

INVESTIGAÇÃO DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DO GENE DA β 1,4-N-ACETILGALACTOSAMINYLTRANSFERASE EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMIAIS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO E LINHAGEM DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

Aline Grimaldi Lérias¹, Cristiane Maria de Borba¹, Bárbara Paranhos Coelho¹, Sílvia Resende Terra¹, Eduardo Chem², Vera Maria T. Trindade¹, Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma¹, Vanessa Schein¹.

¹Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil.



INTRODUÇÃO

Gangliosídeos são glicoesfingolípídeos que contêm ao menos um resíduo de ácido siálico. Eles são componentes da membrana plasmática e estão envolvidos em várias funções biológicas. Sabe-se que mudanças significativas no padrão de expressão de gangliosídeos ocorrem durante o desenvolvimento e diferenciação celular, sendo assim, os gangliosídeos tem sido freqüentemente usados como marcadores de desenvolvimento, tanto no contexto normal, quanto no tumorigênico. A enzima β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNac-T1) é uma enzima chave da síntese de gangliosídeos (Fig. 1). O gene *B4galnt1*, que a codifica, tem sido cogitado como marcador molecular em células tronco mesenquimais humanas, e sua expressão tem sido estudada para melhor se entender a rota e síntese e o estabelecimento do padrão característico de gangliosídeos de cada tipo celular. Segundo a base de dados de genomas Ensembl.org este gene possui 4 transcritos alternativos: um deles já havia sido identificado, e três permaneciam como transcritos preditos (Tabela 1). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a expressão destes transcritos alternativos em células tronco mesenquimais do tecido adiposo humano (MSC-TA) indiferenciadas e com diferenciação adipogênica e osteogênica, e na linhagem de neuroblastoma humana SH-SY5Y; e também caracterizar estes transcritos por análises *in silico*.

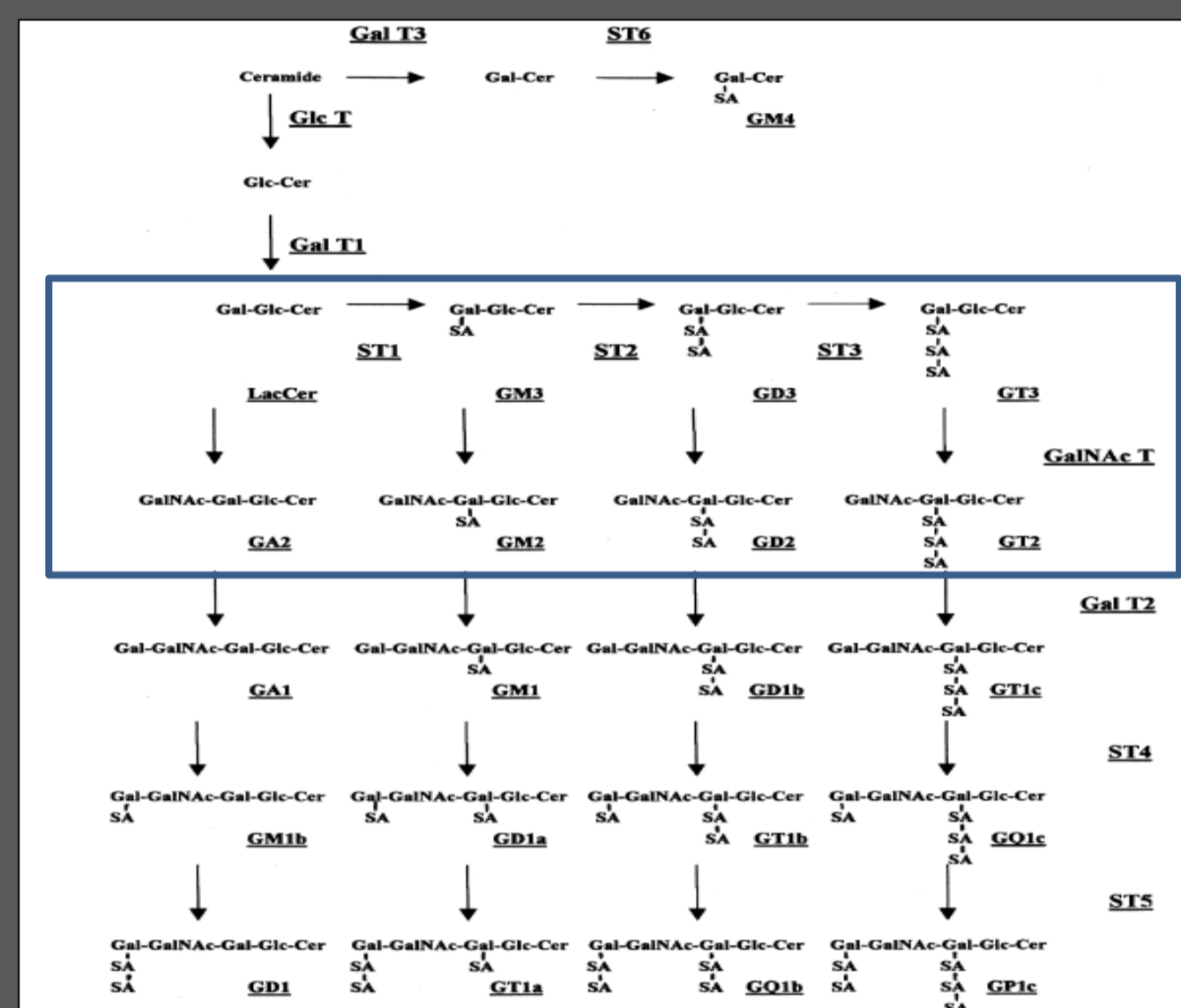


Fig. 1: Rota de síntese dos gangliosídeos (Yu *et al.*, 2004). Retângulo evidencia as reações da GalNac-T1.

Name	Transcript ID	Length (bp)	Protein ID	Length (aa)	Biotype	CCDS
B4GALNT1-201	ENST00000341156	3010	ENSP00000341562	533	Protein coding	CCDS8950
B4GALNT1-202	ENST00000418555	2845	ENSP00000401601	478	Protein coding	-
B4GALNT1-203	ENST00000419870	2911	ENSP00000390284	301	Protein coding	-
B4GALNT1-204	ENST00000449184	1419	ENSP00000392367	328	Protein coding	-

Tabela 1: Transcritos presentes no Ensembl.org. Retângulo mostra a enzima já descrita. As demais permaneciam como transcritos preditos por este banco de dados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de células: O tecido adiposo humano foi obtido de lipoaspirado eletivo seguindo as normas institucionais do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O lipoaspirado foi lavado com (PBS) e tratado com 0,075% de colagenase tipo I em PBS por 30 minutos a 37°. A colagenase foi inativada com igual volume de DMEM/10% SFB e a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm. A fração estromal foi ressuspensa em DMEM/10% SFB e a cultura realizada em garrafas 75 cm². Entre a 3ª e a 6ª passagem as células foram induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica, com 1 μ M de dexametasona, 10 μ M de insulina, 200 μ M de indometacina, e IBMX 0,5 mM; e 50 μ M de ácido ascórbico, 0,01M de β -glicerofosfato e 0,1 μ M de dexametasona, respectivamente. Ambas diferenciações seguiram pelos períodos de 7, 14 e 21 dias. A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y foi gentilmente cedida pelo professor Drº Fábio Klampf, e cultivada com DMEM: F12 (1:1) 15% FBS.

Citoquímica: A indução adipogênica foi confirmada através da coloração das gotículas de lipídeos com solução oil-red O em propilenoglicol. A indução osteogênica foi confirmada através da colocação dos precipitados de cálcio com alizarina red S. As imagens foram obtidas no microscópio invertido (Fig. 2).

Extração do RNA, síntese do cDNA e PCR semi-quantitativo: O mRNA total das células cultivadas foi extraído com o kit RNAqueous (Ambion, USA). A síntese de cDNA ocorreu por transcriptase reversa com o kit SuperScript III-RT (Invitrogen, USA) usando-se 0,5 μ g do RNA total tratado com DNase I (Amplification Grade kit, Invitrogen, USA). Primers para os transcritos alternativos do gene *B4galnt1* foram desenhados (software Beacon Design) baseados nas diferenças entre as seqüências nucleicas de cada transcrito previsto (<http://www.Ensembl.org>) (Fig. 3), e conferidos através da ferramenta Primer-Blast (banco de dados do NCBI). O gene da proteína de ligação a TATAbox (TBP) foi usada como gene endógeno. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 μ l, com 1 μ l de cDNA, 1X tampão, 2mM de MgSO₄, 0,2mM de dNTPs, 1 μ M de cada primer, e 0,5U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, USA) (Fig. 4).

Caracterização das seqüências dos transcritos do gene *B4galnt1*: Através do banco de dados Ensembl foi feita a pesquisa das seqüências nucleica e proteica dos 4 transcritos do gene *B4galnt1*. A fim de se fazer uma análise comparativa dos transcritos, as seqüências foram alinhadas pelo programa Clustal W, e o alinhamento foi editado pelo software GeneDoc 2.6. Foi pesquisada a presença de sítios de fosforilação e de N-glicosilação na base de dados da Plataforma ExPASy-programa ProSite (www.expasy.ch) e MiniMotif Miner Prediction (<http://sms.engr.uconn.edu/service/SMSSearchServlet>) (Fig. 5).

REFERÊNCIAS

- Yu RK, Bieberich E, Xia T, Zeng G. 2004. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res*, 45:783-793.
 Cheung IY, Cheung NK. 2001. Quantitation of marrow disease in neuroblastoma by real-time reverse transcription-PCR. *Clin Cancer Res*, 7:1698-1705.
 Kuo CT, Bostick PJ, Irie RF, Morton DL, Conrad AJ, Hoon DS. 1998. Assessment of messenger RNA of beta 1-4-N-acetylgalactosaminyl-transferase as a molecular marker for metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research*, 4:411-418.
 Ruan S, Lloyd KO. 1992. Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells: relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. *Cancer Res*, 52:5725-5731.

RESULTADOS

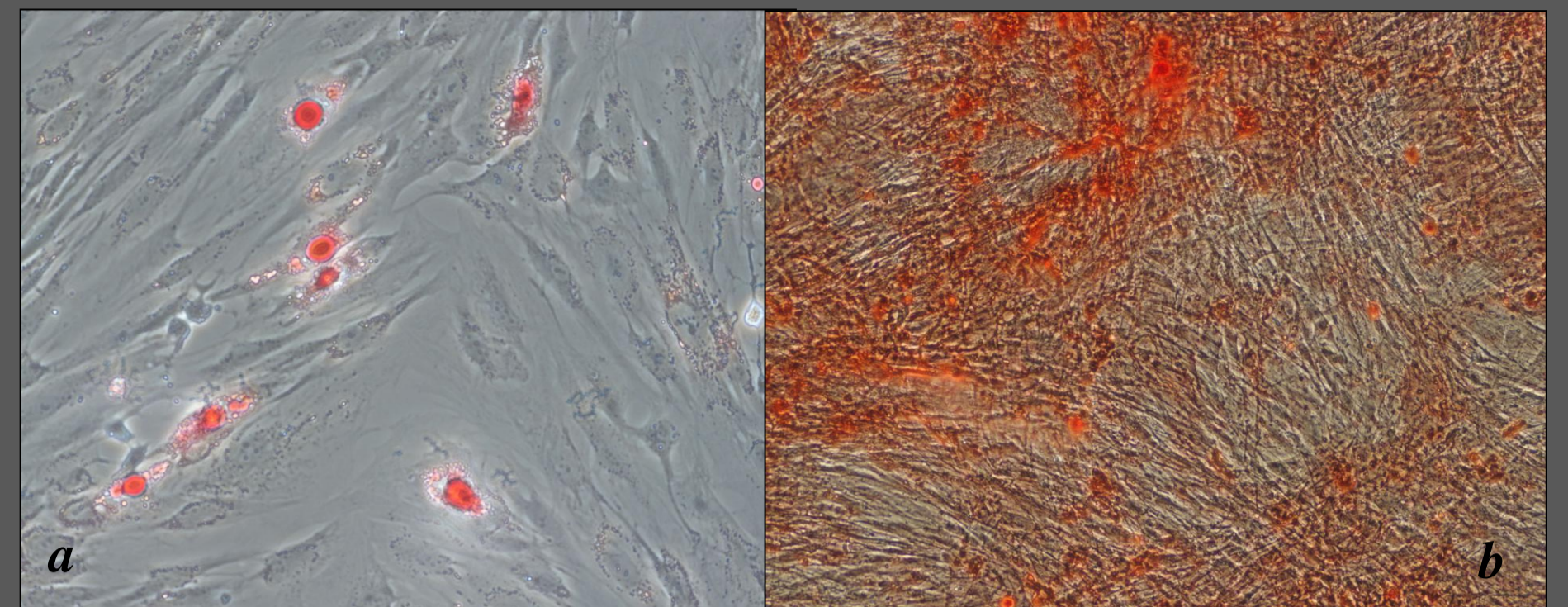


Fig 2: A) Diferenciação adipogênica de 21 dias das MSC-TA coradas com oil red O. B) Diferenciação osteogênica de 21 dias das MSC-TA coradas com alizarina red S.

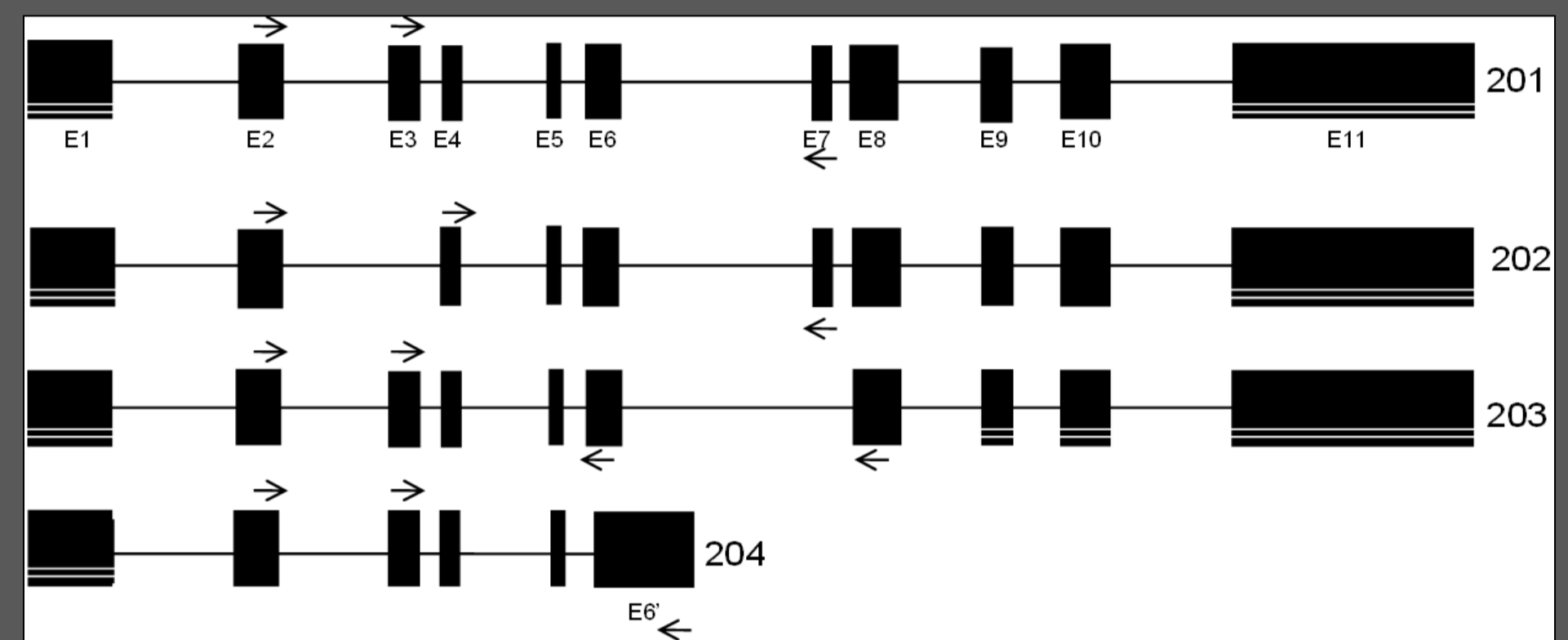


Fig 3: Esquematização da seqüência nucleica dos transcritos alternativos. Éxons são representados por blocos pretos e íntrons por linhas. Os segmentos 5' e 3' UTR (untranslated region) são indicados pelas linhas brancas nos blocos pretos dos éxons. A posição dos primers é indicada pelas setas (duas setas na mesma direção indica que o primer está localizado na conexão entre dois éxons).

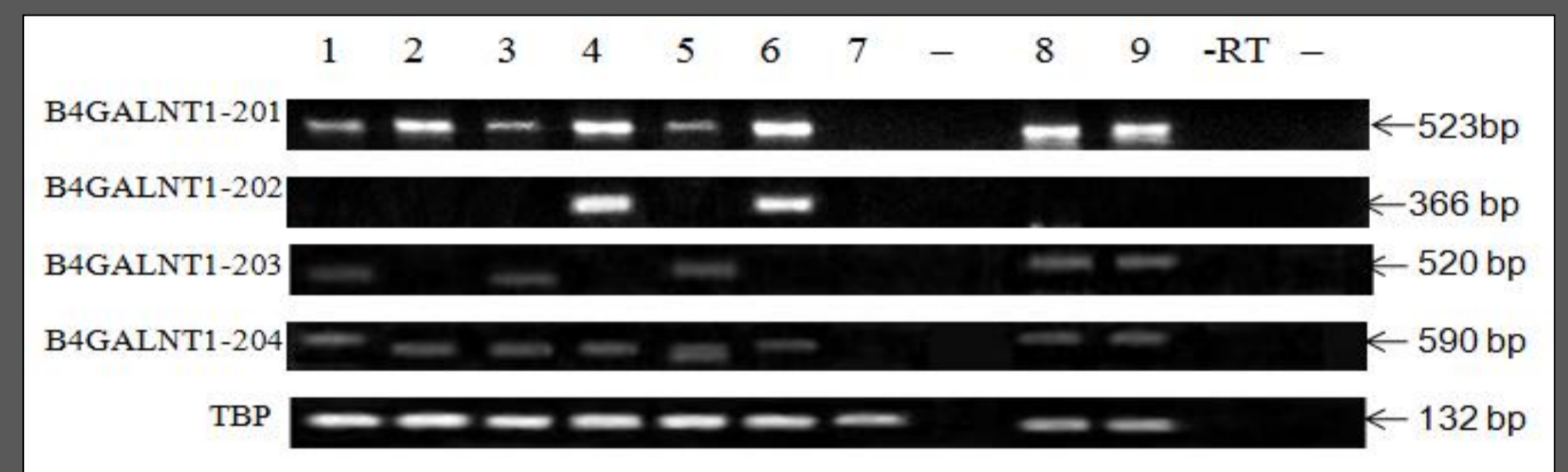


Fig 4: sq-PCR dos 4 transcritos previstos para o gene *B4galnt1* e do gene de referência TBP; 1- MSC-TA indiferenciadas; 2, 4 e 6- MSC-TA diferenciadas para adipócitos por 7, 14 e 21 dias, respectivamente; 3, 5 e 7- MSC-TA diferenciadas para osteoblasto com 7, 14 e 21 dias de diferenciação respectivamente; 8 e 9 - SH-SY5Y; (-RT) e (-) são controles da reação de PCR e não contém cDNA.

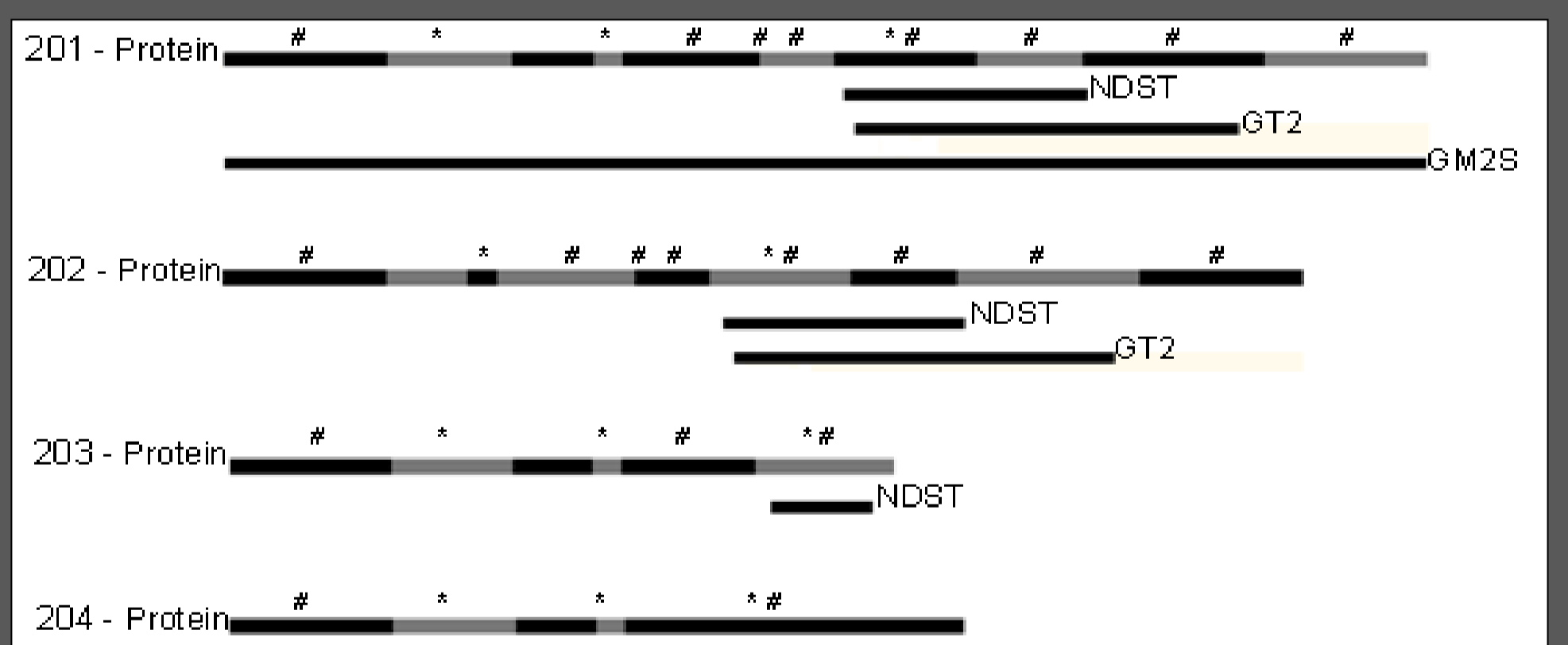


Fig. 5: Sítios de modificação e domínios dos transcritos alternativos. Éxons são mostrados em preto e cinza, distinguindo o limite entre eles. O "*" indica a presença de sítio de N-glicosilação no éxon, e "#" a presença de sítio de fosforilação. Abaixo de cada transcrito alternativo, tem a indicação da presença de domínios "nucleotide-diphospho-sugar transferase" (NDST), "glycosyl transferase family 2" (GT2), e "ganglioside GM2 synthase family" (GM2S) identificados pelo Banco de Dados para Proteínas ProSite.

CONCLUSÃO

Até o momento, a expressão do gene *B4galnt1* havia sido investigada com o uso de dois pares de primers: um que amplificava um fragmento de 99bp, e outro que amplificava 230bp (Cheung, et al. 2001, e Kuo, et al. 1998). No entanto, esses pares de primers não faziam a distinção dos transcritos alternativos do gene *B4galnt1*, nem eram capazes de amplificar apenas um deles. Assim, as ferramentas moleculares usadas até o momento não permitiam explorar a complexidade de expressão desse gene.

Os transcritos alternativos do gene *B4galnt1* mostraram expressão diferencial entre os tipos celulares estudados. Isso indica que eles podem ter funções distintas e/ou que sua expressão deve ocorrer de maneira tecido-específica.

O padrão de expressão de gangliosídeos em uma dada célula pode ser definido basicamente pela expressão relativa das enzimas da rota de síntese (Ruan, et al. 1992). Assim, a expressão diferencial dos transcritos alternativos de *B4galnt1* nas MSCs-TA durante a diferenciação para adipócitos e osteoblastos, e em células SH-SY5Y, pode ter papel importante na regulação da síntese dos gangliosídeos, e influenciar o padrão de expressão dos gangliosídeos dessas células.