

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA DSCR2, UMA PROTEÍNA
RELACIONADA À SÍNDROME DE DOWN**

Patricia Abrão Possik

São Carlos

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA DSCR2, UMA PROTEÍNA
RELACIONADA À SÍNDROME DE DOWN**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

Patricia Abrão Possik

São Carlos

2003

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P856ls

Possik, Patrícia Abrão.

Localização subcelular da DSCR2, uma proteína relacionada à síndrome de Down / Patrícia Abrão Possik : UFSCar, 2003. 66 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Biologia molecular. 2. Down, Síndrome de. 3. Localização subcelular. 4. DSCR2. 5. Cromossomo 21. 6. Retículo endoplasmático. I. Título.

CDD: 574.8 (20^a)

Orientador: Flávio Henrique Silva

“O aspecto mais triste de nossas vidas é que a sociedade ganha em conhecimento mais rapidamente do que a sociedade em sabedoria”
Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Flávio Henrique da Silva pela confiança. Todo conhecimento de biologia molecular que hoje eu adquiri teve imensa participação do meu professor e orientador. Agradeço também pela oportunidade de ser do grupo do Laboratório de Biologia Molecular, onde tive chance de aprender muito mais do que imaginei, que foi muito além das minhas expectativas.

À Universidade Federal de São Carlos, onde me formei Bióloga e tive a oportunidade de começar a trabalhar com pesquisa.

Ao programa de Pós Graduação em Genética e Evolução e ao Departamento de Genética e Evolução, pela oportunidade de realizar este trabalho. À Rose, à Regiane e à Tatiane não posso deixar de agradecer, pois elas muito contribuíram durante este curso.

À todos do Laboratório de Biologia Molecular, desde as primeiras “gerações”. Todos que eu conheci no LBM foram e sempre serão muito especiais e influenciaram muito a minha formação e aprendizado.

A Ana, Adri, Euclides, Panê, Camillão, Kikão, Alê, Wil, Dani, Andréa, Elisete, Sandra, César, Reyes por me agüentarem estes tempos e sempre manterem um clima tão bom dentro do lab.

Aos alunos de Iniciação Científica que estão no LBM. Em especial à Jú, Andreia e Vivi, minhas amigas, que antes que se peça ajuda, estão ajudando.

À Professora Gláucia M. M. Santelli e a Roberto Cabado do Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas (USP - São Paulo), que contribuíram imensamente com este trabalho, com muita atenção e disposição.

À Professora Maria Célia Jamur, do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos (FMRP - USP) pela contribuição tão importante neste trabalho.

Aos meus amigos, mais valorosos que tudo. E à Nina. Não quero nem imaginar o que seria sem eles!

As minhas irmãs, Pri e Paulinha. Que são mais que irmãs. Dizem que, com o tempo, o amor verdadeiro vai crescendo. É verdade...

Aos meus pais, Renaldo e Diney. Não sei por onde começar a agradecer, pois não tenho tanta memória. Só sei que nunca vou conseguir terminar de agradecer.....

Obrigada por estarem ao meu lado, sempre e para sempre. Eu amo vocês. E obrigada pela confiança.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A Síndrome de Down.....	1
1.2. O cromossomo 21.....	3
1.3. A definição de uma região crítica da Síndrome deDown.....	5
1.4. O gene DSCR2.....	7
1.5. Localização subcelular de proteínas.....	11
1.5.1.A célula eucariota.....	11
1.5.2. A síntese e o endereçamento de proteínas.....	12
1.5.3.O transporte das proteínas através das membranas intracelulares.....	14
1.5.4. Proteínas de membranas.....	18
II. OBJETIVOS.....	20
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1. Materiais.....	21
3.2. Métodos.....	23
3.2.1. Análise <i>in silico</i> da seqüência da DSCR2	23
3.2.2.Subclonagens.....	23
3.2.2.A.Sub-clonagem do gene DSCR2 no pGEM-T	23
3.2.2.B. Subclonagem do gene DSCR2 em fusão com os epítomos <i>c-myc</i> e FLAG	26
3.2.2.C. Subclonagem do gene DSCR2 em fusão com a proteína GFP.....	27
3.2.2.D. Subclonagem do fragmento DSCR ₂₉₁₋₂₈₈	29
3.2.2.E. Subclonagem dos fragmentos DSCR ₂₉₁₋₂₁₇ e DSCR ₂₁₋₂₁₇	29
3.2.3. Sequenciamento de DNA.....	31
3.2.4. Cultura Celular e Transfecção Transiente.....	32
3.2.5. Análise da expressão por imunofluorescência.....	34
3.2.6.Caracterização do retículo endoplasmático com DIOC ₆ (3).....	36
3.2.7. Análise das imagens.....	36
3.2.8. Ensaio de "Western Blotting"	37
IV. RESULTADOS	38
4.1.Análise <i>in silico</i> da seqüência da proteína DSCR2.....	38
4.2. Construção dos vetores.....	40
4.2.1 Construção dos vetores pGEM F2R2, pGEM F2R3 e pGEM F3R3.....	40
4.2.2. Construção do vetor contendo a DSCR2 em fusão com os epítomos FLAG M2 e <i>c-myc</i> (FLAG-DSCR2- <i>myc</i>).....	40
4.2.3. Construção dos vetores contendo a DSCR2 em fusão com a GFP (GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP).....	41
4.2.4. Construção dos subclones DSCR ₂₉₁₋₂₈₈ , DSCR ₂₁₋₂₁₇ e DSCR ₉₁₋₂₁₇ .em fusão com os epítomos FLAG M2 e <i>c-myc</i>	42

4.3. A análise da localização subcelular.....	43
4.3.1. A localização subcelular da DSCR2 por imunofluorescência.....	43
4.3.2. A localização subcelular da DSCR2 em fusão com a GFP.....	45
4.3.3. Caracterização do retículo endoplasmático com DIOC ₆ (3).....	46
4.3.4. Co-visualização da DSCR2 com proteínas nuclear e mitocondrial.....	47
4.3.5. Co-visualização da DSCR2 e da GRP-78, uma proteína de Retículo Endoplasmático.....	48
4.3.6. A localização subcelular de formas truncadas da proteína DSCR2.....	50
4.4. Análise da expressão da DSCR2 por “western blotting”	52
V. DISCUSSÃO.....	53
VI. CONCLUSÕES.....	60
VII. BIBLIOGRAFIA.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.2.1: O cromossomo 21 humano e os seus principais marcadores de DNA mapeados.....	4
Figura 1.3.1: As regiões possivelmente relacionadas à SD. Em destaque estão os marcadores moleculares que delimitam as duas regiões críticas da síndrome de Down citadas: DSCR e DCR-2. 21p, braço curto do CH21. 21q, braço longo do CH21.....	7
Figura 1.4.1: Análise da seqüência de aminoácidos da proteína DSCR2.....	8
Figura 1.4.2: Desenho esquemático da proteína DSCR2 demonstrando a provável localização dos domínios transmembrana (TM) de acordo com a seqüência de aminoácidos predita.....	9
Figura 1.4.3: Resultado da análise de expressão da DSCR2 feita por Vidal-Taboada e colaboradores. No primeiro gráfico, está ilustrada a análise feita nos diferentes estágios embrionários. No segundo, a análise feita em diferentes tecidos. (Adaptado de Vidal-Taboada <i>et al</i> , 2000).....	10
Figura 1.5.1: Ilustração de uma célula animal. As setas indicam as vias de transporte de proteínas no interior da célula (Fonte: Lodish <i>et al</i> , 2000).....	12
Figura 1.5.2: Esquema da Síntese de proteínas e translocação simultânea para o RE através do <i>translocon</i> . (Fonte: Lodish <i>et al</i> , 2000).....	14
Figura 1.5.3: Ilustração da via de transporte de proteínas pelas membranas intracelulares. (Fonte: vanVliet <i>et al</i> , 2003).....	17
Figura 3.2.2.1: Mapa do plasmídeo p3XFLAG- <i>myc</i> -CMV-25, onde foi subclonado o gene DSCR2 e esquema da proteína em fusão com epítomos FLAG M2 e <i>c-myc</i>	27
Figura 3.2.2.2: Mapa dos vetores para a subclonagem do DSCR2 (pEGFP-C1 e pEGFP-N1) e esquema da proteína em fusão com a proteína GFP.....	28
Figura 3.2.2.3: Esquema da DSCR2 e das formas truncadas subclonadas em fusão com os epítomos FLAG M2 e <i>c-myc</i>	31
Figura 4.1.1: Modelos hipotéticos da disposição da DSCR2 em uma membrana.....	39
Figura 4.1.2: Valores de hidrofobicidade atribuídos à seqüência da DSCR2.....	39
Figura 4.2.1: Análise de Restrição dos subclones pGEM F2R2, pGEM F2R3 e pGEM F3R3, (1, 2, 3, respectivamente). A banda de 3000pb corresponde ao vetor pGEM-T e a de aproximadamente 900pb	

aos insertos amplificados com combinações de oligonucleotídeos diferentes. Produto de amplificação do gene DSCR2 (M).....40

Figura 4.2.1: a) Produtos do PCR de 4 colônias do FLAG-DSCR2-myc (1, 2, 3, 4). b) Análise dos subclones 1, 2, 3 e 4 do FLAG-DSCR2-myc por restrição enzimática. Produto amplificado correspondente ao gene DSCR2 (P).....41

Figura 4.2.3: Análise de Restrição dos subclones GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP. Marcador de peso molecular (P); pEGFP-N1 (1); pEGFP-C1 (3) Análise de Restrição (2, 4). As bandas de 890pb correspondem ao gene DSCR2 digerido do plasmídeo (4700pb).....42

Figura 4.2.4: Análise de Restrição dos subclones correspondentes às formas truncadas do gene DSCR2. Os subclones selecionados como positivos foram: 6 (DSCR2₁₋₂₁₇), 7 (DSCR2₉₁₋₂₁₇) e 9 (DSCR2₉₁₋₂₈₈). Plasmídeo p3XFLAG-myc-CMV-25 (8). Marcador de peso molecular 1Kb (P).....42

Figura 4.3.1: A DSCR2 é uma proteína citoplasmática. Imunofluorescência de células COS-7 expressando a proteína FLAG-DSCR2-myc. Controle de distribuição citoplasmática, (A,B). Anti-FLAG M2 conjugado com FITC (C,D). Anti-c-myc conjugado com Cy3 (E,F). A seta indica a região em maior aumento (G,H).....44

Figura 4.3.2: O padrão de fluorescência citoplasmático é confirmado nos ensaios com a GFP. À esquerda, análise de células COS-7 expressando as fusões GFP-DSCR2 (A) e DSCR2-GFP (C). À direita, células transfectadas com apenas os vetores pEGFP-C1 (B) e pEGFP-N1 (D).....45

Figura 4.3.3. O retículo endoplasmático é marcado com DIOC₆(3). A distribuição da fluorescência apresenta um padrão de proteínas de RE, inclusive com a região perinuclear mais aparente.....46

Figura 4.3.4: Co-visualização do núcleo e da mitocôndria marcados com EYFP. Células co-transfectadas com o subclone FLAG-DSCR2-myc e plasmídeos marcadores. A marcação vermelha corresponde a DSCR2 detectada pelo anti-c-myc conjugado com Cy3 (A, D) e a marcação verde corresponde aos plasmídeos marcadores de núcleo (B) e mitocôndria (E). C e F demonstram a sobreposição das imagens.....47

Figura 4.3.5: A DSCR2 co-localiza com o retículo endoplasmático. Células transfectadas com o subclone FLAG-DSCR2-myc e submetidas a uma dupla marcação com os anticorpos anti-c-myc conjugado com Cy3 (A, D) e anti-GRP-78 + anti-IgG conjugado com FIRC (B, E). As imagens sobrepostas demonstram o padrão similar de localização das duas proteínas (C, F).....49

Figura 4.3.6.1: Localização subcelular das formas DSCR2₉₁₋₂₈₈(B), DSCR2₁₋₂₁₇ (C) e DSCR2₉₁₋₂₁₇ (D). Os fragmentos subclonados apresentam o mesmo padrão de distribuição subcelular da DSCR2 íntegra (A). As detecções foram feitas utilizando o anti-c-myc conjugado ao Cy3.....51

Figura 4.3.6.2: A DSCR2₉₁₋₂₁₇ vista em um maior aumento. A seta indica a região aumentada.....51

Figura 4.4: Detecção da expressão da DSCR2 por “western blotting”. As bandas representam a proteína FLAG-DSCR2-*myc* reconhecida pelo anticorpo anti-FLAG M2 conjugado com fosfatase alcalina..... 52

Resumo

A Síndrome de Down (SD) é a aneuploidia mais freqüente e a principal causa de retardo mental na população humana. Os portadores apresentam, além das características faciais e dermatológicas típicas, cardiopatias e anomalias imunológicas, gastrointestinais e endócrinas. Há também um risco de desenvolvimento de leucemia 20 vezes maior que o normal em crianças portadoras da síndrome. Embora essa anomalia seja principalmente resultante da trissomia do cromossomo 21, há casos em que apenas uma região deste aparece em triplicata. Esses casos permitiram mapear uma região crítica comum a todos os portadores da síndrome. O gene DSCR2, localizado na Região Crítica da Síndrome de Down 2 (DCR-2), codifica uma proteína de 32,8 kDa rica em leucina e composta de uma alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos. Experimentalmente, pouco se sabe sobre as características desta proteína, mas muitas possibilidades foram levantadas baseadas em sua seqüência de aminoácidos. Neste trabalho, foi estudada a localização subcelular da proteína DSCR2 em células de mamíferos. Estudos anteriores propuseram que a DSCR2 atuaria como uma proteína integral da membrana plasmática. Entretanto, em experimentos com células de mamíferos, nós observamos a proteína DSCR2 no retículo endoplasmático das células. Formas truncadas, construídas com o intuito de entender esta distribuição celular da DSCR2, apresentaram o mesmo padrão de fluorescência da proteína íntegra. Este resultado nos levou a concluir que esta proteína não está inserida na membrana do retículo endoplasmático, uma vez que a ausência dos domínios transmembranas preditos não alterou a sua distribuição subcelular. Desta forma, nós sugerimos que a DSCR2 se localiza associada ao retículo endoplasmático não como uma proteína integral de membrana, mas por algum tipo de interação indireta com a membrana ou com outras proteínas.

Abstract

Down Syndrome (DS) is the major cause of mental retardation with a high incidence among human beings. Main features in DS include facial and dermatological features, congenital heart defects as well as immunological, gastrointestinal and endocrine abnormalities. Among a variety of cancer, a 20 fold increased risk of developing leukemia in younger people and an increased risk of testicular cancer is noticeable in DS patients. Most DS patients carry a complete trisomy of chromosome 21, but patients carrying a partial trisomy have also been observed. Analyses of partial trisomy of chromosome 21 have helped determining the minimal regions potentially associated with DS features. The DSCR2 gene located in the so-called Down Syndrome Critical Region 2 (DCR-2) codes a 32.8-kDa leucine-rich protein comprised of 34% hydrophobic amino acid residues. Little is known about the DSCR2 protein characteristics but many assumptions have been made according to *in silico* predictions. In this work, we used immunocytochemical and fluorescence assays to investigate the subcellular location of the protein encoded by the DSCR2 gene in transfected cells. It was previously suggested that DSCR2 was located in the plasma membrane as an integral protein. Interestingly, we observed this protein in the endoplasmic reticulum of cells. We also studied whether the location of DSCR2 truncated forms had different subcellular distribution and our observations indicate that it is probably not inserted in inner membranes once the fragments lacking the predicted transmembrane helices remained in the ER. We suggest that DSCR2 is located in the cytoplasmic side of endoplasmic reticulum by indirect interaction with the ER membrane or with another protein.

I. INTRODUÇÃO

1.1. A Síndrome de Down

A cento e trinta e sete anos atrás, John Langdon Down publicou a primeira descrição clínica do que seria a Síndrome de Down (SD) (Down, 1866). Entretanto, somente em 1959, Lejeune e colaboradores confirmaram que a Síndrome de Down é resultado de uma aneuploidia genética caracterizada pela presença de três cópias do cromossomo 21 (CH21) no genoma do portador (Lejeune et al., 1959). Atualmente, sabe-se que a Síndrome de Down é a anomalia genética mais freqüente na população humana, afetando 1 em cada 700 nascimentos (Epstein, 1995). A partir dos 35 anos de idade da mãe, a tendência deste risco é de aumentar, podendo atingir 1 em cada 50 nascimentos em mães com 43 anos (Vogel et al., 1997).

Através do uso de marcadores moleculares, foi observado que em 68% dos casos, os erros que originam a trissomia do cromossomo 21 ocorrem durante a meiose materna. Esses estudos também demonstraram que uma proporção significativa das não disjunções durante a meiose I materna estão associadas a uma falha na recombinação cromossômica. Há também erros que são de origem meiótica paterna (6,8%) e de origem mitótica pós-zigótica (5,5%). (Antonarakis et al., 1991, 1992, 1993; Sherman et al., 1991, 1994; Yoon et al., 1996 e Lamb et al., 1997).

A Síndrome de Down é associada a uma grande variedade de características fenotípicas conseqüentes da má formação durante o desenvolvimento. Dentre as principais, retardo mental e hipotonia neonatal são as únicas comuns a todos os casos relatados (Korenberg et al., 1992). Indivíduos portadores podem ainda exibir cardiopatias, anomalias gastrointestinal e endócrina, deficiências imunológicas, baixa expectativa de vida, além de algumas características dermatológicas e faciais diagnosticáveis logo após o nascimento como: face achatada, fendas palpebrais oblíquas, orelhas pequenas e displásicas e prega palmar horizontal única. Em

adição, portadores apresentam um elevado risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer (Epstein, 1986).

A incidência de tumores em portadores da síndrome não é estatisticamente diferente do esperado. Entretanto, é notada uma diferença quanto à distribuição dos tipos de câncer e uma incidência de leucemia aproximadamente 20 vezes superior ao da população normal (Hill et al., 2003). A associação com leucemia parece decrescer com a idade (Hasle et al., 2000). A elevada incidência de leucemia em portadores de SD tem sido associada à presença de alguns genes no cromossomo 21 que participariam do fenótipo de células leucêmicas. Entre eles, destaca-se o gene que codifica o fator de transcrição AML1, envolvido em 25% dos casos de leucemia linfocítica aguda (ALL) e 15% dos casos de leucemia mielóide aguda (AML) (Yang et al., 2002). Em adição, a expressão do fator de metástase e invasão tumoral (TIAM1), codificado no cromossomo 21, é aumentada em portadores leucêmicos (Yang et al., 2002). Outros tipos de tumores, como câncer de testículo, são registrados com uma frequência maior do que a esperada para a população normal. Embora este aumento não seja muito significativo, foi demonstrado que 63-90% dos tumores de testículo não seminomatosos apresentam um ganho da região 21q, sugerindo que a expressão de genes no CH21 deve influenciar a predisposição ao câncer (Hill et al., 2003).

Atualmente, os esforços para se entender as conseqüências do desbalanço gênico resultante da trissomia do CH21 têm se concentrado nos estudos funcionais e na identificação de novos genes potencialmente envolvidos com a SD. Recentemente, estudos de expressão utilizando camundongos modelos de SD demonstraram que algumas proteínas que afetam o desenvolvimento e a degeneração neural, incluindo proliferação e viabilidade celular, são expressos diferencialmente em cérebros de camundongos (Antonarakis, 2001).

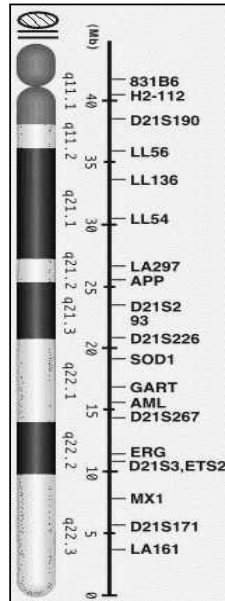
Recentemente, um estudo da expressão dos genes do CH21 revelou que os níveis dos RNAm correspondentes aparecem elevados durante o desenvolvimento cerebral (Mao et al., 2003). Entretanto, há muitas divergências quanto a idéia de que a trissomia do CH21 resultaria em uma super-expressão dos genes presentes neste cromossomo e que este fato contribuiria para a Síndrome de Down. Assim, há duas hipóteses para explicar como a trissomia do cromossomo 21 resulta na Síndrome de Down: (1) a simples presença de três cópias, ao invés de duas, de alguns dos aproximadamente 330 genes do CH21 contribuiriam para o complexo fenótipo da síndrome; (2) os produtos destes genes agiriam direta ou indiretamente através de processos que afetam a expressão de outros genes ou produtos gênicos (Antonarakis et al., 2001). É possível que o mecanismo responsável pela ocorrência da SD só seja clarificado quando os estudos completos do CH21, incluindo a identificação dos genes presentes e seus estudos funcionais, forem elucidados.

1.2. O cromossomo 21

O cromossomo 21 (Figura 1.2) representa aproximadamente 1 a 1,5% do genoma humano (Hattori et al., 2000). Apesar de representar uma parte muito pequena do genoma, os esforços em se obter informações sobre a constituição do cromossomo 21 são devidos principalmente a sua participação no fenótipo da Síndrome de Down.

Com o fechamento da seqüência completa do cromossomo 21 por Hattori e colaboradores em 2000, foram mapeados 225 genes, que correspondem a 33,8 Mb sendo que apenas 3% da seqüência do CH21 codifica proteínas (Antonarakis, 2001). Atualmente, este número aumentou e já foram identificados 165 genes de seqüência conhecida, 150 “tags” de seqüências expressas (EST) e 14 genes preditos (Roizen et al., 2003).

Figura 1.2.1: O cromossomo 21 humano e os seus principais marcadores de DNA mapeados.



Além da densidade gênica relativamente baixa do cromossomo 21, consistente com a observação de que essa é uma das poucas aneuploidias viáveis em humanos (Hattori et al., 2000), há uma grande variação dessa densidade no braço longo do CH21 (21q). Na sua parte distal foram identificados 167 genes enquanto que na parte proximal 58, sendo notável uma região nessa parte proximal de 7Mb com apenas 7 genes (Antonarakis, 2001). Uma análise mais detalhada deste conteúdo mostrou que há alguns grupos de genes no CH21 envolvidos na mesma via metabólica ou sistema biológico (Roizen et al., 2003). Dentre estes, aparecem genes relacionados à disfunção mitocondrial e geração de energia, e um grupo que codifica enzimas do metabolismo de folato. Estes últimos poderiam exercer influência sobre controle da expressão gênica (Roizen et al., 2003). Genes relacionados ao desenvolvimento cerebral também foram mapeados no CH21 (Capone, 2001 e Roizer et al., 2003).

1.3. A definição de uma região crítica da Síndrome de Down

A princípio acreditava-se que a Síndrome de Down era causada somente pela trissomia total do cromossomo 21, isto é, indivíduos portadores deveriam apresentar uma cópia extra deste cromossomo no seu genoma. Estes casos representam 95% dos casos de trissomia do CH21 e resultam de não disjunções cromossômicas durante a divisão celular (Antonarakis, 1998). Nos 5% dos casos restantes, a SD está associada a duplicações de pequenas regiões do braço longo do cromossomo 21 resultantes de translocações. As mais comuns são $t(14; 21)$ e $t(21; 21)$ e demonstram ocorrer com maior frequência durante a meiose materna. Estes casos caracterizam a trissomia parcial do CH21 (Korenberg et al., 1994).

O cromossomo 21 apresenta 37 Mb preenchendo o braço longo (21q), o que representa aproximadamente 1% do genoma humano (Antonarakis, 1998). O braço pequeno do cromossomo 21 (21p), que é similar ao de quatro outros cromossomos acrocêntricos, não demonstra estar associado às características da Síndrome e trissomias parciais resultantes de translocações $t(21;21)$ em que este braço é deletado não diferem de trissomias totais (Antonarakis, 1998). Com esta informação, os esforços na identificação e caracterização de genes que possam estar envolvidos na Síndrome de Down se concentram na região 21q.

Devido ao tamanho do fragmento translocado, alguns casos de trissomia parcial não são detectados pelas técnicas de bandamento cromossômico convencionais. A localização desses pequenos fragmentos do CH21 que se apresentam em triplicata em portadores de SD com número diplóide normal ($2n=46$) pôde ser realizada devido ao uso de marcadores moleculares e estudos correlacionando fenótipo e genótipo do portador. Esse fato possibilitou a investigação de uma região mínima do cromossomo 21 que estaria relacionada ao fenótipo anômalo da Síndrome de Down e muitos estudos vem sendo feitos para

assinalar as características fenotípicas observadas à determinadas regiões do CH21.

A princípio acreditava-se que toda a região 21q22 estaria envolvida com a Síndrome. Atualmente, é sabido que a região crítica é menor, e que o marcador molecular D21S55 está localizado próximo aos genes responsáveis pelas características comuns aos portadores (Rahmani et al., 1989; Epstein et al., 1991 e Fuentes et al., 1995).

O estudo de pacientes com trissomia parcial que apresentam diversas características da SD permitiu mapear duas regiões sobrepostas da região distal do braço longo do cromossomo 21, a DSCR e a DCR-2 (Figura 1.3). Primeira a ser mapeada, a Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR) foi definida como aproximadamente 4 Mb entre os marcadores D21S17 e ETS2 (Antonarakis, 1998) e os genes localizados nessa região estariam relacionados com retardo mental, hipotonia muscular, crescimento retardado e hiperlaxia de junções, além de oito características dermatológicas e faciais. A Região Crítica da Síndrome de Down-2 (DCR-2) estaria localizada entre os marcadores D21S55 e MX1, e incluiria os genes responsáveis por seis características dermatológicas e faciais além de, em alguns casos, demonstrar estar associada à cardiopatia e retardo mental (Korenberg et al., 1992) e estenose duodenal (Vidal-Taboada et al., 1998).

Entretanto, a idéia de regiões únicas responsáveis por todas as características da Síndrome de Down não é totalmente aceita. Já foram reportados casos de portadores que apresentam, em triplicata, fragmentos da parte proximal do 21q, porção mapeada fora da região crítica, e que apresentam algumas das características dermatológicas e faciais, micro-encefalia, estatura baixa, hipotonia e retardo mental (Korenberg et al., 1994).

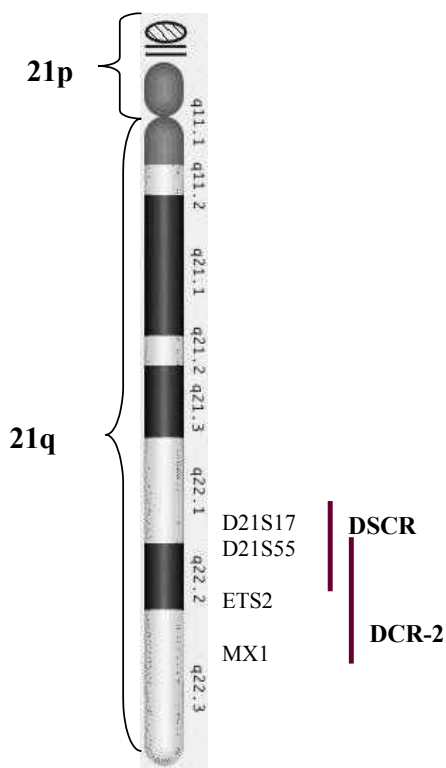


Figura 1.3.1: As regiões possivelmente relacionadas à SD. Em destaque estão os marcadores moleculares que delimitam as duas regiões críticas da síndrome de Down citadas: DSCR e DCR-2. 21p, braço curto do CH21. 21q, braço longo do CH21.

Dessa maneira, ainda não foi possível delimitar regiões do CH21 responsáveis por todas as características da SD. Devido à participação de vários genes fora das regiões envolvidas no fenótipo da anomalia, faz-se necessário um estudo mais amplo, que englobe um maior número de casos, para que seja feito um mapeamento completo do fenótipo e clarifique a implicação dos genes do CH21 na Síndrome de Down.

1.4. O gene DSCR2

Em 1998, Vidal-Taboada e colaboradores identificaram e caracterizaram um gene na Região Crítica da Síndrome de Down 2 (DCR-2), o qual foi nomeado DSCR2. Baseado na abundância do aminoácido leucina em sua seqüência (10%), este gene recebeu o nome oficial de c21-LRP (“chromosome 21 leucine rich protein”). Mapeado entre os marcadores D21S343 e D21S268 do CH21, o DSCR2 possui 1080pb e é composto por 7 éxons e 6 íntrons. Sua fase aberta de leitura é

constituída por 867pb que codificam uma proteína de 288 aminoácidos e 32,8 kDa. É importante ressaltar que todas as referências feitas a esse gene neste trabalho utilizarão a sigla DSCR2.

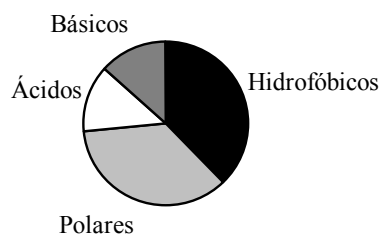


Figura 1.4.1: Análise da seqüência de aminoácidos da proteína DSCR2.

De acordo com a seqüência de aminoácidos codificados, 34% da proteína DSCR2 é composta de aminoácidos hidrofóbicos, 32% polares, 12% básicos e 12% ácidos, sendo o domínio amino-terminal (N-terminal) levemente básico e o carboxi-terminal (C-terminal) levemente ácido (Figura 1.4.1).

No quadro abaixo, pode-se observar a seqüência da proteína DSCR2. Os aminoácidos hidrofóbicos estão em negrito. A primeira região sublinhada corresponde ao domínio SH2 predito, enquanto que as outras duas regiões sublinhadas correspondem aos possíveis domínios transmembranas sugeridos por Vidal-Taboada (1998).

```

MAATFFGEVV KAPCRAGTED EEEEEGRRE TPEDREVRLQ LARKREVRL
RRQTKTSLEV SLLEKYPCSK FIIAIGNNAV AFLSSFVMNS GWEEVGC
LWNEWCRTTD TTHLSSTEAF CVFYHLKSNP SVFLCQCSCY VAEDQQYQWL
EKVFGSCRK NMQITILTCR HVTDYKTSES TGSLPSPFLR ALKTQNFKDS
ACCPLEQPN IVHDLPAAVL SYCOVWKIPA ILYLCYTDV KLDL/TVEAF
KP/LSTRSLK GLVKNIPQST EILKKLMTTN EIQSNIYT

```

Poucas características da proteína DSCR2 já foram reveladas empiricamente, mas muita informação foi levantada de acordo com predições *in silico* (Vidal-

Taboada et al., 1998). A análise da seqüência de aminoácidos da DSCR2 através do programa PSORTII, disponível em <<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>>, não detectou sinais para localização da proteína em organelas celulares específicas e atribuiu 69,6% de probabilidade à uma localização citoplasmática da DSCR2, e uma probabilidade menor (17,4%) de localizar-se na mitocôndria. Em adição, comparando a seqüência da DSCR2 com bases de dados de motivos de proteína foi detectado um domínio SH2 entre os aminoácidos 36 e 42 da proteína.

Ainda baseando-se em análises *in silico*, Vidal-Taboada e colaboradores predisseram a existência de duas hélices transmembrana na seqüência da DSCR2 (Figura 1.4.2). Estes domínios, localizados entre os aminoácidos 72-92 e 217-237, levaram à formulação de dois modelos hipotéticos. No primeiro, a proteína possuiria apenas um domínio transmembrana (TM) e sua porção N-terminal se localizaria no citoplasma. O segundo modelo aponta dois domínios TM. Neste caso, as porções amino e carboxi terminais estariam localizadas no compartimento intracelular e a região entre os TM estaria localizada extracelularmente.

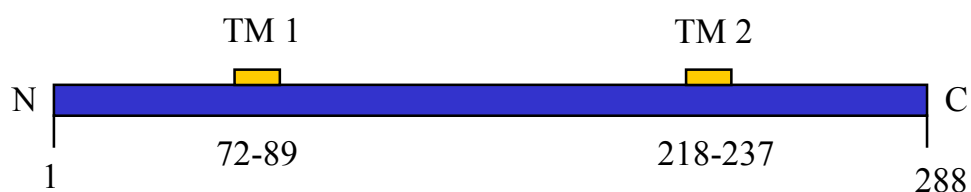


Figura 1.4.2: Desenho esquemático da proteína DSCR2 demonstrando a provável localização dos domínios transmembrana (TM) de acordo com a seqüência de aminoácidos predita.

A homóloga da proteína DSCR2 em camundongo apresenta 85,4% de identidade e 96,9% de similaridade com a DSCR2 humana, o que indica uma provável função conservada em mamíferos (Vidal-Taboada et al., 2000). Análise das proteínas DSCR2 humana e de camundongo utilizando o software Propsearch,

disponível em <<http://embl-heidelberg.de/prs.html>> detectou certa similaridade com proteínas implicadas em transdução de sinal e controle do ciclo celular (Vidal-Taboada et al., 2000).

Um estudo da expressão *in silico* usando o programa BLASTn, disponível em<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>> demonstrou que a proteína DSCR2 é expressa durante todos os estágios embrionários de camundongo (Vidal-Taboada et al., 2000) (Figura 1.4.3). Adicionalmente, análises da expressão do DSCR2 em diferentes linhagens celulares humanas demonstraram que a sua expressão é maior em células que possuem alta taxa de proliferação celular, como as linhagens tumorais Jurkat, Raji, HL60 e Hela (Vidal-Taboada et al., 2000). Também foi demonstrado empiricamente que quando células Jurkat e T98G são induzidas à proliferação celular, o nível de expressão da DSCR2 aumenta. Por outro lado, se a divisão celular é inibida, estes níveis diminuem. Esta correlação com proliferação celular também é evidenciada pela alta incidência da proteína DSCR2 em hepatocarcinoma enquanto que há pouca expressão em hepatócitos normais (Vidal-Taboada et al., 2000). Recentemente, em um trabalho que relata o aumento de expressão dos genes do CH21 durante o desenvolvimento cerebral, Mao e colaboradores demonstraram que o nível de RNAm do gene DSCR2 aparece notavelmente elevado em amostras cérebro fetal e linhagens celulares derivadas de cérebro fetal (Mao et al., 2003).

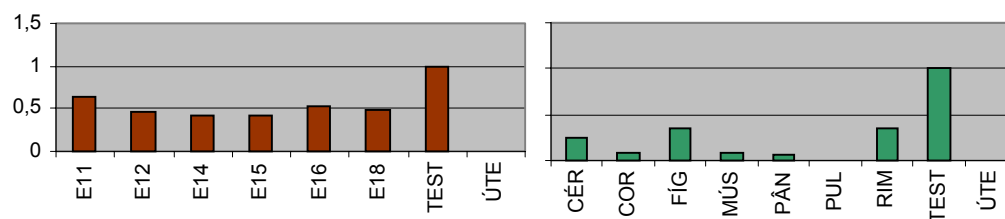


Figura 1.4.3: Resultado da análise de expressão da DSCR2 feita por Vidal-Taboada e colaboradores. No primeiro gráfico, está ilustrada a análise feita nos diferentes estágios embrionários. No segundo, a análise feita em diferentes tecidos. (Adaptado de Vidal-Taboada et al., 2000).

1.5. Localização subcelular de proteínas

1.5.1. A célula eucariota

A célula eucariota apresenta-se organizada em diferentes compartimentos celulares (Figura 1.5.1). Estes compartimentos diferem em sua estrutura e função, incluindo nas proteínas que os compõem. Os estudos da localização de proteínas nos compartimentos subcelulares podem ser utilizados como uma ferramenta inicial do estudo da proteína e seu papel celular, assim como para direcionar e facilitar os estudos funcionais posteriores.

As células apresentam um vasto sistema de membranas, que inclui a membrana plasmática e as membranas intracelulares. Estas membranas são essenciais para o isolamento dos componentes celulares em relação ao meio extracelular e para separar os eventos intracelulares entre si. Cada compartimento celular possui um papel definido no crescimento e metabolismo celular, e conseqüentemente, proteínas com funções específicas (Kotyk et al., 1988).

A membrana plasmática exerce diversas funções, que vão desde a interação com a matriz extracelular e a manutenção da polaridade da célula até a participação em mecanismos de transdução de sinal.

O retículo endoplasmático (RE) representa, na maioria dos tipos celulares, o maior sistema interno de membranas celulares. Frequentemente, o RE forma um grande sistema de vesículas achatadas e conectadas entre si e com a membrana nuclear, se estendendo citoplasma adentro (Teasdale et al., 1996). Além de participar da síntese e enovelamento de proteínas, o RE tem sido muito estudado quanto a sua participação em processos de sinalização celular (Berridge, 2002). O RE pode ser encontrado em duas formas nas células eucariotas: o retículo endoplasmático liso (REL) e o retículo endoplasmático rugoso (RER). No REL ocorre a síntese de ácidos graxos e fosfolipídios e são encontradas muitas enzimas de função celular

importante. Na maioria das células, o REL representa uma pequena parte do retículo endoplasmático. O RER é assim chamado pois sua superfície apresenta-se coberta por ribossomos, onde ocorre a síntese de muitas proteínas (Lodish, et al., 2000). Embora todas as células eucariotas devam apresentar RER para a produção de proteínas especiais, como as que compõem a membrana plasmática e as proteínas da matriz extracelular, são nas células especializadas em secreção de proteínas onde os RER são mais abundantes (Kotyk et al., 1988).

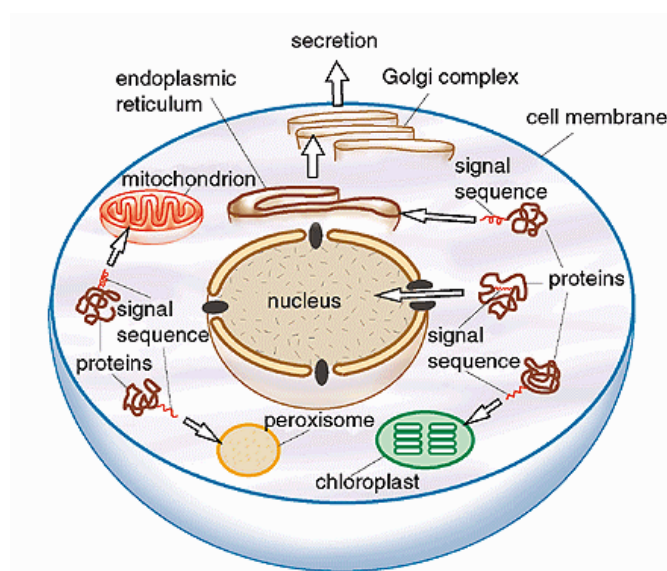


Figura 1.5.1: Ilustração de uma célula animal. As setas indicam as vias de transporte de proteínas no interior da célula. (Fonte: Lodish et al., 2000)

1.5.2. A síntese e o endereçamento de proteínas

A síntese de proteínas se inicia nos ribossomos livres presentes no citosol. Entretanto, algumas proteínas terminam a sua síntese junto à membrana do RER (Figura 1.5.2). Estas proteínas geralmente apresentam uma seqüência sinal de endereçamento para o RE, composta principalmente por resíduos hidrofóbicos, localizada na extremidade N-terminal da sua seqüência de aminoácidos (van Vliet et al., 2003).

Uma proteína conhecida como Partícula Reconhedora de Sinal (SRP) é capaz de reconhecer e se ligar a esta seqüência sinal na proteína que está sendo

sintetizada no ribossomo. Simultaneamente, a SRP se liga ao ribossomo e pausa a síntese desta proteína até que o complexo SRP-proteína-ribossomo alcance a membrana do RE. Uma vez em contato com a membrana do RE, o complexo SRP-proteína-ribossomo se liga a uma proteína receptora (Receptor de SRP) e ao complexo protéico Sec61p localizados na membrana do RE, e a síntese é re-iniciada. A partir daí, um complexo de proteínas transmembranas se encarrega de direcionar a cadeia que está sendo sintetizada em direção ao lúmen do RE através de um canal denominado *Translocon*. Conforme o N-terminal da proteína, e conseqüentemente a seqüência sinal, entra no lúmen do RE, a seqüência sinal é geralmente clivada por uma enzima denominada *peptidase sinal* (van Vliet et al., 2003) e o posterior enovelamento do recém formado polipeptídeo é auxiliado por muitas chaperonas presentes no lúmen do RE (Lodish et al., 2000).

Algumas proteínas possuem um mecanismo de retenção no próprio retículo endoplasmático que evita que estas deixem o RE e sigam para outros compartimentos. O mecanismo pelo qual estas proteínas são mantidas no RE ainda não é totalmente conhecido. Acredita-se que algumas proteínas se mantêm no RE após a oligomerização e exclusão destas proteínas das vesículas que as transportariam para fora do RE (Teasdale et al., 1996).

Algumas proteínas transmembranas, quando estão sendo sintetizadas, atravessam o *translocon* da mesma forma que ocorre com as proteínas da via de secreção. Entretanto, além da seqüência sinal da síntese associada ao RE comum a ambas, estas possuem uma seqüência de retenção capaz de parar o transporte através do *translocon* até que a proteína seja completamente sintetizada. Após a clivagem da seqüência sinal e o término da síntese, a proteína se move lateralmente e utiliza o domínio de retenção, que também atua como hélice transmembrana, para se manter na membrana do RE.

Outras proteínas possuem um domínio que ao mesmo tempo atua como uma seqüência sinal para o RE e um domínio de ancoragem. Este domínio não é clivado e após o término da síntese atua como uma hélice transmembrana. Neste caso, a orientação destas proteínas na membrana do RE dependerá dos resíduos adjacentes ao domínio transmembrana. Geralmente, a região flanqueadora do TM que possui o maior número de aminoácidos positivamente carregados permanece voltado para o citosol (Kotyk et al., 1988).

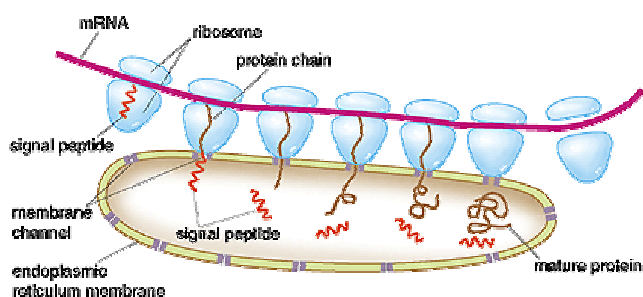


Figura 1.5.2: Esquema da síntese de proteínas e translocação simultânea para o RE através do *translocon*. (Fonte: Lodish et al., 2000)

1.5.3. O transporte das proteínas através das membranas intracelulares

Após a síntese, as proteínas que atingem o lúmen do RE e são corretamente enoveladas são direcionadas para o seu local de atuação ou seguem a via de secreção celular (Figura 1.5.3). As proteínas sintetizadas no RE são exportadas em vesículas de transporte formadas em regiões diferenciadas do RER livres de ribossomos. Estas vesículas de transporte se fundem para formar uma rede tubular de vesículas denominada Compartimento Intermediário RE-Golgi (ERGIC). A região periférica do ERGIC dará origem à rede *cis*-Golgi (van Vliet et al., 2003), que conseqüentemente fará parte do complexo de Golgi. Neste compartimento, as proteínas secretoras continuam a serem transportadas por este sistema de vesículas

que culminará com seu transporte para um local específico na célula ou para o meio extracelular.

Uma vez nas vesículas da via de secreção, as proteínas tomam rumos diversos. As proteínas que são destinadas a compartimentos subcelulares específicos, como algumas proteínas do RE e as de membrana plasmática, são exportadas do RE em vesículas similares. Muitos fatores determinam a direção do transporte das vesículas na via de secreção. Por exemplo, na via de secreção celular, as vesículas de transporte que carregam as proteínas são recobertas por proteínas denominadas COPII, enquanto que as vesículas que carregam proteínas do Golgi para o RE são recobertas por COPI (van Vliet et al., 2003). O carregamento destas proteínas em vesículas de diferente composição protéica é determinada pela seqüência da proteína que será carregada.

Proteínas que são destinadas a compartimentos subcelulares específicos dependem de um sinal de localização para que cheguem ao seu destino. Este sinal determinará qual vesícula carregará a proteína ao seu destino. No caso de proteínas da membrana plasmática, diversos sinais de endereçamento foram identificados. Geralmente, as proteínas de membrana plasmática são segregadas no compartimento *Trans*-Golgi e carregadas em vesículas de transporte (van Vliet et al., 2003) em direção aos domínios apical e basolateral. Para que este mecanismo ocorra, as proteínas apresentam sinais específicos de endereçamento para os diferentes domínios. Alguns dos sinais de membrana apical podem estar localizados dentro da seqüência de ancoragem da proteína na camada lipídica da membrana. Entretanto, embora o encaminhamento e reciclagem das proteínas da membrana plasmática sejam essenciais, os mecanismos de retenção da proteína ancorada na membrana também são muito importantes.

Assim como as proteínas de membrana plasmática, as proteínas de retículo endoplasmático possuem sinais de localização subcelular. As solúveis, isto é, que se mantêm no lúmen do RE geralmente apresentam um domínio conservado entre eucariontes composto de um tetrapeptídeo carboxi-terminal de seqüência KDEL ou HDEL (fungos) (Pelham, 1995; Jackson et al., 1993). O motivo K/HDEL é necessário para ligação de uma proteína receptora chamada Erd2 e seu re-encaminhamento para o RE (van Vliet et al., 2003).

Existem dois tipos de proteínas que compõem a membrana do RE. As proteínas transmembrana de tipo I ($N_{\text{lúmen}}-C_{\text{citósol}}$) na maioria das vezes possuem uma seqüência sinal composta de dois resíduos de lisina chamada de motivo KKXX ou di-lisina e que é responsável pelo re-encaminhamento da proteína ao RE (Pelham, 1995). Foi demonstrado que o motivo KKXX deve estar localizado na extremidade carboxi-terminal, mais especificamente entre os últimos cinco resíduos da extremidade da proteína, para que seja possível interagir com as vesículas cobertas por COPI (Teasdale et al., 1996). Proteínas transmembrana de tipo II ($N_{\text{citósol}}-C_{\text{lúmen}}$) residentes no RE possuem um motivo diferente do presente nas proteínas transmembranas do tipo I. Este motivo é composto por dois resíduos de arginina na extremidade N-terminal da proteína e foi chamado de motivo XXRR ou di-arginina (van Vliet et al., 2003). Estas proteínas também são transportadas em vesículas cobertas por COPI de volta para o RE (Pelham, 1995). Ainda existem algumas proteínas de tipo II que possuem ambos os motivos KKXX e XXRR na sua seqüência, ou ainda que possuem além do motivo XXRR, o motivo H/KDEL comum às proteínas solúveis do RE (Teasdale et al., 1996).

Entretanto, muitas proteínas da membrana do RE não possuem estes motivos di-básicos no seu domínio citoplasmático, necessitando assim de outros mecanismos para seu re-encaminhamento ao RE. Um mecanismo alternativo

utilizado por estas proteínas é a formação de complexos com outras proteínas que, por sua vez, possuem os motivos di-lisinas, como ocorre com as riboforinas I e II. Há também proteínas que possuem motivos alternativos na sua seqüência que ainda não foram identificados. Alguns destes motivos já foram descritos, como o motivo presente no citocromo P-450 e são tipicamente maiores e menos discretos que os motivos di-básicos (Teasdale et al., 1996).

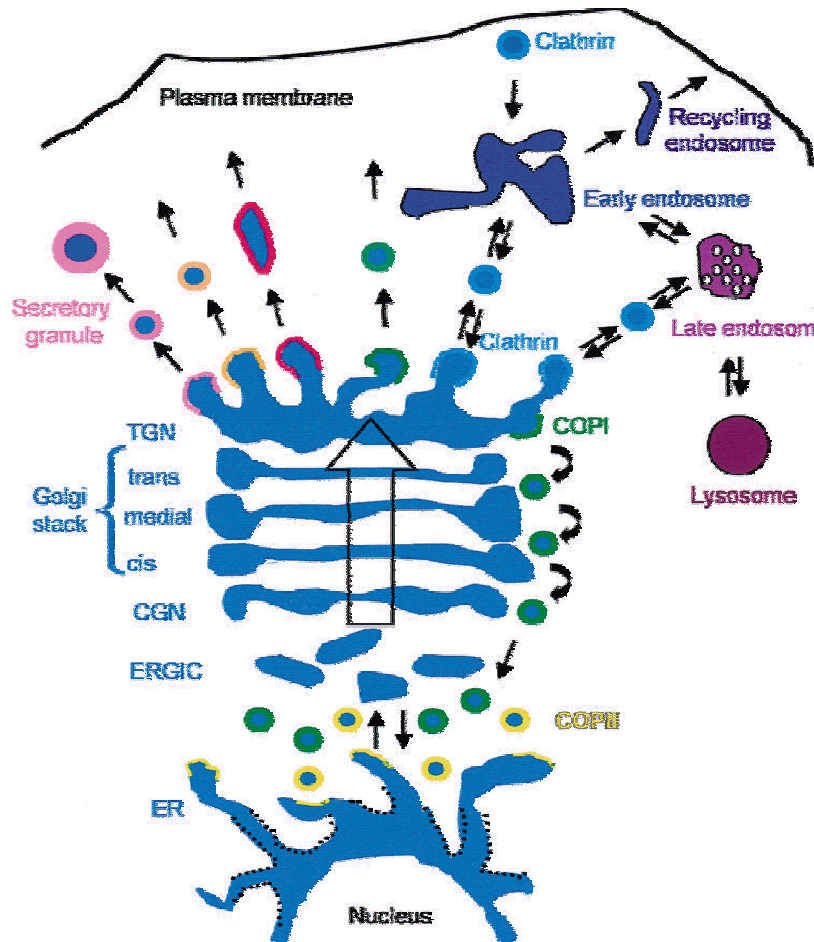


Figura 1.5.3: Ilustração da via de transporte de proteínas pelas membranas intracelulares. (Fonte: van Vliet et al., 2003).

1.5.4. Proteínas de membranas

Existem dois tipos de proteínas que podem estar associadas a membranas celulares: proteínas periféricas e proteínas integrais. Proteínas periféricas de membrana não interagem diretamente com a camada fosfolipídica. Elas se mantêm ligadas indiretamente à membrana por interação com proteínas integrais da membrana ou com grupos polares dos lipídeos presentes na membrana. Um exemplo de proteína periférica de membrana é a quinase C, que apresenta um papel importante na transdução de sinal da face citosólica da membrana plasmática para o citosol (Kotyk et al., 1988).

As proteínas integrais de membrana apresentam um ou mais segmentos imersos na camada fosfolipídica que interagem com os ácidos graxos ancorando a proteína na membrana. Estas proteínas podem estar atravessando a membrana celular da qual fazem parte. Tais proteínas transmembranas possuem um ou mais domínios transmembranas compostos de 20 ou mais resíduos de aminoácidos altamente hidrofóbicos que interagem com os lipídeos da camada fosfolipídica (Lodish et al., 2000). Provavelmente, interações iônicas das proteínas com os grupos polares dos fosfolipídeos também contribuem para a estabilidade da proteína transmembrana. O tipo e grau de interação da proteína com a membrana são determinados pela sua estrutura primária e secundária. O arranjo em α -hélice permite a formação do maior número de pontes de hidrogênio possível da membrana com a proteína e, combinada com a hidrofobicidade, favorece uma forte interação das proteínas integrais com a camada fosfolipídica.

Por outro lado, algumas proteínas possuem apenas uma região que atua como um motivo de ancoragem da proteína na membrana, e esta fica parcialmente submersa na camada fosfolipídica. Um exemplo são as proteínas que se ligam a

membrana através de um glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas possuem um sinal na sua extremidade C-terminal que direciona a ligação do GPI na proteína (Low, 1989).

A maioria das proteínas transmembranas que residem no retículo endoplasmático possuem apenas uma hélice transmembrana (TM) inserindo a proteína na camada fosfolipídica. Estas proteínas podem estar orientadas na membrana de duas maneiras e esta característica depende do tamanho e composição do domínio transmembrana e dos resíduos hidrofílicos que flanqueiam este domínio. Domínios transmembrana com mais de 20 resíduos tendem a adotar a orientação $N_{\text{lumen}}-C_{\text{citossol}}$ enquanto que a orientação oposta é preferida por proteínas com segmentos hidrofóbicos menores (Kotyk et al., 1988). Outros mecanismos permitem a orientação $N_{\text{lumen}}-C_{\text{citossol}}$ das proteínas do retículo endoplasmático, como é o caso dos sinais de re-encaminhamento no transporte retrógrado de proteínas do Golgi para o RE.

Análises *in silico* são primeiramente utilizadas para indicar um possível mecanismo de endereçamento protéico a determinado compartimento celular e, inclusive, retenção da proteína em compartimentos membranosos. Embora este tipo de análise seja muito elucidativo, muitos novos mecanismos estão constantemente sendo descobertos e as análises experimentais são essenciais para a caracterização de uma determinada proteína.

Assim, neste trabalho fazemos uso das duas abordagens para estudar a localização de uma proteína chamada DSCR2. Como pouco se sabe sobre esta proteína, uma análise inicial *in silico* é utilizada para fortalecer as abordagens experimentais.

II. OBJETIVOS

A análise da localização subcelular de proteínas fornece um importante subsídio para estudos sobre suas funções. A expressão diferencial da DSCR2 indica a provável relação com a regulação do ciclo celular, especialmente com a proliferação celular. O fato de indivíduos portadores de Síndrome de Down apresentarem problemas de malformação genética durante o desenvolvimento, o que resulta em algumas características fenotípicas características da síndrome, e o alto risco de incidência de leucemia em portadores faz do gene DSCR2 um alvo importante nas pesquisas relacionadas à SD.

Assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Subclonar o gene DSCR2 em um sistema para expressão heteróloga em células de mamíferos;
- Analisar a localização subcelular da DSCR2 por microscopia de fluorescência e microscopia confocal de varredura a laser;
- Verificar através de mutações a região responsável pela localização da proteína na célula.

III. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Materiais

Inicialmente, a fase aberta de leitura do gene DSCR2 foi amplificada a partir um painel de cDNAs (DNA complementar) de rim fetal humano proveniente da empresa Clontech. Este clone inicial foi construído durante o mestrado do aluno César Adolfo Sommer, e foi utilizado como molde para os estudos seguintes da DSCR2.

O vetor pGEM- T (Promega) foi utilizado para a clonagem inicial do gene DSCR2. Para a subclonagem e posterior expressão heteróloga em células de mamíferos, foram adotados dois sistemas de expressão: (a) o vetor p3XFLAG-*myc*-CMV-25 e o plasmídeo controle p3XFLAG-CMVTM-7-BAP (Sigma-Aldrich); (b) os vetores pEGFP-N1 e pEGFP-C1 (Clontech). Os vetores pEYFP-nuc e pEYFP-mito (Clontech) foram utilizados para análises de co-localização. Todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho foram sintetizados pela empresa Invitrogen.

A maioria dos reagentes utilizada neste trabalho foi obtida da empresa Merck. As enzimas de restrição e modificação são provenientes da Boehringer Mannheim, Amersham Biosciences e Invitrogen. A cepa de *Escherichia coli* DH-5 α foi utilizada para a propagação dos subclones e cultivada em meio de cultura LB líquido e LB ágar suplementados com o antibiótico ampicilina (USB). Os reagentes X-gal (5-Bromo-4-Cloro-3-Indocyl- β -D-Galactosídeo) e IPTG (isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo) foram provenientes da Promega.

As preparações plasmidiais utilizadas para a transfecção em células de mamíferos foram efetuadas utilizando o kit “Perfectprep Plasmid Midi” (Eppendorf). Para as etapas que requeriam a purificação de DNA, resultante de amplificação ou extração de gel de agarose, foi utilizado o kit “NucleoSpin Extract” (Bioeasy).

Para a expressão em células de mamíferos, foram utilizadas como hospedeiras as linhagens eucarióticas CHO-1 (Chinese Hamster Ovary Cells), COS-7 (SV40 African Green Monkey Kidney Cells) e HEK-293 (Human Embryonic Kidney Cells). Para a cultura e transfecção celular, foram utilizados os seguintes materiais: meio de cultura “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM), soro fetal bovino (FBS), Lipofectamina 2000, tripsina, glutamina, penicilina-streptomicina, dimetilsulfoxido (DMSO), todos provenientes da Invitrogen (Gibco-BRL); garrafas para cultura celular (25 cm² e 75 cm²), placas de petri com 35 mm de diâmetro, pipetas sorológicas (5ml, 10 ml e 25 ml) provenientes da Corning–Costar; pipetas pasteur da Nalge-Nunc Int; lâminas retangulares e lamínulas quadradas da GlassTécnica Import Company.

Para os ensaios de imunocitoquímica foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal de camundongo anti-FLAG M2 conjugado com FITC (Sigma-Aldrich); anticorpo monoclonal de camundongo anti-*c-myc* conjugado com Cy3 (Sigma-Aldrich); anticorpo policlonal de cabra anti-GRP-78 (Santa Cruz) e anticorpo policlonal de jumento anti-cabra IgG (Fab’2) conjugado com FITC (Jackson Immuno Research). Para o bloqueio, foram utilizados albumina sérica bovina (BSA) (Bio-Rad) e anticorpo de jumento anti-IgG (Jackson ImmunoResearch).

Para a visualização das células em cultura foi utilizado um microscópio invertido. As lâminas foram visualizadas em um microscópio de fluorescência em colaboração com o Laboratório de Citogenética (DGE-UFSCar). Posteriormente, utilizou-se um Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Zeiss Axiovert LSM 510). Esta etapa do trabalho foi realizada no Laboratório de Microscopia Confocal do Departamento de Histologia e Embriologia (ICB-USP) em colaboração com a Professora Dra. Gláucia Maria Machado Santelli. Os programas LSM 5 Image Browser R 3.0 (Zeiss) e Adobe Photoshop 5.0 foram utilizados para a análise e processamento das imagens, respectivamente.

Para o ensaio de “Western Blotting” utilizou-se membrana de nitrocelulose proveniente da Millipore. O anticorpo monoclonal de camundongo anti-FLAG M2 conjugado com fosfatase alcalina e a solução reveladora da fosfatase alcalina (BCIP/NBT) foram procedentes da Sigma-Aldrich.

3.2. Métodos

3.2.1. Análise *in silico* da seqüência da DSCR2

Embora Vidal-Taboada e colaboradores já tivessem realizado algumas predições *in silico* baseadas na seqüência de aminoácidos da DSCR2, foi necessário analisar os resultados destas predições mais detalhadamente para o delineamento experimental. Assim, neste trabalho algumas destas predições foram refeitas e complementadas com novas análises. Foram utilizados os seguintes programas do pacote EXPASY, disponível *on line* em <<http://www.expasy.org/>>: Psort II, TMHMM, DAS, TOPPred2, TargetP, SOSUI, PredictProtein. Para a investigação de proteínas similares a DSCR2 foi utilizado o programa Propsearch, também do pacote EXPASY.

3.2.2. Subclonagens

A) Subclonagem do gene DSCR2 no pGEM-T

Este sistema é otimizado para a clonagem de produtos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) amplificados utilizando a enzima *Taq* DNA Polimerase, que adiciona uma adenina na extremidade 3' do fragmento resultante. Quando clonado, o inserto interrompe a seqüência da enzima β -galactosidase. Através da adição de X-gal e IPTG no meio de cultura bacteriana, os clones positivos são selecionados

pela coloração branca das colônias recombinantes e azul das colônias falsopositivas.

Oligonucleotídeos contendo sítios de restrição nas extremidades 5' foram desenhados para a amplificação do DSCR2. Essa estratégia visava obter fragmentos que pudessem ser clivados utilizando as enzimas de restrição e posteriormente subclonados em fase de expressão nos diversos vetores. As seqüências dos oligonucleotídeos estão especificadas a seguir:

DSCR2 F2 5'- CCg CTC gAg ATC TCA Tgg Cgg CCA CgT TCT TC - 3'
Xho I Bgl II

DSCR2 R2 5'- gCT CTA gAT gTA TAA ATg TTA CTC Tg - 3'
Xba I

DSCR2 F3 5'- Cgg gAg CTC ATg gCg gCC ACg TTC TTC - 3'
Sac

DSCR2 R3 5'- CgC ggA TCC CgT gTA TAA ATg TTA CTC Tg - 3'
Bam HI

O gene DSCR2 foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase em um aparelho termociclador (PTC-100™ - MJ Research) a partir de um subclone já existente no laboratório. Foram realizadas 3 reações de amplificação com combinações diferentes de oligonucleotídeos (F2/R2, F2/R3, e F3/R3). Essas combinações permitiram que o gene clonado no pGEM-T fosse retirado deste vetor e subclonado em fusão com os peptídeos repórteres nos vetores de expressão. Ao final obteríamos a proteína DSCR2 sendo expressa em fusão com os epítopos FLAG M2 e *c-myc* (p3XFLAG-*myc*-CMV-25) e com a proteína GFP (pEGFP-C1 e pEGFP-N1). Para evitar possíveis erros utilizou-se nas amplificações uma DNA polimerase com atividade revisora, a *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e os reagentes utilizados seguem as recomendações do fornecedor. Abaixo segue as temperaturas e períodos utilizados na amplificação por PCR:

94⁰C, 5 minutos (1 ciclo inicial de desnaturação)

35 ciclos de $\left\{ \begin{array}{l} 94^{\circ}\text{C}, 30 \text{ segundos (desnatura\c{c}\tilde{a}\tilde{o})} \\ 55^{\circ}\text{C}, 30 \text{ segundos (anelamento)} \\ 72^{\circ}\text{C}, 90 \text{ segundos (extens\c{a}\tilde{o})} \end{array} \right.$

72⁰C, 7 minutos (1 ciclo final de extens\c{a}\tilde{o})

O produto de PCR foi analisado atrav\c{e}s de eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X e corado com brometo de et\i\de{o} (Sigma-Aldrich). Sob luz ultravioleta, as bandas de DNA referentes \c{a} amplifica\c{c}\tilde{a}\tilde{o} foram comparadas a padr\c{o}es de peso molecular (Ladder 1Kb, Ladder 100bp) (Invitrogen). Uma vez que o vetor pGEM-T possui uma timina protuberante no 3' e a *Platinum* DNA polimerase n\c{a}\tilde{o} insere a adenina no produto de PCR, o produto foi purificado utilizando o kit "NucleoSpin Extract" e posteriormente tratado com 1mM de dATP (Gibco-BRL) e 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Amershan Biosciences) por 30 minutos \c{a} 70⁰C.

A seguir, foram realizadas as liga\c{c}\tilde{o}es dos fragmentos contendo o DSCR2 amplificado ao vetor pGEM-T. As tr\c{e}s rea\c{c}\tilde{o}es foram feitas seguindo as recomenda\c{c}\tilde{o}es do fabricante e utilizou-se 60ng do produto de PCR e 50ng do vetor. Ap\c{o}s 12 horas a 4⁰C, foram feitas as transforma\c{c}\tilde{o}es por choque t\c{e}rmico de bact\c{e}rias *E.coli* DH-5\c{a} competentes por cloreto de c\c{a}lcio 0,1M (Sambrook et al., 2001). Ap\c{o}s o descongelamento da bact\c{e}ria, foi adicionado a tr\c{e}s tubos contendo as bact\c{e}rias competentes metade dos produtos de cada liga\c{c}\tilde{a}\tilde{o} e as rea\c{c}\tilde{o}es foram mantidas no gelo por 15 minutos. As bact\c{e}rias foram ent\c{a}\tilde{o} incubadas por 90 segundos a 42⁰C e 2 minutos novamente no gelo. Adicionou-se aos tubos 0,8 ml de meio de cultura l\i\quido Luria Bertani (LB) (USB) e incubaram-se as bact\c{e}rias a 37⁰C por uma hora sob suave agita\c{c}\tilde{a}\tilde{o}. Ap\c{o}s esse per\i\odo, as bact\c{e}rias foram plaqueadas em 25 ml de meio de cultura s\c{o}lido LB \c{A}GAR (USB) com ampicilina 100\c{u}g/\c{u}l (USB), 50\c{u}l de IPTG 200mM e 50\c{u}l de X-Gal 5% (Promega).

Ap\c{o}s 12 horas de incubaa\c{c}\tilde{a}\tilde{o}, foi poss\i\vel diferenciar os poss\i\veis recombinantes pela diferen\c{c}\tilde{a} na coloraa\c{c}\tilde{a}\tilde{o} das col\c{o}nias. Assim, algumas col\c{o}nias

foram selecionadas e analisadas por “PCR de colônia” utilizando o mesmo programa citado para a amplificação do gene. Utilizou-se uma alíquota de cada colônia como molde da reação. Foram feitas preparações do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina (Sambrook et al., 2001) das colônias que obtiveram resultado positivo no “PCR de colônia”. As construções foram mapeadas com as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xba* I seguindo as recomendações do fabricante. As análises em gel de agarose 1% foram registradas utilizando um sistema de foto-documentação digital (Kodak DC40).

B) Subclonagem do gene DSCR2 em fusão com os epítomos *c-myc* e FLAG M2

O gene DSCR2 foi retirado do vetor previamente construído pGEM F2R2 utilizando as enzimas de restrição *Bgl* II e *Xba* I segundo as recomendações do fabricante. O mesmo tratamento foi feito com o vetor p3XFLAG-*myc*-CMV-25 (Figura 3.2.2.1). Os fragmentos correspondentes ao inserto e ao vetor tratados com as enzimas de restrição foram extraídos de um gel de agarose 1% utilizando-se o Kit “NucleoSpin Extract”. A ligação dos fragmentos na concentração molar 1:1 foi feita utilizando a enzima T4 DNA Ligase (GIBCO-BRL) e seguindo as especificações do fabricante. Utilizou-se aproximadamente 100ng do vetor.

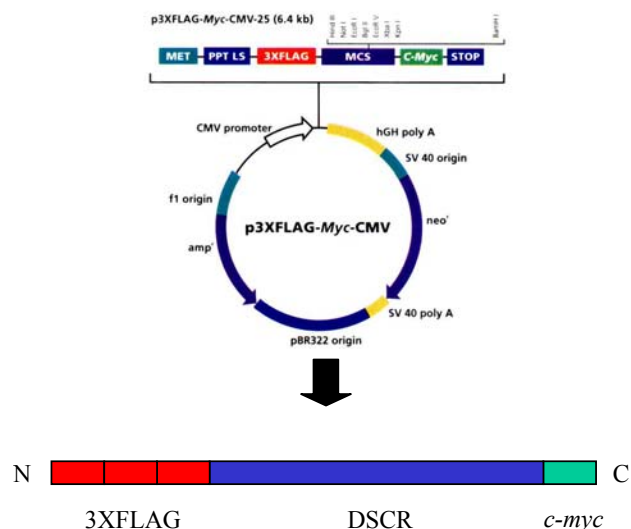


Figura 3.2.2.1: Mapa do plasmídeo p3XFLAG-*myc*-CMV-25, onde foi subclonado o gene DSCR2 e esquema da proteína em fusão com epítomos FLAG M2 e *c-myc*.

Em seguida, foram feitas as transformações de bactérias competentes *E.coli* DH5 α , como já descrito no item 3.2.2. A. As colônias transformantes foram testadas quanto à presença do inserto por “PCR de colônia” e, após preparação do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, por análise de restrição utilizando as enzimas *Bgl* II e *Xba* I. Os resultados foram registrados por um sistema de fotodocumentação digital.

Confirmada a colônia recombinante, foram feitas midi-preparações plasmidiais utilizando o kit “Pefectpred Plasmid Midi”. Este método de preparação plasmidial resulta em uma maior pureza e maior quantidade final de DNA, o que por sua vez resulta em uma maior eficiência da transfecção em células de mamíferos.

C) Subclonagem do gene DSCR2 em fusão com a proteína GFP

Para construção de um plasmídeo contendo a proteína GFP em fase com a extremidade 5' do gene DSCR2, os plasmídeos pGEM-F2R3 e o vetor pEGFP-C1 foram clivados utilizando as enzimas de restrição *Xho* I e *Bam* HI. O plasmídeo contendo a proteína GFP em fase com a extremidade 3' do gene DSCR2, foi

construído através da clivagem dos plasmídeos pEGFP-N1 e pGEM F3R3 utilizando as enzimas de restrição *Sac* I e *Bam* HI (Figura 3.2.2.2). Ambas as reações foram feitas segundo as recomendações do fabricante. Os fragmentos correspondentes aos insertos e aos vetores tratados foram extraídos de um gel de agarose 1% utilizando-se o Kit “NucleoSpin Extract”. A inserção dos fragmentos nos vetores, na concentração 1:1, foi realizada utilizando a enzima T4 DNA Ligase (GIBCO-BRL) e seguindo as especificações do fabricante. Nesta subclonagem também foi utilizada uma quantidade de vetor de aproximadamente 100ng.

Em seguida, foram feitas as transformações da bactéria competentes *E.coli* DH5 α , como já descrito no item 3.2.2. A. As colônias transformantes foram testadas quanto à presença do inserto por “PCR de colônia” e, após preparação do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, por análise de restrição utilizando as enzimas *Bgl* II e *Eco* RI. Os resultados foram registrados utilizando um sistema de foto-documentação digital.

Confirmada a colônia recombinante, foram feitas midi-preparações plasmidiais utilizando o kit “Perfectprep Plasmid Midi”.

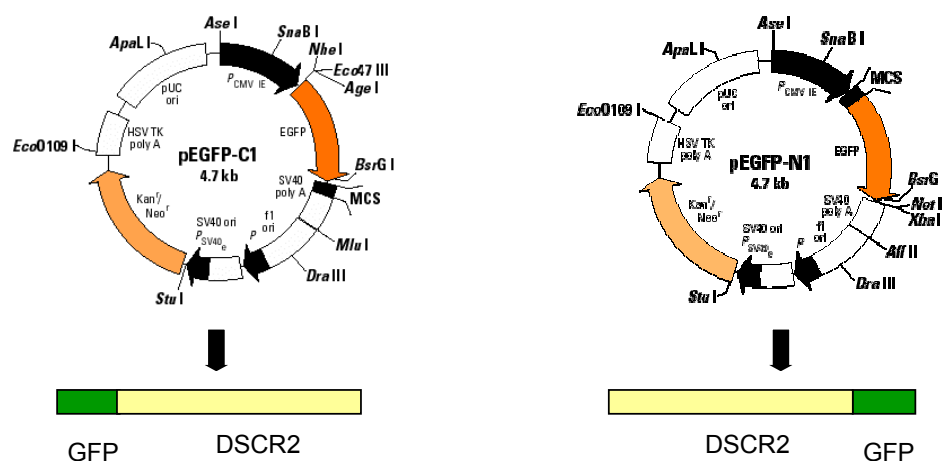


Figura 3.2.2.2: Mapa dos vetores para a subclonagem do DSCR2 (pEGFP-C1 e pEGFP-N1) e esquema da proteína em fusão com a proteína GFP.

D) Subclonagem do fragmento DSCR2₉₁₋₂₈₈

A existência de um sítio de reconhecimento da enzima de restrição *Eco* RI na seqüência do gene DSCR2 permitiu a construção de um plasmídeo contendo uma deleção dos primeiros 264 pares de bases (Figura 3.2.2.3). Esta construção teve a finalidade de investigar se a ausência deste fragmento acarretaria em uma mudança na distribuição subcelular da proteína DSCR2 e, conseqüentemente, verificar a existência do domínio transmembrana predito para os aminoácidos 72-91 e de um possível sinal de endereçamento celular.

Para tal, os vetores FLAG-DSCR2-*myc* e p3XFLAG-*myc*-CMV-25 foram clivados utilizando as enzimas *Eco* RI e *Xba* I. Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e purificados utilizando o kit “NucleoSpin Extract”. A ligação dos fragmentos e subsequente transformação de bactérias competentes *E.coli* DH5 α foram realizadas como descrito para as subclonagens anteriores.

As colônias transformantes foram testadas quanto à presença do inserto por “PCR de colônia” e, após preparação do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, por análise de restrição utilizando as enzimas *Eco* RI e *Xba* I.

Os resultados foram registrados pelo sistema de foto-documentação digital. Da colônia recombinante foi feita uma midi-preparação plasmidial utilizando o kit “Perfectprep Plasmid Midi”.

E) Subclonagem dos fragmentos DSCR2₉₁₋₂₁₇ e DSCR2₁₋₂₁₇

Foi necessária a construção de mais dois plasmídeos para investigar a relação da seqüência da proteína DSCR2 com a sua localização subcelular. Assim, novos oligonucleotídeos foram desenhados para amplificar fragmentos específicos do gene DSCR2 (Figura 3.2.2.3), que estão descritos a seguir:

DSCR2 F4 5'- gAA gAT CTA ggA gTC Tgg g- 3'
Bgl II

DSCR2 R4 5'- gCT CTA gAA ggA Agg TCg - 3'
Xba I

Estes oligonucleotídeos foram utilizados em uma reação de amplificação por PCR utilizando como molde um subclone contendo o gene íntegro. Para amplificar a forma DSCR2₉₁₋₂₈₈, foram utilizados os oligonucleotídeos DSCR2F4 e DSCR2R2. Para amplificar a forma DSCR2₁₋₂₁₇, foi utilizada a combinação DSCR2F2 e DSCR2R4. Essas combinações de oligonucleotídeos foram escolhidas baseadas na fase de leitura do plasmídeo p3XFLAG-*myc*-CMV-25 e do fragmento amplificado. A enzima *Platinum* DNA Polimerase (Invitrogen) foi novamente utilizada e as reações foram feitas nas mesmas condições já descritas neste trabalho.

Após análise em gel de agarose 1%, o produto de PCR foi purificado utilizando o kit “NucleoSpin Extract” e diretamente submetido à clivagem utilizando as enzimas *Xba* I e *Bgl* II conforme as indicações do fabricante. Os fragmentos correspondentes aos produtos amplificados e tratados foram isolados de um gel de agarose 1% utilizando novamente o kit “NucleoSpin Extract”. A ligação dos fragmentos, transformação de bactérias competentes *E.coli* DH5 α e o “PCR de colônia” foram realizados como descrito para as subclonagens anteriores. Após preparação do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina, foi realizada a análise de restrição utilizando as enzimas *Xba* I e *Bgl* II. Os resultados foram registrados pelo sistema de foto-documentação digital. Das colônias recombinantes, foram feitas midi-preparações plasmidiais utilizando o kit “Perfectprep Plasmid Midi”.

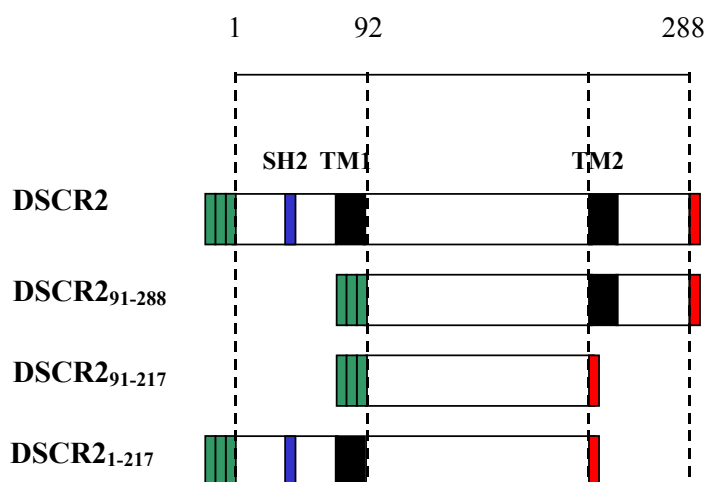


Figura 3.2.2.3: Esquema da DSCR2 e das formas truncadas subclonadas em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc*

3.2.3. Sequenciamento de DNA

Todos os recombinantes construídos neste trabalho foram seqüenciados pelo método dideoxi utilizando o aparelho ABI Prism™ 377 DNA Sequencer. Os reagentes utilizados e o protocolo seguido foram provenientes do kit “Dyemantic ET Dye” (Amersham Biosciences).

Na reação de seqüenciamento das construções no pGEM-T foram utilizados os oligonucleotídeos comerciais T7 promoter e SP6 promoter. Para o seqüenciamento dos fragmentos no plasmídeo p3XFLAG-*myc*-CMV-25 foram utilizados os oligonucleotídeos comerciais CMV30 e CMV24. E para o seqüenciamento das construções GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP foram utilizados os oligonucleotídeos DSCR2F e GFP-antisense; GFP-sense e DSCR2R, respectivamente. Os oligonucleotídeos GFP-sense e GFP-antisense foram desenhados em nosso laboratório para o seqüenciamento das construções em fusão com a GFP.

Foram feitas reações de seqüenciamento da região 5' e da região 3' de todas as construções com a finalidade de obtenção da seqüência completa do inserto. No caso dos plasmídeos de expressão, também era de interesse verificar a integridade

das junções do gene DSCR2 com a seqüência repórter codificada pelo plasmídeo. A montagem da seqüência completa foi feita por sobreposição dos fragmentos seqüenciados. Os programas utilizados para a análise das seqüências foram: “GeneRunner” versão 3.05, disponível em <<http://www.generunner.com/>> e “Multiple sequence alignment – Multalin”, disponível em <<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>>.

3.2.4. Cultura Celular e Transfecção Transiente

Células CHO-1, HEK-293 e COS-7 permanecem estocadas em tubos criogênicos contendo meio de cultura DMEM com 10% de DMSO congeladas em nitrogênio líquido. Os tubos contendo estas células foram aquecidos a aproximadamente 37°C para que as células fossem descongeladas. As células foram então centrifugadas por 5 minutos a 2000 RPM para retirar o DMSO, e ressuspendidas em meio de cultura celular (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS), 2mM de glutamina e 100U/(ml de penicilina e estreptomicina). Estas células foram semeadas em garrafas de 25 cm² contendo mais um volume de meio de cultura.

Após atingir uma confluência de 80-100%, as células foram retiradas da garrafa pelo método de tripsinização. Para tal, as células foram lavadas em PBS (Tampão Fosfato Salino) 1X e incubadas em Tripsina 0,05% por 2-5 minutos para desaderi-las da superfície da garrafa. As células foram então centrifugadas por 5 minutos a 2000 RPM, ressuspendidas em meio de cultura e semeadas. Para ensaios de transfecção celular, as células foram transferidas para placas de 35 mm. Nestas placas, foram previamente colocadas lamínulas de vidro esterilizadas com álcool.

O método de transfecção realizado neste trabalho foi a transferência mediada por lipídeos catiônicos, que envolve a encapsulação do DNA de interesse em vesículas membranosas (lipossomos artificiais) seguida da fusão destes complexos com a membrana plasmática da célula hospedeira. Segundo o fabricante, este método permite uma eficiência 10 X superior ao método de transfecção por fosfato de cálcio.

As placas contendo as células foram incubadas até atingir a confluência de 60-80% (aproximadamente 10^5 células). Para realizar a transfecção, aproximadamente 2 μ g do DNA foi misturado a 80 μ l de meio DMEM sem FBS enquanto que 3 μ l de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) foram misturados a 97 μ l de meio DMEM sem FBS. As misturas foram mantidas a temperatura ambiente por 10 minutos e então juntadas em uma só solução. Durante 30 minutos a temperatura ambiente, os complexos lipossomo-DNA foram formados e então foram adicionados às placas. Para uma melhor eficiência do método, estas placas foram previamente lavadas com PBS e o meio de cultura foi trocado por DMEM sem FBS. Durante 5 horas, as células foram incubadas em DMEM sem FBS para que ocorresse a entrada do complexo DNA-lipossomo na célula hospedeira. Após este período, foi adicionado o equivalente a um volume de meio de cultura com 10% de FBS (concentração final de 5%). Em alguns casos, as células foram submetidas diretamente à análise de expressão doze horas após a adição do meio. Outras vezes, doze horas depois, o meio de cultura foi trocado por DMEM com 10% de FBS e as células foram mantidas na estufa por mais 24 ou 36 horas.

Durante o período de realização de ensaios com as células, as garrafas eram sempre mantidas com as culturas em crescimento, trocando o meio de cultura e tripsinizando as células quando necessário. A observação das células em cultura foi feita através de um microscópio invertido. Todas as incubações e manutenção da

cultura de células eram realizadas a 37°C em uma estufa umedecida e com circulação de 5% de CO₂. Em todos os passos de manipulação de cultura de células, foram tomados os devidos cuidados de esterilização e descontaminação dos reagentes e equipamentos.

3.2.5. Análise da expressão por imunofluorescência

Os vetores usados para a expressão da DSCR2 permitem que a análise seja feita por observação das células fixadas através um microscópio de fluorescência e, com uma resolução maior, através de um microscópio confocal de varredura a laser.

Uma vez que a proteína GFP possui fluorescência natural e não é necessária a adição de nenhum substrato para que esta seja observada, somente a fixação e montagem da lâmina são suficientes para analisar a expressão da proteína de interesse em fusão com a GFP. Assim, para a análise da expressão transiente das proteínas DSCR2-GFP e GFP-DSCR2, as células foram fixadas com paraformaldeído 3,7% em PBS (pH 7,4) por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este intervalo, as células foram lavadas com PBS e a lamínula foi transferida para uma lâmina de vidro com de 10µl de glicerol, com a superfície contendo as células voltadas para baixo. A lamínula foi vedada com esmalte comercial sem formaldeído e observada à luz de um microscópio de fluorescência.

Para os ensaios de imunofluorescência, as células fixadas foram lavadas em PBS e permeabilizadas com a adição de Triton X-100 (Merck) na concentração de 0,5% por 5 minutos. As células fixadas e permeabilizadas foram lavadas novamente e subseqüentemente incubadas por 10 minutos em uma solução de bloqueio contendo PBS e 1% de BSA (albumina sérica bovina).

Finalmente, as lamínulas com as células aderidas foram incubadas com os respectivos anticorpos, de acordo com a construção transfectada. Nos experimentos

para a detecção da proteína FLAG-DSCR2-*myc* e das formas truncadas subclonadas com as mesmas fusões, foram necessárias incubações únicas, uma vez que o anticorpo primário já se apresentava conjugado com FITC ou Cy3. Assim, as lamínulas foram incubadas por 1 hora com anti-FLAG M2 conjugado com FITC na concentração 1:400 ou anti-*c-myc* conjugado com Cy3 na concentração 1:50 em PBS com 1% de BSA.

Em alguns experimentos, foram feitos ensaios de co-localização utilizando dois corantes celulares simultaneamente. Para a co-localização com o retículo endoplasmático, as células transfectadas com a construção FLAG-DSCR2-*myc* foram fixadas e permeabilizadas como já descrito anteriormente. Na reação de bloqueio, foi adicionado ao PBS com 1% de BSA o anticorpo de jumento anti-IgG e as células foram incubadas nesta solução por 30 minutos. As células foram então incubadas com o anticorpo anti-*c-myc* conjugado com Cy3 nas mesmas condições descritas anteriormente. A mesma lamínula foi lavada com PBS e incubada por 1 hora com o anticorpo primário policlonal de cabra anti-GRP-78 na concentração de 15µg/ml em PBS com 1% de BSA. Após este procedimento, a lamínula foi incubada por mais uma hora com o anticorpo secundário policlonal de jumento anti-cabra IgG (Fab'2) conjugado com FITC diluído em PBS na concentração 1:50.

Para a marcação do núcleo e da mitocôndria, foram feitas co-transfecções de plasmídeos codificando as formas da DSCR2 em fusão com os epítomos *c-myc* e FLAG M2 e dos plasmídeos pEYFP-nuc (núcleo) ou pEYFP-mito (mitocôndria). As marcações das formas da DSCR2 foram feitas pelo uso do anti-*c-myc* conjugado com Cy3, enquanto que a marcação do núcleo e da mitocôndria contou com a fluorescência da proteína de fusão EYFP, uma proteína modificada a partir da proteína GFP.

Após as incubações, as lamínulas que foram submetidas aos ensaios imunocitoquímicos foram lavadas, montadas em lâmina de vidro com 10 μ l de glicerol ou “antifading” e vedadas com esmalte comercial sem formaldeído. Todas as etapas foram feitas à temperatura ambiente.

3.2.6. Caracterização do retículo endoplasmático com DIOC₆(3)

Uma alternativa utilizada para a marcação do retículo endoplasmático foi a marcação com um corante lipofílico catiônico verde fluorescente chamado DIOC₆(3). A Marcação foi realizada como descrito por Spector e colaboradores (1997). Para tal, células não transfectadas foram fixadas, lavadas com PBS 1X, incubadas por 10 segundos em uma solução contendo 2 μ l de DIOC₆(3) 0,5 μ g/ml em 2ml de PBS 1X. A lamínula foi novamente lavada em PBS 1X e montada em uma lâmina de vidro como descrito anteriormente.

3.2.7. Análise das imagens

As lâminas foram inicialmente observadas à luz de um microscópio de fluorescência convencional. Este microscópio permite apenas uma visualização grosseira da localização da fluorescência na célula. Assim as lâminas foram guardadas à -20°C por no máximo uma semana e analisadas em um microscópio confocal de varredura a laser. O resultado pôde ser observado por sobreposição das imagens capturadas a 488nm e 543nm.

As imagens tridimensionais são captadas pelo laser e visualizadas através do programa LSM 5 ImageBrowser 3.0. A partir desta primeira visualização, pudemos modificar o aumento do microscópio selecionando uma região de maior interesse na área captada. Em algumas análises, foram feitos fatiamentos da imagem tridimensional da célula que permitem uma visualização de cortes transversais na

célula e, conseqüentemente, uma melhor definição. O programa utilizado também permite outros tipos de análise, que foram utilizados conforme a necessidade.

3.2.8. Ensaio de “Western Blotting”

Para confirmar se a proteína DSCR2 estava sendo expressa nas células transfectadas foi feito um ensaio de “western blotting”. Uma garrafa de 75 cm² com uma confluência celular de 60-80% foi transfectada com a construção FLAG-DSCR2-*myc* pelo método descrito anteriormente. Após 48 horas de incubação, as células foram tripsinizadas, transferidas para um tubo de 15 ml, e centrifugadas à 2000 RPM por 5 minutos. As células foram então ressuspendidas e homogenizadas em um tampão contendo 0,25M sacarose, 20mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA e 1mM PMSF.

Uma alíquota do homogenado foi aplicada em gel SDS-PAGE 15% (“Sodium Dodecil Sulfate-Polyacrilamide Gel Electroforesis”). Após a corrida, o gel, a membrana de nitrocelulose e dois pedaços de papel de filtro Whatman 3MM foram imersos em tampão de transferência contendo Tris 200mM, Glicina 50mM e metanol 15%. O sistema de transferência foi montado na cuba de eletroforese e submetido à voltagem de 150V e 160mA por 2 horas. Após este período, a membrana foi corada em uma solução de Ponceau 0,5% e ácido acético 0,1%, por 5 minutos, para visualização das bandas das proteínas transferidas. A membrana foi então incubada por 1 hora em solução de bloqueio contendo 1% leite em pó desnatado em TBS 1X (Tris 50mM e NaCl 150mM), lavada em TBS 1X e incubada por mais 1 hora em uma solução de TBS 1X contendo o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-FLAG M2 conjugado com fosfatase alcalina em uma diluição 1:50. A revelação da membrana foi feita utilizando a solução reveladora da fosfatase alcalina (BCIP/NBT).

IV. RESULTADOS

4.1. Análise *in silico* da seqüência da proteína DSCR2

Se há pouca informação disponível sobre uma proteína em estudo, é possível fazer análises *in silico* baseando-se na seqüência de aminoácidos e em bancos de dados que guardam seqüências e motivos de proteínas já conhecidas. Muitos programas que fazem este tipo de análise estão disponíveis na rede e sugerem características estruturais e funcionais para a proteína. Este primeiro passo em um trabalho pode direcionar futuras etapas empíricas. Embora análises da seqüência da DSCR2 já tivessem sido feitas, a falta de informação detalhada nos levou a refazer algumas e realizar novas análises. Abaixo segue o resultado das predições *in silico* feitas neste trabalho para a proteína DSCR2:

- **DAS:** indicou a presença de um possível TM entre os aminoácidos 74-87 e outro TM entre os aminoácidos 219-232. A segunda predição apresentou maior significância.
- **TMHMM:** não revelou nenhuma predição de domínio transmembrana com valor significativo.
- **PredictProtein:** indicou a presença de uma hélice transmembrana entre os aminoácidos 219-236 e ainda sugeriu que a porção N-terminal estaria localizada na parte externa e a C-terminal na parte interna da célula ou organela subcelular.
- **SOSUI:** não indicou a existência de peptídeos sinais na DSCR2 e sugeriu que fosse uma proteína solúvel.
- **TMPred:** indicou a presença de uma hélice transmembrana entre os aminoácidos 71-91. Embora com uma significância abaixo da confiável, o programa também apontou a possibilidade de um segundo TM entre os

aminoácidos 215 e 240 da DSCR2. A proteína poderia estar em ambas as orientações na membrana.

- **TOPPred:** revelou suas predições na forma de um gráfico de hidrofobicidade (Figura 4.1.2) e um modelo de disposição da proteína na célula (Figura 4.1.1). Este resultado pode ser visualizado abaixo: Segundo o TOPPred, a proteína possuiria um domínio transmembrana (TM) único e estaria disposta na membrana celular com o N-terminal voltado para dentro da célula (ou organela) e o C-terminal para o exterior. Uma segunda possibilidade que foi levantada seria a existência de dois domínios TM, sendo o N-terminal localizado no exterior celular.



Figura 4.1.1: Modelos hipotéticos da disposição da DSCR2 em uma membrana.

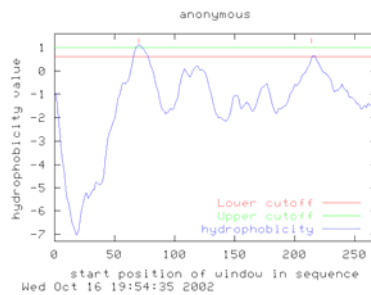
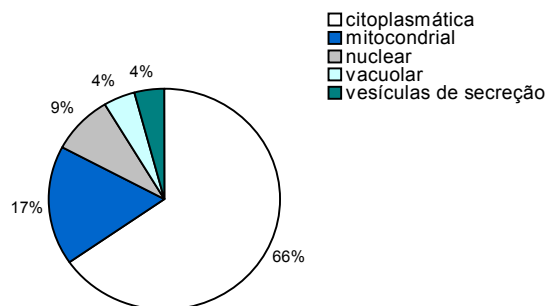


Figura 4.1.2: Valores de hidrofobicidade atribuídos à seqüência da DSCR2.

- **PSORT II:** não apontou nenhuma seqüência sinal de endereçamento para a DSCR2 e sugeriu que a proteína se localize no citoplasma da célula.



4.2. Construção dos vetores

4.2.1 Construção dos vetores pGEM F2R2, pGEM F2R3 e pGEM F3R3

Para facilitar a manipulação do DSCR2, o gene foi clonado em um vetor de propagação (pGEM-T). Esta clonagem inicial foi feita com o intuito de facilitar as subclonagens posteriores nos diferentes plasmídeos de expressão. Assim, foram feitas três reações de amplificação que diferiam na composição dos oligonucleotídeos. Estes foram responsáveis pela inserção de sítios de restrição específicos na extremidade 5'e 3' do fragmento amplificado. Como resultado, obtivemos 3 plasmídeos, pGEM F2R2, pGEM F2R3 e pGEM F3R3.

A confirmação das três construções foi feita por PCR de colônia e posteriormente por análise de restrição (Figura 4.2.1). A integridade do gene, que havia sido re-amplificado de uma construção já existente, foi confirmada por sequenciamento de DNA.

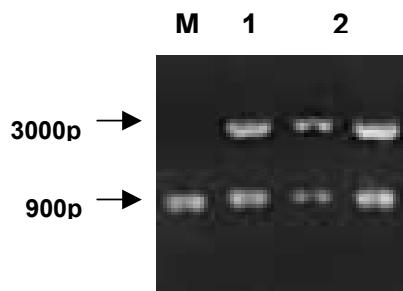


Figura 4.2.1: Análise de restrição dos subclones pGEM F2R2, pGEM F2R3 e pGEM F3R3, (1, 2, 3, respectivamente). A banda de 3000pb corresponde ao vetor pGEM-T e a de aproximadamente 900pb aos insertos amplificados com combinações de oligonucleotídeos diferentes. Produto de amplificação do gene DSCR2 (M).

4.2.2. Construção do vetor contendo a DSCR2 em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc* (FLAG-DSCR2-*myc*)

Para verificar a inserção do gene no vetor p3XFLAG-*myc*-CMV-25, foi feito um PCR de colônia e restrição enzimática com as endonucleases *Bgl* II e *Xba* I (Figura 4.2.2). A integridade da construção e a fusão do gene em fase de leitura com os epítomos FLAG M2 e *c-myc* foram verificadas pelo sequenciamento de DNA.

Uma vez confirmada a validade do subclone, foi realizada uma midipreparação plasmidial da qual se obteve uma concentração de 200ng/ μ l em 250 μ l de água milliQ autoclavada.

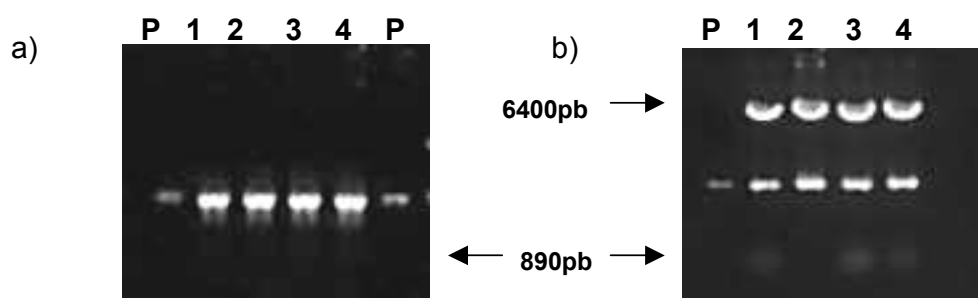


Figura 4.2.1:a)Produtos de PCR de 4 colônias do FLAG-DSCR2-*myc* (1, 2, 3, 4). b)Análise dos subclones 1, 2, 3 e 4 do FLAG-DSCR2-*myc* por restrição enzimática. Produto amplificado correspondente ao gene DSCR2 (P).

4.2.3. Construção dos vetores contendo a DSCR2 em fusão com a GFP (GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP)

A estratégia de utilizar uma forma otimizada da GFP (EGFP) fundida em fase com a DSCR2 para a visualização da localização subcelular dessa proteína apresenta a vantagem de ser desnecessários tratamentos com anticorpos, uma vez que a própria GFP é fluorescente e detectável por microscopia de fluorescência convencional. Além do mais, utilizando os ensaios com a GFP, o resultado por imunofluorescência poderia ser confirmado. Desse modo, além da subclonagem no vetor p3XFLAG-*myc*-CMV-25, o gene DSCR2 foi subclonado nos plasmídeos de expressão pEGFP-C1 e pEGFP-N1. A proteína DSCR2 foi então fundida ao C-terminal (GFP-DSCR2) ou N-terminal (DSCR2-GFP) da proteína EGFP. A figura 4.2.3 mostra a análise de restrição dos subclones com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*. A integridade destas construções foi confirmada por sequenciamento de DNA.

Enfim, foi realizada uma midi-preparação plasmidial da qual se obteve uma concentração de 250ng/μl em 250μl de água milliQ autoclavada.

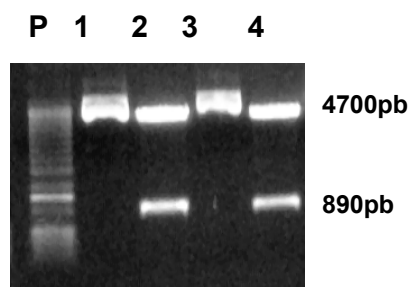


Figura 4.2.3: Análise de restrição dos subclones GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP. Marcador de peso molecular (P); pEGFP-N1 (1); pEGFP-C1 (3) Análise de restrição (2, 4). As bandas de 890pb correspondem ao gene DSCR2 digerido do plasmídeo (4700pb).

4.2.4. Construção dos plasmídeos DSCR2₉₁₋₂₈₈, DSCR2₁₋₂₁₇ e DSCR2₉₁₋₂₁₇ em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc*

A análise de recombinantes por PCR de colônia e restrição enzimática foi realizada utilizando as enzimas *Eco* RI e *Xba* I, no caso do subclone DSCR2₉₁₋₂₈₈, e *Bgl* II e *Xba*I, no caso dos subclones DSCR2₁₋₂₁₇ e DSCR2₉₁₋₂₁₇. A figura 4.2.4 mostra a fotografia do gel confirmando as subclonagens. A integridade da construção e a fusão do gene em fase de leitura com os epítomos FLAG M2 e *c-myc* foram verificadas pelo sequenciamento de DNA. Na midi-preparação plasmidial obteve-se uma concentração de 200ng/μl em 250μl de água milliQ autoclavada.

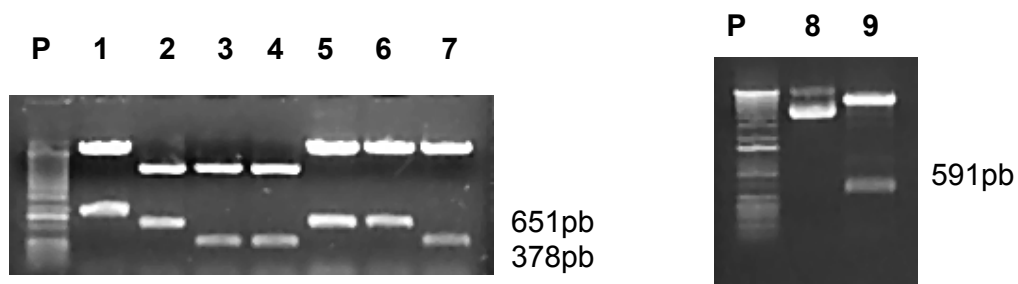


Figura 4.2.4: Análise de Restrição dos subclones correspondentes às formas truncadas do gene DSCR2. Os subclones selecionados como positivos foram: 6 (DSCR2₁₋₂₁₇), 7 (DSCR2₉₁₋₂₁₇) e 9 (DSCR2₉₁₋₂₈₈). Plasmídeo p3XFLAG-*myc*-CMV-25 (8). Marcador de peso molecular 1Kb (P).

4.3. A análise da localização subcelular

4.3.1. A localização subcelular da DSCR2 por imunofluorescência

Os plasmídeos contendo a proteína DSCR2 em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc* foram transfectados inicialmente nas células COS-7 (“SV-40 Green Monkey”), CHO-1 (“Chinese Hamster Ovary”) e HEK-293 (“Human Embryonic Kidney”). Entretanto, devido à facilidade de manipulação e formato adequado para as análises do citoplasma, toda a foto-documentação foi realizada com as células COS-7. Como pode ser observado na figura 4.3.1, a DSCR2 apresentou uma distribuição citoplasmática (C-F). Para uma análise mais detalhada, foi feita a imagem em maior aumento, que pode ser observada em G-H. A princípio, este padrão de expressão já descarta a provável localização na membrana plasmática, possibilidade levantada por Vidal-Taboada em 1998. Entretanto, proteínas citosólicas, isto é, que não se localizam em organelas específicas do citoplasma, apresentam uma distribuição mais homogênea, como pode ser observada na imagem correspondente às células transfectadas com o plasmídeo controle p3XFLAG-CMVTM-7-BAP (A-B). As células foram analisadas 12, 36 e 48 horas após a transfecção, o que indica que este padrão de expressão não é temporário. A localização também foi independente do tipo celular utilizado (COS-7, CHO-1 e HEK-293).

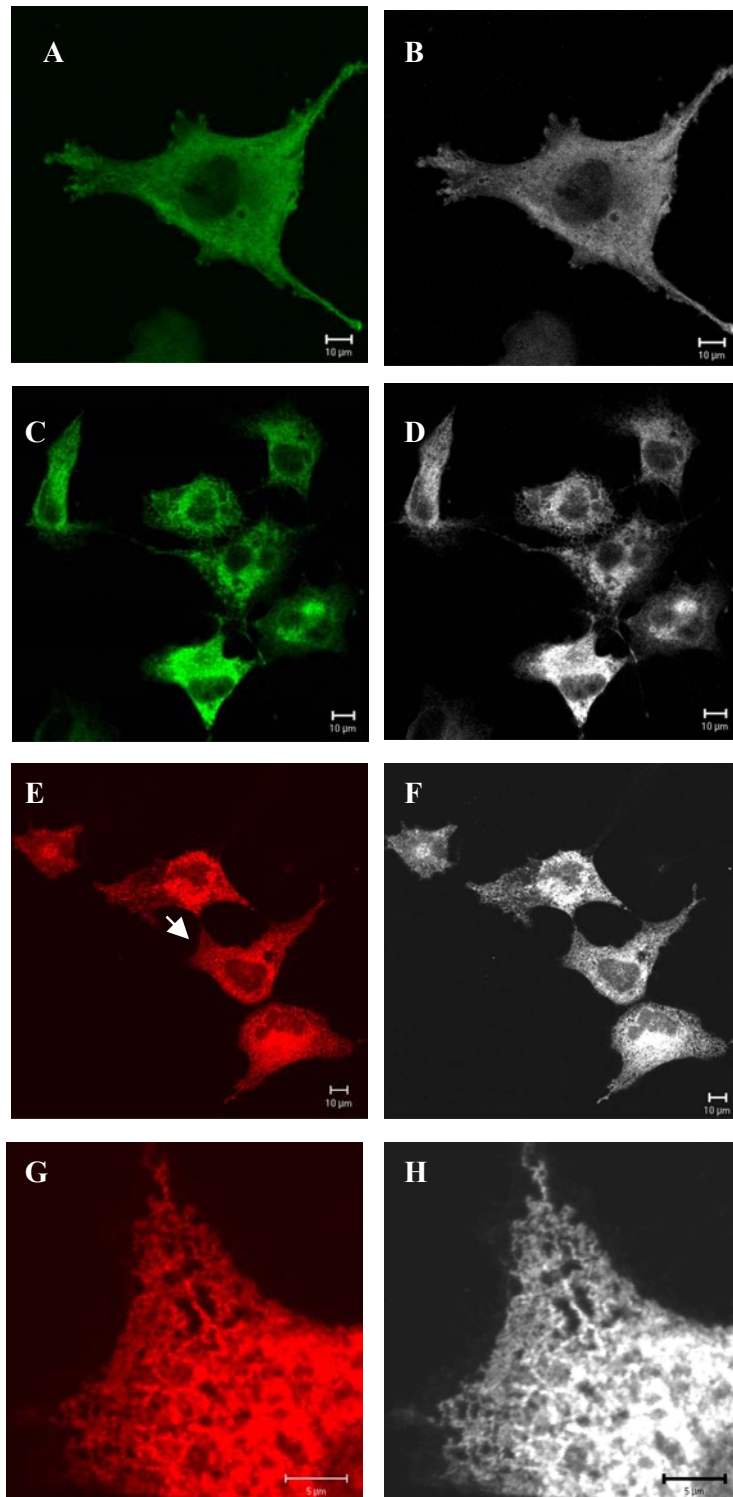


Figura 4.3.1: A DSCR2 é uma proteína citoplasmática. Imunofluorescência de células COS-7 expressando a proteína FLAG-DSCR2-*myc*. Controle de distribuição citoplasmática, (A,B). Anti-FLAG M2 conjugado com FITC (C,D). Anti-*c-myc* conjugado com Cy3 (E,F). A seta indica a região em maior aumento destacada em G,H.

4.3.2. A localização subcelular da DSCR2 em fusão com a GFP

Para confirmar os resultados obtidos por imunofluorescência, foi analisada a expressão da proteína DSCR2 em fusão com a proteína EGFP. Como resultado, as proteínas GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP foram observadas no citoplasma das células e não foi observada diferença entre as duas construções, isto é, tanto com a EGFP no amino ou no carboxi terminal, a localização foi citoplasmática (Figura 4.3.2). Embora a grande intensidade da fluorescência da proteína EGFP não permitisse uma definição muito apurada da localização da DSCR2 dentro do citoplasma, as análises destas células demonstraram claramente que a proteína não apresentava localização na membrana plasmática.

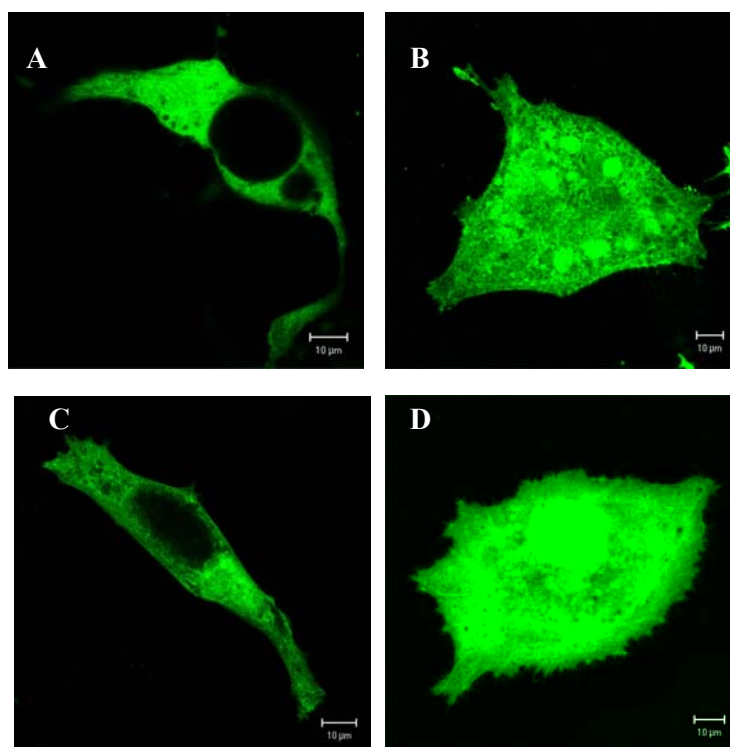


Figura 4.3.2: O padrão de fluorescência citoplasmático da DSCR2 é confirmado nos ensaios com a GFP. À esquerda, análise de células COS-7 expressando as fusões GFP-DSCR2 (A) e DSCR2-GFP (C). À direita, células transfectadas com apenas os vetores pEGFP-C1 (B) e pEGFP-N1 (D).

4.3.3. Caracterização do retículo endoplasmático com $\text{DIOC}_6(3)$

Alguns fluorocromos, como a dicarbocianina $\text{DIOC}_6(3)$, coram o retículo endoplasmático quando usados em determinadas concentrações. Para uma primeira visualização do RE e uma conseqüente análise comparativa, foi realizada a marcação de células COS-7 com $\text{DIOC}_6(3)$ e pôde-se observar uma rede de membranas citoplasmáticas muito similar à observada nos ensaios de localização da DSCR2 marcada com Cy3 e FITC (figura 4.3.3). Este resultado indicou a possibilidade da localização da DSCR2 ser no retículo endoplasmático.

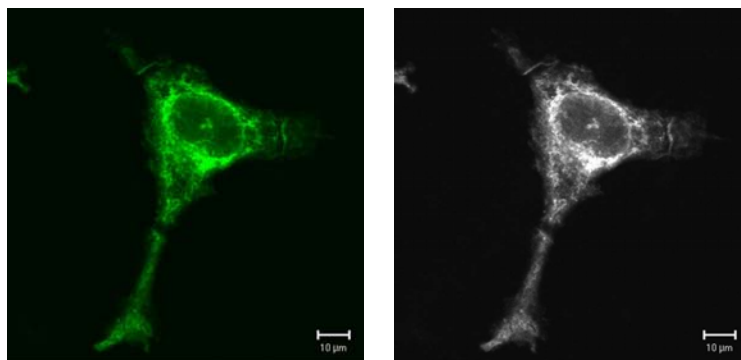


Figura 4.3.3: O retículo endoplasmático é marcado com $\text{DIOC}_6(3)$. A distribuição da fluorescência apresenta um padrão de proteínas de RE, inclusive com a região perinuclear mais aparente.

4.3.4. Co-visualização da DSCR2 com proteínas nuclear e mitocondrial

Plasmídeos que codificam uma proteína modificada a partir da GFP, chamada de EYFP (“enhanced yellow fluorescent protein”), em fusão com uma seqüência alvo para estruturas subcelulares específicas, foram utilizados para ensaios de co-localização subcelular. Deste modo, os plasmídeos pEYFP-nuc e pEYFP-mito foram utilizados para a marcação do núcleo celular e da mitocôndria, respectivamente. As células foram analisadas após a co-transfecção do subclone FLAG-DSCR2-*myc* e cada um dos dois plasmídeos marcadores em ensaios paralelos. Na figura 4.3.4 podemos observar que a localização da DSCR2 difere da disposição da proteína marcadora de mitocôndria e de núcleo nas células.

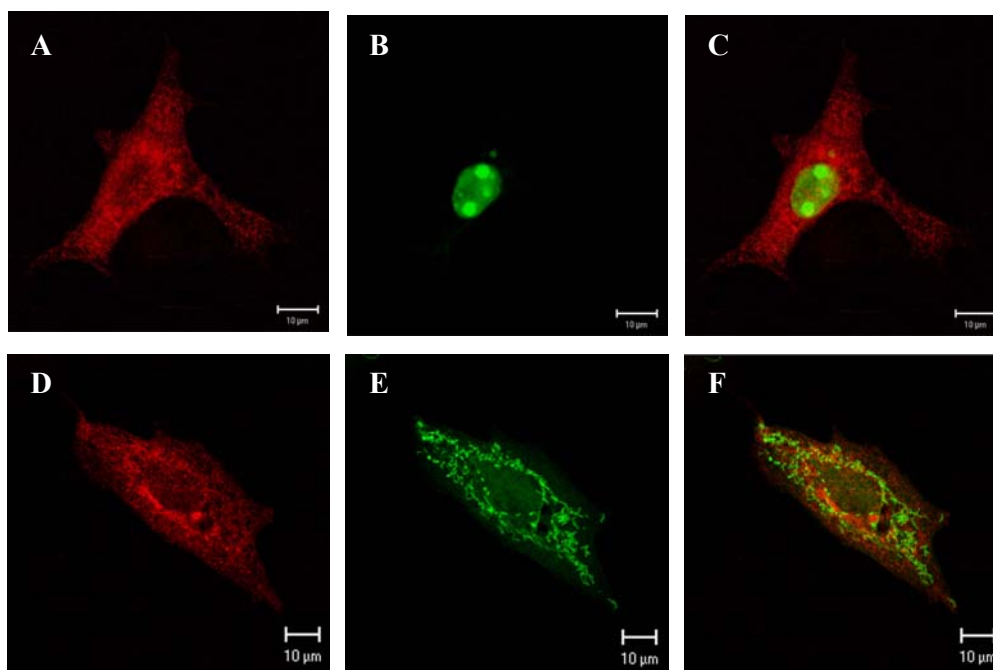


Figura 4.3.4: Co-visualização do núcleo e da mitocôndria marcados com EYFP. Células co-transfectadas com o subclone FLAG-DSCR2-*myc* e plasmídeos marcadores. A marcação vermelha corresponde à DSCR2 detectada pelo anti-*c-myc* conjugado com Cy3 (A, D) e a marcação verde corresponde aos plasmídeos marcadores de núcleo (B) e mitocôndria (E). C e F demonstram a sobreposição das imagens.

4.3.5. Co-visualização da DSCR2 e da GRP-78, uma proteína de retículo endoplasmático

A confirmação de que a DSCR2 estava sendo observada no RE foi obtida pelo uso de uma proteína chamada GRP-78 (“glucose-regulated protein”) ou BIP (“immunoglobulin heavy chain binding protein”). Esta proteína é um membro da família de chaperoninas HSP70 que se localizam no RE. Assim, para os ensaios de co-localização da DSCR2 com o retículo endoplasmático, as células transfectadas com o subclone FLAG-DSCR2-*myc* foram submetidas a uma dupla-marcação com fluorescências distintas. Enquanto que o anticorpo anti-*c-myc* conjugado com Cy3 marcou a proteína FLAG-DSCR2-*myc* com fluorescência vermelha, a proteína endógena GRP-78 foi detectada pelo anticorpo anti-GRP-78 e subseqüentemente marcada com fluorescência verde pelo anticorpo secundário anti-IgG conjugado com FITC (figura 4.3.5). A análise das imagens obtidas revela um padrão altamente similar de expressão das proteínas DSCR2 e GRP-78. Entretanto, alguns ensaios demonstram que a DSCR2 apresenta uma fluorescência mais elevada na região perinuclear quando comparada a GRP-78, o que pode ser resultado de uma localização em regiões específicas do compartimento intracelular. Embora as análises realizadas indiquem uma localização da DSCR2 no retículo endoplasmático, este resultado não é suficiente para inferir se a proteína está localizada no lúmen, na membrana ou simplesmente associada à superfície do retículo endoplasmático por interação com outra proteína ou complexo protéico.

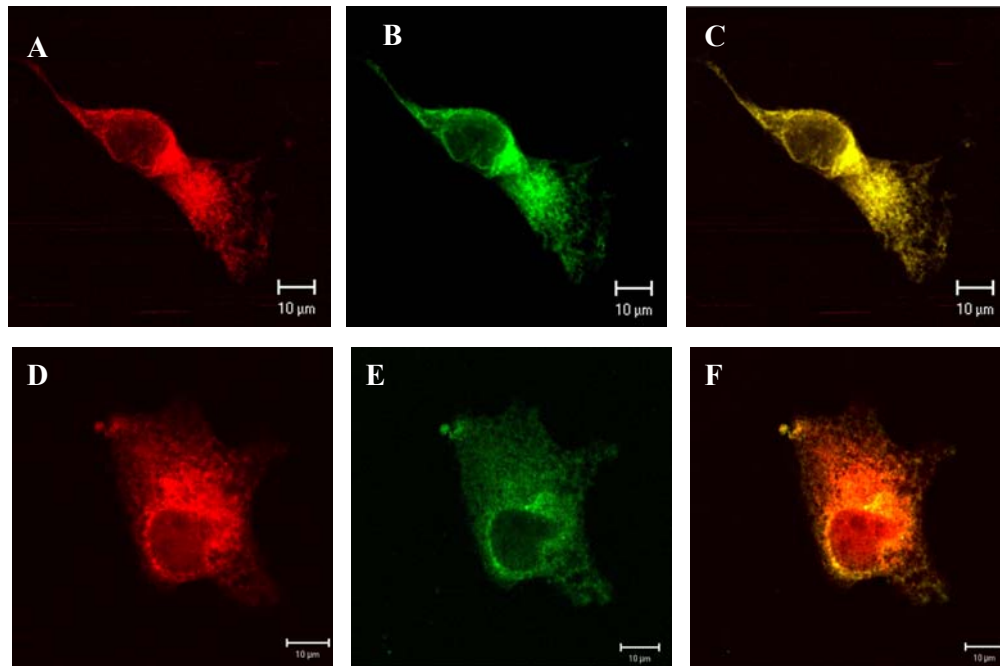


Figura 4.3.5: A DSCR2 co-localiza com a GRP-78 no retículo endoplasmático. Células transfectadas com o subclone FLAG-DSCR2-*myc* e submetidas a uma dupla marcação com os anticorpos anti-*c-myc* conjugado com Cy3 (A, D) e anti-GRP-78 + anti-IgG conjugado com FITC (B, E). As imagens sobrepostas demonstram o padrão similar de localização das duas proteínas (C, F).

4.3.6. A localização subcelular de formas truncadas da proteína DSCR2

Seqüências sinais de localização subcelular de proteínas geralmente estão localizadas nas extremidades da seqüência de aminoácidos. Baseado neste conhecimento e na predição da existência dos domínios transmembrana na DSCR2, formas truncadas da proteína foram subclonadas em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc*. Foram subclonados fragmentos correspondentes a DSCR2 sem o N-terminal, sem o C-terminal e sem ambas as extremidades. Surpreendentemente, a análise da localização dos fragmentos foi similar ao resultado obtido com a proteína DSCR2 íntegra (figura 4.3.6.1). Este fato pode ser visualizado com um aumento maior da célula transfectada com a construção DSCR2₉₁₋₂₁₇ (figura 4.3.6.2).

O resultado obtido com estes experimentos foi muito importante, pois descartou algumas possibilidades de mecanismos que poderiam direcionar o transporte subcelular da DSCR2. Pôde ser observado que a ausência dos domínios transmembranas em diferentes construções, assim como a ausência de ambos os domínios preditos na mesma construção, não alterou a distribuição da DSCR2 na célula. O que também pôde ser concluído foi que as extremidades N e C terminais da proteína não são essenciais para a localização da proteína.

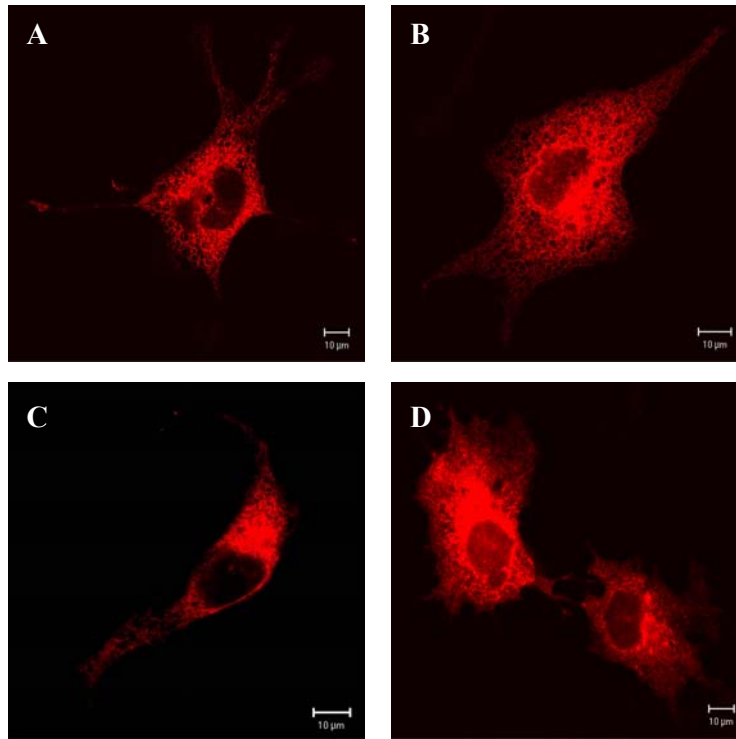


Figura 4.3.6.1: Localização subcelular das formas DSCR2₉₁₋₂₈₈(B), DSCR2₁₋₂₁₇(C) e DSCR2₉₁₋₂₁₇(D). Os fragmentos subclonados apresentam o mesmo padrão de distribuição subcelular da DSCR2 íntegra (A). As detecções foram feitas utilizando o anti-*c-myc* conjugado ao Cy3.

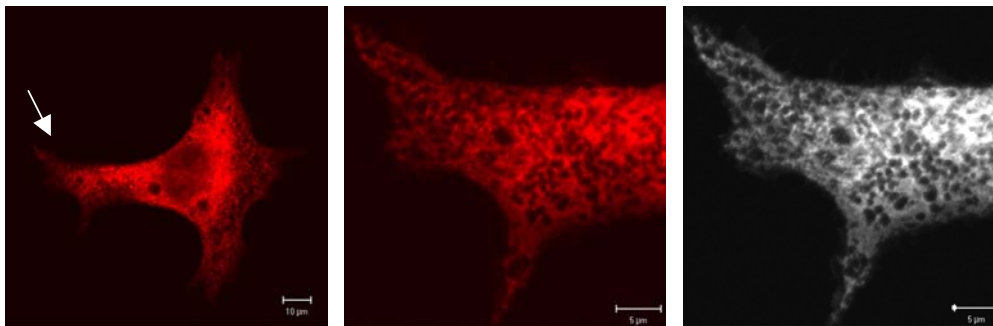


Figura 4.3.6.2: A DSCR2₉₁₋₂₁₇ em maior aumento. A seta indica a região aumentada.

4.4. Análise da expressão da DSCR2 por “western blotting”

A detecção da proteína FLAG-DSCR2-myc nas células transfectadas foi confirmada pelo ensaio de “western blotting”. Uma garrafa de cultura de células COS-7 foi transfectada com esta construção e o extrato celular foi analisado por SDS-PAGE. Uma alíquota de células não transfectadas foi utilizada como controle negativo. As proteínas foram então transferidas para uma membrana e a incubação com o anticorpo anti-FLAG M2 conjugado com fosfatase alcalina permitiu detectar uma proteína no extrato celular. De acordo com o peso molecular da proteína reconhecida pelo anticorpo, podemos assumir que se trata da DSCR2 em fusão com os epítopos nas células. Este resultado pode ser observado na figura 4.4 e indica também a eficiência da transfecção.



Figura 4.4: Detecção da expressão da DSCR2 por “western blotting”. As bandas representam a proteína FLAG-DSCR2-myc reconhecida pelo anticorpo anti-FLAG M2 conjugado com fosfatase alcalina.

V. DISCUSSÃO

A determinação do compartimento subcelular onde uma proteína se localiza pode ser muito importante quando se quer estudar uma proteína e sua função. O resultado pode guiar as primeiras inferências sobre o provável papel da proteína na célula. A predição *in silico* de uma localização da DSCR2 na membrana plasmática levantou algumas idéias sobre o papel da DSCR2 na célula, embora estas análises não tivessem sido confirmadas experimentalmente.

Na tentativa de investigar a localização subcelular da DSCR2, nós utilizamos um sistema de expressão contendo pequenas seqüências de nucleotídeos codificando os epítomos FLAG M2 e *c-myc* em fusão com a extremidade 5' e 3' do gene DSCR2, respectivamente. Em uma construção diferente, o DSCR2 foi fundido a proteína verde fluorescente gerando as proteínas GFP-DSCR2 e DSCR2-GFP. Nas construções, tanto o C-terminal como o N-terminal da proteína foram marcados pelos seguintes motivos: (a) pouco se sabia sobre as propriedades da seqüência de aminoácidos da proteína DSCR2; (b) duas hélices transmembranas haviam sido preditas na seqüência da DSCR2; (c) nenhum peptídeo sinal ou seqüência de endereçamento subcelular havia sido identificado na DSCR2. Assim, não havia informação disponível e confiável sobre as regiões da seqüência da DSCR2 importantes para sua localização na célula. Por outro lado, é sabido que a distribuição de proteínas na célula eucarioto é, na maioria das vezes, regulada por mecanismos complexos.

Baseado nas predições de Vidal-Taboada em 1998 era esperado observar a DSCR2 na região periférica das células, uma vez que esta é uma característica de proteínas de membrana plasmática e este padrão de localização é muito fácil de ser diferenciado de proteínas citoplasmáticas. Entretanto, a DSCR2 em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc* foi detectada no citoplasma das células, com uma maior

fluorescência na região perinuclear. Este padrão é característico de proteínas de retículo endoplasmático. Nenhuma diferença foi observada entre o uso do anticorpo contra o epítipo FLAG M2 e *c-myc*. Entretanto, devido à maior intensidade e menor decaimento da fluorescência, optamos em usar o anti-*c-myc* nos experimentos seguintes. As proteínas marcadas com a GFP também obtiveram um padrão similar de distribuição celular. Entretanto, a fluorescência obtida com o uso da GFP foi muito intensa e não permitiu uma caracterização mais detalhada do citoplasma marcado.

O uso das células COS-7 para toda a foto-documentação foi uma opção, uma vez que, embora os resultados observados para as células HEK-293 e CHO-1 tenham sido iguais aos observados com a COS-7, estas últimas apresentam um formato mais adequado para se estudar proteínas citoplasmáticas. Além do mais, as células COS-7 são mais facilmente manipuladas e apresentam alta taxa de proliferação celular, o que facilitou a manutenção da cultura celular durante os experimentos.

Os primeiros resultados obtidos descartaram a possibilidade da localização da proteína DSCR2 na membrana plasmática. Esta possibilidade foi levantada por Vidal-Taboada e colaboradores e foi baseada em análises da seqüência da proteína por programas disponíveis na Internet em <www.expasy.org>. Durante a revisão destas análises, pudemos notar que os programas discordavam entre si. A sugestão da localização da proteína na membrana plasmática provavelmente foi resultante da falha unânime dos programas em encontrar um motivo responsável pelo endereçamento da proteína para outros compartimentos celulares. Esta sugestão também deve ter sido reforçada pela indicação, pela maioria dos programas revisados, de um ou mais domínios transmembranas na seqüência da DSCR2. Entretanto, vale lembrar que nenhum programa em específico sugeriu a localização

da DSCR2 na membrana plasmática e que alguns programas não mapearam domínios transmembranas na proteína. Já foi demonstrado que os programas de predições disponíveis apresentam um maior índice de erros quando analisando classes de proteínas com composições similares de aminoácidos. Além do mais, também é sabido que, através do uso das predições *in silico*, a discriminação é melhor entre proteínas de membrana e núcleo e pior entre proteínas intracelulares e ancoradas na membrana (Cedano et al., 1997). Assim, levando em conta a alta hidrofobicidade da DSCR2, podemos considerar a dificuldade dos programas em discernir entre domínios transmembranas característicos e regiões altamente hidrofóbicas de proteínas. Em adição, nenhum programa detectou sinais de endereçamento subcelular para a DSCR2.

Uma vez que o programa PSORT II indicou a possibilidade da DSCR2 se localizar na mitocôndria, foram feitos ensaios de co-localização com uma proteína marcadora de mitocôndria e a DSCR2. Nos resultados obtidos neste trabalho, ficou claro que a DSCR2 não se localiza na mitocôndria, demonstrando ter uma distribuição mais ampla na célula, sendo esta mais intensa nas áreas adjacentes ao núcleo.

A análise das células marcadas com DIOC₆(3) revelou um padrão de fluorescência muito similar ao observado para a DSCR2. Este resultado nos levou a investigar por dupla-marcação a possível localização da DSCR2 no RE. Através da dupla-deteção da DSCR2 e da proteína GRP-78 (uma chaperonina residente no RE), pudemos confirmar que a DSCR2 co-localiza com o RE. Entretanto, a intensa marcação na região perinuclear continuou mais aparente.

A interação de uma proteína com uma determinada membrana lipídica é dada pela sua estrutura primária e secundária e a âncora surpreendentemente forte é resultante da estrutura em α -hélice do segmento hidrofóbico de 20-25 aminoácidos

(Kotyk et al., 1988). Este segmento pode também ser determinante da retenção da proteína no RE, independentemente em alguns casos de outros sinais de endereçamento. De acordo com Vidal-Taboada (1998), a DSCR2 possui dois domínios transmembranas possíveis. Entretanto, é mais provável que os aminoácidos 72-91 componham um domínio TM, enquanto que a seqüência predita no C-terminal da proteína (217-237) apresenta uma probabilidade menor de compor um TM.

Como já descrito anteriormente, sabe-se que proteínas do lúmen e da membrana do retículo endoplasmático requerem uma seqüência sinal que direciona a síntese e transporte da proteína para o RE. Também é comum, além dos TM, a existência de uma seqüência de endereçamento responsável pelo transporte retrógrado do Golgi ao RE. Sinais parecidos também são encontrados em proteínas solúveis de RE. Embora a DSCR2 não possua um sinal típico, nossos experimentos demonstraram que a DSCR2 está localizando no RE.

Assim, para caracterizar a região responsável pela localização da DSCR2 no RE, foram feitas análises mutacionais do gene DSCR2. Foram subclonadas formas truncadas da proteína (DSCR2₁₋₂₁₇, DSCR2₉₁₋₂₁₇, DSCR2₉₁₋₂₈₈) em fusão com os epítomos FLAG M2 e *c-myc*. O fragmento DSCR2₁₋₂₁₇ não possui a região C-terminal da DSCR2 mas contém o TM1, predito para esta região. O fragmento DSCR2₉₁₋₂₈₈ não possui todo o C-terminal da proteína, o que inclui o TM2. Adicionalmente, um terceiro fragmento composto apenas da seqüência entre os dois domínios transmembranas putativos foi subclonado. Neste fragmento não há nenhuma das extremidades da proteína DSCR2. O epítipo *c-myc* foi mais uma vez utilizado nos ensaios de imunofluorescência e pôde-se observar que a ausência destes fragmentos da DSCR2 não influenciou a localização da proteína na célula, que continuou com o mesmo padrão de localização subcelular no RE.

A maioria das proteínas depende de sinais de localização subcelular e estes sinais tipicamente se localizam nas extremidades da proteína, seja no N ou C-terminal. Há ainda casos de proteínas onde o TM poderia ser um sinal de retenção ou re-direcionamento. Embora nenhum programa detectou sinais de endereçamento na DSCR2, a DSCR2 poderia possuir um sinal atípico ou simplesmente ter sua localização dependente de uma segunda proteína, que agiria como uma carregadora da DSCR2 para um compartimento subcelular específico.

Os motivos mais comuns de endereçamento para o RE via transporte retrógrado de proteínas de membrana, os motivos di-lisina e di-arginina na extremidade da proteína, não estão presentes na seqüência da DSCR2, como já dito anteriormente. Entretanto, se analisarmos outras regiões da seqüência, encontramos estes motivos afastados da extremidade da proteína. Há uma dupla de aminoácidos arginina distanciados 28 aminoácidos do amino-terminal, e uma di-lisina distanciada 14 aminoácidos do C-terminal.

Não há na literatura trabalhos que relatem a funcionalidade destes motivos nestas posições. Além do mais, neste trabalho foi demonstrado que a localização da DSCR2 independe das suas extremidades. As análises também indicam que as regiões que haviam sido preditas como TMs não indicam ser seqüências de inserção da proteína na membrana do RE, uma vez que quando deletadas da DSCR2 não alteram a distribuição subcelular da proteína.

Na ausência de possibilidades já descritas na literatura, podemos inferir que a DSCR2 não demonstra ser uma proteína integral da membrana do RE, embora sua localização coincida com o retículo endoplasmático. Existem algumas proteínas de RE que apresentam seqüências não características que direcionam a sua localização subcelular. Este é o caso do citocromo b_5 (Kotyk, et al., 1988), e este sinal não está localizado muito próximo à extremidade da proteína (Newton et al.,

2003). Entretanto, uma vez que apenas a região entre os domínios transmembranas preditos foi suficiente para manter a proteína marcando o RE, e esta região não apresenta características de domínios transmembranas, é mais provável que a DSCR2 estaria sendo mantida no lado citoplasmático do RE por algum mecanismo desconhecido. Se a proteína não possui uma seqüência sinal para o RE, poderíamos supor que o seu carregamento para próximo ao RE, e a sua localização no RE seria dependente de alguma outra proteína ou complexo protéico. A identificação desta interação seria muito importante para se entender o papel da DSCR2 nas células.

Se a DSCR2 é realmente uma proteína de atuação no RE, a sua função passa a ser estudada neste contexto. O RE é uma organela altamente dinâmica e responsável por muitas funções celulares vitais, que incluem a síntese e empacotamento das proteínas. Estes processos envolvem fatores de transcrição e tradução que regulam síntese e apoptose. O RE também realiza um papel importante nas vias de transdução de sinais do RE para outros compartimentos celulares (Berridge et al., 2002).

Estudos anteriores da expressão da DSCR2 revelaram algumas evidências de que a DSCR2 poderia estar relacionada a mecanismos de sinalização do ciclo celular e processos proliferativos (Vidal-Taboada et al., 2000). Estas evidências incluem a similaridade com outras proteínas relacionadas a transdução de sinal e controle do ciclo celular assim como uma expressão mais elevada em tumores, desenvolvimento embrionário e linhagens altamente proliferativas. É importante considerar a incidência elevada de leucemia e tumor de testículo em pacientes com síndrome de Down, assim como a expressão elevada da DSCR2 em linhagens leucêmicas e testículo. Esta proteína pode estar envolvida em mecanismos do RE relacionados ao ciclo celular, o que poderia sugerir o seu envolvimento com alguns

processos proliferativos, que por sua vez poderia se relacionar com a incidência de leucemia ou tumor de testículo em portadores de SD. Mais estudos precisam ser realizados que visem entender estes mecanismos e a participação do DSCR2 em processos relacionados.

Uma possível abordagem elucidativa seria a investigação de proteínas que interajam com a DSCR2. O estudo, através da técnica de duplo-híbrido, está sendo planejado em nosso laboratório e poderá contribuir muito para o entendimento do papel da DSCR2 na célula.

VI. CONCLUSÕES

A proteína DSCR2 foi localizada no retículo endoplasmático de células de mamíferos;

A DSCR2 não é uma proteína integral de membrana;

Os fragmentos 72-92 e 217-237 não demonstram ser domínios transmembranas uma vez que quando deletados não alteram a distribuição da proteína;

O fragmento entre os aminoácidos 92-217 é suficiente para manter a proteína no retículo endoplasmático;

A DSCR2 pode estar interagindo indiretamente com a membrana do RE via uma outra proteína;

A localização da DSCR2 no RE permite uma revisão de seu provável papel na célula.

VII. BIBLIOGRAFIA

ANTONARAKIS, S. E., and Down Syndrome Collaborative Group. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. **N. Engl. J. Med.**, v.324, p. 872-876, 1991.

ANTONARAKIS, S. E., PETERSEN, M. B., MCINNIS, M. G., ADELSBERGER, P. A., SCHINZEL, A. A., BINKERT, F., PANGALOS, C., RAOUL, O., SLAUGENHAUPT, S. A., HAFEZ, M., et al. The meiotic stage of non-disjunction in trisomy 21: Determination by using DNA polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.**, v.50, p.544-550, 1992.

ANTONARAKIS, S. E., AVRAMOPOULOS, D., BLOUIN, J. L., TALBOT, C. C. and SCHINZEL, A. A. Mitotic errors in Somatic cells cause trisomy 21 in about 4,5% of cases and are not associated with advanced maternal age. **Nat. Genet.**, v.3, p.146-150, 1993.

ANTONARAKIS, S. E. 10 years of Genomics, Chromosome 21, and Down Syndrome. **Genomics**, v.51, p.1-16, 1998.

ANTONARAKIS, S. E., LYLE, R., CHRAST, R., SCOTT, H. S. Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down syndrome. **Brain Research Reviews.**, v.36, p.265-274, 2001.

BERRIDGE, M. J. The endoplasmic Reticulum: a multifunctional signaling organelle. **Cell Calcium.**, v.32, n.5-6, p.235-249, 2002.

CAPONE, G.T. Down Syndrome: Advances in Molecular Biology and the Neurosciences. **J Dev Behav Pediatr.**, v.22, p.40-59, 2001.

CEDANO, J., ALOY, P., JOSEP, A., PÉREZ-PONS, QUEROL, Q. Relation between aminoacid composition and cellular location of proteins. **J. Mol. Biol.**, v.266, p.594-600, 1997.

DOWN, J. L. H. Observations on an ethnic classification of idiots. **London Hosp. Clin. Lect. Rep.** v.3, p.259, 1866.

EPSTEIN, C. **The Consequences of Chromosome Imbalance:** Principles, Mechanisms and Models. Cambridge University Press, New York, 1986.

EPSTEIN, C., KORENBERG, J., ANNERÉN, G., ANTONARAKIS, S., COURCHESNE, E., EPSTEIN, I., FOWLER, A., GRONER, Y., HURET, J., KEMPER, T., LOTT, I., LUBIN, B., MAGENIS, E., OPITZ, E., PATTERSON, D., PRIEST, J., PUESCHEL, S., RAPOPORT, S., SINET, P.M., TANZI, R and DE LA CRUZ, F. Protocols to Establish Genotype-Phenotype Correlations in Down Syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v.49, p.207-235, 1991.

EPSTEIN, C. J. Down Syndrome (trisomy 21). In **The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease**. C. R. SCRIVER, A.L. BEAUDET, W. S. SLY, D. VALLE, EDS. McGraw-Hill, New York. p.749-794, 1995.

FUENTES, J.J., PRITCHARD, M.A., PLANAS, A.A., BOSCH, A., FERRER, I., ESTIVILL, X. A New Human Gene from the Down Syndrome Critical Region Encodes a Proline-Rich Protein highly expressed in Fetal Brain and Heart. **Human. Mol. Genet.**, v.4, p.1935-1944, 1995.

HATTORI, M., FUJIYAMA, A., TAYLOR, T.D., WATANABE, H., YADA, T., PARK, H.S., TOYODA, A., ISHII, K., TOTOKI, Y., CHOI DK, SOEDA E, OHKI M, TAKAGI T, SAKAKI Y, TAUDIEN S, BLECHSCHMIDT K, POLLEY A, MENZEL U, DELABAR J, KUMPF K, LEHMANN R, PATTERSON D, REICHWALD K, RUMP A, SCHILLHABEL M, SCHUDY A, ZIMMERMANN W, ROSENTHAL A, 76 KUDOH J, SHIBUYA K, KAWASAKI K, ASAKAWA S, SHINTANI A, SASAKI T, NAGAMINE K, MITSUYAMA S, ANTONARAKIS SE, MINOSHIMA S, SHIMIZU N, NORDSIEK G, HORNISCHER K, BRANDT P, SCHARFE M, SCHON O, DESARIO A, REICHELT J, KAUER G, BLOCKER H, RAMSER J, BECK A, KLAGES S, HENNIG S, RIESSELMANN L, DAGAND E, HAAF T, WEHRMEYER S, BORZYM K, GARDINER K, NIZETIC D, FRANCIS F, LEHRACH H, REINHARDT R, YASPO ML. The DNA sequence of human chromosome 21. **Nature.**, v.405, n.6784, p.311-319, 2000.

HILL, D.A., GRIDLEY, G., CNATTINGIUS, S., MELLEMKJAER, L., LINET, M., ADAMI, H.O., OLSEN, J.H., NYREN, O., FRAUMENI, J.F. Mortality and cancer incidence among individuals with Down syndrome. **Arch Intern Med.**, v.163, p.705-711, 2003.

HASLE, H., CLEMMENSEN, I. H., MIKKELSEN, M. Risks of leukemia and solid tumors in individuals with Down's syndrome. **Lancet.**, v.355, p.165-169, 2000.

HOOK, E.B. Down Syndrome rates and relaxed selection at older maternal ages. **Am. J. Hum. Genet.**, v.53, n.6, p.1307-1313, 1983.

JACKSON, M. R., NILSSON, T., PETERSON, P. A. Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. **J. Cell Biol.**, v.121, n.2, p.317-333, 1993.

KORENBERG, J.R., BRADLEY, C. and DISTECHE, C.M. Down syndrome: Molecular Mapping of the Congenital Heart Disease and Duodenal Stenosis. **Am. J. Hum. Genet.**, v.50, p.294-302, 1992.

KORENBERG, J., CHEN, X.N., SCHIPPER, R., SUN, Z., GONSKY, R., GERWEHR, S., CARPENTER, N., DAUMER, C., DIGNAN, P., DISTECHE, C., GRAHAM, J.M.J., HUGDINS, L., MCGILLIVRAY, B., MIYAZAKI, K., OGASAWARA, N., PARK, J.P., PAGON, R., PUESCHEL, S., SACK, G., SAY, B., SCHUFFENAUHER, S., SOUKUP, S. and YAMANAKA, T. The Consequence of Chromosome Imbalance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.4997-5001, 1994.

KOTYK, A., JANÁČEK, K., KORYTA, J. **Biophysical Chemistry of Membrane Functions**. John Wiley and Sons Ltd., 1988.

LAMB, N. E., FEINGOLD, E., SAVAGE-AUSTIN, A., AVRAMOPOULOS, D., FREEMAN, S. L., GU, Y., HALLBERG, HERSEY, J., KARADIMA, PETTAY, D., SAKER, D., SHEN, A, J., TAFT, L., MIKKELSEN, M., PETERSEN, M. B., HASSOLD, T. J., SHERMAN, S. L. Characterization of susceptibly chiasmata configurations that increase the risk of maternal non-disjunction of chromosome 21. **Hum. Mol. Genet.**, v.6, p.1391-1399, 1997.

LEJEUNE, J., TURPIN, R. and GAUTIER, M. Le Mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. **Ann. Génét.**, v.1, p.41-49, 1959.

LODISH, H., BERK, A., ZIPURSKY, S. L., MATSUDAIRA, P., BALTIMORE, D., DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4th Edition. W.H. Freeman and Company. 2000.

LOW, M. G. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins **FASEB J.**, v.3, p.1600-1608, 1989.

MAO, R., ZIELKE, C.L., ZIELKE, H.R., PEVSNER, J. Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing down syndrome brain. **Genomics.**, v.81, n.5, p.457-467, 2003.

NEWTON, T. P., BLACK, J., BUTLER, J., LEE, A. G., CHAD, J. EAST., J. M. Sarco/endoplasmic-reticulum calcium ATPase SERCA1 is maintained in the endoplasmic reticulum by a retrieval signal located between residues 1 and 211. **Biochem. Journal.**, v.371, p.775-782, 2003.

PELHAM, H. R. B. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v.7, p.530-535, 1995.

RAHMANI, Z., BLOUIN, J.L., CRÉAU-GOLDBERG, N., WATKINS, P.C., MATTEI, J.F., POSSONNIER, M., PRIEUR, M, CHETTOUH, Z., NICOLE, A., SINET, P.M. and DELABAR, J.M. Critical Role of the D21S55 Region on Chromosome 21 in the Pathogenesis of Down Syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.86, p.5958-5962, 1989.

ROIZEN, N.J., PATTERSON, D. Down's Syndrome. **Lancet.**, v.361, p.1281-1288, 2003.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Press, N.Y, 2001.

SHERMAN, S. L., TAKAESU, N., FREEMAN, S. B., GRANTHAM, M., PHILIPS, C., BLACKSTON, R. D., JACOBS, P. A., COCKWELL, A. E., FREEMAN, V., UCHIDA, I., *et al.* Trisomy 21: Association between reduced recombination and non-disjunction. **Am. J. Hum. Genet.**, v.49, p.608-620, 1991.

SHERMAN, S. L., PETERSEN, M. B., FREEMAN, S. B., HERSEY, J., PETTAY, D., TAFT., L., FRANTZEN, M., MEKKELSEN, M. and HASSOLD, T. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: Evidence for a maternal age dependent mechanism involving reduced recombination. *Hum. Mol. Genet.*, v.9 p.1529-1535, 1994.

SPECTOR, D. L., GOLDMAN, R. D., LEINWAND, L. A. **Cells: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Press, N.Y, 1997.

TEASDALE, R. D., JACKSON, M. R. Signal-Mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Ann Rev. CellDev. Biol.* v.12, p.27-54, 1996.

VAN VLIET, C., THOMAS, E. C., MERINO-TRIGO, A., TEASDALE, R. D., GLEESON, P. A. Intracellular sorting and transport of proteins. **Prog Biophys Mol Biol.**, v.83, p.1-45, 2003.

VIDAL-TABOADA, J. M., SANS, S., EGEO, A., SCARTEZZINI, P., OLIVA, R. Identification and characterization of a new gene from Human Chromosome 21 between markers D21S343 and D21S268 encoding a leucine-rich protein. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, v.250, p.547-554, 1998.

VIDAL-TABOADA, J. M., LU, A., PIQUE, M., PONS, G., GIL, J., OLIVA, R. Down Syndrome Critical Region Gene 2: Expression during mouse development and in human cell lines indicates a function related to cell proliferation. **Bioch. Bioph. Res. Commun.**, v.272, p.156-163, 2000.

VOGEL, F., MOTULSKY, A. G. **Human Genetics**. Problems and Approaches. 3rd Edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 1997.

YANG, Q., RASMUSSEN, S. A., FRIEDMAN, J. M. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. **Lancet.**, v.359, p.1019-1025, 2002.

YOON, P. W., FREEMAN, S. B., SHERMAN, S. L., TAFT, L. F., GU, Y., PETTAY, D., FLANDERS, W. D., KHOURY, M. J. and HASSOLD, T. J. Advanced maternal age and risk of Down Syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: A population based study. **Am. J. Hum. Genet.**, v.58, p.628-633, 1996.