outros componentes no sistema (Figura 2).

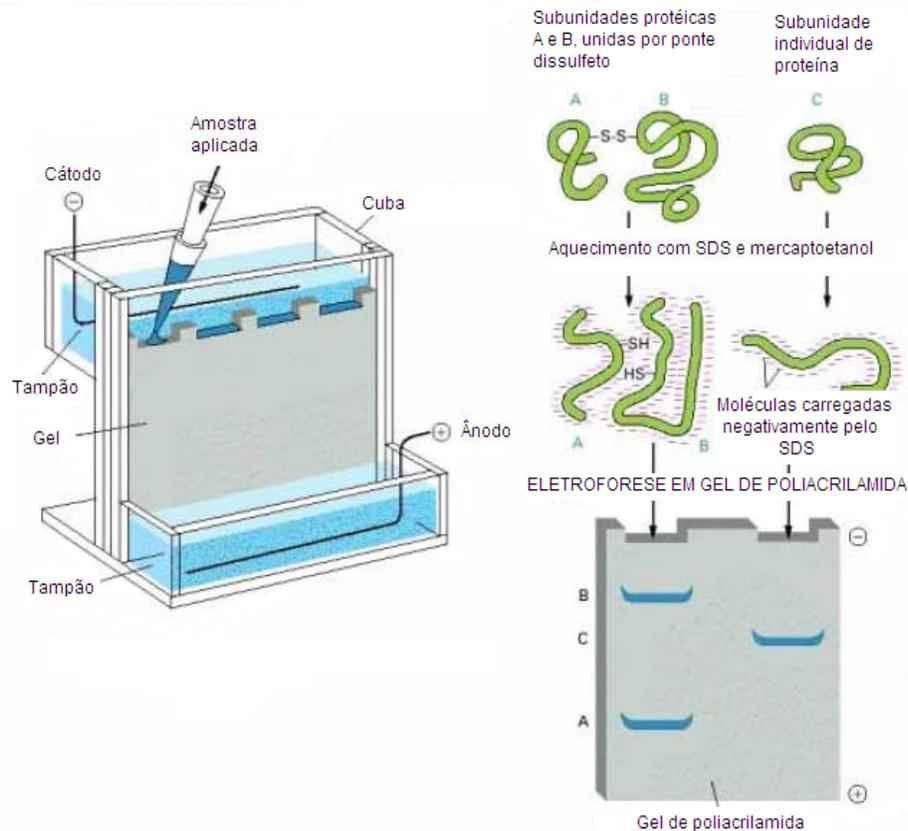


Figura 2.Esquema da eletroforese de proteínas (SDS-PAGE).

2.2 Preparação de gel de poliacrilamida(SDS-PAGE) para a separação de proteínas

A) Tampão de corrida (0.025 M Tris, 0.192 M Glicina, 0.1% SDS, pH 8,3).

B) Gel de empilhamento (superior) a5% (para 5 ml)

Componente	Volume (ml)
Água destilada	3.4
Solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%	0.83
Tris 1M (pH 6,8)	0.63
SDS 10%	0.05
Persulfato de amônio 10%	0.05
TEMED	0.005

C) Gel de separação (inferior) a 12 % (para 10 ml)

Componente	Volume (ml)
Água destilada	3.3
Solução de acrilamida/bis-acrilamida 30%	4
Tris 1,5M (pH 8,8)	2.5
SDS 10%	0.1
Persulfato de amônio 10%	0.1
TEMED	0.004

D) Preparo das amostras

Misturar as amostras de proteínas com tampão de amostra 1X (B7709S da Biolabs já preparado com DTT) e ferver por 5 minutos a 95-100°C. Aplicar no gel seguindo a ordem estabelecida e correr a eletroforese até as amostras passarem pelo gel de empilhamento (60 volts) e depois aumentar a voltagem (100 volts) acompanhando a migração.

3. Western blotting

3.1 Fundamentos do Western blotting

O Western blotting localiza, com o uso de anticorpos específicos, proteínas que foram previamente separadas através de eletroforese em gel (Figura 3). O procedimento utiliza membranas, normalmente de nitrocelulose ou PVDF (*polyvinylidene fluoride*). O gel é colocado em contato com a membrana e a aplicação de uma corrente elétrica força as proteínas a se moverem do gel para a membrana e se aderirem a ela. A membrana então é uma réplica do padrão de proteínas no gel, e é subsequentemente corada com o corante Ponceau-S e incubada com anticorpos específicos que irão se ligar à proteína de interesse e localizá-la entre as demais proteínas.

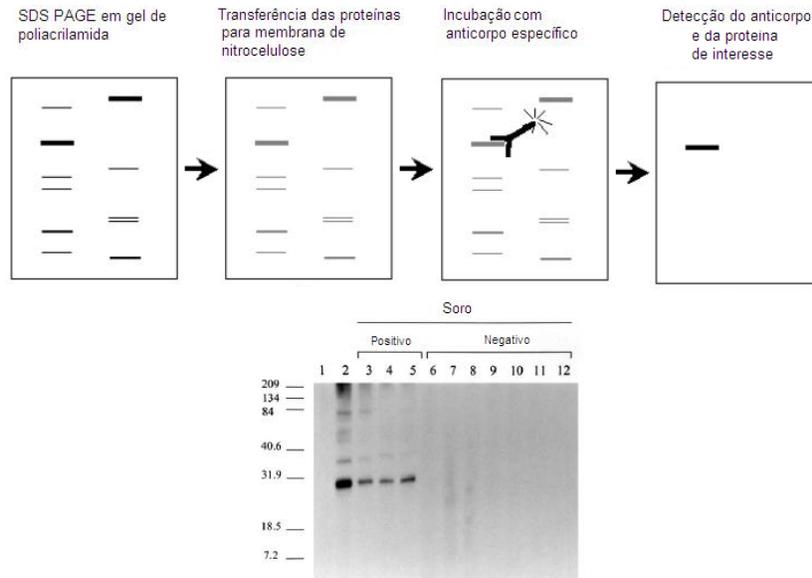


Figura 3. Esquema geral do Western blotting.

3.2 Procedimento

A) Tampão de transferência (submersa) para Westernblotting: 14.4 g de glicina, 3 g de Tris, 900 ml de água destilada, 100 ml de metanol). Metanol é muito tóxico, use luvas durante o prepare e manuseio. pH final: 8.3 Resfriar (4° C) antes de usar.

B) Montagem do sistema de transferência

1. Retire o(s) cassette(s) do mini-gel (placas e gel) do sistema Biorad após a migração das proteínas na eletroforese.
2. Remova o(s) gel(is) das placa com cuidado, pois as placas de vidro (principalmente a placa fina) são muito frágeis. Com auxílio da espátula verde de plástico remova o gel de empilhamento completamente. Lave o gel com água destilada para remover o excesso de SDS.
3. Coloque o gel de separação em tampão de transferência por 15 minutos.
4. Molhe a membrana de nitrocelulose com água destilada estéril e coloque em tampão de transferência por 15 minutos. Coloque também os papéis de filtro Whatman e esponjas espaçadoras em tampão de transferência por 15 minutos.
5. Monte o cassette de transferência de acordo com a ordem abaixo (ver Figura 4), com todas as partes previamente equilibradas em tampão de transferência por pelo menos 15 minutos.

6. Montar o sistema de acordo com a Figura 4 (tenha certeza de que não ficaram bolhas de ar entre o gel e a membrana, retirando as bolhas rolando a extremidade de uma pipeta ou tubo de ensaio sobre a membrana)

Após a montagem, coloque o cassete no sistema e coloque o sistema de resfriamento no interior da cuba. Ligue o sistema (70 volts) por 40 minutos, depois aumente a voltagem (100 volts) por mais 20 minutos. Verifique se há pequenas bolhas se formando nos eletrodos (eletrólise).

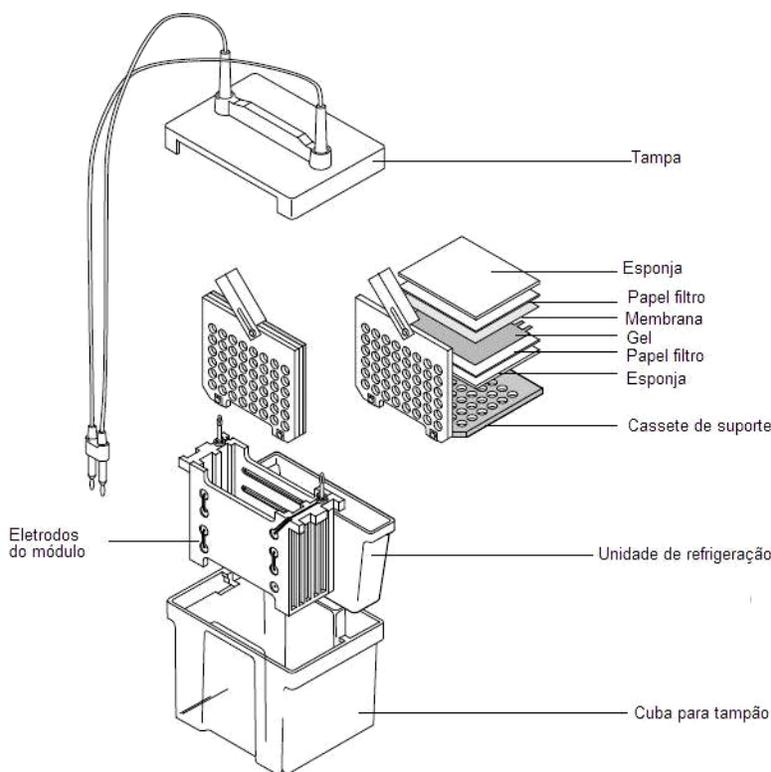


Figura 4. Esquema de montagem do cassete de transferência por Western Blotting.

C) Coloração com Ponceau-S: 0,5% PonceauS (w/v), 1% ácido acético (v/v).

A coloração de proteínas com Ponceau-S é importante por ser temporária, você poderá comparar sua membrana após a detecção com anticorpos com a coloração de Ponceau-S. Este corante pode ser reutilizado várias vezes.

1. Incube a membrana por 5 minutos no corante. Recupere o corante e guarde.
2. Com o auxílio de um pissete e uma pinça, lave a membrana com água destilada até que a mesma fique branca e as proteínas sejam visíveis (lave dos dois lados).

Corte a membrana do tamanho adequado, deixando uma margem de 0,5 cm de todos os lados (manipular a membrana utilizando luvas e com o auxílio de pinças e tesouras limpas).

3. Descore com mais água destilada para remover o corante residual.
4. Neste ponto, a membrana deve ser escaneada ou fotografada, para uso futuro em análise de imunoblotting, ou desidratadas, envoltas em papel e armazenadas a 4°C para uso futuro.

D) Análise em *Immunoblotting* – Detecção com *ECL Plus Westwern Blotting reagents*.

Antes de iniciar esta etapa do protocolo, incube a membrana em TBS-T 1X (Tris-HCl 100 mM pH 7,5; NaCl 1.5 mM; 0.05% Tween-20) até a remoção completa do Ponceau-S (normalmente 10 min são suficientes).

1. Bloqueie a membrana incubando em solução a 5% (w/v) de albumina (Sigma) em TBS-T 1X por 1 hora a temperatura ambiente.
2. Diluir o anticorpo primário em TBS-T/albumina 5%. Diluição apropriada: 1:10000. Incubar a membrana em contato com a solução do anticorpo primário em saquinho plástico vedado por 1 hora à temperatura ambiente (ou “overnight” a 3-8°C) sob agitação (a diluição do anticorpo primário pode ser diferente dependendo do material).
3. Lavar a membrana três vezes por 5 minutos com TBS-T 1X (sem albumina). Enquanto é feita a lavagem, preparar anticorpo secundário.
4. Diluir o anticorpo secundário em TBS-T/albumina 5%. Diluição apropriada: 1:20000. Incubar com anticorpo secundário à temperatura ambiente por 1 hora.
5. Lavar a membrana três vezes por 5 minutos com TBS-T 1X. Preparar a solução de revelação do kit de revelação para Western blotting *ECL Plus* (Misturar os reagentes A e B em uma relação de 40:1, por ex. 0,5 ml da sol. A + 12.5 µl da sol. B, suficiente para duas membranas). Misturar os reagentes imediatamente antes de sua utilização, no escuro.
6. Coloque a membrana em uma placa de Petri limpa, com o lado das proteínas para cima. Pipete a solução de revelação sobre a membrana e incline a placa em vários sentidos para que a solução cubra toda a superfície da membrana. Incube a membrana na solução de revelação por 3 minutos, cobrindo a membrana com papel alumínio para evitar a luz (ligar o equipamento Storm).

7. Com um pissete, lave a membrana abundantemente com água destilada, usando pressão para retirar a solução de revelação.
8. Coloque a membrana entre duas folhas de plástico transparente apoiado em uma superfície limpa. Com papel higiênico remova as bolhas de ar cuidadosamente.
9. Detectar no Storm (canal azul) ou nos dois canais (azul e vermelho, para confirmação do padrão se necessário). A membrana deve ser colocada no scanner de modo que o lado da transferência deve ficar voltado para baixo. Se a imagem aparecer muito escura, repita os passos de lavagem da membrana com água destilada e pissete, sempre trocando as folhas de plástico para proteger a membrana e realizando nova detecção, até que o “background” esteja claro e as bandas sejam visíveis.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. G.; KOWALCZYKOWSKI, S. C. Reconstitution of an SOS response pathway: derepression of transcription in response to DNA breaks. **Cell** 95: 975-979, 1998.

ANGULO, J. F.; MOREAU, P. L.; MAUNOURY, R.; LAPORTE, J.; HILL, A. M.; BERTOLOTI, R.; DEVORET, R. Kin, a mammalian nuclear protein immunologically related to *E. coli* RecA protein. **Mutation Research** 217: 123-134, 1989.

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** 19: 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** 277: 19156-19165, 2002.

DESPRAS, E. Les proteines kin17, xpc, dna-pkcset xrcc4 dans la reponse cellulaire aux dommages de l'adn. Etude des relations entre la reparation par excision de nucleotides et la recombinaison non homologue dans un modele syngénique humain. **These de docteur aux biologes cellulaires et moléculaires. Université Paris V, Paris, França**, 2006.

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** 159: 748-758, 2003.

FREITAS, ZFO; RODRIGUES, EG; OLIVEIRA, V; CARMONA, A K; TRAVASSOS, LR. (2004) 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

KANNOUCHE, P.; MAUFFREY, P.; PINON-LATAILLADE, G.; MATTEI, M. G.; SARASIN, A.; DAYA-GROSJEAN, L.; ANGULO, J. F. Molecular cloning and characterization of the human KIN17 cDNA encoding a component of the UVC response that is conserved among metazoans. **Carcinogenesis** 21: 1701-1710, 2000.

LE MAIRE, A.; SCHILTZ, M.; STURA, E. A.; PINON-LATAILLADE, G.; COUPRIE, J.; MOUTIEZ, M.; GONDROY, M.; ANGULO, J. F.; ZINN-JUSTIN, S. A tandem of SH3-like domains participates in RNA binding in KIN17, a human protein activated in response to genotoxics. **Journal of Molecular Biology** 364: 764-776, 2006.

MAZIN, A.; TIMCHENKO, T.; MURCIA, J. M.; SCHREIBER, V.; ANGULO, J.; MURCIA, G.; DEVORET, R. Kin17, a mouse nuclear zinc finger protein that binds preferentially to curved DNA. **Nucleic Acids Research** 22: 4335-4341, 1994.

PINON-LATAILLADE, G.; MASSON, C.; BERNARDINO-SGHERRI, J.; HENRIOT, V.; MAUFFREY, P.; FROBERT, Y.; ARANEDA, S.; ANGULO, J. F. KIN17 encodes an RNA-binding protein and is expressed during mouse spermatogenesis. **Journal of Cell Science** 117: 3691-3702, 2004.

RAPPSILBER, J.; RYDER, U.; LAMOND, A. I.; MANN, M. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. **Genome Research** 12: 1231-1245, 2002.

STEINER, T.; KAISER, J. T.; MARINKOVIC, S.; HUBER, R.; WAHL, M. C. Crystal structures of transcription factor NusG in light of its nucleic acid- and protein-binding activities. **The EMBO Journal** 21: 4641-4651, 2002.

ZENG, T.; GAO, H.; YU, P.; HE, H.; OUYANG, X.; DENG, L.; ZHANG, Y. Up-regulation of kin17 is essential for proliferation of breast cancer. **Plos One** 6, 2011.