

Ensaio de transativação do gene *SUC2* em *Saccharomyces cerevisiae* mediada pelos efetores TAL artificiais Art-P2/Up e Art-P2/Box.

Rafaela Alves Guimarães^{1*} (Estudante de Iniciação Tecnológica), Eveliny Prado Souza² (Estudante de Iniciação Tecnológica), André Luiz Araújo Pereira² (Docente - Pesquisador).
rafa.kesia@gmail.com

Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas - Henrique Santillo
Br 153, Nº3105 Fazenda Barreiro do Meio-Campus Henrique Santillo-Anápolis

Resumo: O etanol é um biocombustível e destaca-se pela redução dos impactos ambientais. Contudo, é necessário o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas tecnologias para elevar a produtividade e o rendimento de etanol. Recentemente uma nova tecnologia foi desenvolvida, os efetores ativadores da transcrição (transcription activator-like ou TAL), são proteínas provenientes de fitopatógenos que funcionam como fatores de transcrição com especificidade de ligação ao DNA e capacidade de ativação de genes em eucariotos. O presente trabalho propõe o desenho de efetores TAL artificiais para modular positivamente genes específicos na via de biossíntese de etanol em *Saccharomyces cerevisiae*. Através das análises *in silico* identificamos a sequência de DNA do gene e do promotor do *SUC2*. A região promotora do *SUC2* foi isolada e amplificada através da técnica de PCR. A partir de uma região de -203 pb do promotor do gene *SUC2*, foram desenhados dez domínios centrais de até 15 repetições utilizando o software TALENT 2.0. Obteve-se o plasmídeo pTAL-Base que consiste em uma ferramenta molecular para produção de novos efetores TAL artificiais. Com a ativação do gene *SUC2* mediada pelo efetor TAL artificial, espera-se obter uma superexpressão de *SUC2*, elevando os níveis de invertase e conseqüentemente aumentando a produção de etanol.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*. Efetor TAL. Invertase. Etanol

Introdução

A poluição ambiental está cada vez mais ocupando o centro das atenções mundiais, assim a busca por modelos alternativos que equilibra o desenvolvimento econômico com a proteção ao meio ambiente tem sido muito frequente. Aderindo a essa nova tendência, o uso do etanol como biocombustível tem crescido. O etanol é produzido a partir de fontes renováveis mostra-se menos agressivo ao meio ambiente. Apesar de sua produção ser significativa, ela pode ser melhor explorada em relação ao tempo de obtenção e rendimento de produção. A geração de microrganismos de alta eficiência na fermentação alcoólica demonstra-se um

competente meio para elevar os níveis de etanol com redução dos custos envolvidos neste bioprocesso (SCHENBERG et al., 2010; ARGUESO et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada para a produção de etanol em escala industrial e em uma série de outros processos biotecnológicos (GOFFEAU et al., 1996). O gene *SUC2* de *S. cerevisiae* codifica a enzima invertase. Desta forma, a fermentação alcoólica ocorre em anaerobiose com a ação da invertase que promove a clivagem da sacarose em glicose e frutose. Assim a glicose segue na via da fermentação alcoólica passando por várias reações específicas até dar origem ao etanol (OSTERGAARD et al., 2000; LIMA et al., 2001).

A tecnologia inovadora recém desenvolvida dos efetores ativadores de transcrição (*transcription activator-like* ou TAL) amplia as possibilidades de manipulação genética em diferentes organismos. Os efetores TAL são proteínas provenientes de fitopatógenos que funcionam como fatores de transcrição em eucarioto. Com potencial de reprogramar o genoma da célula hospedeira na transcrição de genes que favoreçam o seu próprio ciclo de vida (KAY et al., 2007; RÖMER et al., 2007; KAY e BONAS 2009; BÜTTNER e BONAS 2010). A principal característica estrutural dos efetores TAL é possuir um domínio central (DC), composto por 34/35 resíduos de aminoácidos que se repetem em série e em número variável. O DC é responsável pela atividade de ligação ao DNA e promove o reconhecimento de bases nitrogenadas específicas por meio de um dirresíduo de aminoácidos (*repeat variable di-residue* ou RVD) presentes nas posições 12 e 13 de cada repetição. O mecanismo de ligação dos RVDs ficou conhecido como código TAL, de acordo com este código cada RVD se liga preferencialmente a um único nucleotídeo obedecendo uma certa frequência (BOCH et al., 2009; MOSCOU e BOGDANOVE, 2009).

Neste sentido, através do código TAL é possível desenhar efetores TAL artificiais para modular a via de biossíntese de etanol através da regulação positiva do gene *SUC2*, cujo o produto proteico que é a invertase, caracteriza-se como um importante elemento na formação de etanol. Esta é, portanto, uma estratégia alternativa com potencial para aumentar os níveis do etanol em bioprocessos industriais.

Material e Métodos

Efetores e plasmídeos

A partir de PthA2, um efetor TAL selvagem proveniente da bactéria *Xanthomonas citri*, uma versão truncada foi desenvolvida para funcionar como proteína molde útil à construção de novos efetores TAL artificiais. Os plasmídeos pET28a e pBI121 foram manuseados conforme manual correspondente.

O gene completo de PthA2 contido no plasmídeo pBI121 foi clivado com *Xba*I e *Eco*RI, removendo a sequência inteira do gene *pthA2*. O gene foi então clonado no plasmídeo pET28a-6xHis linearizado com as mesmas enzimas de restrição, e em seguida clivado com a enzima de restrição *Msc*I (sítio: TGGCCA) para remover apenas a sequência que codifica o DC do efetor PthA2. O plasmídeo resultante foi denominado pET28a-P2ΔDC, *a posteriori* renomeado: pTAL-Base.

Isolamento e clonagem do promotor

A região promotora do gene *SUC2* foi identificada por meio de análises *in silico* do genoma de *S. cerevisiae* (disponível em www.yeastgenome.org/). O promotor foi isolado utilizando-se a técnica de PCR – Reação em Cadeia da Polimerase. O DNA da levedura foi extraído conforme Holm (1986) e utilizado para as reações de PCR. Oligonucleotídeos (Tabela 1) foram desenhados pela ferramenta SGD (disponível em: <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) para amplificar especificamente a região promotora do gene *SUC2* com pelo menos 1000pb. Foi realizado PCR e PCR Nested. A reação de PCR foi realizada com os primers R1 e F1. O PCR *Nested* foi realizado com os primers R2 e F2 utilizando o amplicon do primeiro PCR.

Os fragmentos de DNA obtidos foram detectados em gel de agarose com concentração de 1% preparado com tampão TBE 1X sendo o mesmo tampão de corrida do gel durante a eletroforese, corados com brometo de etídio segundo Sambrook (2000). A eletroforese foi realizada com as seguintes condições de corrida: 110 volts e 400 amperes por 30 minutos. Os géis foram observados em transluminador UV e fotografados com câmera digital.

Tabela 1 – Primers usados para Amplificação do promotor do *SUC2*

Nome do Prime	Sequência
SUC2 F1	AAAAAACTAAGTTTTCCCCTG
SUC2R1	CGCTAGTTTCGTTTGTCATTG
SUC2F1	CCCGGGAACTAAGTTTTCCCCTGTAG
SUC2R2	CCCGGGCATATACGTTAGTGAAAAG

Fonte: a autora. Primers obtidos pela ferramenta SGD (disponível em: <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>)

Desenho e síntese do efector TAL artificial

Com base na sequência de ligação (*box*) do promotor do gene *SUC2*, o efector TAL recombinante foi desenvolvido *in silico* utilizando-se a ferramenta do sítio *TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0*, disponível em <https://tale-nt.cac.cornell.edu/>. Esta ferramenta permite o desenho de efetores TAL artificiais.

Apenas o domínio central (DC) do efector TAL, responsável pela especificidade de ligação ao DNA foi sintetizado. A síntese do DC foi realizada pela empresa DNA 2.0 (www.dna20.com). Assim, o DC sintético pode ser clonado no lugar do DC da proteína PthA2 selvagem, de modo a obter um efector TAL artificial, denominado Art-P2.

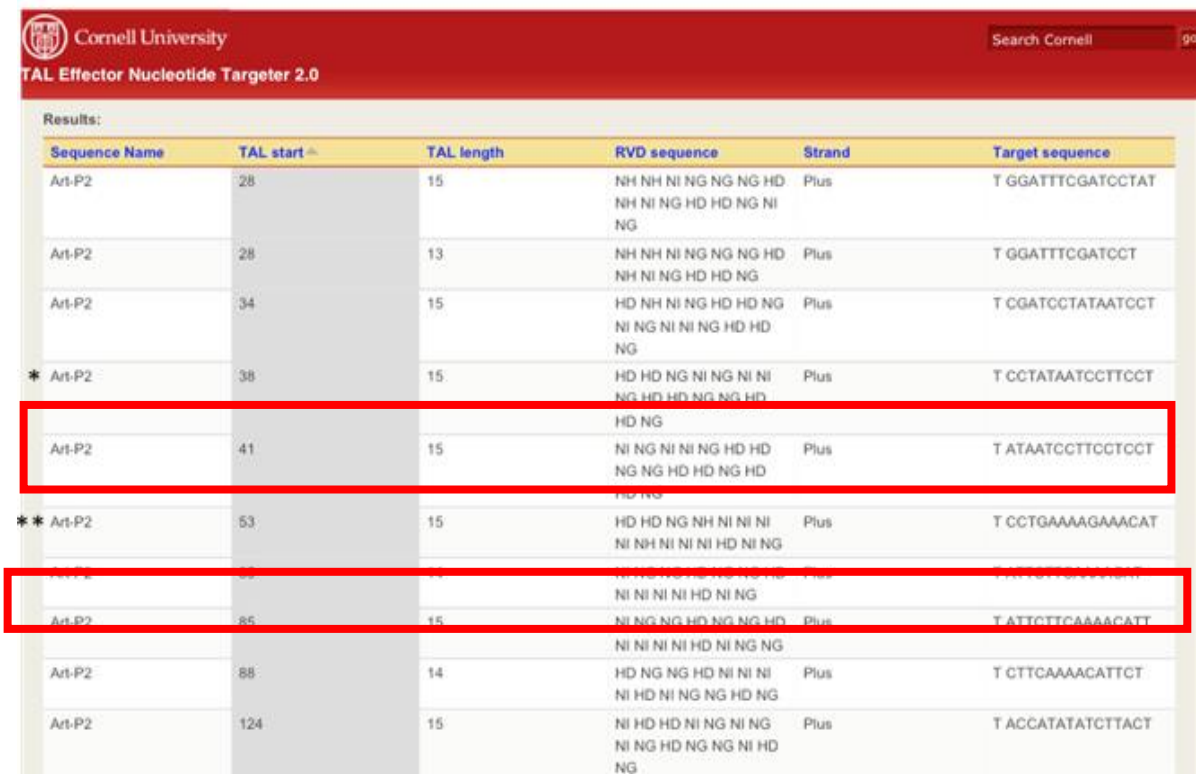
Resultados e Discussão

Análise *in silico* do promotor do gene *SUC2* e desenho dos DCs sintético

A sequência completa do promotor de *SUC2* foi obtida no banco de dados de *Saccharomyces* – SGB (disponível em: www.yeastgenome.org/). Após identificar os elementos de regulação do promotor, dentre os quais, o principal TATA-*box*,

localizado na posição -133 (BU e SCHMIDT, 1998), utilizando o TALENT 2.0, selecionamos uma região de -203pb para desenhar os DCs sintéticos. Foram identificados 10 elementos de ligação de efetores (*effector binding elements* ou EBEs) em potencial, com DCs de até 15 repetições representados, cada um com a composição de RVDs de maior afinidade ao EBE correspondente (Figura 1).

Figura 1: Desenho do DC sintético



Sequence Name	TAL start	TAL length	RVD sequence	Strand	Target sequence
Art-P2	28	15	NH NH NI NG NG NG HD NH NI NG HD HD NG NI NG	Plus	T GGATTTTCGATCCTAT
Art-P2	28	13	NH NH NI NG NG NG HD NH NI NG HD HD NG	Plus	T GGATTTTCGATCCT
Art-P2	34	15	HD NH NI NG HD HD NG NI NG NI NI NG HD HD NG	Plus	T CGATCCTATAATCCT
* Art-P2	38	15	HD HD NG NI NG NI NI NG HD HD NG NG HD HD NG	Plus	T CCTATAATCCTTCCT
Art-P2	41	15	NI NG NI NI NG HD HD NG NG HD HD NG HD HD NG	Plus	T ATAATCCTTCCTCCT
** Art-P2	53	15	HD HD NG NH NI NI NI NI NH NI NI NI HD NI NG	Plus	T CCTGAAAAGAAACAT
Art-P2	85	15	NI NI NI NI HD NI NG NI NG NG HD NG NG HD NI NI NI NI HD NI NG NG	Plus	T ATTCTTCAAAACATT
Art-P2	88	14	HD NG NG HD NI NI NI NI HD NI NG NG HD NG	Plus	T CTTCAAAACATTCT
Art-P2	124	15	NI HD HD NI NG NI NG NI NG HD NG NG NI HD NG	Plus	T ACCATATATCTTACT

Fonte: Figura adaptada de TALENT 2.0. (Disponível em <https://tale-nt.cac.cornell.edu/>)

A figura 1 demonstra a identificação de EBEs na última coluna contidos na região entre -203 pb e +1 codante do promotor do *SUC2* e predição da sequência dos RVDs para ligação dos EBEs correspondentes. A coluna em cinza indica a localização de cada EBE partindo da extremidade 5' do promotor, enquanto a coluna à direita indica o comprimento do DC em número de repetições. Os DCs destacados foram selecionados para síntese e subsequente construção de dois efetores TAL artificiais.

Evidências recentes sugerem que os efetores TAL mimetizam proteínas ligadoras de TATA-box (*TATA binding protein* ou TBP) (GRAU et al., 2013), e que frequentemente o EBE está localizado à montante o TATA-box, em média à uma

distância de 0 a 30pb (PEREIRA *et al.*, 2014). Neste sentido, dois DCs foram selecionados para síntese, um com EBE na posição -29 em relação ao TATA-*box*, denominado ArtP2-Up, e outro na posição -14, denominado ArtP2-Box.

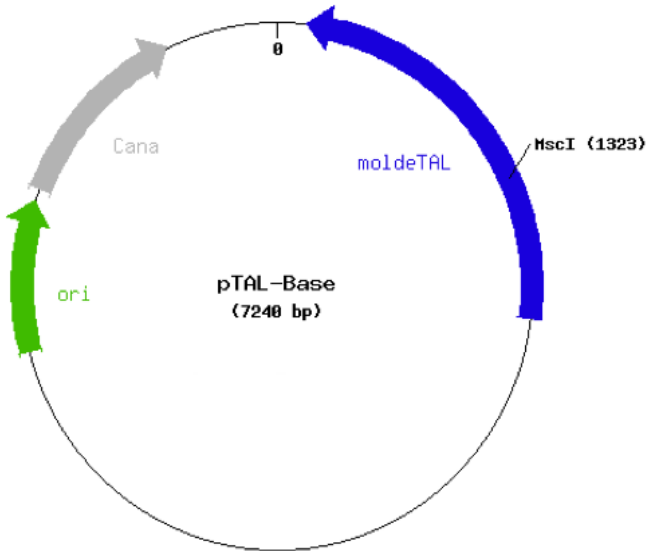
Estratégias de clonagens e otimização dos DCs

A partir de uma série de clonagens, desenvolveu-se o plasmídeo pTAL-Base, que pode ser utilizado como uma ferramenta molecular que contribui para a construção de efetores TAL artificiais. O plasmídeo pTAL-Base carrega uma versão truncada do efector TAL selvagem PthA2, cujo DC foi removido. A estratégia de clonagem desenvolvida neste estudo, permite, em um único passo, inserir um DC sintético de interesse no pTAL-Base para gerar um efector TAL artificial novo.

A estratégia inicia-se com a otimização e síntese dos DCs. Algumas modificações na sequência de DNA do DC foram necessárias. Primeiramente, os sítios da enzima de restrição *MscI* que permeiam toda a extensão do DC foram removidos, exceto os sítios contidos na primeira e na última repetição que irão compor o DC. Estes sítios foram mantidos nas extremidades para possibilitar a clonagem do DC sintético no pTAL-Base. Em seguida, a sequência do DC de interesse a ser sintetizada foi otimizada de acordo a melhor frequência de códons para o organismo no qual o efector TAL artificial será expresso, neste caso, *S. cerevisiae*. Finalmente, o pTAL-Base pode ser linearizado utilizando-se o sítio de *MscI* para inserir um DC sintético de interesse, permitindo a reconstituição de um efector TAL com qualquer especificidade de ligação desejada.

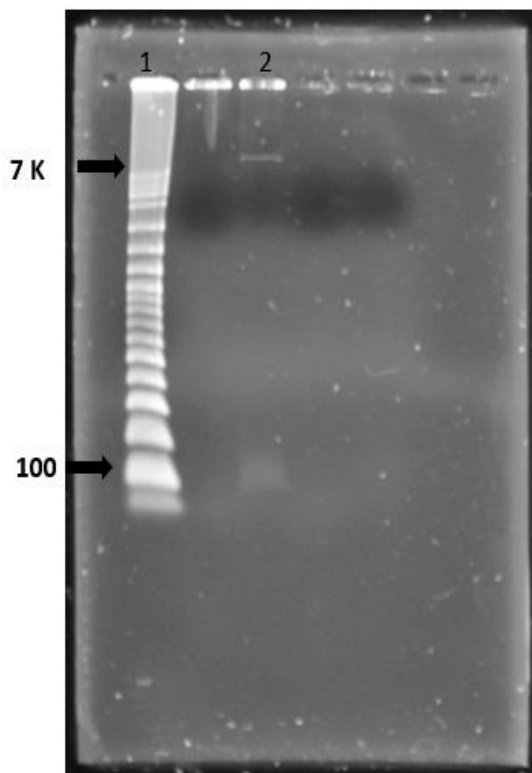
Outra vantagem desse sistema é que, como o pTAL-Base foi construído sobre o vetor pET28a, o efector TAL artificial pode ser produzido em bactérias por expressão heteróloga e purificado por cromatografia de afinidade, conforme protocolo previamente estabelecido (DOMINGUES *et al.*, 2010).

Figura 2: Mapa simplificado do plasmídeo pTAL-Base.



O molde TAL indicado pela seta azul é o gene *p2ΔDC*, representado pelo gene do efetor TAL *pthA2* de *X. citri* truncado, sem o DC. Cana em cinza é a marca de seleção para o antibiótico canamicina. Ori em verde é a origem de replicação em *E. coli*. A posição do sítio para *MscI* está indicada pelo número em parênteses. **Fonte:** a autora. Produzido pela ferramenta NetPlasmid (disponível em: <http://www.justbio.com>).

Figura 3: Digestão do pET28a-PthA2 com *MscI*



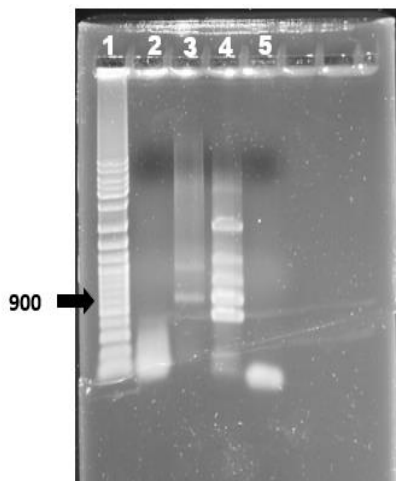
O gel da figura 3 representa a digestão do pET28a-PthA2 com *MscI*, dando origem ao plasmídeo pTAL-Base. Obteve-se dois padrões de bandas esperados, um em torno de 7 K que representa o pET28a-PthA2 sem o domínio central e a outra banda em torno de 100 pb que representa o domínio central fragmentados em bandas de 100 pb. Canaleta 1- Marcador Long Range DNA Ladder; Canaleta 2- pET28a-PthA2.

Fonte: A autora.

Amplificação do *SUC2*

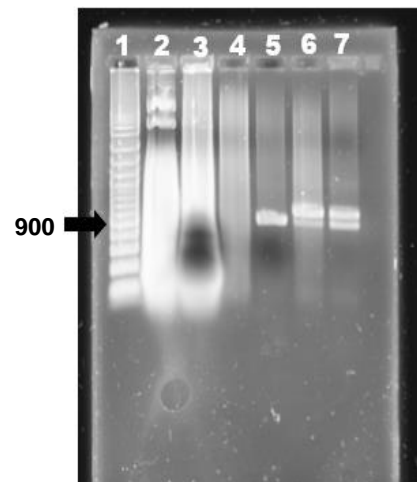
Através deste gel (Figura 4) sugerimos que esse padrão de banda de DNA por volta de 900 pb seja o gene *SUC2* amplificado após o PCR realizado com os primers R1 F1.

Figura 4: Gel de eletroforese do PCR do *SUC2*



Canaleta 1- Marcador Long Range DNA Ladder; Canaleta 3 – DY150. **Fonte:** A autora

Figura 5: Gel de eletroforese do PCR Nested do *SUC2*



Canaleta 1- Marcador Long Range DNA Ladder; Canaleta 5 – DY150. **Fonte:** A autora

Foi realizado o PCR *Nested*, na canaleta 5 (Figura 5) evidenciamos o mesmo perfil de banda do gel da figura 4 que representa a banda do gene *SUC2*, porém mais forte no gel por conta do PCR *Nested* ser mais específico.

Considerações Finais

Através das técnicas de biologia molecular e recorrendo ao código TAL foi possível desenhar dois efetores TAL artificiais com especificidade de ativação do gene *SUC2*. Assim apresenta potencial de modular a via de biossíntese e maximizar a produção de etanol, visto que o catabolismo de carboidratos permanecerá ativo na presença do efector TAL constitutivo que deverá favorecer consequentemente a expressão de *SUC2*. A Invertase vai estar em quantidades aumentada e pode favorecer um aumento significativo nos níveis de etanol.

Propiciou o emprego das ferramentas de Bioinformática para elaborar a estratégia de construção, clonagem e expressão de efetores TAL artificiais. O projeto possibilita o desenvolvimento de uma cepa geneticamente modificada de alta eficiência na fermentação alcoólica. Desta forma consiste em um produto de interesse biotecnológico, e portanto, possui valor econômico agregado.

Através das análises *in silico* identificamos a sequência de DNA do gene e do promotor do *SUC2*. E isolamos e amplificamos a região promotora do *SUC2* através da técnica do PCR. Obteve-se o plasmídeo pTAL-Base que consiste em uma ferramenta molecular que poderá ser utilizada para produção de novos efetores TAL artificiais.

Agradecimentos

A UEG pela bolsa de iniciação concedida e a FAPEG pelo financiamento do projeto.

Referências

- ARGUESO, J. L. et al. **Genome structure of a *Saccharomyces cerevisiae* strain widely used in bioethanol production.** Genome Res, v. 19, n. 12, p. 2258-2270, 2009.
- BOCH, J. et al. **Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors.** Science, v. 326, n. 5959, p. 1509-1512, 2009.
- BÜTTNER, D.; BONAS, U. **Regulation e secretion of *Xanthomonas* virulence factors.** FEMS Microbiol Rev, v. 34, n. 2, p. 107-133, 2010.
- BU, Yan; SCHMIDT, Martin C. **Identification of cis-acting elements in the *SUC2* promoter of *Saccharomyces cerevisiae* required for activation of transcription.** Nucleic Acids Research, Vol. 26, Nº 4. 1998.
- GRAU, J. et al. **Computational Predictions Provide Insights into the Biology of TAL Effector Target Sites.** PLOS Comput Biol, v. 9, n. 3, p. 1-20, 2013.
- GOFFEAU, A. et al. **Life with 6000 genes.** Science, v. 274, n. 5287, p. 546-547, 1996.
- KAY, S. et al. **A bacterial effector acts as a plant transcription factor e induces a cell size regulator.** Science, v. 318, n. 5850, p. 648-651, 2007.
- KAY, S.; BONAS, U. **How *Xanthomonas* type III effectors manipulate the host plant.** Curr Opin Microbiol, v. 12, n. 1, p. 37-43, 2009.
- LIMA, U. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

MOSCOU, M.; BOGDANOVA, A. **A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors.** Science, v. 326, n. 5959, p. 1501, 2009.

OSTERGAARD, S., L. Olsson, et al., (2000). **Metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae.** Microbiol Mol Biol Rev 64(1): 34-50.

PEREIRA, A. L. A. et al. **Identification of putative TAL effector targets of the citrus canker pathogens shows functional convergence underlying disease development and defense response.** BMC Genomics, v. 15, n. 157, p. 1-15, 2014.

RÖMER, P. et al. **Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene.** Science, v. 318, n. 5850, p. 645-648, 2007.

SCHENBERG, Ana Clara Guerrini. **Biotecnologia e desenvolvimento sustentável.** Estudos Avançados. Vol. 24 nº 70. São Paulo, 2010.