**SUPEREXPRESSÃO DE MAHOGUNINA EM LINHAGEM CELULAR ESTÁVEL**

Barbara Mello Brandão1,2, Luiza Schier Gortz2, Liana Alves de Oliveira2, Roberto Rosati2.

1. Acadêmica do Curso de Farmácia pela Faculdades Pequeno Príncipe;

2. Faculdades Pequeno Príncipe e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba (PR), Brasil.

barbarambrandao@hotmail.com

**Introdução**

*Mahogunin RING Finger* 1 – MGRN1 (pela tradução livre, Mahogunina) é uma enzima E3 ligase, pertencente à família RING *Finger (Really Interesting New Gene).* Enzimas E3 ligases são particularmente importantes, já que determinam quais substratos serão marcados a partir de um processo sequencial chamado Ubiquitinação, juntamente com as enzimas Ativadora de ubiquitina (E1) e Conjugadora de ubiquitina (E2). Entre os efeitos da ubiquitinação estão: afetar a atividade das proteínas, promover ou impedir interações proteicas e degradar proteínas via proteossomo. Dados de literatura sugerem que MGRN1 seja importante em vários processos, sendo um deles o controle de qualidade proteico, e responsável por fenótipos quais a pigmentação e o desenvolvimento de degeneração espongiforme em animais. Desta forma, um modelo celular que superexpresse a MGRN1 seria importante para esclarecer a funcionalidade desta proteína.

**Métodos**

Células HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) e N2a (*Neuro 2a*) foram geneticamente modificadas para que expressassem MGRN1 por indução do antibiótico doxiciclina. As células foram trasfectadas com plasmídeo pSBtet-BP para introdução do gene sintético, e selecionadas com puromicina. Para validar este sistema, foi realizada técnica de transcrição reversa-PCR em tempo real (RT-qPCR) com o objetivo de investigar a expressão gênica de MGRN1. As células foram cultivadas até alcançar a confluência e lisadas para extração de RNA total pelo método Trizol. Todas as amostras de RNA foram quantificadas por fluorimetria, sua pureza determinada por espectrofotometria e a integridade de cada RNA foi avaliada pelo equipamento TapeStation. O RNA total foi transformado em cDNA pelo método da Transcrição Reversa utilizando o Kit GoScript Reverse Transcriptase (Promega) e para a PCR em tempo real, foi utilizado o Kit Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para a RT-qPCR, que tem como objetivo avaliar a expressão relativa de um determinado gene através o monitoramento da amplificação de DNA de interesse, foram desenvolvidos iniciadores específicos; a técnica foi realizada com corante fluorescente para DNA dupla fita (SYBR Green).

**Resultados e conclusão**

Foram cultivadas com sucesso todas as linhagens estáveis que eram objeto do estudo, obtendo amostras de RNA que demonstraram um alto grau de pureza e ótima integridade, sendo aptas à retrotranscrição em cDNA. Desta forma, foi possível criar uma linhagem celular estável que expressa MGRN1 74 vezes acima da linha de base quando induzida por doxiciclina.

**Palavras-chave:** MGRN1; qPCR; Transcrição Reversa.

**REFERÊNCIAS**

BAGHER, P.; JIAO, J.; SMITH, O. C.; COTA, C. D.; GUNN, T. M. **Characterization of Mahogunin Ring Finger-1 expression in mice**. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083490 > Acesso em: 16.Ago.2017.

HE, L.; ELDRIDGE, A. G.; JACKSON, P. K.; GUNN, T. M.; BARSH, G. S. **Accessory proteins for melanocortin signaling**: attractin and mahogunin. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851328 > Acesso em: 16.Ago.2017.

PÉREZ-OLIVA, A. B.; OLIVARES, C.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J. C. **Mahogunin Ring Finger-1 (MGRN1) E3 Ubiquitin Ligase Inhibits Signaling from Melanocortin Receptor by Competition with GαS**. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19737927 > Acesso em: 16.Ago.2017

UPADHYAY, A.; AMANULLAH, A.; CHHANGANI, D.; MISHRA, R.; PRASAD, A.; MISHRA, A. **Mahogunin Ring Finger-1 (MGRN1), a Multifaceted Ubiquitin Ligase: Recent Unraveling of Neurobiological Mechanisms**. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26255182 > Acesso em: 16.Ago.2017.

UPADHYAY, A.; AMANULLAH, A.; CHHANGANI, D.; MISHRA, R.; MISHRA, A. **Selective multifaceted E3 ubiquitin ligases barricade extreme defense**: Potential therapeutic targets for neurodegeneration and ageing. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247845 > Acesso em: 16.Ago.2017.