

Expressão e purificação de efetores TAL artificiais para estudos de interação proteína-DNA

Kleber Augusto T. da Cruz* (IC), André Luiz A. Pereira (PQ)

kleber.ueg@gmail.com

Universidade Estadual de Goiás, Campus Itapuranga - GO

Resumo: A expressão e purificação de proteínas é uma técnica que possibilita a realização de estudos funcionais e estruturais, além de permitir o emprego de proteínas em diferentes áreas da pesquisa e do setor produtivo. Os efetores ativadores de transcrição (*transcription activator-like* ou TAL) são proteínas que atuam como fatores de transcrição. Muito embora o exato mecanismo da ativação transcricional ainda permaneça desconhecido, os efetores TAL vem sendo utilizados como uma importante ferramenta molecular na manipulação genética de diferentes organismos. Neste sentido, os efetores apresentam uma aplicação biotecnológica. O objetivo do presente trabalho é promover a expressão dos efetores TAL visando estudar seu mecanismo de ação que promove a ligação em sítios promotores e ativação de genes específicos. Para isso a primeira etapa consistiu em alguns passos de clonagem. A região de ligação de DNA do efector TAL foi sintetizada e clonada em um vetor de expressão, gerando um efector TAL artificial com especificidade de ligação a um gene chave na via de biossíntese do etanol. A segunda etapa, ainda por realizar, consiste na expressão deste efector para posteriormente realizar estudos funcionais. Este estudos serão essenciais para a entender o processo de transativação de genes utilizado pelos efetores TAL.

Palavras-chave: efetores TAL. clonagem.

Introdução

A expressão heteróloga de proteínas é uma técnica utilizada como ferramenta no campo da biologia molecular desde a década de 70; com o tempo passou por modificações em sua metodologia em busca de aperfeiçoamento. Atualmente é possível realizar a expressão heteróloga de proteínas em organismos unicelulares e pluricelulares (PEREIRA, 2009).

Em essência, a técnica é baseada em um conjunto de reações enzimáticas que tem por objetivo clivar e ligar genes exógenos (insertos) em plasmídeos. Um plasmídeo é uma molécula de DNA circular que não faz parte do DNA cromossomal, e seu papel é conferir alguma vantagem metabólica à célula que o abriga. Na biotecnologia, os plasmídeos são utilizados como vetores de insertos de interesse,

cujo produto é uma proteína de valor agregado, que deverá ser produzida em grande quantidade e com elevado grau de pureza (CARUSO, 2007).

A partir da expressão heteróloga e purificação de proteínas é possível realizar estudos funcionais e estruturais (PEREIRA, 2009). Deste modo, milhares de proteínas com características ainda desconhecidas passaram a ser produzidas, dentre elas, os efetores ativadores de transcrição (*transcription activator-like* ou TAL).

Os efetores TAL são proteínas de origem bacteriana que são capazes de ativar a transcrição de genes em uma célula hospedeira (RÖMER *et al.* 2007). A principal característica estrutural de um efector TAL é um domínio central (DC), que determina a especificidade de ligação do efector à sequência de DNA alvo (RÖMER *et al.* 2007; SCHOLZE; BOCH, 2011). A ligação ocorre em regiões regulatórias no genoma – como os sítios promotores – promovendo a ativação da transcrição do gene correspondente, resultando em uma alteração da expressão gênica (SCHOLZE; BOCH, 2010).

Atualmente é possível desenvolver efetores TAL artificiais com especificidade de ativação transcricional de genes de interesse, alterando a sequência de aminoácidos do efector que determina a sequência de nucleotídeo alvo a ser ligada. Neste sentido, o efector TAL pode ser utilizado na biologia molecular como uma ferramenta biotecnológica (SCHOLZE; BOCH, 2011). Muito embora o código de ligação do efector TAL ao seu alvo seja conhecido (BOCH *et al.* 2009), o mecanismo de ativação do gene ainda não foi completamente elucidado (MAK *et al.* 2014).

Material e Métodos

Bactérias e condições de cultivo

A bactéria *Escherichia coli* foi utilizada para os ensaios de clonagens. O cultivo de *E. coli* foi realizado em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C por 14-16h. Sempre que necessário os antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações finais: ampicilina, 100 µg/ml e canamicina 50 µg/ml.

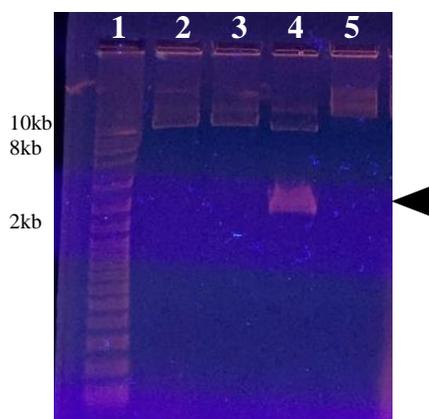
Clonagem de efetores TAL artificiais

Todo o processo foi realizado através da transformação de cepas de clonagem termo competentes utilizando o plasmídeo Eurofins contendo o DC artificial de um efector TAL sintetizado em duas versões: ArtP2-UP e ArtP2-BOX. O plasmídeo

pET28a-P2ΔDC é um vetor de expressão que contém um efator TAL sem o DC, e foi linearizado com a enzima *MscI* (sítio: TGGCCA). Simultaneamente, a liberação do DC do plasmídeo Eurofins ocorreu pela digestão com essa mesma enzima. Em seguida, os DCs ArtP2-UP e ArtP2-BOX foram clonados no plasmídeo pET28a-P2ΔDC, gerando pET28a-Art-P2-Up e pET28a-Art-P2-Box.

Resultados e Discussão

Através da técnica de clonagem fizemos uma digestão utilizando a enzima *MscI* para cortar o inserto e ligá-lo no plasmídeo de interesse, a reação foi feita com êxito e logo foi realizada a ligação do gene no vetor de expressão. Após estudos *in silico*, duas estratégias de digestão com enzimas de restrição foram utilizadas para checar a orientação de clonagem do inserto: uma com a enzima de restrição *XbaI* (UP) e outra *NotI* (BOX). O perfil eletroforético das digestões revelou o pET28a-ArtP2-Box com duas bandas, sugerindo a presença do inserto com 2,8 kb (Figura 1, seta), enquanto para o pET28a-ArtP2-Up o perfil eletroforético observado não permite concluir sobre o sucesso da clonagem.



- 1- Marcador de peso molecular
- 2- Digestão (*XbaI*) ArtP2-UP (colônia 1)
- 3- Digestão (*XbaI*) ArtP2-UP (colônia 2)
- 4- Digestão (*NotI*) ArtP2-BOX (colônia 1)
- 5- Digestão (*NotI*) ArtP2-BOX (colônia 2)

Considerações Finais

Em síntese, conclui-se que a expressão heteróloga de proteínas e sua respectiva purificação possui grande aplicabilidade na ciência moderna, favorecendo o desempenho de técnicas que contribuem para o crescimento econômico e científico mundial. A expressão heteróloga dos efetores TAL demonstra-se importante devido à sua aplicação biotecnológica, sobretudo no que diz respeito a manipulação genética. A partir dos experimentos de clonagem, que foram realizados com sucesso, estudo funcionais considerando ensaios de interação proteína-DNA.

Agradecimentos

Agradecemos a FAPEG pelo financiamento do projeto que abarca este plano de trabalho e à UEG pela bolsa de iniciação científica, concedida ao aluno na modalidade PIBIT. Estendemos nosso agradecimentos à Profa. Dra. Claudia Didonet e à Profa. Dra. Patrícia Lima pela colaboração na realização dos experimentos.

Referências

BOCH, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. **Science** n. 326 p. 1509-1512, 2009.

CARUSO, Célia Sculzbacher. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes em *Xilella Fastidiosa***. 187 f. Tese (Doutorado em Ciências, ares Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

MAK, Amanda Nga-sze *et al.* TAL Effectors: function, structure, engineering and applications. **NIH Public Access**, 01 fev. 2014.

PEREIRA, Larissa Miranda. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

RÖMER, Patrick *et al.* Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. **Science**. Zürich, 2007.

SCHOLZE, Heidi; BOCH, Jens. TAL effector-DNA specificity. **Virulence**. v. 1, P. 428-432, 01 set. 2010.

SCHOLZE, Heidi; BOCH, Jens. TAL effectors are remote controls for gene activation. **Current Opinion in Microbiology**, V.14, P. 47-53. 2011.