Sistema de localização celular para a proteína reguladora de splicing RBFOX-1

Luidy K. Issayama*, Fulvia Di Pillo, Natassia C. M. Oliveira, Katlin B. Massirer

Resumo

Em neurônios, existe uma importante proteína ligante ao RNA (RBP) que promove eventos de splicing alternativo, chamada RBFOX-1, que se liga à uma sequência específica de nucleotídeos (UGCAUG) de pré-mRNAs destas células. Foi visto que a enzima quinase WNK-3 fosforila RBFOX-1, fazendo com que esta seja transportada para o citoplasma onde permanece inativada. Através de ensaios de imunofluorescência e transfecção de plasmídeos, estabelecemos técnicas de análise da localização celular da proteína RBFOX.

Palavras-chave:

células-tronco humanas, Proteínas de ligação ao RNA, RBFOX

Introdução

As proteínas ligantes ao RNA (RBP) são importantes reguladoras dos processos pós-transcricionais, pois controlam eventos como o splicing alternativo, transporte, degradação e estabilidade do RNA. Consequentemente, alterações na expressão dessas proteínas podem levar a enfermidades como Parkinson (FAF1), autismo (FOX1), esclerose lateral amiotrófica (TDP43), e Alzheimer (Musashi).

A proteína RBFOX é uma RBP encontrada em neurônios de mamíferos que regula eventos de splicing alternativo, ela se liga a um sítio específico no pré-mRNA e promove a adição ou exclusão de éxons alternativos. Existem três integrantes desta família: RBFOX-1 (A2BP1 ou Fox-1), expressa em cérebro, músculos esqueléticos e coração; RBFOX-2 (RBM9), encontrada em diversos neurônios; e RBFOX-3, que foi recentemente descoberto ser a mesma molécula conhecida como um marcador de neurônios pós-mitóticos, NeuN (Neuronal Nuclei).

A localização da RBFOX determina o estado de ativação de splicing, permanecendo ativo no núcleo e inativo no citoplasma. Esta localização pode estar relacionada com a atividade da enzima quinase WNK (With no K – Sem lisina), visto que ela interage com sítios específicos da RBFOX, entretanto não existem estudos suficientes que confirmam esta hipótese. Portanto, um dos objetivos do trabalho é a transfecção de um vetor plasmidial GFP-RBFOX construído no laboratório que irá determinar a localização da RBFOX em neurônios. Futuramente, serão investigados inibidores de quinases e sua interação com a RBFOX.

Resultados e Discussão

Imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado após 48 horas a partir da transfecção por lipofectamina em cultura de células HEK293T, com a fixação por formol 3,7% e incubação com anticorpo primário (Rabbit anti-RBM9 1:1000) overnight. Após a incubação com anticorpo primário, foi adicionado o anticorpo secundário (anti-rabbit Cy3 1:250) e, ao final foi feito a o preparo das lâminas com meio de montagem anti-fade with DAPI. As análises foram realizadas em microscópio de fluorescência e microscópio LEICA TCS SP5 II (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida - LaCTAD) (Figura 1)

Quantificação

Futuramente, as imagens obtidas pelo microscópio confocal podem ser quantificadas utilizando o software ImageJ, através da determinação de regiões de interesse.

Figura 1.

Imunofluorescência de células HEK293T. Nas linhas estão representadas as transfecções com os plasmídeos. Nas colunas, as fluorescências do núcleo (TO-PRO3), GFP e RBFOX2 (Cy3). Merge representa as imagens sobrepostas.

Conclusão

Os resultados sugerem que o plasmídeo pcDNA3.1(+) GFP-RBFOX2 apresenta expressão de GFP e RBFOX2 como esperado. Além disso, o trabalho permitiu o estabelecimento de diversos protocolos e preparação para futuros resultados no trabalho de avaliação da localização celular da proteína RBFOX, incluindo a quantificação de proteína presente no núcleo e no citoplasma dos ensaios de imunofluorescência. Em seguida, o sistema de localização estará em condições de ser testado em culturas primárias de neurônios gerados de células-tronco embrionárias humanas.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Katlin Brauer Massirer, e à equipe do laboratório, à equipe de Biologia Celular do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pelas contribuições nas etapas de microscopia confocal. E à Unicamp pelo oferecimento da bolsa PIBIC.

¹Lunde, B. M.; Moore, C. e Varani, G. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, 8 (6), 479-490.6

²Wells, D. G. *J. Neurosci.* **2006**, 26 (27) 7135-7138

³Jin, Y.; Suzuki, H.; Maegawa, S.; Endo, H.; Sugano, S.; Hashimoto, K.; Yasuda, K. e Inoue, K. **2003**, 22(4): 905-912

⁴Lovci, M. T.; Ghanem, D.; Marr, H.; Arnold, J.; Gee, S.; Parra, M.; Liang, T. Y.; Stark, T. J.; Gehman, L. T.; Hoon, S.; Massirer, K. B.; Pratt, G. A.; Black, D. L.; Gray, J. W.; Conboy, J. G. e Yeo, G. W. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, 20, 1434-1442