

UTILIZAÇÃO DA GFP NA LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR DA ORF YPR048W DE *Saccharomyces cerevisiae*

CATUNDA, KC¹ e NÓBREGA, FG¹

¹Universidade do Vale do Paraíba/ Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento/ Laboratório de Genética Molecular e Genomas, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, SJCampos, SP.
kccatunda@uol.com.br

Resumo - Estudo iniciais demonstraram que a proteína codificada pelo gene YPR048W é essencial para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e que representa possivelmente uma proteína de membrana. O presente trabalho teve como objetivo a geração de resultados que possibilitem concluir sua localização intracelular auxiliando assim, na caracterização funcional deste gene. Para tanto, foi utilizada estratégia para a construção plasmidial utilizando recombinação homóloga onde *linkers* de recombinação sintéticos, dupla-fita, são utilizados para subclonar, com mais de 80% de eficiência, um fragmento de DNA em um plasmídeo. A observação em microscopia de fluorescência das fusões traducionais trazendo como resultados que a proteína em questão possui provável localização citoplasmática.

Palavras-chave: levedura, proteína verde fluorescente, transporte de elétrons.

Área do Conhecimento: II – Ciências biológicas

Introdução

Tendo sido encontrada ao buscar por um terceiro componente da cadeia de transporte de elétrons envolvida na clivagem do colesterol em pregnenolona em mamíferos, a ORF YPR048W foi inicialmente estudada neste laboratório [1].

Tais estudos demonstraram que a ORF YPR048W apresentava homologia com NADPH-citocromo p450 reductase de mamíferos e, comprovou que este se tratava de um gene essencial ao realizar a inativação de um de seus alelos. Com o intuito de auxiliar na localização intracelular da proteína, testes de solubilização foram então realizados, onde resultados indicaram que esta está fortemente associada à membrana [1].

A ORF YPR048W está localizada no cromossomo XVI da levedura *Saccharomyces cerevisiae* entre as coordenadas 659179 e 661050 da fita Watson. Sendo composta por 1872 nucleotídeos (623 aminoácidos) é um gene nuclear sem introns, de função molecular, processo biológico e localização intracelular não descrita.

Com o intuito de contribuir para a caracterização funcional da proteína YPR048W, buscamos neste trabalho examinar a localização intracelular do produto gênico de YPR048W utilizando fusões traducionais N-terminal (amino terminal) e C-terminal (carboxi-terminal) da Proteína Verde Fluorescente (GFP) com a ORF.

Materiais e Métodos

Tendo como base uma estratégia para a construção plasmidial utilizando recombinação homóloga onde *linkers* de recombinação sintéticos, dupla-fita, são utilizados para subclonar um fragmento de DNA em um plasmídeo com mais de 80% de eficiência [2].

Sequenciamento do plasmídeo pMW29:

Visando a obtenção da seqüência nucleotídica do vetor centromérico pMW29 (Figura 1) para elaboração dos iniciadores a serem utilizados na construção das fusões traducionais N e C terminal, realizamos reação em cadeia da polimerase para seqüenciamento do plasmídeo em questão com a utilização de dois iniciadores: 533 – voltado para a região GAL10 e 534 – voltado para a região GAL1.

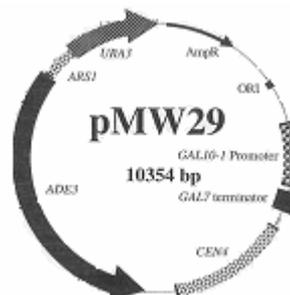
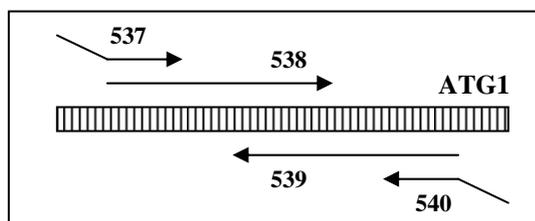


Figura 1 Mapa do plasmídeo centromérico pMW29

Elaboração de iniciadores: posteriormente a obtenção da seqüência do plasmídeo centromérico pMW29, dezesseis iniciadores foram elaborados, sendo quatro pares para construção N terminal (2 para “linker ATG1” 2 para “linker ATG2”) e quatro pares para construção C terminal (2 para “linker STOP1” 2 para “linker STOP2”). A utilização dos iniciadores para geração do *linker* está exemplificada na Figura 1.

Obtenção de linkers para construção N terminal: Para a reação de amplificação dos *linkers* ATG1 e ATG2 foram utilizados 0,6µL dos primers 538 e 539 (ATG1) ou 542 e 543 (ATG2), 6µL para



os primers 537 e 540 (ATG1) ou 541 e 544 (ATG2), 1 μ L MgSO₄, 1,5 μ L 10mM dNTP, 5 μ L enhancer, 5 μ L de tampão e 0,5 μ L Pfx Dna Polimerase. 30 ciclos foram realizados para amplificação de ATG1, contendo como passos: 1) 30 segundos de desnaturação a 94°C, 2) 60 segundos de anelamento a 55°C e 3) 60 segundos de extensão a 72°C, tendo a temperatura de anelamento alterada para 50°C no caso da amplificação de ATG2.

As bandas obtidas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 2% e, após serem submetidas a processo de eletroeluição, foram purificadas, precipitadas com fenol:clorofórmio:isoamílico (24:24:1) e diluídas em 5 μ L de água milliQ.

Obtenção de linkers para construção C terminal: A reação de amplificação dos *linkers* para construção C terminal foi realizada com os mesmos volumes e ciclagens utilizados para a amplificação dos *linkers* para construção N terminal, diferindo somente nos iniciadores utilizados (545 à 552) e na temperatura de anelamento (48°C para STOP1 e 55°C para STOP2).

As bandas foram verificadas em gel de agarose 2% de onde foram cortadas e submetidas a processo de eletroeluição seguido de purificação e precipitação por fenol:clorofórmio:isoamílico e por fim diluídas em 5 μ L de água milliQ.

Amplificação da ORF YPR048W e obtenção de "acceptor vector – pMW29-YPR": Para amplificação da ORF YPR048W foram utilizados 7 μ L de Supermix, 1 μ L do iniciador 535, 1 μ L do iniciador 536 e 1 μ L de plasmídeo p450R/ST1 contendo a ORF em questão, diluído 1:100. 35 ciclos foram realizados contendo os passos 1) 15 segundos de desnaturação a 94°C, 2) 30 segundos de anelamento a 36°C e 3) 2 minutos e meio de extensão a 72°C. A banda amplificada foi verificada através da análise de 1 μ L da reação em gel de agarose. A reação foi então precipitada e purificada (fenol/clorofórmio) e submetida a digestão enzimática com *SacI* e *XbaI* durante 1 hora a 37°C. A reação foi novamente submetida a eletroeluição, purificação e precipitação e assim diluída ao final em 5 μ L de água milliQ.

Paralelamente ao procedimento acima descrito, o vetor centromérico pMW29 foi submetido a digestão enzimática com *SacI* e *XbaI*, teve sua banda verificada em gel de agarose 1% a qual foi submetida a eletroeluição, purificação e precipitação

5 μ L de água milliQ.

Procedimento de ligação da ORF YPR048W amplificada e digerida com o vetor centromérico pMW29 digerido foi realizada seguindo as normas do fabricante 2,5 μ L desta reação foi utilizado para transformação em células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α , obtidas pelo método de CaCl₂, as quais foram plaqueadas em meio Luria Berthani adicionado de ampicilina (LA) e incubadas no decorrer da noite a 37°C.

Diversos clones obtidos foram submetidos a processo de extração de DNA plasmidial, o qual foi verificado em gel de agarose após digestão com *SacI* e *XbaI*, afim de verificar a presença do gene YPR048W clonado. Quatro clones positivos foram identificados sendo três deles estocados e um deles tendo seu DNA plasmidial extraído, agora denominado pMW29-YPR, utilizado para dar continuidade aos estudos.

Obtenção de donor fragment – o fragmento doador, correspondente a seqüência codificante da proteína verde fluorescente (GFP), foi digerido a partir do vetor pGALC1b-GFP de Okamoto *et al* (1998) com as enzimas *KpnI* e *XhoI* durante 1 hora a 37°C. A reação foi então totalmente submetida a corrida eletroforética em gel de agarose 1%, onde comprovou-se liberação de banda de aproximadamente 730Kb a qual foi cortada, eletroeluída, purificada, precipitada sendo, por fim, diluída em 5 μ L de água milliQ.

Construção do plasmídeo pMW29-YPR-GFPN – fusão N-terminal: Tendo como base a estratégia descrita por Raymond *et al* (1999), realizou-se transformação em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem FF18133 pelo método de LiOAc utilizando-se: 1) 2 μ L de *donor fragment* (GFP extraída de pGALC1b-GFP), 2) 0,5 μ L de *acceptor vector* (plasmídeo pMW29-YPR previamente linearizado através de digestão enzimática com *SacI*), 3) 1 μ L do *linker* ATG1 e 4) 1 μ L do *linker* ATG2. A linhagem foi então plaqueada em meio mínimo (WO) adicionado dos aminoácidos triptofano, lisina, histidina e leucina, selecionando assim somente clones que possuísem a construção desejada. Os clones foram obtidos após incubação a 30°C durante o transcorrer da noite.

Construção do plasmídeo pMW29-YPR-GFPC – fusão C-terminal: Foram utilizados os mesmos procedimentos e quantidades que aqueles descritos para obtenção da fusão N-terminal, diferindo somente em dois aspectos: 1) o *acceptor vector* foi linearizado por digestão enzimática com *XbaI*, 2) foram utilizados os *linkers* STOP1 e STOP2 em substituição aos *linkers* ATG1 e ATG2.

Indução da expressão gênica da fusão traduscional: Dois clones previamente selecionados, contendo construção de fusão traduscional N-terminal e C-terminal foram incubados em 5mL de meio contendo galactose

Figura 2 Ilustração da utilização dos iniciadores para obtenção do *linker* ATG1.

como fonte de carbono fermentável, e crescidos *overnight* a 30°C visando indução da expressão gênica devido ao promotor GAL10 presente no plasmídeo pMW29.

Crescimento de linhagens controle: linhagens controle-negativas foram crescidas *overnight* sob as mesmas condições que a linhagem contendo as construções de fusões C e N terminais.

Observação por microscopia de fluorescência: 500µL das linhagens crescidas *overnight* foram centrifugadas em microtubos por 5 minutos a 14000 rpm e ressuspendidas em água milliQ estéril, repetiu-se a centrifugação e as células foram então ressuspendidas em 1000mL de água milliQ estéril. 10µL desta suspensão foram colocados em lâmina e coberto com lamínula.

As lâminas foram então observadas em microscópio de fluorescência Leica DMLB no maior aumento (1000x) utilizando-se óleo de imersão e filtro de 470nm próprio para GFP. Os resultados foram documentados com auxílio de câmera Leica e filme Fuji ASA 400.

Resultados

Análise em gel de agarose demonstrada na Figura X permite concluir que os *linkers* ATG1, ATG2, STOP1 e STOP2 gerados através das reações de amplificação condizem com o tamanho esperado de 100pb.

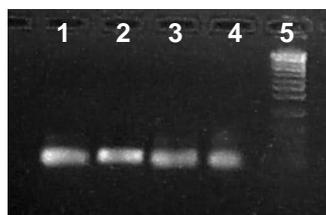


Figura 3 – 1) ATG1, 2) ATG2, 3) STOP1, 4) STOP2 e 5) DNA Std.

Análise em gel de agarose demonstrada na Figura X permite concluir que o fragmento liberado após digestão do plasmídeo pGALC1b-GFP é correspondente ao fragmento esperado de XXX Kb.

Os testes de digestão enzimática realizados no DNA plasmidial extraído dos clones crescidos em meio LA após transformação e analisados em gel de agarose condizem com o tamanho esperado de XX Kb.

Os clones obtidos após transformação em levedura através de crescimento em meio mínimo suplementado com aminoácidos necessários permitem a seleção de linhagens contendo o plasmídeo pMW29-YPR-GFPN ou pMW29-YPR-GFPC

A expressão da proteína verde fluorescente detectada nas linhagens contendo o plasmídeo centromérico pMW29-YPR-GFPN ou pMW29-YPR-GFPC atestam a correta realização da construção.

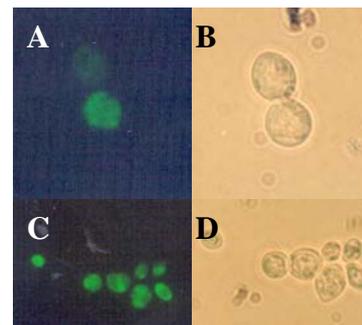


Figura 4 – A) FF1833 pMW29-YPR-GFPN por microscopia de fluorescência, B) FF1833 pMW29-YPR-GFPN por microscopia comum, C) FF1833 pMW29-YPR-GFPC por microscopia de fluorescência, B) FF1833 pMW29-YPR-GFPC por microscopia comum

Discussão

Os estudos realizados inicialmente demonstram a proteína codificada pela ORF YPR048W como sendo uma proteína de membrana mas, foram inconclusivos em relação à localização intracelular não podendo o autor afirmar sua localização como sendo na mitocôndria ou no retículo endoplasmático [1]. Estudo mais recente onde foram determinadas a localização subcelular de todas as 6100 proteínas de *Saccharomyces cerevisiae*, determina a localização intracelular da proteína como sendo citoplasmática [3]

A busca em banco de dados [4] por genes homólogos trouxe como resultados mais relevantes diversas proteínas hipotéticas, ou ainda não descritas sendo, na sua maioria, similares à proteína NADPH citocromo p450 redutase (CPR) de fungos e alguns mamíferos. Tal proteína, já encontrada em *Saccharomyces cerevisiae* [5] sendo codificada pela ORF YHR042W (NCP1) é descrita possuindo somente um único gene codificador em sistemas animais e fúngicos [6].

Outro *hit* importante é a proteína de *Homo sapiens* NR1 (*novel reductase*), encontrada entre os 20 melhores resultados gerados pela busca, e cuja similaridade e identidade é alta, considerando-se a distância evolutiva entre os organismos. Tal proteína foi descrita como possuindo localização citoplasmática [7].

A análise da expressão protéica de fusões traducionais, tanto N terminal quanto C terminal, da ORF YPR048W com a seqüência codificadora da GFP, através de observação por microscopia de fluorescência demonstradas nos Resultados inicialmente levaram a concluir que a localização da proteína em questão estaria vinculada ao citoplasma celular. Uma análise mais detalhada das fotografias, onde pequenas granulações podem ser notadas, novamente levaram a questionar os resultados concluídos acreditando que a análise destas construções por microscopia confocal se fazem necessárias.

Conclusão

Uma análise mais detalhada das construções, realizada em microscopia confocal possivelmente contribuirão para a conclusão dos resultados aqui demonstrados, possibilitando o direcionamento dos estudos de caracterização funcional considerando a similaridade da proteína com as proteínas CPR, cuja localização está no retículo endoplasmático e acordando com resultados de Barros [1] ou com as proteínas NR1, cuja localização está no citoplasma celular acordando por sua vez com resultados publicados por Kumar e colaboradores [3].

Referências

[1] BARROS, M.H. O gene *ARH1* de *Saccharomyces cerevisiae*: estudos genéticos funcionais e localização intracelular. Dissertação de Mestrado – IB – USP – São Paulo-SP, 1996.

[2] RAYMOND CK *et al.* General method for plasmid construction using homologous recombination. **Biotechniques** **26**:134-141, 1999.

[3] KUMAR, A *et al.* Subcellular localization of the yeast proteome. **Genes Dev.** **16(6)**:707-709, 2002.

[4] NCBI, Internet site address: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> acessado em 20/06/2005

[5] SGD, Internet site address: <http://www.yeastgenome.org> acessado em 20/06/2005

[6] VENKATESWARLU, D *et al.* The N-terminal membrane domain of yeast NADPH-Cytochrome p450 (CYP) oxidoreductase is not required for catalytic activity in sterol biosynthesis or in reconstitution of CYP activity. **The journal of biological chemistry.** **273(8)**:4492-4496, 1998

[7] PAINE, M.J. *et al.* Cloning and characterization of a novel human dual flavin reductase. **J. Biol. Chem.** **275 (2)**, 1471-1478, 2000.