

CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE NORMALIZADOR FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS 3 SUBUNIDADE G (eIF3g) EM PEIXE-REI

AMANDA WEEGE DA SILVEIRA MARTINS¹; LUCAS DOS SANTOS DA SILVA²; BRUNA FAGUNDES BARRETO²; WILLIAM BORGES DOMINGUES²; TONY LEANDRO REZENDE DA SILVEIRA²; VINICIUS FARIAS CAMPOS³

¹ Universidade Federal de Pelotas – amandaweege98@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – lucassantos_17@hotmail.com; brunaf.barreto@live.com; williamwwe@yahoo.com.br; silveira.tlr@gmail.com.

³ Universidade Federal de Pelotas – fariascampos@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os *Housekeeping genes* (genes de referência) são genes com alto grau de conservação e com expressão constante em diferentes tecidos ou estágio de desenvolvimento. Esses genes são de extrema importância para a realização da técnica de PCR em tempo real (qPCR), técnica tida como padrão ouro para a quantificação de expressão gênica, visto que são utilizados como controle interno dessas reações, possibilitando assim a obtenção de resultados fidedignos (EISENBERG; LEVANON, 2013).

Os fatores de iniciação da tradução em eucariotos (eIFs) são proteínas acessórias que participam da maior parte deste processo de iniciação da síntese proteica. Sendo que o complexo eIF3 e suas subunidades interagem com um segundo complexo, o eIF4, e se tornam responsáveis pelo recrutamento da subunidade ribossomal menor (JACKSON; HELLEN; PESTOVA; 2010).

Alguns estudos relatam que o complexo eIF3 é responsável por dissociar os ribossomos após o término da tradução, impedindo também a reassociação indesejada dessas subunidades ribossomais (PISAREV; HELLEN; PESTOVA, 2017).

Devido à grande importância desses complexos proteicos nas células eucarióticas e seu alto grau de conservação, alguns eIFs já estão sendo testados e analisados como genes de referência, como é o caso do complexo eIF5A, o qual foi testado em *Paralichthys olivaceus*, uma espécie de peixe de ampla importância em países asiáticos (ZHANG et al, 2013).

Visto isso, buscando subsidiar estudos futuros em relação à análise de *housekeeping genes* para qPCR em peixe-rei, espécie aquícola encontrada em abundância na região sul da América do Sul, com grande importância nessas regiões devido a comercialização da sua carne e possuindo grande exigência por qualidade de água (GARCÍA et al., 2014), este trabalho tem como objetivo a clonagem molecular e o sequenciamento do gene eIF3g em peixe-rei *Odontesthes humensis*.

2. METODOLOGIA

2.1. Animais Experimentais

Para a realização do experimento foram obtidos, no município de Arroio grande, no Laboratório de Piscicultura da UFPel, peixes-rei da espécie *Odontesthes humensis* em diferentes estágios de desenvolvimento. Esses animais foram aclimatados durante 4 semanas, onde foram mantidos em tanques de 1000 L sob condições controladas e posteriormente expostos a condições adversas.

Após este período, os animais foram anestesiados com uma solução composta de benzocaína e posteriormente eutanasiados por secção medular e excisão cerebral para retirada dos tecidos de interesse e posteriormente foram armazenados em nitrogênio líquido. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel, com o número de processo 7018/2015-85

2.2. Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada a partir do tecido cerebral com o auxílio do reagente TRIzol®, seguindo as instruções do fabricante.

2.3. Confecção de cDNA

Após a extração, realizou-se a quantificação da concentração e pureza do RNA por espectrofotometria de luz UV utilizando o equipamento Nanovue. Conseguinte à determinação da concentração ideal de RNA, foi possível realizar a confecção de DNA Complementar (cDNA) utilizando o *kit* comercial *High Capacity* (Applied Biosystems, EUA).

2.4. Clonagem e Sequenciamento

Os *primers* específicos para a amplificação do gene eIF3g foram desenhados com o auxílio do software *online* PriFi (<http://cgi-www.daimi.au.dk/cgichili/Prifi/main>), tendo como base a análise de alinhamentos de sequências gênicas do eIF3g de outros organismos, já depositadas no *GenBank*.

Para a amplificação do gene eIF3g, foram realizadas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os *primers* desenhados, o cDNA confeccionado como *template* e um gradiente de temperatura buscando elucidar a melhor temperatura de amplificação do *primer*. A confirmação da amplificação se deu através de eletroforese em gel de agarose 1,2%, seguida da purificação do produto, utilizando colunas com membrana de gel sílica proveniente do *kit* comercial *Purelink*.

Após a obtenção de um produto puro e com concentração ideal, foi realizado o sequenciamento por método de Sanger automatizado no Laboratório de Genômica Estrutural da UFPel e o depósito da sequência nucleotídica obtida no banco de dados *GenBank*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a visualização em gel de agarose, foi possível verificar que a melhor temperatura de anelamento dos *primers* desenhados foi de 59,9 °C, uma vez que nessa condição foi observado o produto da PCR do gene com o tamanho esperado de 435 pares de bases (Fig. 1), o qual foi sequenciado e encontra-se depositado no GenBank sob o número de acesso KX060035.1.

```

1 taccaccaca gtcagcgacg atgtcttcatc gacgttcatc tcgagcaaag aggacttcaa
61 tgcccaagac caggatgaag atcctatgaa caagttgaaa ggacacagaaga ttgtgtcttg
121 ccgtatttgc aaaggcgacc attggaccac ccgctgtccg tacaaggaca ccctgggtcc
181 catgcagaag gagctggctg agcagcttgg gcttccact ggagacaaag acaagcctgc
241 tggttctgca gaaccagagc ccatacagcc tgcacagagc aagactggga agtatgtccc
301 tccaaagcctg agggacggag gcacacggag aggagagtcc atgcagccta accgcagagc
361 tcatgacaat gctaccattc gtgtgaccaa cttgtcttag gacacccgtg agacagattt
421 gcaggagctc tttag

```

Fig.1: Sequência nucleotídica depositada no GenBank.

Para confirmar a sequência depositada, foi realizado um BLAST (Fig. 2), onde obteve-se uma identidade maior de 90%.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Odontesthes humensis eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (eif3g) mRNA, partial cds	804	804	100%	0.0	100%	KX060035.1
PREDICTED: Stegastes partitus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G (eif3g), mRNA	614	614	99%	8e-172	92%	XM_008283092.1
PREDICTED: Acanthochromis polyacanthus eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (eif3g), mRNA	610	610	100%	1e-170	92%	XM_022214656.1
PREDICTED: Seriola dumerili eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (eif3g), transcript variant X2, mRNA	608	608	99%	4e-170	92%	XM_022739459.1
PREDICTED: Seriola dumerili eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (eif3g), transcript variant X1, mRNA	608	608	99%	4e-170	92%	XM_022739458.1
PREDICTED: Austrofundulus limnaeus eukaryotic translation initiation factor 3, subunit G (eif3g), mRNA	603	603	99%	2e-168	92%	XM_014024501.1
PREDICTED: Monopterus albus eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G (eif3g), transcript variant X2, mRNA	586	586	99%	2e-163	91%	XM_020610401.1

Fig.2: Blast realizado a partir da sequência nucleotídica depositada.

4. CONCLUSÕES

Esse estudo tem como perspectiva a análise dos demais genes normalizadores clonados e sequenciados pelo nosso grupo de pesquisa, a fim de determinar o melhor *housekeeping gene* para estudos de genômica funcional na espécie *Odontesthes humensis*, e posteriormente elucidar os efeitos do herbicida RoundUp® sobre a expressão de genes relacionados a toxicologia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CATTIE, Douglas J. et al. Mutations in nonessential eIF3k and eIF3l genes confer lifespan extension and enhanced resistance to ER stress in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS genetics**, v. 12, n. 9, p. e1006326, 2016.

PISAREV, Andrey V.; HELLEN, Christopher UT; PESTOVA, Tatyana V. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 286-299, 2007.

EISENBERG, Eli; LEVANON, Erez Y. Human housekeeping genes, revisited. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 10, p. 569-574, 2013.

CHOE, Junho et al. Translation initiation on mRNAs bound by nuclear cap-binding protein complex CBP80/20 requires interaction between CBP80/20-dependent translation initiation factor and eukaryotic translation initiation factor 3g. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18500-18509, 2012.

ZHANG, Jian et al. Selection of normalization factors for quantitative real time RT-PCR studies in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) under conditions of viral infection. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 152, n. 3, p. 303-316, 2013.

JACKSON, Richard J.; HELLEN, Christopher UT; PESTOVA, Tatyana V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 113, 2010.

GARCÍA, Graciela et al. Promiscuous speciation with gene flow in silverside fish genus *Odontesthes* (Atheriniformes, Atherinopsidae) from south western Atlantic Ocean basins. **PLoS one**, v. 9, n. 8, p. e104659, 2014.