

Produção de vetor para expressão *in vitro* de *TEAD4*: um ensaio *in silico*

In silico design of expression vector for *TEAD4 in vitro* expression

RESUMO

Luciane Xavier Ferreira
lucianexferreira@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

Flavia Regina Oliveira de Barros
flaviabarros@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil.

O TEAD4 é uma proteína responsável pela regulação da expressão gênica de vários genes e é indispensável para a formação do blastocisto. Entretanto, embriões murinos *Tead4*^{-/-} *in vitro* desenvolvem-se até estágio de blastocisto, diferentemente de embriões mantidos *in vivo* (*in utero*). Portanto, é necessário entender como o ambiente *in vitro* pode afetar a expressão gênica do TEAD4 e da família TEAD (1-3). Destarte, a finalidade deste estudo foi utilizar ferramentas de bioinformática para ensaios filogenéticos, de expressão gênica e de desenvolvimento de vetores para posterior utilização em um projeto de engenharia genética *in vitro*. Foi identificada conservação do TEAD4 entre o camundongo, rato, humano e bovino, tanto para sequência de DNA quanto cadeia polipeptídica. Ainda, dentro da família TEAD foi observada alta homologia, demonstrada em árvores filogenéticas. Quando a interação entre genes da família TEAD e genes envolvidos com o metabolismo celular foi considerada, os fatores de transcrição SP1 e REST destacaram-se por terem sua função afetada por todos os genes TEAD. Assim, espera-se que o vetor do *TEAD4* produzido em *software* no presente trabalho possa ser utilizado para testar *in vitro* esta interação em fibroblastos bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: TEAD4. Bioinformática. Cultivo *in vitro*.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

ABSTRACT

TEAD4 is a protein responsible for regulation of many genes and it is indispensable for blastocyst formation. However, *in vitro* cultured *Tead4*^{-/-} mouse develop to the blastocyst stage, differently to those developed *in vivo* (*in utero*). Therefore, we need to better comprehend how the *in vitro* environment affects TEAD4 and other TEAD (1-3) gene expression. In this manner, this study aimed to apply bioinformatics on phylogenetic analysis, gene expression and design of expression vectors for a later use in genetic engineering study *in vitro*. Both TEAD4 DNA and protein sequences were conserved among mouse, rat, human and bovine. In addition, high homology was observed within TEAD family genes. When the interaction between TEAD and cellular metabolism genes were taken into consideration, SP1 and REST were identified as being affect by all TEAD genes. Hence, we expect the TEAD4 expression vector designed *in silico* here can be useful to test such interactions *in vitro* in bovine fibroblasts.

KEYWORDS: TEAD4. Bioinformatics. *In vitro* culture.



INTRODUÇÃO

Desde o desenvolvimento embrionário até a homeostase celular os processos biológicos são dirigidos pelo DNA. Um dos protagonistas da vida é o TEAD4 (*TEA domain transcription factor 4*) da família TEAD, proteína responsável pela expressão gênica de diversos genes (KANEKO; DEPAMPHILIS, 2013; NISHIOKA et al., 2008). No desenvolvimento embrionário, após a fecundação do oócito, o zigoto passa a ser sinalizado para executar a divisão celular, e no estágio de 8 a 16 células embrião passa a ser denominado de mórula. Na mórula, as células que estão em contato com a zona pelúcida sofrem uma polarização, formando um domínio apical, enquanto as células internas continuam apolares. A partir deste momento uma cascata de reações acontecem em prol da diferenciação celular (CHAZAUD; YAMANAKA, 2016; RAYON et al., 2014). O domínio apical é crucial para a captura da Lats 1/2, consequentemente tornando possível a entrada do YAP no núcleo. Dentro do núcleo, o YAP, tem um de seus domínios ligado com o TEAD4, assim formando um complexo de transcrição do Cdx2, gene responsável para formação do trofotoderma. Nas células internas apolares, Lats 1/2 fosforiliza YAP, que fica sequestrado no citoplasma. Desta forma, ao invés de expressarem Cdx2 as células expressam o Sox2, gene responsável pela formação de massa celular interna (ICM) (POSFAI et al., 2017; RAYON et al., 2014). Após a expressão do Cdx2 e Sox2, o embrião entra na fase de blastocisto, fase em que é possível a visualização da primeira diferenciação celular da vida. Neste estágio se tem o estabelecimento do trofotoderma, responsável pela formação de placenta e seus contribuintes, e da massa celular interna, no qual formará o embrião (HUANG et al., 2017; POSFAI et al., 2017).

TEAD4 regula a sinalização Hippo, responsável pelo tamanho de órgãos e proliferação celular, e conjuntamente regula os oncogenes, visto que sua expressão é associada a diferentes tipos de câncer e sua proliferação. Portanto, o TEAD4 é um fator de transcrição de extrema importância tanto para diferenciação celular quanto pela manutenção de homeostase celular (LIM et al., 2014).

No entanto, ainda não são conhecidos todos os mecanismos regulados pelo TEAD4. Em cultivos *in vitro* de embriões murinos *knockout* para *TEAD4* os resultados obtidos demonstraram desenvolvimento e diferenciação celular dos embriões nos ambientes de 5% e 21% de oxigênio, evidenciando uma compensação transcricional do TEAD4, uma vez que um embrião no útero não se desenvolve na ausência do *TEAD4* (KANEKO; DEPAMPHILIS, 2013; Dados não publicados do grupo).

Em vista disso, considerando-se a crescente demanda para o desenvolvimento da biotecnologia animal e o enfoque de agronegócio da UTFPR Campus Dois Vizinhos, um estudo da expressão gênica do *TEAD4* é necessário o uso do modelo bovino. Sendo assim, o projeto teve como objetivo analisar filogeneticamente os genes da família TEAD, posteriormente identificar as interações gênicas entre TEAD e genes envolvidos no metabolismo celular conservados entre as espécies estudadas, e com base nisso, desenhar *in silico* vetores de expressão de *TEAD4* para futuramente testar os gene-alvos identificados.

MATERIAIS E METODOS

Genes e promotores da família TEA

Os genes do *TEAD4*, 3, 2 e 1 foram adquiridos no banco de dados *GenBank* do NCBI para os seguintes organismos: *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* e *Rattus norvegicus*. Os promotores dos genes do *GenBank* foram capturados na ferramenta *Nucleotide Graphic Report*, com tamanho de +/- 2 mil bases. A sequência de aminoácidos das proteínas do *TEAD4*, 3, 2 e 1, para os mesmos organismos, foram adquiridas no *UniProt*. Posteriormente, o *software* *SerialCloner* versão 2. 6. 1 foi usado para armazenar e compilar as sequências, sempre considerando as isoformas.

Análise filogenética

As sequências obtidas do *GenBank* para *TEAD4* foram analisadas no *Clustal Omega* do *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI) para observar a similaridade e conservação das sequências entre as espécies. Para análise mais ampla de similaridade entre os *TEAD* foram realizadas árvores filogenéticas no *TaxonTree* do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG com a sequência de aminoácidos do *TEAD4*, a árvore foi visualizada no *software* *FigTree* versão 1. 4. 3. Fatores que regulam a expressão genica

Os fatores de transcrição dos promotores da família *TEAD* de humanos foram obtidos no banco de dados *GeneCards* do *WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE*. Já os fatores de transcrição dos promotores do *Bos taurus*, *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* foram gerados na ferramenta *LASAGNA 2.0* (LEE; HUANG, 2013), utilizando o banco de dados do *JASPAR* e as sequências dos promotores obtidos no *GenBank*.

Em seguida, os fatores de transcrição da família *TEAD* dos quatro organismos foram analisados no Excel versão 2013, usando a função =CONT.SE para determinação de fatores de transcrição em comum a todos os genes. Para identificação das vias metabólicas em que os fatores de transcrição estão envolvidos foi aplicada a ferramenta *PathCards* do *WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE*.

Ensaio *in silico* do vetor *knockin* de *TEAD4* mediado por *CRISPR/Cas9*

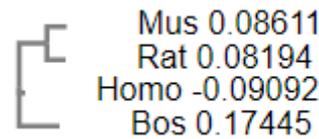
Embasado no ensaio de Yuanpeng Gao et al., por conta da produção de um organismo geneticamente modificado a partir de fibroblasto bovino, a *Cas9* escolhida foi *pSpCas9 (BB) -2A-GFP (PX458)* da *Addgene*, os *RNAg* selecionados foram os mesmos no ensaio, atingindo o locus F – A, próximo ao gene da β - Actina do *Bos taurus*. O vetor do inserto do *TEAD4* foi um plasmídeo do grupo com sequências e sítios de restrição já conhecidos. O vetor *in silico* foi montado no *software* *SerialCloner* versão 2. 6. 1 com o promotor e gene do *TEAD4* do *Bos taurus*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise filogenética

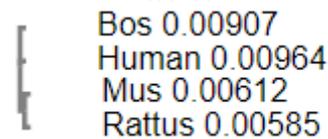
O *TEAD4* é um importante fator para diferenciação celular na embriogênese, desta forma, o gene apresenta-se conservado entre os mamíferos, apresentando o modelo bovino alta similaridade com o *TEAD4* humano (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Árvore filogenética do *Clustal Omega* das sequências de *TEAD4* do *GenBank*.
 Mus: *Mus musculus*, Rat: *Rattus norvegicus*, Homo: *Homo sapiens*, Bos: *Bos taurus*.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 2: Árvore filogenética do *Clustal Omega* das sequências de aminoácidos do *UniProt* do *TEAD4*. Mus: *Mus musculus*, Rat: *Rattus norvegicus*, Human: *Homo sapiens*, Bos: *Bos taurus*.

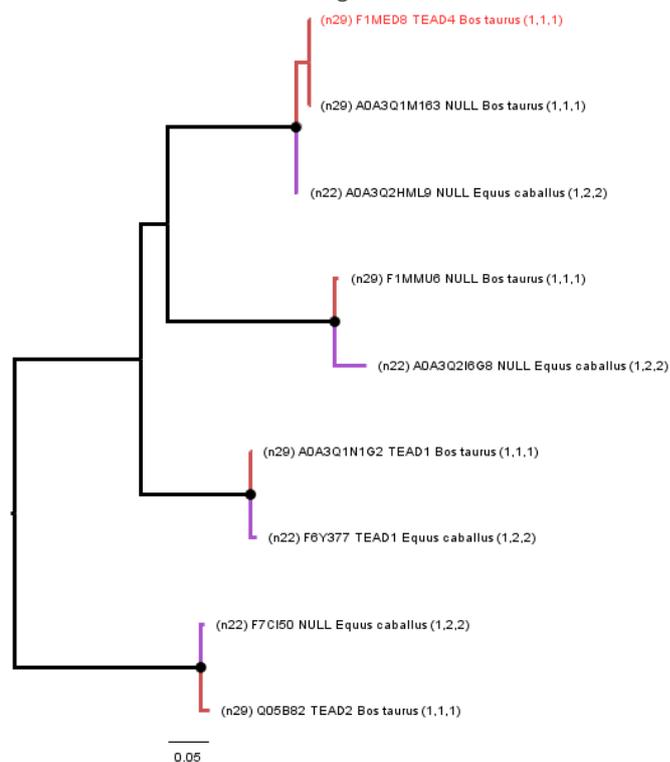


Fonte: Autoria própria (2019).

Por decorrência do *splicing* alternativo e das diferentes isoformas presentes em um mesmo organismo as árvores filogenéticas diferenciam-se entre si, porém mantém uma característica conservada entre o humano e o bovino.

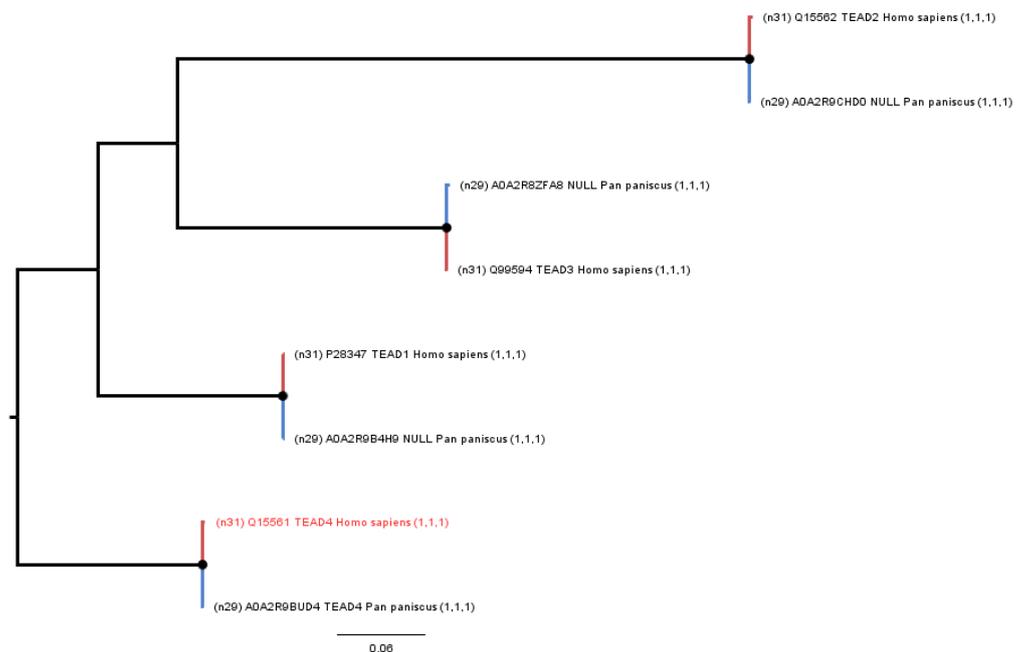
Além da conservação entre espécies o *TEAD4* tem similaridade com os outros *TEAD* da família *TEAD* do mesmo organismo ou de outro organismo. Deste modo, além da conservação entre espécies, o *TEAD4* apresenta sítios de reconhecimento similar aos outros fatores da mesma família e um grau de similaridade com outras espécies, como demonstrado nas Figuras 3 e 4.

Figura 3: Árvore filogenética do *TaxonTree* do *TEAD4*, *F1MED8* do *Bos taurus*, do *UniProt*, exibido no *FigTree* v1.4.3.



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 4: Árvore filogenética do *TaxonTree* do TEAD4, Q15561 do *Homo sapiens*, do *UniProt*, exibido no FigTree v1.4.3.



Fonte: Autoria própria (2019).

Fatores de transcrição

Decorrente da conservação do TEAD4 e de sua similaridade com os outros integrantes da família TEAD, a expressão gênica dos mesmos foi estudada com base dos fatores de transcrição que se ligam aos seus respectivos promotores, desta forma, regulando a transcrição dos TEAD4, 3, 2 e 1. Além da análise dos fatores de transcrição em comum aos TEAD4, 3, 2 e 1, também foram examinados os fatores de transcrição das famílias TEAD dos organismos estudados. Os fatores de transcrição em comum a todos os TEAD e a todos os organismos estão listados no Quadro 1, em conjunto está listado em conjunto os metabolismos que estão envolvidos os fatores.

Quadro 1: Metabolismos envolvidos nos fatores de transcrição da família TEAD.

Fatores de transcrição	Metabolismos	Substratos envolvidos
SP1	Regulação do metabolismo lipídico pelo PPARA, síntese e secreção de aldosterona e regulação da biossíntese de colesterol pelo SREBF	Lipídeos e Na+
REST	Transporte de elétrons respiratórios	Aminoácidos e glicose

Fonte: Autoria própria (2019).

Projeção de modificação genética mediada por CRISPR/Cas9

O vetor do TEAD4 teve a característica de no seu inserto obter não apenas o gene e seu promotor, mas também as sequências homologas do local onde será feito a recombinação homóloga no genoma bovino. Desta forma, utilizável como modelo para modificação genética mediada por CRISPR/Cas9.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados, entende-se que além do TEAD4 se manter conservado entre as espécies o mesmo é altamente similar aos TEAD da própria família, podendo assim haver compensação funcional na falta de algum TEAD. Ademais, as interações gênicas e metabólicas da família TEAD porta conservação dos fatores de transcrição SP1 e REST, desta forma, a metabolômica dos organismos estudados se demonstra conservada, o que por consequência pode ser estudado a interferência dos substratos envolvidos na expressão gênica do TEAD4. Com fundamento, o vetor do TEAD4 *in silico* foi obtido com sucesso e executável para o uso de expressão gênica e suas respectivas interações.

REFERÊNCIAS

- CHAZAUD, C.; YAMANAKA, Y. **Lineage specification in the mouse preimplantation embryo**. *Development*, v. 143, n. 7, p. 1063–1074, 2016.
- HUANG, D. et al. **The role of Cdx2 as a lineage specific transcriptional repressor for pluripotent network during the first developmental cell lineage segregation**. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- KANEKO, K. J.; DEPAMPHILIS, M. L. **TEAD4 establishes the energy homeostasis essential for blastocoel formation**. *Development*, v. 140, n. 17, p. 3680–3690, 2013.
- LIM, B. et al. **Integrative genomics analysis reveals the multilevel dysregulation and oncogenic characteristics of TEAD4 in gastric cancer**. *Carcinogenesis*, v. 35, n. 5, p. 1020–1027, 2014.
- NISHIOKA, N. et al. **Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos**. *Mechanisms of Development*, v. 125, n. 3–4, p. 270–283, 2008.
- POSFAL, E. et al. **Position- and hippo signaling-dependent plasticity during lineage segregation in the early mouse embryo**. *eLife*, v. 6, p. 1–24, 2017.
- RAYON, T. et al. **Notch and Hippo Converge on Cdx2 to Specify the Trophectoderm Lineage in the Mouse Blastocyst**. *Developmental Cell*, v. 30, n. 4, p. 410–422, 2014.
- GAO, Y. et al. **Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects**. *Genome Biology*, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.
- LEE, C.; HUANG, C. H. **LASAGNA-search: An integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization**. *BioTechniques*, v. 54, n. 3, p. 141–153, 2013.