

2.08.04 - Bioquímica / Biologia Molecular

ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS LIGADORAS DE ACIL-COENZIMA A EM *Tribolium castaneum* POR RNA INTERFERENTE

COSTA, M.M.¹; SANTANA, C.C.¹; GONDIM, K.C.²; MAJEROWICZ, D.²; DORNELAS, C.B.¹; GRILLO, L.A.M.¹

¹ Universidade Federal de Alagoas ² Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Resumo:

O *Tribolium castaneum*, é um pequeno besouro de simples manutenção que tem emergido como um sofisticado modelo para estudo, assim como a *Drosophila*. Proteínas ligadoras de acil-CoA (ACBP) protegem e transportam acil-CoA direcionando-o entre outras coisas para reações do metabolismo de lipídeos. Este trabalho tem por objetivo compreender a função do gene ACBP no *T. castaneum* através de silenciamento por RNA interferente. Em análise da expressão do gene ACBP, foi evidenciada expressão mais relevante no inseto adulto e na larva, embora o gene seja expresso em todas as fases de desenvolvimento. Foram silenciadas larvas com 25 dias e o efeito do silenciamento do gene TcACBP-6 causou redução significativa da beta oxidação. Os resultados apresentados, mostraram uma significativa expressão desse gene no momento de transição da fase de larva para adulto, considerando uma função importante desta no direcionamento de ácidos graxos para beta oxidação.

Palavras-chave: transporte da acil-CoA; silenciamento; inseto.

Apoio financeiro: CNPq; FAPEAL

Introdução:

Proteínas ligadoras de acil-CoA (ACBP) constitui uma família de proteínas que regulam a disponibilidade desses lipídeos para os diversos processos metabólicos celulares. As proteínas de domínio ACBP são altamente conservadas e ligam acil-CoA graxos de cadeia longa com grande afinidade e os protegem de hidrólise (Majerowicz et al., 2016). Nos insetos, as células do epitélio intestinal absorve os ácidos graxos presente na dieta e, provavelmente, os convertem nos seus derivados esterificados à coenzima A antes da síntese de lipídeos complexos, como diacilglicerol, que será transferido para a lipoforina. Os acil-CoA de cadeia longa servem como importantes intermediários na biossíntese de lipídeos e degradação de ácidos graxos. Além dessas funções básicas, os acil-CoA têm importantes funções na regulação do metabolismo intermediário e expressão gênica (Knudsen, Neergaard et al., 2000). Assim sendo, a ACBP, pelo seu o alto grau de conservação por todas as espécies eucarióticas, e o fato desta proteína ser expressa na maioria das células e tecidos, sugerem que suas funções estão associadas a um ou mais processos básicos e comuns a todas as células. No entanto, seu papel preciso no metabolismo de lipídio ainda não é completamente conhecido.

O inseto *Tribolium castaneum*, modelo deste estudo, está em crescente aplicação em pesquisas de análise genética funcional de questões biológicas básicas, assim como a *Drosophila*, devido em parte, à facilidade de interferência de RNA (Susan J. Brown, et al., 2009). O silenciamento por RNAi é um método útil para avaliar fenótipos de perda de função em muitos organismos, incluindo insetos (Yoshinori Tomoyasu; Robin E. Denell, 2004).

Portanto, o escopo deste trabalho é avaliar a expressão de um dos genes para ACBP em *T. castaneum*, nomeado TcACBP-6, em todas as etapas de desenvolvimento do inseto, e tentar compreender a função desse gene através do silenciamento pela técnica de RNA interferente e seu consequente efeito fisiológico na beta oxidação de lipídeos.

Metodologia:

1) Pesquisa de sequências homólogas e análise bioinformática

A busca foi realizada utilizando a sequência consenso do domínio ACBP do banco de dados do Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) e investigação pelo Ensembl Metazoa (<http://metazoa.ensembl.org/biomart/martview/>) com pesquisa de dados no bioMart (Metazoa Mart), o

qual tornou existente 5 sequências de ACBPs no inseto. Foi prosseguida análise com o código da sequência primária da ACB1p de *S. cerevisiae* (AAA34384) com o algoritmo tBlastn (Altschul, Madden et al., 1997) no genoma do *T. castaneum*. Foram identificadas 6 sequências codificantes, confirmadas no Banco de Dados de Domínios Conservados (CDD - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

2) Caracterização da expressão gênica de ACBP em tecidos por reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

Foi determinada a concentração dos primers em 0,2µM, utilizando 20ng de RNA total. Os dados da análise de expressão relativa do gene TcACBP-6 foram normalizados utilizando a PS3 como gene de controle endógeno (SANG, et al 2015). O qPCR foi realizado em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) usando Power SYBR® Green PCR Master Kit (Applied Biosystems).

3) Silenciamento por RNAi

a. Síntese de dsRNA

Foram sintetizados primers específicos para a sequência do gene (senso- GGAAATTTACGCTTTATTTA / anti-senso- TTATTGTAAACCGATGGAT) associados ao iniciador T7minimal (5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG G - 3'). Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e sintetizados pela empresa DNA Express Biotecnologia (Guarulhos, São Paulo). Como controle não relacionado, foi produzido um dsRNA homólogo a uma proteína ligadora de maltose de *Escherichia coli* (dsMal).

Os dsRNAs foi produzido com o kit MEGAScript® RNAi Kit (Ambion, Austin, EUA). As amostras de dsRNA foram quantificadas em Nanodrop ND- 1000, evaporadas totalmente em liofilizador a vácuo e ressuspensas em água mili-Q até a concentração de 2,17 µg/µl.

b. Silenciamento de larvas de *T. castaneum*

Foi realizado através da injeção de 0,15µg de dsRNA em larvas no 20º dia de desenvolvimento. Após 3 dias as larvas foram homogeneizadas em 600 µl de reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, EUA) para extração de RNA, tratadas com DNase I (Fermentas International Inc., Burlington, Canadá) e quantificadas em Nanodrop ND- 1000. Para a síntese de cDNA, utilizou-se o kit High-Capacity cDNA Reserve Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

c. Efeito do silenciamento na β-oxidação e no conteúdo de triacilglicerol (TAG)

Para a β oxidação, a radioatividade associada à fração aquosa foi determinada por contagem em cintilador líquido na presença de 2 mL de Optiphase Hisafe 3 (Perkin-Elmer). O conteúdo total de TAG (Labtest Reagentes, MG, Brasil) foi avaliado em relação ao conteúdo de proteína (LOWRY et al. (1951)). nas larvas silenciadas e larvas controle.

Resultados e Discussão:

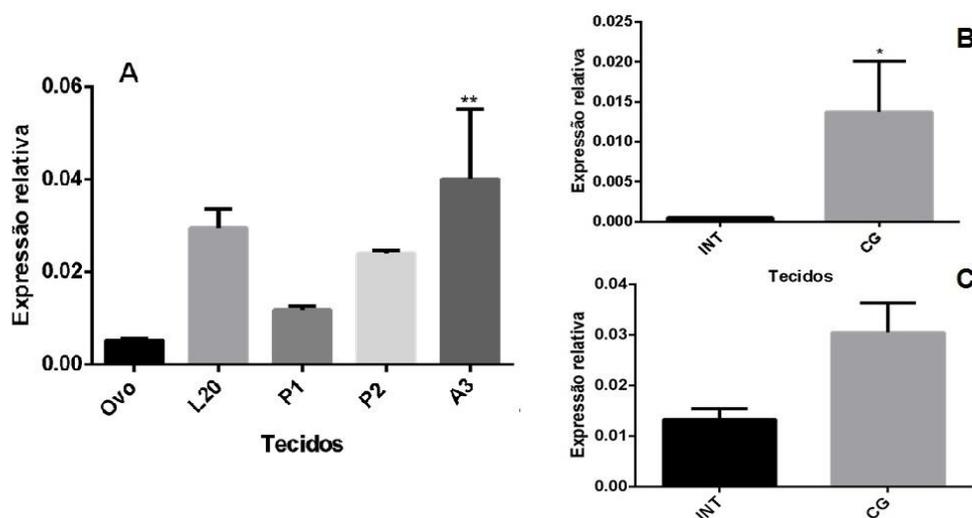
Na busca pelos genes da família ACBP no genoma do *T. castaneum*, foram confirmadas 6 sequências codificantes. O gene TcACBP-6 (~ 9,9 KDa e pI ~ 7,77), apresenta a sequência mais recente adicionada ao banco de dados genômico do NCBI, mostrou-se bastante conservada quando comparada às outras ACBPs já descritas.

De acordo com o que se conhece a respeito do metabolismo de lipídeos em insetos, visualiza-se na fase de larva aumento do armazenamento lipídico no corpo gorduroso para posteriormente ser utilizado na fase de pupa e inseto adulto (ATELLA; MAJEROWICZ; GONDIM, 2012). Na larva no 20º dia de crescimento, que é considerado um momento próximo a mudança para fase de pupa, se torna visível uma expressão maior em relação aos demais estágios, com exceção do adulto (**Fig.1A**). Na fase de pupa (P1-pupa recém-formada) a expressão do gene é significativamente menor comparado aos valores no adulto. Neste momento não há mais absorção de lipídeos da dieta, restando apenas a mobilização de ácidos graxos do corpo gorduroso. Ao contrário do que acontece na fase inicial da pupa, o fim do estágio (P2), condicionou um aumento da expressão até a fase adulta.

O resultado inicial da expressão desse gene em várias etapas de desenvolvimento orientou a investigação da expressão para os principais tecidos envolvidos na sua atividade. Dessa maneira, a expressão do gene TcACBP-6 também foi analisada no corpo gorduroso e intestino das larvas (**Fig.1B**) sendo observada uma expressão majoritária no corpo gorduroso, quando comparado ao intestino. Entende-se nos insetos, que o corpo gorduroso é um órgão central para o metabolismo, atuando como local de síntese e estocagem de lipídeos, proteínas e carboidratos (ARRESE; SOULAGES, 2010).

A fim de evidenciar a mudança da expressão do gene TcACBP-6 na pupa, foi feita a análise diferenciando intestino e corpo gorduroso na fase P2 (**Fig.1 C**) onde foi constatada maior expressão no corpo gorduroso, fato que pode estar associado a síntese de novo ou desvio para β oxidação de ácidos graxos.

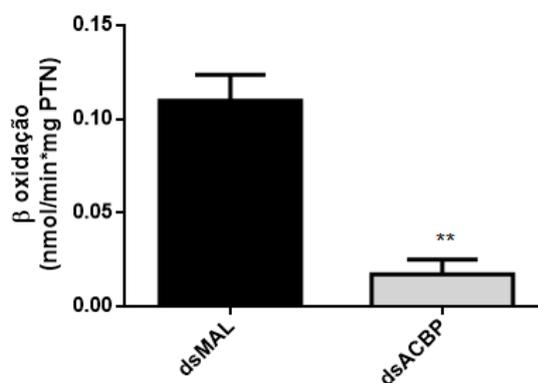
Fig.1- Expressão relativa do gene TcACBP-6 em (A) estágios de desenvolvimento; (B) intestino e corpo gorduroso da larva; (C) Intestino e corpo gorduroso da pupa 2 do *Tribolium castaneum* por qPCR.



Considerando a significativa expressão na fase de larva e melhor visualização dos efeitos fisiológicos nas mudanças de estádios, foram silenciadas larvas com 20 dias e comprovado o efeito por qPCR, onde o gene TcACBP6 apresentou uma redução significativa da expressão em relação ao controle não relacionado, dsMal, comprovando o silenciamento esperado.

O efeito fisiológico nas larvas silenciadas foi avaliado por ensaio de β oxidação e conteúdo de TAG após 7 dias. O resultado da medida de β oxidação mostrou significativa redução nas larvas silenciadas com dsACBP6 em comparação com o dsMal, o que sugere função dessa ACBP no direcionamento de acil-CoA para degradação lipídica (**Fig.2**). No entanto, a análise de conteúdo total de TAG por proteína, não mostrou redução significativa nas larvas silenciadas após 7 dias da injeção do dsRNA.

Fig.2- Redução da taxa de β -oxidação em larvas silenciadas após 7 dias.



Conclusões:

Foram constatadas 6 seqüências homólogas à ACBP no genoma do *T. castaneum*, em que a TcACBP-6, mostrou expressão diferenciada nos quatro estágios de desenvolvimento. Os resultados apresentados, mostram uma significativa expressão dessa ACBP no momento de transição da fase de larva para adulto. O estudo desse gene por silenciamento permitiu evidenciar uma possível função no direcionamento de ácidos graxos para beta oxidação através do knockout de função por RNAi.

Referências bibliográficas

Majerowicz D.; Hannibal-Bach, H. K.; Castro, R. S. C.; Bozaquel-Morais, B. L.; Alves-Bezerra, M., Grillo, L. A. M.; Masuda, C. A.; Færgeman, N. J.; Knudsen, J.; Gondim, K. C. The ACBP gene family in *Rhodnius prolixus*: Expression, characterization and function of RpACBP-1. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V. 72, p. 41-52, 2016.

Knudsen, J., T. B. F. Neergaard, et al. Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. **Journal of Nutrition**, v.130, n.2, p.294S- 298S. 2000.

Brown S. J; Shippy T. D; Miller S.; Bolognesi R.; Beeman R. W.; Lorenzen M. D.; Bucher G.; Wimmer E. A.; Klingler M. **Cold Spring Harb Protoc**. The red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera): a model for studies of development and pest biology, 2009.

Tomoyasu Y.; Denell, R. E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Dev Genes Evol**. V. 214, p. 575–578, 2004.

Sang, W.; He L.; Wang, X.; Zhu-Salzman, K.; Lei C. Evaluation of Reference Genes for RT-qPCR in *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) Under UVB Stress. **Environ. Entomol.** 44(2), 418–425, 2015.

Atella, G.C.; Majerowicz D.; Gondim, K. C.. Metabolismo de Lipídeos. **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular INCT – EM. Cap. 6, 2012.

Arrese, E.L.; Soulages, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. **Annu. Rev. Entomol.** 55, 207-225.