

OBTENÇÃO DE CONSTRUÇÕES DE EXPRESSÃO CONTENDO MUTAÇÕES NOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO LOCALIZADOS NO PROMOTOR DO GENE DA MIOSTATINA

Carolina Stefano Mantovani (carol_mantovani@yahoo.com.br), Carla Vermeulen Carvalho Grade (carla_grade@hotmail.com) & Lúcia Elvira Alvares (lealvare@unicamp.br)



INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP
 PIBIC/CNPQ



Palavras-chave: Miostatina - Promotor - Mutagênese sítio-dirigida

Introdução

A proteína Miostatina (GDF-8) é um regulador negativo chave da deposição de musculatura esquelética (Figura 1), e sua estrutura e função são conservadas em diversas espécies, incluindo humanos.

Nocaute do gene da Miostatina → Hiperplasia e hipertrofia de fibras musculares

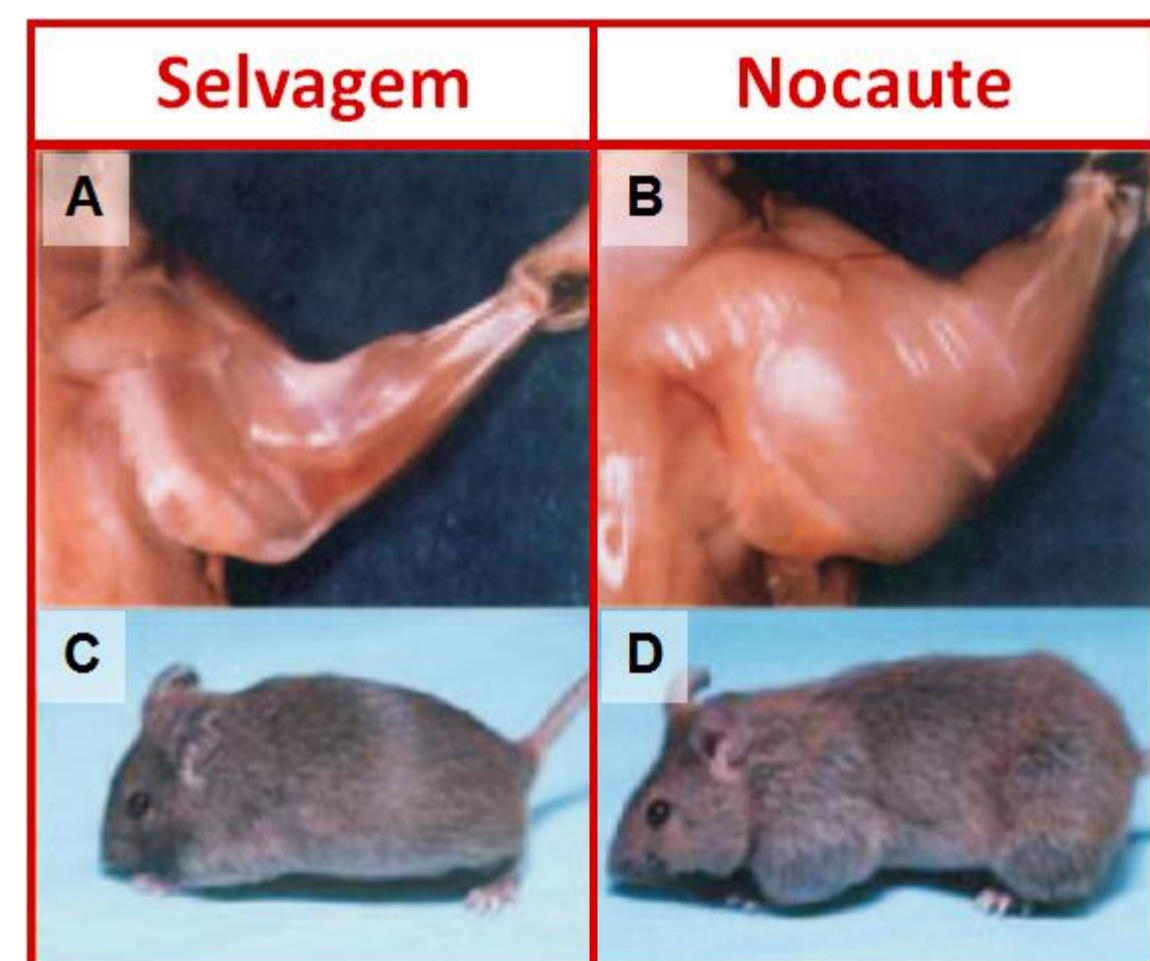


Figura 1. Camundongo selvagem (A, C) e nocauteado (B, D) para o gene da Miostatina. Adaptado de Rodgers (2008).

Para compreender melhor a regulação deste gene, seu promotor basal foi identificado por análises de bioinformática, as quais revelaram a presença de sítios de ligação para os fatores de transcrição Meis1, FXR, CREB/ATF e NFY (Figura 2). A fim de determinar o papel destes fatores na modulação da atividade transcricional da *Miostatina*, o promotor basal de camundongo foi clonado no vetor pGL3-Basic Luciferase.



Figura 2. Sequência do promotor do gene da Miostatina.

Metodologia

Para poder determinar o papel de Meis1, FXR, CREB/ATF e NFY na atividade do promotor da *Miostatina* foram geradas construções de expressão em que os sítios de ligação de tais fatores foram inativados individualmente ou de maneira combinada (Figura 3). Foram desenhados primers mutagênicos através do programa *QuikChange® Primer Design*, permitindo a utilização da técnica de mutagênese sítio-dirigida *in vitro* (Figura 4).

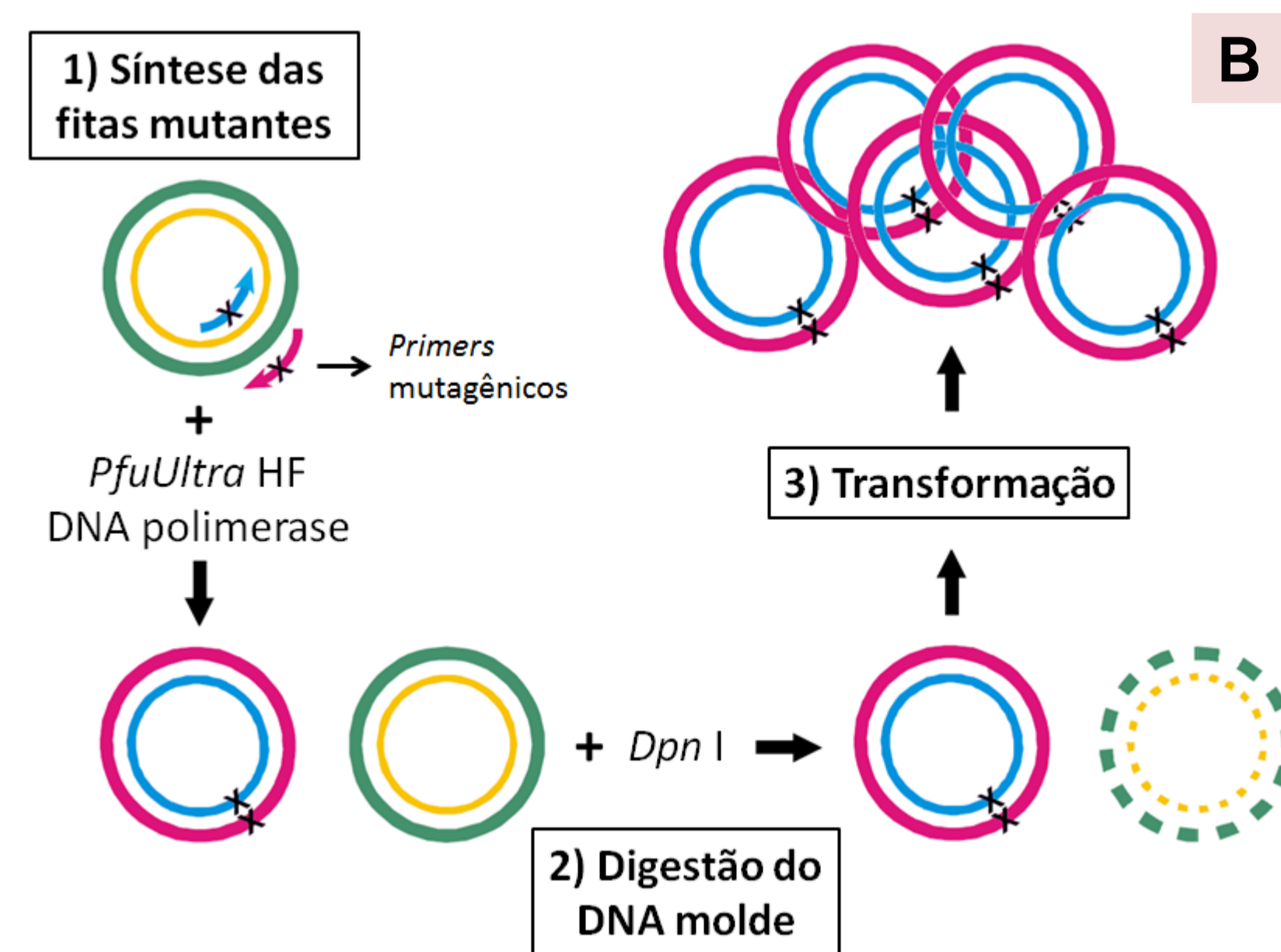


Figura 4. A) No desenho dos primers mutagênicos alguns nucleotídeos foram trocados (X) a fim de formar os sítios de ligação de enzimas de restrição (sublinhado). B) Passos para a obtenção das construções de expressão do kit *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis*, da Agilent. 1) Síntese das fitas mutantes por ciclagem térmica; 2) Digestão do DNA molde; 3) Transformação do DNA mutado em bactérias competentes.

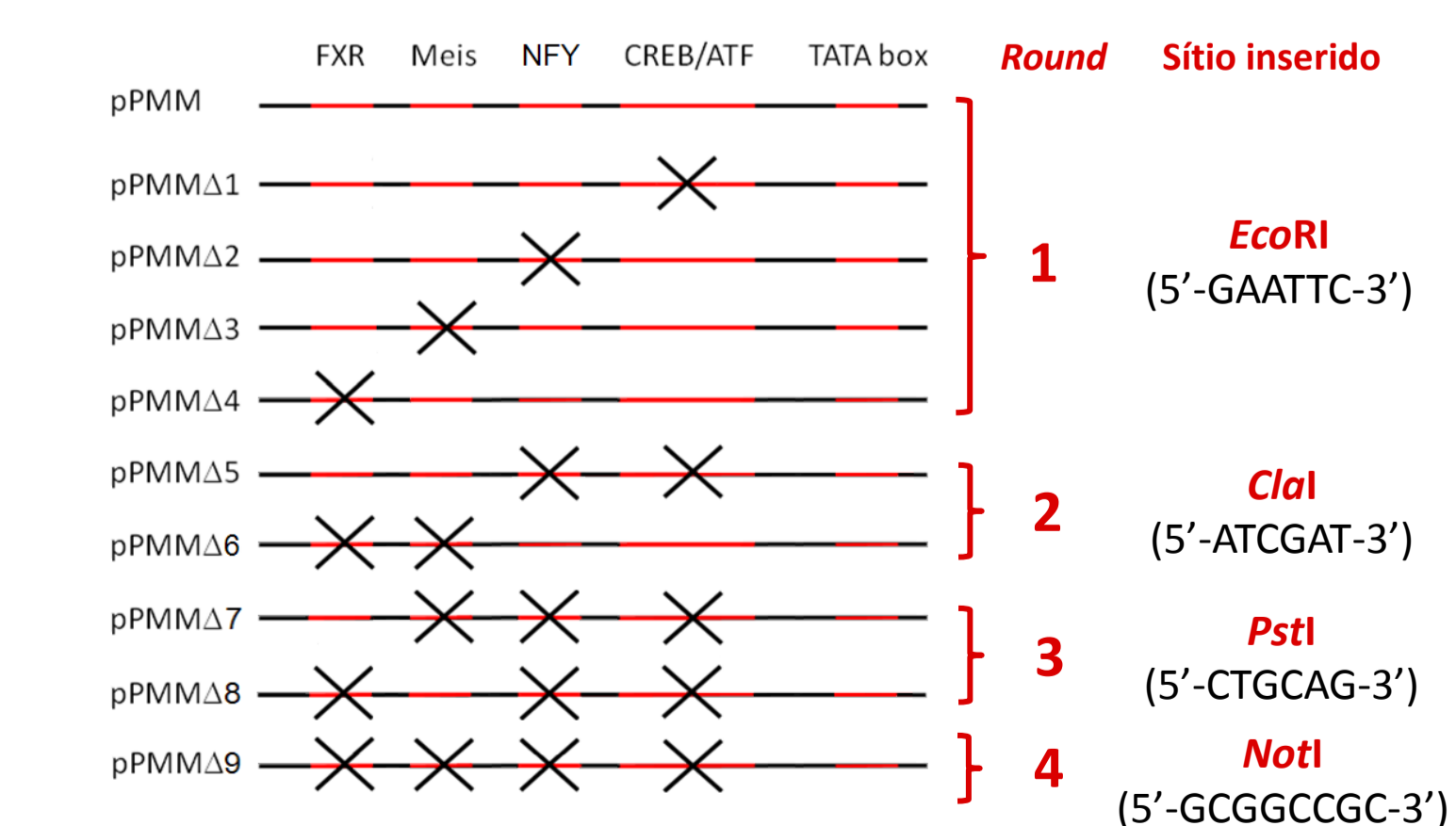


Figura 3. Representação dos rounds para obtenção das construções contendo mutações sítio-dirigidas (X) formando sítios de enzimas de restrição no promotor do gene da Miostatina (pPMM) para possibilitar rápida verificação do sucesso da mutagênese.

Resultados e Discussão

Os plasmídeos mutados foram digeridos com as enzimas *EcoRI* (Round 1) e *ClaI* (Round 2) e os resultados foram verificados através de eletroforese em gel de agarose (Figura 5), de acordo com o padrão de bandas esperado para o número de sítios existentes depois das mutagêneses (Tabela 1).

Tabela 1. Número de sítios das enzimas *EcoRI* e *ClaI* presentes antes e depois das mutagêneses bem sucedidas.

Enzima de restrição	Número de sítios antes da mutagênese	Número de sítios depois da mutagênese
<i>EcoRI</i>	0	1
<i>ClaI</i>	3	4

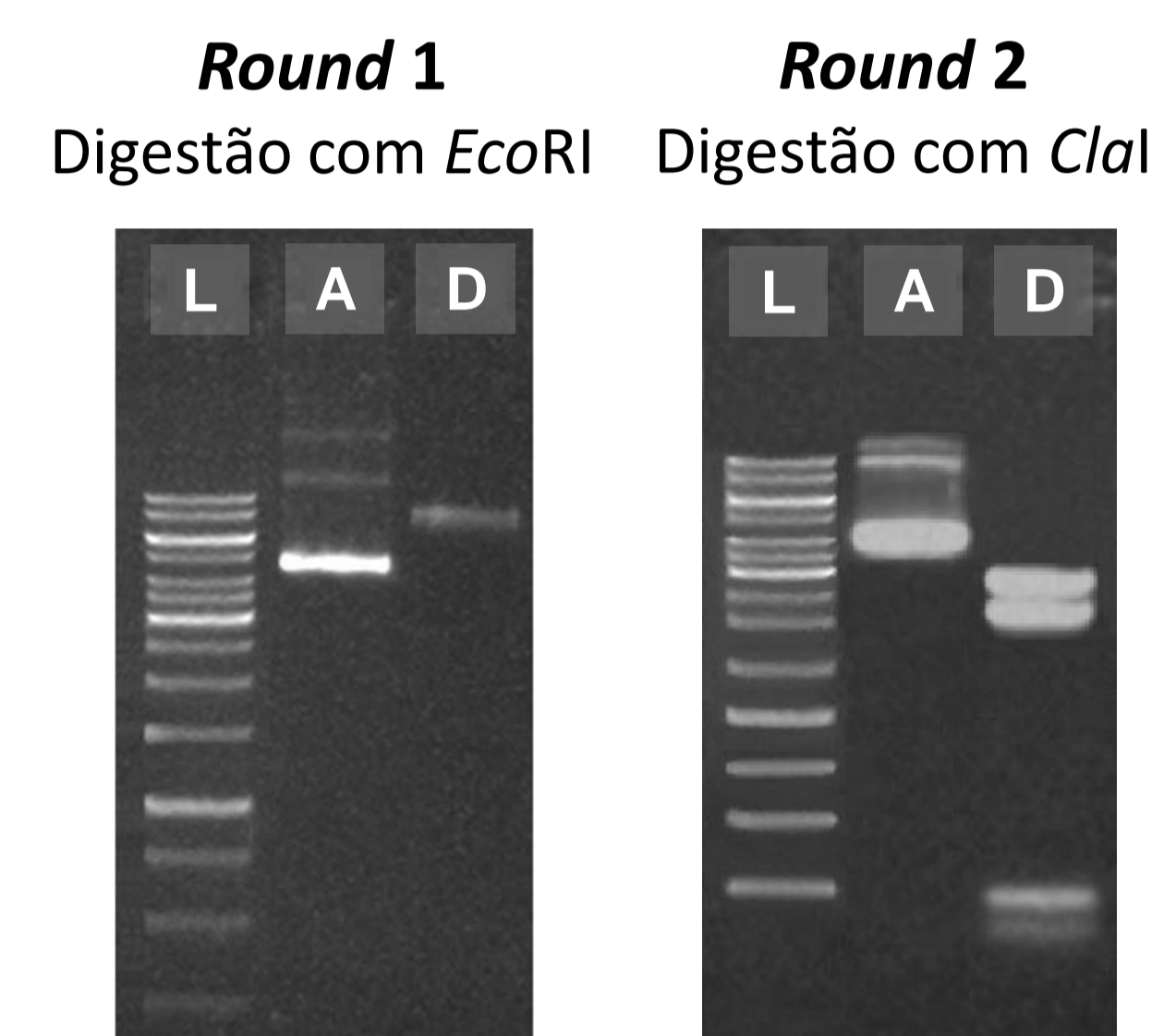


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose após a realização da mutagênese para confirmar a inserção da mutação desejada. L: Ladder 1 kb; A: Antes da digestão; D: Depois da digestão.

Para confirmar cada mutação e garantir que o restante da sequência estava inalterado, todas as construções obtidas foram sequenciadas (Figura 6).

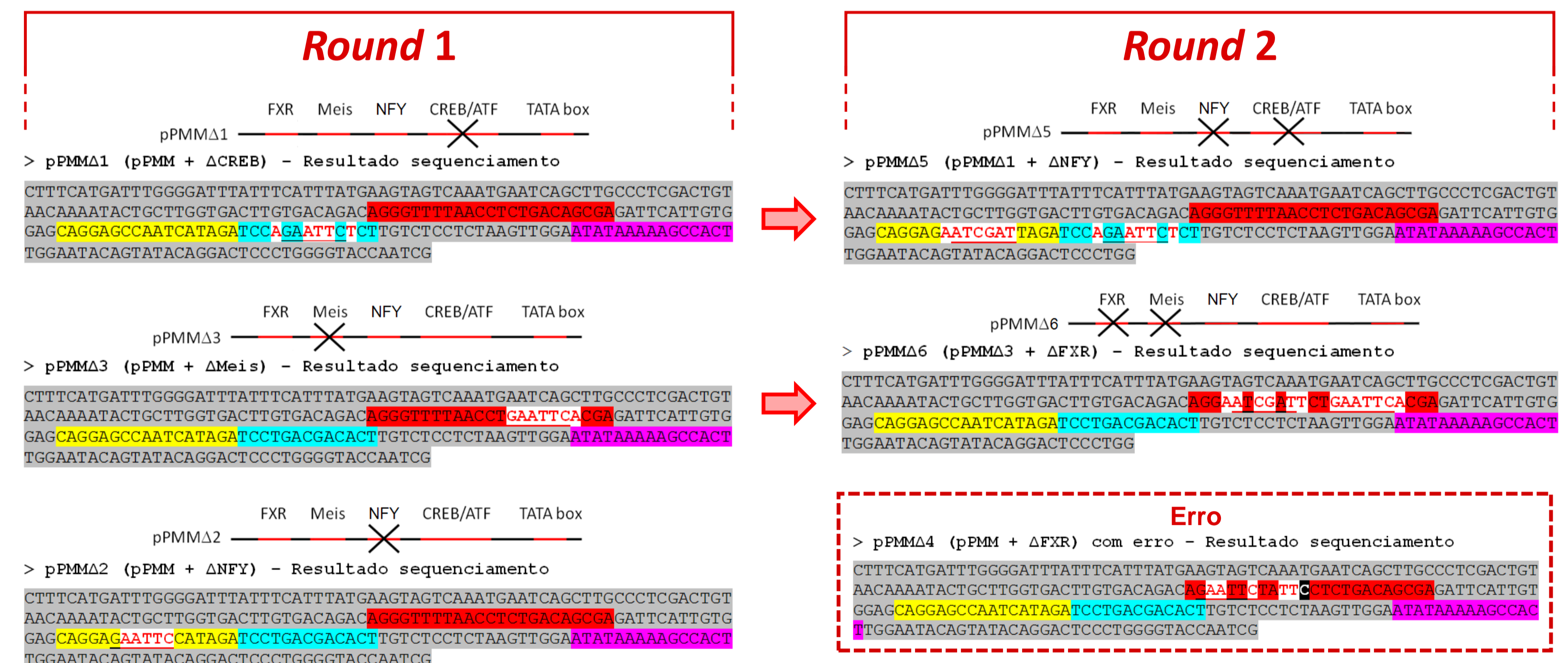


Figura 6. Resultados dos sequenciamentos. Fundo branco: mutações bem-sucedidas; Sublinhado: sítios de enzimas de restrição; Fundo preto: erro na mutagênese (inserção de nucleotídeo). Obs.: Os rounds 3 e 4 ainda não foram finalizados.

Como as mutações foram realizadas no promotor que está clonado no vetor pGL3-Basic Luciferase, a medição dos níveis de atividade da Luciferase irá permitir avaliar o papel de cada sítio na modulação da atividade do gene da Miostatina.

Conclusões

- A técnica da mutagênese sítio-dirigida *in vitro* se mostrou eficaz e com pequena taxa de erros na geração das construções de expressão desejadas;
- As construções geradas a partir deste trabalho serão fundamentais para o estabelecimento do papel individual de cada fator de transcrição na atividade do promotor do gene da Miostatina, bem como para a identificação de possíveis interações sinérgicas ou antagonísticas entre esses fatores em futuros ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo*.