

8

CAPÍTULO

CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA RANDÔMICA DE OLIGONUCLEOTIDEOS CONTENDO O PROMOTOR DA T7 POLIMERASE PARA A SÍNTESE, IN VITRO, DE RNA

Silva, Amanda Gabrielle da ¹ *;
Marangoni, Karina ²;
Goulart, Luiz Ricardo ²;
Neves, Adriana Freitas ¹

¹ Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Química, Laboratório de Biologia Molecular, Catalão, Goiás, Brasil.

² Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Nanobiotecnologia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

* email: amangaby17@yahoo.com.br

Resumo: O método, in vitro, de seleção de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) vem sendo amplamente aplicado na caracterização de ácidos nucleicos estruturalmente funcionais, chamados aptâmeros ligantes a um alvo. Os aptâmeros são pequenas moléculas de DNA em fita simples ou RNA, os quais apresentam alta sensibilidade e afinidade a um alvo, que pode ser proteína, células, vírus, ácidos nucleicos, vitaminas, dentre outros. A seleção de aptâmeros é feita por meio de biblioteca randômica de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente, sendo estas constituídas por uma região aleatória flanqueada por regiões conservadas. Para a seleção dos aptâmeros de RNA, a biblioteca randômica de oligonucleotídeos de DNA deve ser transcrita in vitro em uma biblioteca de RNA. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo otimizar um processo para a síntese de uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos contendo o promotor da T7 RNA Polimerase (T7 RNAP) para posterior aplicação na seleção de aptâmeros de RNA. Um pool de DNA genômico humano foi utilizado como fonte para a biblioteca, este pool foi sonificado em diferentes tempos, para se verificar a melhor condição para geração da biblioteca. O produto obtido após 60 minutos foi amplificado por PCR, incorporando sequências fixas por meio de primers, dentre os quais o primer senso continha o promotor da T7 RNAP. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose e fotocimentados, sendo que os fragmentos variaram de aproximadamente 80 à 600 nucleotídeos. O método utilizado demonstrou ser útil na construção de bibliotecas randômicas de RNA com aplicabilidade na seleção de aptâmeros.

Palavras-chave: Selex; aptâmero; ácido nucleico

1. Introdução

A química combinatória é uma tecnologia importante para a indústria, assim como para a investigação biotecnológica, que têm sido utilizada para o desenvolvimento de novos materiais. Os ácidos nucleicos são compostos atraentes para a química combinatória, uma vez que se dobram em estruturas secundárias e terciárias definidas e pode ser amplificado por síntese enzimática. Dentre os métodos utilizados para a seleção, *in vitro*, de RNAs funcionais chamadas aptâmeros a evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) se destaca na seleção em larga escala de ligantes específicos a uma molécula alvo (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007). Esta técnica foi descrita

simultaneamente por Tuerk e Gold (1990), Ellington e Szostak (1990) e Robertson e Joyce (1990) e vem sendo amplamente aplicada .

O SELEX envolve a seleção progressiva de aptâmeros (figura 1) por repetição de séries de ligação, partição e amplificação a partir de uma biblioteca degenerada de ácidos nucleicos (TUERK; GOLD, 1990; ELLINGTON; SZOSTAK, 1990). Esse método representa uma ferramenta útil na identificação de aptâmeros que se ligam a uma molécula, podendo gerar alvos com potencial diagnóstico e também terapêutico para o tratamento de doenças que acometem a saúde humana (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

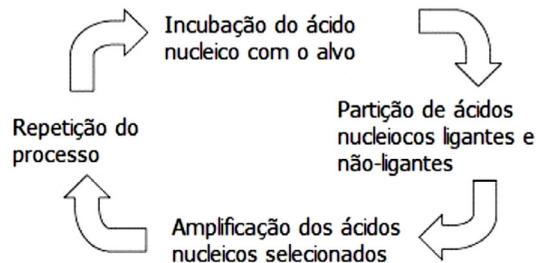


Figura 1: Esquema simplificado do SELEX. Inicialmente ocorre da biblioteca com o alvo, em seguida a separação das sequências ligadas das não ligadas. Os ácidos nucleicos ligados são selecionados e submetidos à transcrição reversa, amplificação e transcrição, para a geração de uma nova biblioteca que será usada no próximo ciclo de SELEX.

Os aptâmeros são oligonucleotídeos de cadeia simples (ssDNA e RNA) capazes de formar bem definida estruturas tridimensionais e se ligam com alta afinidade e especificidade contra uma variedade de alvos, que incluem pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas, proteínas, hidratos de carbono e antibióticos. Entre as vantagens apresentadas pelos aptâmeros podem ser mencionados o tamanho relativamente pequeno em comparação com os anticorpos, o que facilita a sua síntese química e modificações (ULRICH et al., 2006; STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

Além disso, têm sido relatados como agente terapêutico demonstrando grande eficácia em testes em cultura de células e em animais (LEE et al., 2006). Foram descritos como sendo pouco imunogênicos e ao contrário da produção de anticorpos monoclonais, a sua produção em larga escala é menos dispendiosa e sua área de atuação é versátil (GOPINATH et al., 2006). Segundo Miyazaki e Fujita (2012), cerca de duas décadas se passaram desde a descrição do método de seleção de aptâmeros por SELEX e suas aplicações estão aumentando e se tornando cada vez mais sofisticadas, sendo o atual momento uma oportunidade para que as pesquisas em viroses considerem o uso de aptâmeros.

Ponto de partida de um processo SELEX é uma biblioteca aleatória de oligonucleotídeos de DNA quimicamente sintetizados. Esta biblioteca consiste de um grande número de fragmentos de ssDNA ($\sim 10^{15}$ moléculas) que abrange uma região central aleatória de aproximadamente 20-80 nucleotídeos que são flanqueado por diferentes sequências específicas (ULRICH et al., 2006). A indústria farmacêutica utiliza bibliotecas combinatórias de

moléculas naturais, artificiais, de peptídeos e de oligonucleotídeos na identificação de moléculas específicas ao alvo para fins terapêuticos (MAJUMDER et al., 2005).

Para seleção de aptâmeros de DNA, a biblioteca pode ser usada diretamente no primeiro round do SELEX, pois os primers (senso e antisenso) derivam das sequências específicas nas terminações 5'e 3', permitindo assim a amplificação dos oligonucleotídeos selecionados. Admiti-se que moléculas de DNA sintetizadas quimicamente são amplificadas pela polimerase com diferentes eficiências, assim, podem ocorrer perdas de algumas sequências ligantes após o primeiro round. No que se refere para aptâmeros de RNA, a biblioteca randômica de DNA deve ser transcrita in vitro em uma biblioteca de RNA antes de começar os rounds do SELEX, por isso é essencial que o primer senso da 5' possua a sequência promotor da T7 RNA Polimerase (T7 RNAP). Assim durante cada round do SELEX é feito uma transcrição reversa e uma subsequente amplificação (STOLTENBURG; REINEMANN; STREHLITZ, 2007).

Bibliotecas de oligonucleotídeos quimicamente modificadas foram utilizadas em alguns experimentos de SELEX a fim de aumentar a complexidade da biblioteca, incorporando assim novas características de grupos funcionais, possibilitando novas interações da molécula - alvo, além de estabilizar as estruturas conformacionais ou aumentar a resistência à nucleases, propriedades que são importantes para muitas aplicações de aptâmeros (KLUSSMANN, 2006).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como o objetivo realizar a síntese de uma biblioteca randômica de RNA a partir da fragmentação de um pool de DNA genômico humano e inserção da sequência promotora da T7 RNAP utilizando primers específicos, a fim de posterior uso na seleção de aptâmeros ligantes à região 3'-UTR do RNA do vírus da dengue.

2. Material e métodos

2.1 DNA Genômico

Comumente, para a construção da biblioteca qualquer fonte de DNA genômico pode ser utilizada, desde que o DNA seja qualidade e representa de forma confiável o genoma de interesse. Neste trabalho foi utilizado um pool de DNA genômico humano.

Os procedimentos empregados neste estudo para manipulação do material biológico adotaram as normas do Código de Ética Médica, com No. 005/2001 de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A identificação das amostras foi feita conforme os números de prontuários e o número de entrada do indivíduo na pesquisa.

2.2 Sonicação do DNA humano genômico:

O pool de DNA genômico humano com 12 ng, foi submetido à sonicação por 40, 45 e 60 minutos, para se obter fragmentos de tamanhos variados. Os produtos sonicados foram analisados em gel de agarose 1% e fotodocumentados utilizando o aparelho LPix (Loccus).

2.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O pool de DNA foi sonicado, em aparelho Ultrasonic Cleaner (1440D, Odontobras), em diferentes tempos e em seguida submetido à PCR, de acordo com Singer et al.(1997), onde foram incorporadas as sequências fixas (figura 2) utilizando primers com sequência fixa e randômica. Inicialmente foi realizada uma PCR para incorporação do primeiro primer denominado Bran. A amplificação da biblioteca ocorreu de acordo com a seguinte reação de PCR: DNA genômico (12 µg), primer Bran (5 pmols), Platinum Taq DNA Polimerase (1 U), dNTPs (200 mM) , MgCl₂ (1.5 mmol/L) e tampão 1X da Taq para volume final de 50µL. A reação foi incubada por 20 ciclos de 93°C – 20 s, 50°C – 40 s, 72°C – 40 s, precedida por desnaturação inicial de 93°C - 3 minutos e extensão final de 72°C - 10 minutos.

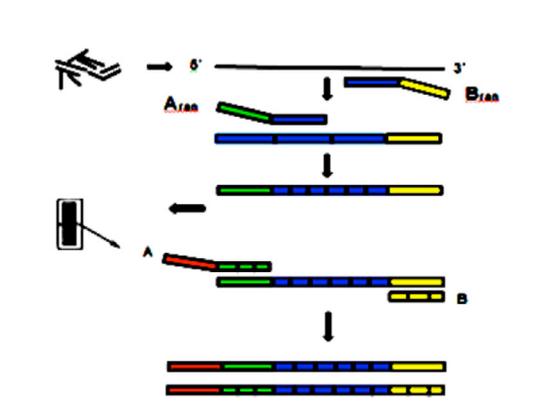


Figura 2- Diagrama da construção da biblioteca. Por meio da sonicação geraram-se cortes aleatórios de DNA para a inserção do primer Bran na primeira PCR, após a purificação uma nova PCR foi realizada para inserção do primer Aran. Por fim, uma nova amplificação foi feita usando o primer A juntamente com o primer B. Fonte: Adaptado de SINGER et al., (1997).

O produto desta reação foi purificado utilizando acetato de sódio (3M) e o pellet foi ressuspendido em 10 μ L de água ultrapura. Posteriormente, este material foi sujeito a uma nova PCR com o primer Aran nas mesmas condições supracitadas, cujo produto também foi purificado. Uma terceira PCR foi realizada incorporando o primer A, que além da sequência fixa de pareamento ao produto anterior, continha uma sequência randômica para geração da biblioteca e a sequência do promotor da T7 RNAP. O primer B foi utilizado a fim de amplificar produtos com base no anelamento ao à sequência Bran previamente introduzida à biblioteca.

Com a finalização da construção da biblioteca randômica após a incorporação dos primers A e B, o produto da reação foi analisado por eletroforese utilizando gel de agarose 1% e as variações nos pesos moleculares entre aproximadamente 80 a 600 nucleotídeos foram purificadas a partir da agarose e precipitados com acetato de sódio (3M).

3. Resultados e discussões

O melhor tempo de sonicação do pool de DNA humano foi de 1 hora, pois com este tempo ocorreu maior fragmentação do produto no aparelho aqui utilizado, conforme apresentado na Figura 3A. A fragmentação do DNA foi importante para que ocorra a geração de diferentes tamanhos do produto, aumentando assim a aleatoriedade na construção da biblioteca (Figura 3B). Geralmente a fragmentação é feita por procedimentos físicos (sonicador, hydroshear), mas também pode ser realizada por métodos enzimáticos, onde reagentes clivam o DNA, como por exemplo, enzimas de restrição e nucleases não específicas (MARINE et. al., 2011).

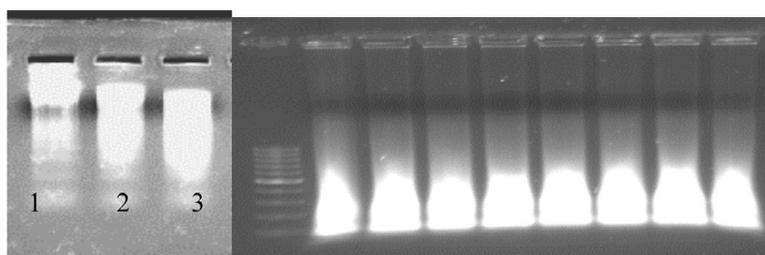


Figura 3: Eletroforese dos produtos obtidos para a construção de biblioteca de RNA. A)- Pool de DNA: 1- Sonicado por 40 minutos; 2- Sonicado por 45 minutos; 3- DNA Sonicado por 60 minutos. B) Eletroforese correspondente ao produto das reações sucessivas para incorporação do promotor da T7 RNAP, demonstrando haver fragmentos genômicos variando de aproximadamente 80–600 nucleotídeos. Estes fragmentos foram cortados do gel de agarose e purificados para uso posterior na seleção de aptâmeros ligantes à regiões de RNA funcionais presentes no genoma do vírus da dengue.

Para realizar a seleção de aptâmeros de RNA, a biblioteca randômica de DNA precisa ser convertida em uma biblioteca de RNA antes do início dos rounds. Dessa forma, foi importante a incorporação de um primer que possuísse a sequência do promotor da T7 RNAP, conforme descrito por Stoltenburg, Reinemann e Strehlitz (2007). A enzima T7 RNAP é conhecida por ser uma das mais simples na síntese de qualquer tipo de RNA. Contrastando com a maioria das RNA Polimerases conhecidas, tais como aquelas codificadas por bacteriófagos T3, SP6 e K11, esta enzima é composta por uma única subunidade catalisadora (KOCHEKOV; RUSAKOVA; TUNITSKAYA, 1998).

Por reconhecimento de seu promotor específico e por meio de uma catálise, a T7 RNAP realiza síntese de RNA na direção 5' → 3' com a presença de um molde de DNA podendo ser utilizada na geração de sondas marcadas com RNA de alta atividade específica e RNA para tradução *in vitro* (SCHENBORN; MEIRENDORF, 1985).

4. Conclusão

O método de síntese aqui empregado permitiu a construção de uma biblioteca randômica de oligonucleotídeos que será útil para diversas aplicações do SELEX genômico. Dentre as perspectivas deste trabalho estão a síntese, *in vitro*, da biblioteca randômica e a utilização da mesma na seleção de aptâmeros de RNA contra elementos regulatórios presentes no genoma do vírus da dengue, tais como a região 3'-UTR.

Agências Financiadoras: FAPEG, CNPq.

Construction of a Random Oligonucleotide Library containing the T7 polymerase promoter for in vitro synthesis of RNA.

Abstract: The method in vitro called selection of ligands by exponential enrichment (SELEX) has been widely applied in the characterization of structural and functional nucleic acid ligands to a target called aptamers. Aptamers can be single strand DNA and RNA molecules, which have high sensitivity and affinity to a target, which may be protein, cell, virus, nucleic acids, vitamins, in others. The selection of aptamers is made by means of a random library of chemically synthesized oligonucleotides, which are comprised of a random region flanked by conserved regions. For the selection of RNA aptamers, the random library of DNA oligonucleotides must be transcribed in vitro in an RNA library. Thus, this study aimed to standardize a process for the synthesis of a random library of oligonucleotides containing the T7 RNA polymerase (T7 RNAP) promoter for subsequent application in the selection of RNA aptamers for dengue virus. A human genomic DNA pool was used as a source for the library, this pool was sonicated at different times, to assess the best condition for generation of the library. The product obtained after 60 minutes was amplified by PCR, incorporating sequences fixed by a set of four primers, one of them contained the T7 RNAP promoter. The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis and photodocumented, and the fragments ranged from about 80-600 nucleotides. The method used has proved useful in the construction of base libraries of random RNA with applicability in the selection of aptamers in vitro binding to a particular target.

Keywords: Selex; aptamer; nucleic acid.

Referências bibliográficas

Ellington, A.D; Szostak, J.W. **In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands.** In: Nature. 346, pp. 818-822,1990.

Gopinath, S. C.; Misono, T. S.; Kawasaki, K.; Mizuno, T.; Imai, M.; Odagiri, T.; Kumar, P.K. **An RNA aptamer that distinguishes between closely related human influenza viruses and inhibits haemagglutinin-mediated membrane fusion.**In J. Gen. Virol . 87 (3), p. 479-487, 2006.

Klussmann, S. **The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications.** Weinheim: WILEY-VCH, 2006.

Kochetkov, S.N.; Rusakova, E.E.; Tunitskaya, V.L. **Recent studies of T7 RNA polymerase mechanism.** In: Febs Letters. 440 (3), p.264-267, 1998.

Lee, J. F.; Stovall, G. M.; Ellington, A. D. **Aptamer therapeutics advance**. In: *Curr Opin Chem Biol.* 10 (3), p. 282-289, 2006.

Majumder, P et al. **Targeting DNA Associated Processes for Cancer Therapy by the Use of SELEX and Anti-gene Approaches – When Selection Meets Rational Design**. In: *Medicinal Chemistry Reviews Online.* 2 (3), p. 257-264, 2005.

Marine, R., S.W. Polson, J. Ravel, G. Hatfull, D. Russell, M. Sullivan, F. Syed, M. Dumas; K.E. Wommack. **Evaluation of a transposase protocol for rapid generation of shotgun highthroughput sequencing libraries from nanogram quantities of DNA**. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 77, p. 8071-8079, 2011.

Miyazaki, Y.; Fujita, M. **Commentary on aptamers for virus research**. In: *Front. Microbio.* 52 (3), 2012.

Robertson, DL; Joyce, GF. **Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA**. In: *Nature.* 344, pp. 467-468, 1990.

Schenborn, E.T; Meirendorf, R.C. novel transcription property of SP6 and T7 **RNA polymerases: dependence on template structure**. In: *Nucl. Acids Res.* 13, p. 6223-6236, 1985.

Singer, B. S.; Shtatland, T.; Brown, D.; G, L. **Libraries for genomic SELEX**. In: *Nucleic Acids Res.* 25, p.781-786, 1997.

Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. **SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands**. In: *Biomol Eng.* 24, p 381–403, 2007.

Tuerk, C; Gold, L. **Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase**. In: *Science.* 249, pp. 505-510, 1990.

Ulrich, H. ; Trujillo, C.A.; Nery, A. A.; Alves, J. M.; Majumder, P.; Resende, R. R.; Martins, A. H. **DNA and RNA aptamers: from tools for basic research towards therapeutic applications**. In: *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 9, p 619–632, 2006.