

PROTEÍNAS FLUORESCENTES: VANTAGENS NO ESTUDO DOS MECANISMOS QUE MANTÊM A ESTABILIDADE GENÉTICA

Ana Sofia Príncipe

Estagiária em Genética Molecular da Mitose
Instituto de Biologia Molecular e Celular
anaprincipe@gmail.com

Inês Lopes Cardoso

Professora Associada, Investigadora
Faculdade de Ciências da Saúde - UFP
Instituto de Biologia Molecular e Celular
mic@ufp.pt

Joana Queiroz-Machado

Professora Auxiliar, Investigadora
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
Instituto de Biologia Molecular e Celular
jqueiroz@ufp.pt

Resumo

Pretendeu-se acoplar a *EGFP* (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) a proteínas importantes na protecção telomérica e estabilidade genómica, evitando a morte celular: as proteínas *HP1* (*Heterochromatin Protein 1*) e *HOAP* (*HP1-Orc associated protein*). Assim, utilizaram-se métodos de clonagem para ligar os respectivos genes. Para confirmar a funcionalidade das proteínas de fusão e capacidade de localizar nos telómeros, como acontece com as proteínas endógenas, transfectaram-se células em cultura. Este trabalho permitirá observar a dinâmica destas proteínas *in vivo*, utilizando microscopia de fluorescência.

Palavras-chave

EGFP, estudos *in vivo*, mitose, drosophila

Abstract

The aim was to couple the EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) to proteins essential in telomere protection and genome stability maintenance: HP1 (Heterochromatin Protein 1) and HOAP (HP1-Orc associated protein). Genes encoding these proteins were cloned in a plasmid containing the EGFP gene. To confirm the activity and telomeric localization of fusion proteins, clones were used to transfect cells. This will allow future *in vivo* studies using fluorescence microscopy, increasing the knowledge of cell cycle dynamics of these proteins.

Key-words

EGFP, *in vivo* studies, mitosis, drosophila

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de aprofundar o conhecimento relativamente aos mecanismos de desenvolvimento de um organismo, evidenciou a importância de recorrer à observação da distribuição subcelular e dinâmica de proteínas (Morin *et al.*, 2001) *in vivo*. Tal foi possível com o aparecimento de marcadores moleculares fluorescentes como a *Green Fluorescent Protein*, *GFP* (Clyne *et al.*, 2003), aos quais podem ser ligadas proteínas de interesse, formando proteínas de fusão (Chen *et al.*, 2002), sem que sejam alteradas as propriedades fluorescentes (Wang e Hazelrigg, 1994) ou a função biológica da proteína em questão (Kain *et al.*, 1995). No sentido de aumentar a sua sensibilidade, a *GFP* foi modificada no que diz respeito aos picos de excitação, luminosidade e nível de expressão (*Enhanced GFP* ou *EGFP*) (Yang *et al.*, 1996).

Utilizando esta tecnologia, foi já demonstrado o papel dinâmico de algumas proteínas em vários organismos, nomeadamente, em *Drosophila melanogaster* (Siller *et al.*, 2005, Basto *et al.*, 2004), *Schizosaccharomyces pombe* (Mulvihill e Hyams, 2002), tais como, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (Garcia *et al.*, 2002) e no controlo do tamanho celular em *Drosophila melanogaster* (Patel *et al.*, 2003), entre outras.

A microscopia confocal tem tido um papel preponderante na extensão do potencial da *GFP* na investigação biológica (Brand *et al.*, 1999), particularmente na compreensão dos mecanismos envolvidos na reparação e protecção cromossómica, incluindo dos telómeros.

Os telómeros são complexos nucleoproteicos localizados nas extremidades dos cromossomas eucariotas. Possuem funções essenciais para a viabilidade celular e estabilidade cromossómica, protegendo contra a degradação nucleolítica, contribuindo para o posicionamento dos cromossomas no núcleo interfásico e prevenindo contra fusões terminais (Callén e Surrallés, 2004). De facto, estas estruturas evitam que as extremidades naturais dos cromossomas sejam reconhecidas como quebras pelo sistema de reparação de danos nas células, impedindo a sua fusão (McClintock, 1941; Muller, 1938). A perda de sequências teloméricas parece estar associada com a senescência e a carcinogénese e há um número crescente de síndromes com predisposição para o cancro que possuem telómeros disfuncionais (Callén e Surrallés, 2004).

Neste trabalho pretende-se construir, por tecnologias de engenharia genética, proteínas de fusão com a *GFP* e proteínas envolvidas na protecção telomérica. É sabido que a ausência dessas proteínas em mutantes de *Drosophila melanogaster* conduz ao aparecimento de fusões entre as extremidades dos cromossomas e aos subsequentes rearranjos genómicos e posterior morte celular (Cenci *et al.*, 2003).

As proteínas eleitas foram a *HP1* (*Heterochromatin Protein 1*) e *HOAP* (*HP1-Orc Associated Protein*) que se ligam directamente aos telómeros, protegendo-os (Fanti *et al.*, 1998, Cenci *et al.*, 2003). O mecanismo através do qual estas proteínas interactivam para promover essa protecção ainda é desconhecido. No sentido de procurar explicar este mecanismo molecular, a dinâmica destas proteínas teloméricas será no futuro comparada com a que se observa em células mutantes de outros genes também envolvidos na protecção telomérica, como o *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) e o *Nbs* (*Nijmegen Breakage Syndrom*). A ausência destas proteínas conduz igualmente a inúmeras fusões terminais e instabilidade genética. As proteínas *ATM* e *Nbs* desempenham um importante papel na reparação do DNA e na

protecção telomérica (Oikemus *et al.*, 2004). Mutações nestas proteínas causam síndromes de predisposição hereditária para o cancro (Shiloh, 2003).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO HOAP-EGFP E HP1-EGFP: CLONAGEM DE HOAP E HP1 NO VECTOR pMT-EGFP

Para a produção das proteínas de fusão HOAP-EGFP e HP1-EGFP começou-se por amplificar pela reacção em cadeia da Polimerase (PCR), o segmento codificante (cDNAs) dos genes HOAP e HP1 a partir de clones obtidos no *Drosophila Genomics Research Center* (DGRC, Indiana University). O PCR foi efectuado com *primers* que flanqueiam as extremidades dos genes e que contêm locais de restrição específicos, permitindo a obtenção de extremidades coesivas nos produtos de PCR para posterior clonagem no vector que contém o gene EGFP. Desta amplificação resultaram bandas de 1030 pb (HOAP) e 690 pb (HP1), visualizadas por electroforese em gel de agarose 1%. Os produtos de PCR foram digeridos com enzimas de restrição específicas, para posterior reacção de ligação com o vector previamente digerido com as mesmas enzimas (ver "Procedimento experimental").

A inserção dos produtos de PCR dos genes HOAP e HP1 foi feita a jusante do gene EGFP no vector pMT-EGFP. Para tal, teve de se manter o quadro de leitura dos codões entre o final do gene EGFP e o início dos genes HOAP e HP1 (Figuras 1 e 2).

As ligações foram utilizadas na transformação de células competentes de *E. coli* (ver "Procedimento experimental").

O rastreio das colónias transformadas com o vector recombinante que contém o gene de interesse, foi efectuado por PCR do DNA das bactérias, utilizando *primers* que flanqueiam o terminal 3' do gene EGFP e os terminais 3' dos genes HOAP ou HP1, respectivamente (ver "Procedimento experimental"). A presença de produtos de PCR com o peso esperado nas colónias transformadas, confirma a inserção dos genes no vector pMT-EGFP (Figura 3).

No sentido de confirmar este resultado recorreu-se à digestão com enzimas de restrição (Figura 4). Os resultados obtidos demonstram que a clonagem ocorreu com sucesso, dado que os pesos moleculares dos fragmentos de DNA obtidos foram os esperados (ver Mapa de Restrição, Figura 5).

Relativamente ao HOAP, por análise dos fragmentos podemos constatar logo no primeiro poço, que são originados dois fragmentos com pesos moleculares na ordem dos 1000pb e 4500pb, equivalentes aos pesos do HOAP (1072pb) e do pMT-EGFP (4661pb). Quanto ao HP1 (690 pb), podemos observar 2 fragmentos, um na ordem dos 700p (HP1) e outro na ordem dos 4500pb (pMT-EGFP).

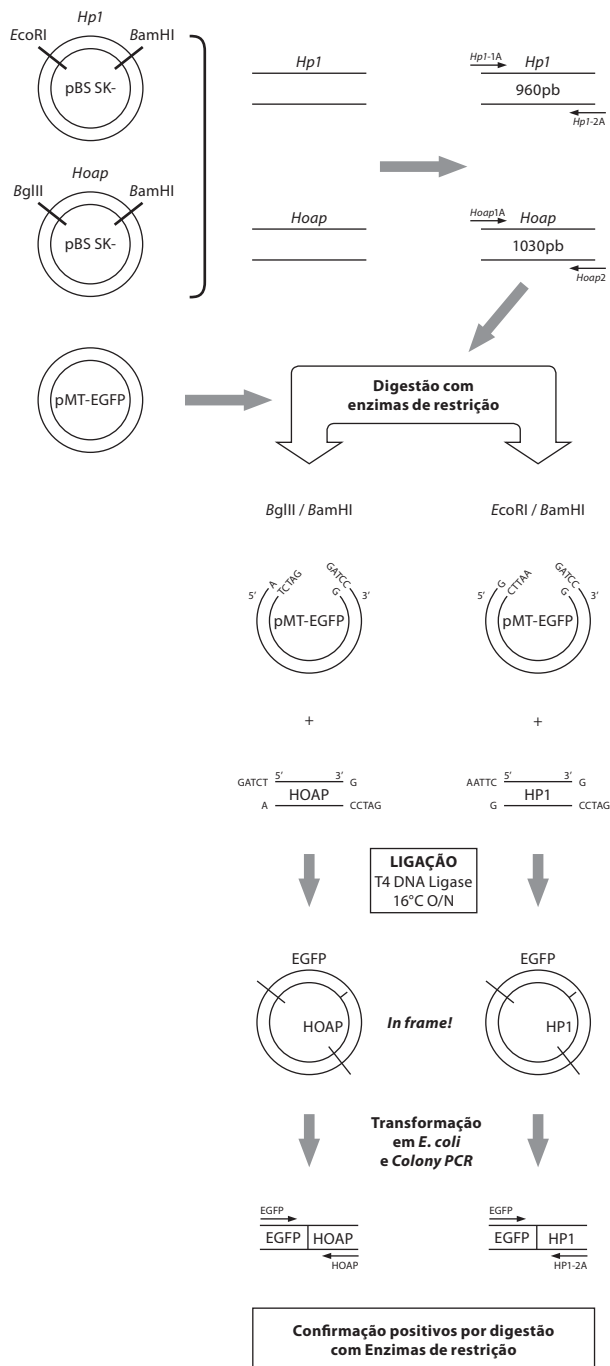


Figura 1 - Estratégia experimental utilizada para clonagem dos cDNAs codificantes das proteínas HP1 e HOAP no vector pMT-EGFP.

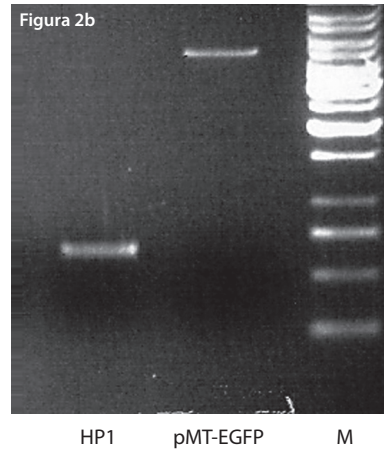
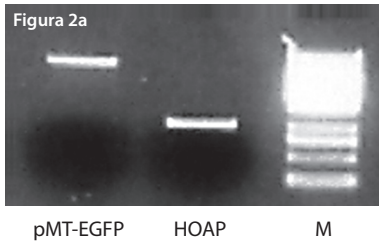


Figura 2 - Electroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. (a) DNA de Hoap e (b) de Hp1 e do vector pMT-EGFP (a e b); M: marcador de peso moleculare (Gene ruller DNA Ladder 1 kb).

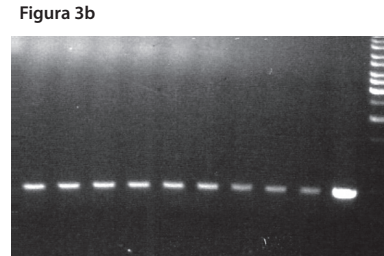


Figura 3 - Rastreo de colónias transformadas por "colony PCR" em electroforese em gel de agarose 1%. (a) *HOAP-EGFP* e (b) *HP1-EGFP*. Os clones positivos estão devidamente assinalados. M: marcador de peso moleculare (Gene ruller DNA Ladder 1 kb, Fermentas).

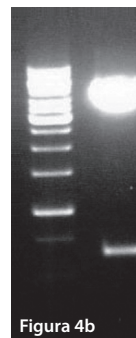
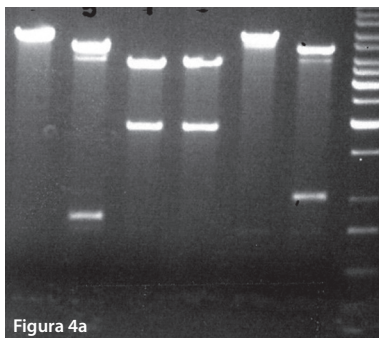


Figura 4 - Confirmação da clonagem de (a) HOAP em pMT-EGFP e (b) HP1 em pMT-EGFP através da digestão com enzimas de restrição: 1. *BamHI/BgIII*, 2. *BgIII*, 3. *HindIII*, 4. *BamHI/HindIII*, 5. *HincII/BgIII*, 6. *HincII*, 7. *EcoRI/BamHI*. Relativamente ao HOAP, por análise dos fragmentos podemos constatar logo na primeira digestão que são obtidos dois fragmentos com pesos moleculares na ordem dos 1000pb e 4500pb, equivalentes aos pesos do cDNA HOAP (1072pb) e do vector pMT-EGFP (4661 pb). Quanto ao HP1 (690 pb), podemos observar 2 fragmentos, um na ordem dos 700p (HP1) e outro na ordem dos 4500pb (pMT-EGFP). M: Marcador de peso moleculare (Gene ruller DNA Ladder 1 kb, Fermentas).

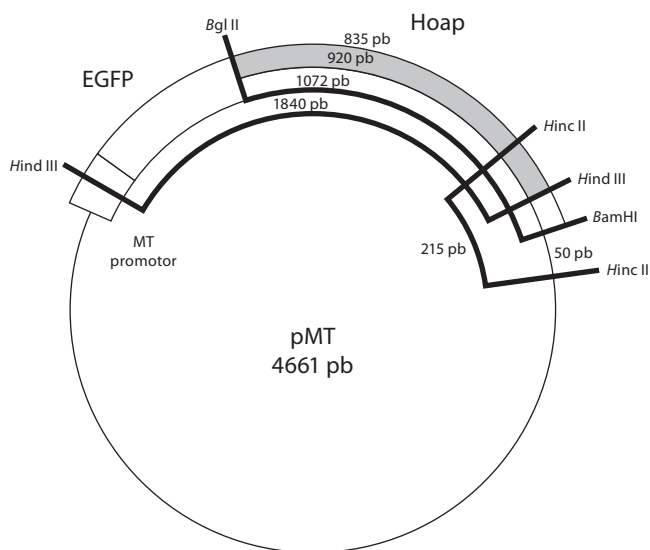


Figura 5 - Mapa de restrição do plasmídeo recombinante pMT-EGFP+Hoap.

2.2. TRANSFECCÃO EM CÉLULAS SCHNEIDER 2 (S2) DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* COM CÁLCIO

Para validar a actividade das proteínas de fusão e confirmar que a EGFP não interfere com a capacidade das proteínas em estudo localizarem nos telómeros, foi efectuada a transfecção dos clones positivos em células S2 de *Drosophila*. A transfecção consiste na inserção de material genético exógeno em células eucariotas através de diversos métodos. Um dos métodos mais usados é o do fosfato de cálcio, desenvolvido por Bacchetti e Graham (Bacchetti e Graham, 1977), que tem sido basicamente a única via de transfectar células *Schneider 2* (DiNocera e Dawid, 1983), uma cultura primária em estadio tardio (20-24 horas) de embriões de *Drosophila melanogaster* (Schneider, 1972). Este método caracteriza-se por ser barato e acessível e pode ser usado em diferentes tipos de culturas de células.

Uma vez que o vector pMT-EGFP é um vector de expressão indutível (promotor da metalotioneína) pela adição de cobre ou cádmio, adicionou-se sulfato de cobre às células que assim permaneceram 20h. A observação dos cromossomas ao microscópio foi possível depois de centrifugar as células em suspensão (1×10^5 células) numa lâmina de vidro (*Cytospin*).

O *cytospin* é uma técnica que beneficia de uma centrifugação para posicionamento das células num local específico da lâmina, permitindo a adsorção do fluido residual no filtro de cartão. A citocentrifugação também contribui para uma melhor dispersão das células permitindo uma apresentação nuclear excelente. Em seguida, as células foram fixadas numa solução de formaldeído. Esta solução preserva as células, mantendo-as num estado livre da autólise levada a cabo pelas enzimas intracelulares, activadas após morte celular.

2.3. IMUNOMARCAÇÃO DE CÉLULAS MITÓTICAS

Com o intuito de confirmar a presença de *HOAP* e *HP1* nos telómeros efectuou-se imunomarcacão das células transfectadas com anticorpo anti-*HOAP* (Shareef *et al.*, 2003) revelada por incubacão com um anticorpo secundário acoplado com um fluorocromo que emite luz num comprimento de onda distinto da *EGFP*. O DNA foi corado com 4,6-diamidino-2-phenylindole (*DAPI*), que se intercala neste e, se excitado com luz ultravioleta emite uma coloracão azul, permitindo a sua visualizacão em microscópio de fluorescência. Os resultados estão expostos nas Figuras 6 e 7.

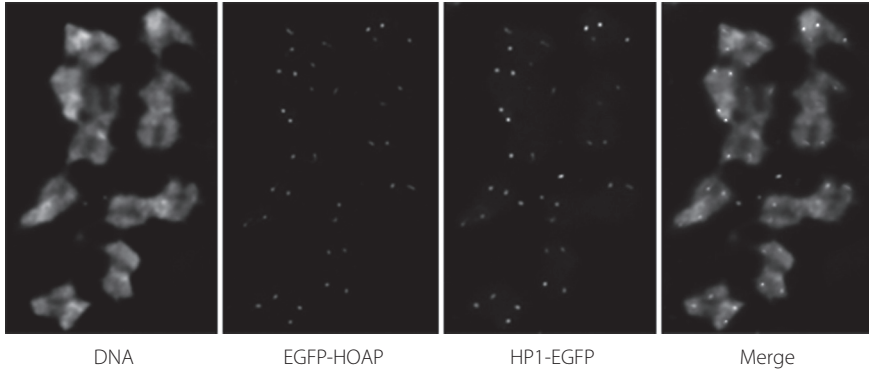


Figura 6 - Imagens da marcação dos telómeros com EGFP (verde) e imunolocalizacão do HOAP nos telómeros (vermelho). A azul está marcado o DNA.

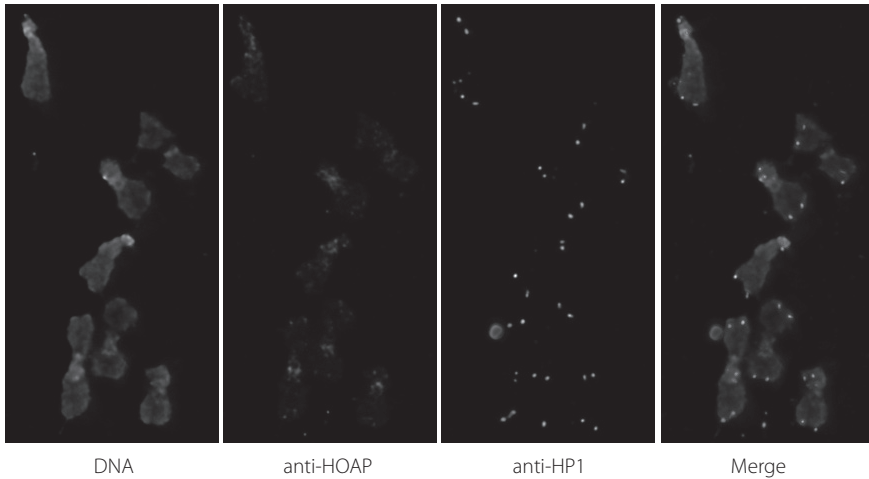


Figura 7 - Imagens da marcação dos telómeros com EGFP (verde), localizacão do HP1 nas regiões peri-centroméricas e teloméricas, localizacão do HOAP nos telómeros (vermelho). A azul está marcado o DNA.

Com este trabalho podemos concluir que as proteínas de fusão obtidas são capazes de se ligar aos telómeros tal como as proteínas endógenas e que portanto, poderão ser usadas para posteriores estudos *in vivo*.

2.4. PERSPECTIVAS FUTURAS - SUBCLONAGEM DE HOAP-EGFP EM PUASP1

O objectivo futuro será a inserção das fusões *HOAP-EGFP* e *HP1-EGFP* no genoma de *D. melanogaster* depois de efectuada a microinjecção em embriões, através do vector *pUASP1*. O estudo estender-se-á à obtenção de moscas mutantes em genes relacionados com as vias de reparação do DNA, de forma a perceber o papel e a dinâmica das proteínas envolvidas, assim como a forma como interagem.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1. CONSTRUÇÃO DA PROTEÍNA DE FUSÃO *HOAP-EGFP* E *HP1-EGFP*: CLONAGEM DOS CDNAS DE *HOAP* E *HP1* NO VECTOR *PMT-EGFP*

Amplificação, purificação dos cDNAs de HOAP, HP1 e pMT-EGFP e digestão dos produtos de PCR com enzimas de restrição. Os *primers* utilizados na amplificação do cDNA de *HOAP* foram 5'ACGTATAAGATCTATGTCGGGGACGCAAATGTCTGTC3' com local de restrição *Bgl*III, e 5'GTTTAATATATGGATCCATCAGGC3' com local de restrição *Bam*HI; e na amplificação do cDNA de *HP1*, os *primers* 5'AATGGACCGAATTC AATGGGCAAGAAAATCGAC AACC3' com local de restrição *Eco*RI, e 5'TAACTTAGGATCC TTAATCTTATTATCAGAGTACC3' com local de restrição *Bam*HI (os locais de restrição estão assinalados a azul e as regiões que não emparelham com o cDNA encontram-se sublinhadas). Os *primers* foram encomendados à *Sigma-Aldrich* e purificados por *HPLC*.

As condições de PCR utilizadas estão esquematizadas no Quadro I. A DNA polimerase utilizada para as reacções de PCR foi a *Pfu*, uma vez que esta possui actividade de correcção. Os produtos de PCR foram purificados com *GeneClean Turbo kit* (*qbiogene, USA*), digeridos (3h a 37°C) com as respectivas enzimas de restrição, *Bam*HI e *Bgl*III (*New England Biolabs, USA*) para *HOAP* e *Eco*RI e *Bam*HI (*New England Biolabs, USA*) para *HP1*, e novamente purificados. O *pMT-EGFP* foi digerido nas mesmas condições, seguidamente fez-se extracção da forma digerida de gel de agarose a 1%. e purificado com *GeneClean Turbo kit* (*qbiogene, USA*).

Quadro I - Perfil de temperaturas utilizado para amplificação por PCR dos genes *HOAP* e *HP1*.

	HOAP		HP1		Tempo (min)
Desnaturação	94°C				1
Emparelhamento dos primers	56°C	59°C	51°C	55°C	2
Extensão (Síntese)	72°C				2
	4°C				
Nº ciclos	5	25	5	25	

Ligação de HOAP e HP1 ao pMT-EGFP e transformação da cassette em células de *Escherichia coli*. Para a ligação usou-se uma proporção de 1:10 de pMT-EGFP: produto de PCR. Incubou-se com T4 DNA ligase, a 16°C durante a noite.

Misturou-se a ligação com células competentes de *E. coli*, seguindo-se um período de incubação em gelo de 30 min., um choque térmico de 2 min. a 42°C e gelo novamente. Para a recuperação das células transformadas adicionou-se meio *Luria Bertani* (LB) líquido e incubou-se 1h a 37°C. Seguidamente, plaqueou-se em meio LB sólido com ampicilina (gene de resistência presente no vector utilizado, o pMT-EGFP) e incubou-se a 37°C durante a noite.

Rastreio das colónias transformantes por “Colony PCR”. Inocularam-se algumas colónias em LB com ampicilina e incubaram-se 1h a 37°C com agitação. Procedeu-se, então, ao PCR utilizando cultura, sendo que os primers utilizados para rastreio de EGFP-HOAP e EGFP-HP1 flanqueiam o terminal 3’ da EGFP e o terminal 3’ das sequências HOAP ou HP1. O perfil de temperaturas utilizado foi o mesmo da amplificação de HOAP e HP1. Extraiu-se DNA das colónias positivas pelo kit da Qiagen (QIAprep Spin Miniprep Kit, USA) e confirmou-se a inserção do produto de PCR no vector com enzimas de restrição.

Transfecção em células Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster* com Cálcio. O procedimento de transfecção foi adaptado da Invitrogen. Inocularam-se 3×10^6 células em 3 ml de meio completo (Schneider +10% Fetal Bovine Serum), a uma concentração final de 1×10^6 células/ml. Incubaram-se as células 24h a 25°C, tendo sido adicionadas, posteriormente, as soluções A (CaCl_2 2M, 15 μg DNA, H_2O) e B (2x HBS: 50 mM HEPES, 1.5 mM Na_2HPO_4 , 280 mM NaCl, pH 7.1), previamente filtradas e misturadas no vórtex antes de adição. Incubaram-se as células durante a noite a 25°C. Adicionou-se sulfato de cobre a uma concentração final de 1 mM, e incubaram-se novamente as células 9h a 25°C.

Os cytopins foram realizados com e sem choque hipotónico prévio (0.5% de citrato de sódio). Às células tratadas com choque hipotónico, foi retirado o meio por centrifugação 2 min a 1000 rpm, e seguidamente ressuspendeu-se o precipitado no mesmo volume de solução hipotónica. Adicionaram-se células a cada lâmina e centrifugou-se 5 min a 10000 rpm. Seguidamente, as células foram fixadas numa solução de formaldeído 37%, Triton 10% e PBS 10x.

Posteriormente, procedeu-se a imunomarcações de células mitóticas fixadas, usando o anticorpo anti-HOAP (Shareef *et al.*, 2003) utilizando uma diluição de 1:200, numa solução isotónica contendo 10% de soro fetal. A revelação foi realizada por incubação com anticorpo secundário acoplado com o fluorocromo 568 (vermelho) (Molecular Probes, Alfacene) que emite luz num comprimento de onda distinto da EGFP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACCHETTI S, Graham F. (1977). Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *In: Proc Natl Acad Sci USA*, 74, pp. 1590-4
- BASTO, R., Scaerou, F., Mische, S., Wojcik, E., Lefebvre, C., Gomes, R., Hays, T., Karess, R. (2004). In vivo dynamics of the rough deal checkpoint protein during *Drosophila* mitosis. *In: Curr. Biol.*, 14, nr.1, pp. 56-61
- BRAND, A. (1995) GFP in *Drosophila*. *In: Trends in Genetics*, 11, pp.324-325
- CALLÉN, E., Surrallés, J. (2004) Telomere dysfunction in genome instability syndromes. *In: Mutation Research.*, 567, pp. 85-104
- CENCI G, Siriaco G, Raffa GD, Kellum R, Gatti M (2003) The *Drosophila* HOAP protein is required for telomere capping. *In: Nat Cell Biol*, 5, pp. 82-84
- CHEN, Y., Müller, J. D., Ruan, Q., Gratton, E. (2002) Molecular brightness characterization of EGFP *in vivo* by fluorescence fluctuation spectroscopy. *In: Biophys. J.*, 82, pp. 133-144
- CLYNE, P. J., Brotman, J. S., Sweeney. S. T., Davis, G. (2003) Green Fluorescent Protein tagging *Drosophila* proteins at their native genomic loci with small P elements. *In: Genetics*, 165, pp. 1433-1441
- DiNOCERA, P. P. and Dawid, J. B. (1983). Transient expression of genes introduced into cultured cells of *Drosophila melanogaster*. *In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80, pp. 7095-7098
- FANTI, L., Giovinazzo, G., Berloco, M., and Pimpinelli, S. 1998. The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*. *In: Mol. Cell*, 2, pp. 527-538
- GARCIA, MA., Koonrugsa, N., Toda, T. (2002). Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *In: Curr. Biol.*, 12, nr.8, pp. 610-621
- KAIN, S. R., Adams, M., Kondepudi, A., Yang, T. T., Ward, W. W. and Kitts, P. (1995). Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. *In: Biotechniques*, 19, pp. 650-655
- McCLINTOCK, B. (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *In: Genetics*, 26, pp. 234-282
- MORIN, X., Daneman, R., Zavortink, M., Chia, W. (2001). A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *In: PNAS*, 98, nr.26, pp.15050-15055
- MULLER, HJ. (1938). The remarking of chromosomes. *In: Collecting Net*, 13, pp.181-195
- MULVIHILL, DP, Hyams, JS. (2002). Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. *In: J. Cell. Sci.*, 115, nr.18, pp.3575-3586
- OIKEMUS, S., McGinnis, N., Queiroz-Machado, J., Tukachinsky, H, Takada, S., Sunkel, C., Brodsky, M. (2004). *Drosophila* atm/telomere fusion is required for telomeric localization of HP1 and telomere position effect. *In: Genes&dev*, 18, pp. 1850-1861
- PATEL, P., Thapar, N., Guo, L., Martinez, M., Maris, J. Gau, C., Lengyel, J., Tamanoi, F. (2003). *Drosophila* Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *In: J. Cell Sci.*, 116, pp. 3601-3610
- MM, Bagudu R & Kellum R (2003). Hp1/ORC complex and heterochromatin assembly. *In: Genetics*, 117, pp. 127-134
- SCHNEIDER, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *In: J. Embryol. Exp. Morph.* 27, pp. 363-365

- SHILOH, Y.** (2003). ATM and related protein kinases: Safeguarding genome integrity. *In: Nat. Rev. Cancer*, 3, pp. 155-168
- SILLER, KH, Serr, M., Steward, R., Hays, TS., Doe, CQ.** (2005). Live imaging of *Drosophila* brain neuroblasts reveals a role for Lis1/dynactin in spindle assembly and mitotic checkpoint control. *In: Mol. Biol. Cell.*, 16, nr.11, pp.5127-5140
- WANG, S., Hazelrigg, T.** (1994). Implications for bcd messenger RNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *In: Nature*, 369, pp.400-403
- YANG TT, Cheng L, Kain SR** (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *In: Nucl Acids Res*, 24; 4592-4593