ANÁLISE DO EFEITO DA MUTAÇÃO E89K SOBRE A CAPACIDADE DE LIGAÇÃO DA PROTEÍNA SRY À SEQÜÊNCIA DNA-ALVO

Bernardi, R. D.[1]; Cunha Junior, J. L. R.[1]; Soardi, F. C.[1]; Benedetti, C. E.[2]; de Mello, M. P.[1]

[1]Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG)

[2]Centro de Biologia Molecular Estrutural do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron

Agência financiadora: PIBIC/CNPq

Palavras-chave: SRY - Disgenesia gonadal - Mutação

INTRODUÇÃO

A expressão do gene *SRY* constitui o primeiro passo para a diferenciação sexual masculina nos embriões de mamíferos. Este gene localizado no braço curto do cromossomo Y codifica uma proteína de 204 aminoácidos dos quais 79 constituem um domínio denominado HMG-box que confere a esta proteína a capacidade de interagir com o DNA. Mutações no gene *SRY* em indivíduos 46,XY causam disgenesia gonadal.

OBJETIVO

Neste projeto pretende-se estudar o gene *SRY* de uma paciente previamente diagnosticada com disgenesia gonadal e que possui a alteração E89K provocada pela troca G>A na posição nucleotídica 265 a partir do ATG, ou seja, dentro do domínio HMG-box da proteína (figura 1). O objetivo final deste trabalho é fazer o estudo molecular do efeito biológico desta variante e suas conseqüências na função de ligação da proteína SRY mutante ao DNA alvo.

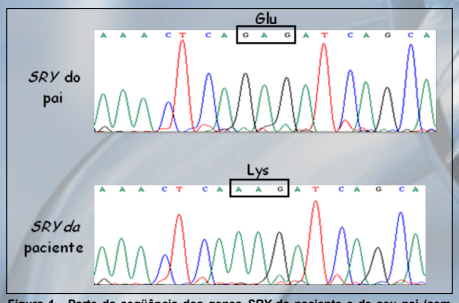

Figura 1. Parte da seqüência dos genes *SRY* da paciente e de seu pai (sem mutação), destacando a alteração G>A .

METODOLOGIA

✓ Extração de DNA genômico a partir de sangue total periférico da paciente e do controle.

✓ Amplificação dos genes *SRY*, normal e mutante, por PCR (Polimerase Chain Reaction).

✓ Purificação e clonagem do produto de PCR em vetor *pGEM-T easy (Promega®) (figura 3).*

✓ Transformação em *E. coli DH5α.*

✓ Extração plasmidial (figura 2).

✓ Subclonagem em vetor de expressão *pET28a (figura 4).*

✓ Transformação em linhagem de expressão *E. coli BL21(DE3).*

✓ Expressão e purificação das proteínas.

✓ Ensaio de ligação entre proteína e DNA alvo (*EMSA – Gel "shift"*)

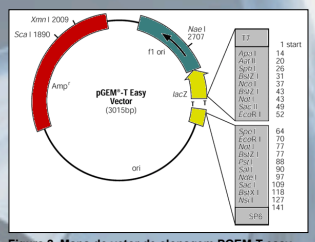

Figura 2. Mapa do vetor de clonagem PGEM-T easy (Promega®).

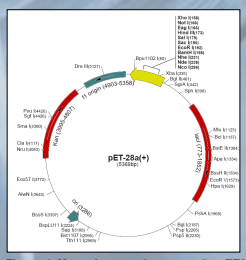

Figura 4. Mapa do vetor de expressão pET28a.

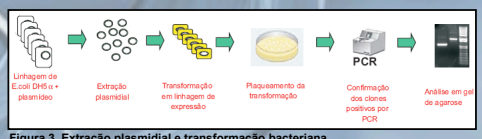

Figura 3. Extração plasmidial e transformação bacteriana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontradas dificuldades em algumas etapas. Dentre as principais, destacam-se:

PROBLEMAS	SOLUÇÕES
Inserção de bases erradas pela enzima *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen)	Uso da enzima de alta fidelidade *Pfx50™ DNA polymerase (Invitrogen)*
Amplificação de DNA contaminante (resultado falso-positivo)	Uso de controle negativo (branco) e de *primers* que flanqueiam o *polylinker* vetorial
Baixa eficiência na extração plasmidial sem *kits*	Uso de *kits* comerciais
Baixa eficiência da transformação por tampão químico e por choque térmico.	Uso de transformação por eletroporação
Dificuldades gerais no uso do *pET28a*	Uso alternativo do vetor *pGEX2T*

Destas soluções, algumas já foram aplicadas e outras estão em processo de implementação.

CONCLUSÃO

O presente trabalho deixou em aberto as principais questões sobre a conseqüência da mutação E89K na proteína em relação à sua capacidade de se ligar ao DNA alvo. Porém, estamos caminhando para concluí-lo o mais rápido possível. É importante mencionar que toda essa parte do trabalho, de Biologia Molecular, está sendo muito importante para o grupo, porque a partir dele tem se padronizado muitos protocolos que estão sendo utilizados em outros projetos do Laboratório.