



Andreia Filipa Bonecas Mósca

Licenciada em Bioquímica

**Caracterização funcional das
aquaporinas-3 e 7 de mamífero por
expressão heteróloga em leveduras**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica Estrutural e Funcional

Orientador: Prof. Doutora Graça Soveral, Professora
Associada com Agregação, Faculdade de
Farmácia da Universidade de Lisboa
Co-orientador: Mestre Ana Paula Cavaco da Silva Martins



Andreia Filipa Bonecas Mósca

Licenciatura em Bioquímica

Caracterização funcional das aquaporinas-3 e 7 de mamífero por expressão heteróloga em leveduras

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica Estrutural e Funcional

Orientador: Prof. Doutora Graça Soveral, Professora
Associada com Agregação, Faculdade de
Farmácia da Universidade de Lisboa
Co-orientador: Mestre Ana Paula Cavaco da Silva Martins

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Outubro de 2013

Caracterização funcional das aquaporinas-3 e 7 de mamífero por expressão heteróloga em leveduras

Os direitos de autor pertencem à Andreia Filipa Bonecas Mósca, à Faculdade de Ciências e Tecnologia e à Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Copyright belongs to Andreia Filipa Bonecas Mósca and Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa has the perpetual and geographically unlimited right of archiving and publishing this thesis through printed or digital copies, or by any other means known or to be invented, and to divulgate its contents through scientific repositories and of admitting its copy and distribution with educational, research, noncommercial goals, as long as its author and editor are properly credited.

Dedicatória e Agradecimentos

Ainda que esta dissertação seja uma prova individual de esforço e dedicação, é também o conjunto de várias contribuições que não podem ser de todo ignoradas. Por essa razão quero expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Professora Doutora Teresa Fonseca de Moura, por me ter cativado desde a licenciatura pela sua forma de ensinar e transmitir conhecimento, o que me conduziu até ao seu laboratório para esta etapa final. E ainda, por me ter ajudado sem qualquer hesitação. Sem a sua ajuda incansável não teria conseguido.

À Professora Doutora Graça Soveral, que sem me conhecer previamente me recebeu de braços abertos no seu laboratório e me fez sentir em casa. Por isso, e também pelo papel fundamental que teve no decurso do meu trabalho experimental, bem como toda a ajuda que me deu ao longo deste tempo.

À Ana Paula Martins, que por ter estado mais próximo de mim nesta etapa, me transmitiu todos os conhecimentos necessários à realização deste trabalho, bem como algumas lições para a Vida. Um muito obrigado pela disponibilidade, paciência e voto de confiança que me deste todos os dias.

À Doutora Catarina Prista, por me ter recebido no seu laboratório no Instituto Superior de Agronomia e por ter estado sempre disponível para tirar imediatamente qualquer tipo de dúvida que surgisse.

Ao Ricardo Franco, que como coordenador do Mestrado em Bioquímica Estrutural e Funcional sempre esclareceu e resolveu prontamente qualquer problema académico.

À Cláudia, companheira de licenciatura e mestrado, pela sua amizade e preocupação ao longo de todos estes anos. O facto de falarmos a mesma linguagem minimizou os problemas que foram surgindo. Fazemos realmente uma parceria de sucesso.

Aos meus sobrinhos, Carolina e Gonçalo, pela (pouca) paciência e compreensão que tiveram durante os dias que passaram cá em casa. Prometo que vos compenso.

Aos meus pais, que sempre quiseram o melhor para mim e, pelos sacrifícios que fizeram, o conseguiram. Agradeço do fundo do coração e espero que estejam orgulhosos por mais esta etapa que consegui ultrapassar.

Por último mas não menos importante, porque a Vida não é só trabalho, dedico estas páginas aos meus amigos que partilham o dia-a-dia comigo: Diogo, Bruno, Carlos, Daniel, Diana, Joana, Marlene, Sérgio e Vicente. Depois dos grandes azares que já vivemos juntos, que esta dissertação seja um motivo de comemoração no próximo fim-de-semana, no sítio do costume.

Índice

Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xiii
Abreviaturas e símbolos	xv
Resumo	xvii
Abstract	xix
I. Introdução	1
1. A água como componente fundamental das células	2
2. Descoberta das aquaporinas – Perspectiva histórica	3
2.1. Identificação de um canal de água - CHIP28	3
3. Aquaporinas e aquagliceroporinas	4
3.1. Estrutura tridimensional	5
3.2. Aquaporinopatias	9
3.2.1. Desenho de moléculas farmacológicas - Drug design	12
4. A levedura <i>S. cerevisiae</i> como modelo celular para expressão de proteínas	13
5. Determinação da permeabilidade membranar e actividade de aquaporinas	13
5.1. Fluxos acoplados de água e soluto - Equações de Kedem Katchalsky	15
5.1.1. Volume osmótico e não osmótico	16
5.1.2. Concentrações intracelulares	17
II. Objectivos	19
III. Materiais e Métodos	21
1 Estirpes e plasmídeos	22
1.1. Meios de cultura, condições de crescimento e manutenção	23
1.2. Armazenamento de material biológico	23
2 Amplificação das sequências codificantes dos genes da AQP3 e AQP7	24
2.1. Preparação de células competentes de <i>E. coli</i> DH5- α	24
2.2. Transformação de células competentes de <i>E. coli</i> com os plasmídeos pcDNA3-AQP3, pWPi-AQP7 e pUG35	24
2.3. Extracção e purificação de DNA plasmídico	25
2.4. Amplificação dos fragmentos por PCR	25
3 Clonagem dos fragmentos amplificados em <i>E. coli</i>	28
3.1. Digestão dos produtos de amplificação e do plasmídeo pUG35	28

3.2. Ligação dos produtos de digestão	29
3.3. Transformação de <i>E. coli</i> com produtos de ligação	29
4 Selecção de colónias de transformantes de <i>E. coli</i> contendo o produto amplificado	30
4.1. Extracção de DNA com fenol-clorofórmio	30
4.2. Extracção de DNA por lise alcalina	30
4.2.1. Digestão com enzimas de restrição	31
4.2.2. PCR de confirmação	31
4.3. Sequenciação automática	32
5. Expressão heteróloga da AQP3 e AQP7 em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
5.1. Transformação de células competentes de <i>S. cerevisiae</i> com os plasmídeos construídos	32
5.2. Detecção da localização celular através de microscopia de fluorescência	33
6 Ensaio funcionais através da técnica de interrupção brusca do fluxo	34
6.1. Aquisição de sinais de fluorescência	36
6.2. Calibração do sinal de fluorescência para volume relativo	37
6.3. Determinação dos coeficientes de permeabilidade P_f e P_s e energias de activação E_a	38
7. Inibição da permeabilidade à água e ao glicerol pelo composto Auphen	38
IV. Resultados e Discussão	41
1 Construção dos plasmídeos recombinantes	42
1.1. Desenho de <i>primers</i>	43
1.2. Optimização das condições e amplificação da sequência codificante da AQP3 e AQP7	46
1.3. Ligação do produto amplificado	47
1.4. Selecção de colónias contendo o produto amplificado	48
2 Expressão heteróloga da AQP3 e AQP7 em <i>S. cerevisiae</i> YSH 1770	52
2.1. Detecção da localização celular utilizando GFP como repórter	53
2.2. Resposta osmótica celular	55
2.2.1. Calibração de F/F_0 em v_{rel}	55
2.2.2. Dependência de v_{rel} nos gradientes de solutos	57
2.3. Estimativa dos coeficientes de permeabilidade e energias de activação	60
2.4. Estudos de inibição com o composto organometálico Auphen	66
V. Conclusões	69
VI. Bibliografia	73
VII. Anexos	79

Índice de Figuras

Figura I.1 – A. Representação esquemática de uma célula eucariótica animal. B. O transporte de água através da membrana plasmática e das membranas intracelulares pode ser feito por difusão simples, co-transporte passivo ou extremamente facilitado pela presença de canais específicos – aquaporinas.	2
Figura I.2 – Estrutura tridimensional de alta resolução (2.2Å) da AQP1 de bovino (bAQP1). (A) Vista lateral e (B) Vista de cima e de baixo, respectivamente. Adaptado de [27].	6
Figura I.3 – O monómero da AQP1 é constituído por seis hélices transmembranares (1-6) conectadas por cinco ansas (A-E). As ansas B e E formam o filtro de selectividade, onde se encontram os motivos NPA (Asn-Pro-Ala). Adaptado de [29].	6
Figura I.4 – Vista detalhada da região do poro da bAQP1 onde se podem encontrar os dois filtros de selectividade. A vermelho encontram-se representados os resíduos hidrofílicos (capazes de estabelecer ligações com as moléculas de água) e a amarelo encontram-se representados os resíduos hidrofóbicos. Adaptado de [27].	7
Figura I.5 – Representação esquemática do mecanismo de transporte de água através da bAQP1. As moléculas de água atravessam o canal por formação e quebra de pontes de hidrogénio com os resíduos de asparagina que pertencem ao motivo NPA. Adaptado de [30].	8
Figura I.6 – Comparação do arranjo tridimensional da região ar/R do canal GlpF de <i>E. coli</i> (a) e da hAQP1 (b). O círculo representa o diâmetro de uma molécula de glicerol. Adaptado de [32].	9
Figura I.7– Observação de múltiplos papilomas em ratinhos selvagem(+/+) mas ratinhos <i>knock-out</i> (-/-) de AQP3 são resistentes ao desenvolvimento de papilomas. Adaptado de [37].	10
Figura I.8 – (A) Hipertrofia dos adipócitos em ratos deficientes (-/-) em AQP7; (B) Fotografias representativas de acumulação de gordura nas gónadas (indicada pelas setas brancas) em ratos deficientes (-/-) em AQP7, às 16 semanas. Adaptado de [40].	11
Figura I.9 – Mecanismo proposto para a hipertrofia dos adipócitos com deficiência em AQP7. Adaptado de [40].	11
Figura I.10 – Estruturas dos compostos de ouro (III) testadas como inibidores da AQP3. Adaptado de [45].	12
Figura I.11 – Gradiente de pressão osmótica criado por um soluto impermeante. A água desloca-se do compartimento <i>out</i> para o compartimento <i>in</i> , devido à existência de um gradiente osmótico provocado pela adição de um soluto impermeante a um dos lados da membrana, até que se atinja o equilíbrio osmótico.	14
Figura I.12 - Gradiente de pressão osmótica criado por um soluto permeante (S). Existe um fluxo simultâneo de água e de soluto, até que se atinja o equilíbrio osmótico.	14
Figura III.1 - Esquema do aparelho de fluxo interrompido utilizado neste trabalho experimental.	35
Figura IV.1– Mapa circular do plasmídeo recombinante, construído a partir do vector pUG35 por clonagem da sequência codificante da aquaporina em questão, em linha com o gene da GFP e sob a regulação do promotor MET25.	42
Figura IV.2 – Sequência de reconhecimento e padrão de corte das enzimas de restrição <i>SpeI</i> e <i>ClaI</i> . O corte destas enzimas resulta na formação de extremidades coesivas.	45

Figura IV.3 – Esquema ilustrativo do desenho dos *primers* específicos para o início e para o final (à excepção do codão stop) de cada sequência alvo para permitir a co-expressão da aquaporina e da yEGFP. 46

Figura IV.4 – Perfil de amplificação por PCR de gradiente de temperaturas da AQP3 (A) e da AQP7 (B). Foram feitos dois gradientes para as temperaturas dos dois ciclos de hibridação. As temperaturas testadas para o Gradiente 1 e Gradiente 2, foram respectivamente, para a AQP3: 1-56 e 65 °C; 2-55,4 e 64,5 °C; 3-54,3 e 63,3 °C; 4-52,3 e 61,4 °C; 5-49,9 e 58,9 °C; 6-48 e 57 °C; 7-46,6 e 55,7 °C; 8-46 e 55 °C; e para a AQP7: 9- 51 e 57 °C; 10- 51,9 e 58 °C; 11- 53,3 e 59,3 °C; 12- 55 e 61 °C; 13- 57,3 e 63,3 °C; 14- 59,1 e 65,1 °C; 15- 60,3 e 66,3 °C; 16- 61 e 67 °C; C- controlo negativo da reacção de PCR; N- marcador NZYDNAladder I da NZYTech. 47

Figura IV.5 – Exemplos dos padrões obtidos na extracção por fenol-clorofórmio dos plasmídeos de algumas das colónias escolhidas da construção pUG35-AQP3 (A) e pUG35-AQP7 (B). pUG- pUG35 vazio. H- marcador λ DNA/*Hind*III. As setas (\uparrow) indicam as colónias seleccionadas para prosseguir. A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 60 min a 80V. 49

Figura IV.6 – Exemplo da amplificação da sequência da AQP7 obtida por PCR, utilizando como DNA molde os plasmídeos seleccionados entre os transformantes que possivelmente contêm o fragmento. H- marcador λ DNA/*Hind*III, N- marcador NZYDNA ladder I, P- pUG35 vazio, PP- pUG35 vazio sujeito também à reacção de amplificação, C- controlo negativo da reacção de PCR. A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 60 min a 80V. 51

Figura IV.7 – Electroforese em gel de agarose do resultado da digestão com *Spe*I e *Cla*I dos plasmídeos extraídos. P- pUG35 vazio, PD- pUG35 vazio sujeito também à reacção de digestão, H- marcador λ DNA/*Hind*III, N- marcador NZYDNA ladder I. A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 60 min a 80V. 52

Figura IV.8 – Exemplo de fotografias obtidas por microscopia de fluorescência (A) e de luz visível (B) de células de *S. cerevisiae* YSH 1770 transformadas com o plasmídeo pUG35 sem inserto. 54

Figura IV.9 - Exemplo de fotografias obtidas por microscopia de fluorescência (A e C) e de luz visível (B e D) de células de *S. cerevisiae* YSH 1770 transformadas com o plasmídeo recombinante pUG35-AQP3 (A) e pUG35-AQP7 (C). 54

Figura IV.10 – A. Sinais de água (●) e glicerol (○) típicos obtidos a 23 °C, quando sujeitos a um choque hiperosmótico ($\Lambda=1.25$) não-tratados e linha de base média (◐) obtida a 23 °C com um choque iso-osmótico $\Lambda=1$, onde é possível observar o efeito de *bleaching*. B. Sinais de água e sinais de glicerol anteriores, depois da subtracção da linha de base. 56

Figura IV.11 – Sinal de fluorescência obtido quando células da estirpe YSH 1770/pUG35-rAQP3 são expostas a um choque osmótico de $\Lambda=1.25$ com a adição de sorbitol, soluto impermeante (A) e com a adição de glicerol, soluto permeante (B) e respectivas calibrações para volume relativo. 57

Figura IV.12 – Variação do volume relativo celular quando se introduz um choque osmótico de tonicidade $\Lambda=1.25$ com adição de soluto impermeante (sorbitol) e simulação da variação do gradiente de pressão osmótica criado por este (A) e simulação da variação da concentração interna de espécies não-difusíveis (B), ao longo do tempo. 58

Figura IV.13–(A) Variação do volume relativo e simulação da variação do gradiente de pressão osmótica criado por este, ao longo do tempo e (B) simulação da variação das concentrações intracelulares das espécies não-difusíveis.	59
Figura IV.14 – Comparação da variação de v_{rel} das três estirpes, quando sujeitas a um choque osmótico com sorbitol ($\Lambda=1.25$) a 23 °C e a pH 7,4.	61
Figura IV.15 – Representação gráfica de Arrhenius dos ensaios de permeabilidade à água para cada estirpe, quando sujeitas a um choque osmótico com sorbitol de tonicidade $\Lambda=1.25$, a pH 7,4. A escala de temperaturas varia de 9 °C (282 K) a 37 °C (310K). As energias de activação (E_a) para cada estirpe foram calculadas a partir dos declives das linhas de tendência.	62
Figura IV.16 – Simulação numérica de um gráfico de Arrhenius em função do número de canais expressos na membrana. As duas linhas sólidas a cinzento e preto representam o comportamento típico da via lipídica e da via facilitada por canais, respectivamente. A linha sólida vermelha representa a soma da contribuição de ambas as vias.	63
Figura IV.17 - Comparação da variação de v_{rel} das três estirpes, quando sujeitas a um choque osmótico com glicerol ($\Lambda=1.25$) a 23 °C e a pH 7,4.	65
Figura IV.18 - Representação gráfica de Arrhenius dos ensaios de permeabilidade ao glicerol para cada estirpe, quando sujeitas a um choque osmótico com glicerol de tonicidade $\Lambda=1,25$ a pH 7,4. A escala de temperaturas varia de 12 °C (285 K) a 36 °C (309 K). As energias de activação (E_a) para cada estirpe foram calculadas a partir dos declives das linhas de tendência.	65
Figura IV.19 – Efeito do Auphen 100 μ M, a 23 °C e a pH 7,4, na permeabilidade à água (A) e na permeabilidade ao glicerol (B) das várias estirpes.	67
Figura VII.1 – Mapa circular do vector de expressão pUG35 e sequência nucleotídica do sítio de clonagem múltipla sob a regulação do promotor MET25. (Guldener & Hegenmann)	80
Figura VII.2 – Alinhamento da sequência codificante da AQP3 de <i>Rattus norvegicus</i> com os resultados da sequenciação do plasmídeo extraído das colónias 3.5 (equivalente 2.2) e e 3.7 (equivalente a 3.2). O múltiplo alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta ClustalW do <i>software</i> BioEdit versão 7.2.0.	86
Figura VII.3 - Alinhamento da sequência codificante da AQP7 de <i>Homo sapiens</i> com os resultados da sequenciação do plasmídeo extraído das colónias 7.7 (equivalente a 4.3) e 7.8 (equivalente a 4.4). O múltiplo alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta ClustalW do <i>software</i> BioEdit versão 7.2.0.	87

Índice de Tabelas

Tabela I.1 – Distribuição nos principais tecidos onde as aquaporinas de mamífero são maioritariamente expressas e sua classificação de acordo com a selectividade. Adaptado de [24].	5
Tabela III.1 - Descrição das estirpes e plasmídeos utilizados neste trabalho.	22
Tabela III.2 - Sequências dos <i>primers</i> desenhados para amplificação da AQP3 e AQP7. A azul encontra-se assinalada a sequência de restrição da enzima <i>SpeI</i> e a verde a sequência de restrição para a enzima <i>ClaI</i> . O conjunto de nucleótidos que se encontra sublinhado corresponde à região do <i>primer</i> que é específico para a sequência codificante da respectiva aquaporina.	25
Tabela III.3 – Intervalo de temperaturas utilizado no Gradiente 1 e Gradiente 2 para a optimização das temperaturas de hibridação. A negrito encontra-se o valor de temperatura médio para cada par de primers e para cada gradiente e a vermelho encontram-se o intervalo de temperaturas adoptado para cada caso.	26
Tabela III.4 - Programa de PCR para optimização das temperaturas de hibridação dos <i>primers</i> desenhados para amplificar a sequência codificante da AQP3 e da AQP7.	27
Tabela III.5 - Mistura reaccional preparada para amplificar a sequência codificante da AQP3 e da AQP7.	27
Tabela III.6 – Composição da reacção de digestão enzimática para preparação da clonagem.	28
Tabela III.7 – Composição da mistura reaccional de ligação entre os fragmentos amplificados por PCR da AQP3 e AQP7 e o pUG35.	29
Tabela III.8 - Mistura reaccional preparada para confirmar a presença do fragmento, com <i>primers</i> específicos do pUG35.	31
Tabela III.9 - Programa de PCR para confirmação da presença de fragmento, com os <i>primers</i> específicos do pUG35.	32
Tabela III.10 – Componentes da mistura de transformação da estirpe <i>S. cerevisiae</i> YSH 1770.	33
Tabela IV.1 – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> específicos desenhados para amplificar as sequências-alvo de cada aquaporina	44
Tabela IV.2 – Sequência nucleotídica completa dos <i>primers</i> utilizados para amplificação das sequências das aquaporinas. Os locais de corte das enzimas de restrição encontram-se sublinhados.	45
Tabela IV.3 – Tamanho dos fragmentos esperados após digestão dos três plasmídeos com as enzimas <i>SpeI</i> e <i>ClaI</i> .	51
Tabela VII.1 – Composição do meio de cultura LB.	80
Tabela VII.2 – Composição do meio de cultura YNB.	81
Tabela VII.3 – Composição do meio de cultura YPD.	81
Tabela VII.4 - Composição do meio de regeneração SOC.	81
Tabela VII.5 - Composição da solução 2x TSS.	81
Tabela VII.6 – Composição das soluções usadas no protocolo de extracção de DNA por lise alcalina.	82
Tabela VII.7 – Composição do tampão H, utilizado na reacção de digestão com as enzimas <i>SpeI</i> e <i>ClaI</i> .	82

Tabela VII.8 – Composição do tampão utilizado na reacção de ligação entre plasmídeo e fragmento.	82
Tabela VII.9 – Composição do tampão ácido cítrico/fosfato dipotássico utilizado na preparação das soluções para os choques osmóticos.	83

Abreviaturas e símbolos

A	Área (cm ²)
ATP	5'-trifosfato de adenosina
[Au(phen)Cl ₂]Cl	Auphen
AQP(s)	Aquaporina(s)
AQP3	Aquaporina-3
AQP7	Aquaporina-7
C	Concentração (mol cm ⁻³)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E _a	Energia de activação (kcal mol ⁻¹)
GFP	Proteína verde fluorescente
GlpF	Canal facilitador de glicerol
J _S	Fluxo molar de soluto (mol s ⁻¹)
J _V	Fluxo de água (cm ³ s ⁻¹)
LB (meio)	Luria-Bertani (meio)
ND	Solutos não-difusíveis
osm _{im}	Osmolaridade interna (mOsm)
osm _{out}	Osmolaridade externa (mOsm)
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
P _f	Coefficiente de permeabilidade à água (cm s ⁻¹)
P _S	Coefficiente de permeabilidade ao soluto (cm s ⁻¹)
Q	Quantidade (mol)
R	Constante dos gases perfeitos (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
S	Soluto permeante
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
T	Temperatura absoluta (K)
T _M	Temperatura de hibridação (°C)
V	Volume celular total (cm ³)
V _{Nosm}	Volume não-osmótico (cm ³)
V _{osm}	Volume osmótico (cm ³)
v _{osm}	Volume osmótico relativo
v _{rel}	Volume celular relativo
V _w	Volume parcial molar da água (cm ³ mol ⁻¹)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
β	Volume não-osmótico relativo
ΔC _S	Gradiente de concentração de soluto (mol cm ⁻³)
ΔΠ	Gradiente de pressão osmótica (J cm ⁻³)
Λ	Tonicidade do choque osmótico

Resumo

As aquaporinas (AQPs) são proteínas intrínsecas de membrana, fisiologicamente importantes, que transportam água (aquaporinas ortodoxas) e também, em alguns casos, outros pequenos solutos como o glicerol (aquagliceroporinas). Em mamíferos, treze aquaporinas (AQP0-AQP12) são conhecidas até à data, sendo diferencialmente expressas em diversas células e tecidos. Recentemente, foram encontradas evidências em ratinhos e posteriormente em humanos obesos, que a deficiência da AQP7 está relacionada com obesidade por causar hipertrofia dos adipócitos. Além desta e de outras patologias associadas às restantes AQPs, verificou-se ainda que a AQP3 facilita a migração e proliferação das células epidérmicas, o que indica um importante papel na carcinogénese cutânea.

Face à diversidade de patologias associadas à disfunção das diferentes aquaporinas, este trabalho pretendeu criar um sistema de expressão heteróloga, na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ideal para caracterizar funcionalmente aquaporinas, em particular a AQP3 e AQP7, bem como testar o efeito de compostos capazes de modular a sua actividade. Para esse efeito, a partir da estirpe de *S. cerevisiae* YSH 1770 foram criadas duas estirpes que sobre-expressam individualmente as aquaporinas de mamífero AQP3 e AQP7. Após a expressão e confirmação da sua localização celular, procedeu-se à caracterização da sua função através da determinação dos coeficientes de permeabilidade à água e ao glicerol e das respectivas energias de activação do transporte, utilizando a técnica de interrupção brusca de fluxo e medindo a variação do volume celular após a aplicação de um gradiente de pressão osmótica com soluto impermeante (sorbitol para permeabilidade à água) ou permeante (glicerol para permeabilidade ao glicerol). O efeito de um inibidor específico para aquagliceroporinas, o Auphen, mostrou um decréscimo do transporte de água e do transporte de glicerol das estirpes transformadas, validando este sistema de expressão heteróloga como modelo celular para o rastreio de compostos moleculares e de mecanismos de regulação de aquaporinas.

Palavras-chave: aquaporina-3, aquaporina-7, expressão heteróloga, *Saccharomyces cerevisiae*, Auphen

Abstract

Aquaporins (AQPs) are intrinsic membrane proteins, physiologically important, that transport water (orthodox aquaporins) and also transport, in some cases, other small solutes such as glycerol (aquaglyceroporins). In mammals, thirteen aquaporins (AQP0 - AQP12) are known, being differentially expressed in diverse cells and tissues. Recently, evidences that AQP7 deficiency is associated with obesity were found in null mice and later in obese humans, who showed adipocytes hypertrophy. In addition to this and other diseases associated with other AQPs, it was found that AQP3 facilitates migration and proliferation of epidermal cells, suggesting an important role in skin carcinogenesis.

Given the diversity of pathologies associated with dysfunction of the different aquaporins, this work aims to create a system for heterologous expression in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) that could serve to functionally characterize aquaporins, and in particular, the AQP3 and AQP7, as well as, to test the effect of compounds that modulate its activity. For that purpose, from the strain *S. cerevisiae* YSH 1770 were created two strains, overexpressing mammalian AQP3 and AQP7 individually. After expression and confirmation of its cellular localization, we proceeded to the functional characterization by determining the water and glycerol permeability coefficients and the respective activation energies of transport, using the stopped-flow technique and measuring the cell volume change after the application of an osmotic pressure gradient with impermeant solute (sorbitol for water permeability) or permeant solute (glycerol for glycerol permeability). The effect of a specific inhibitor for aquaglyceroporins, Auphen, showed a decrease in water and glycerol transport of transformed strains, validating this heterologous expression system as cellular model for screening of molecular compounds and regulation mechanisms of aquaporins.

Keywords: aquaporin-3, aquaporin-7, heterologous expression, *Saccharomyces cerevisiae*, Auphen

I. Introdução

1. A água como componente fundamental das células

A água possui um papel crucial para a vida devido às suas propriedades físicas e químicas únicas. Todos os processos bioquímicos e fisiológicos de um organismo dependem da presença de água, sendo esta o componente fundamental na manutenção da sua homeostase [1].

Nas células eucarióticas, a água encontra-se distribuída pelos vários compartimentos intracelulares separados entre si por membranas intracelulares e do meio extracelular pela membrana plasmática (Figura I.1 A). Todas estas membranas de composição bilipídica são normalmente impermeáveis à maioria dos solutos polares e/ou carregados (cuja passagem é facilitada através de canais membranares específicos) tendo características de selectividade distintas. No entanto estas membranas são permeáveis à água, sendo então propostas três vias de transporte desta: *i)* por difusão simples, através da bicamada lipídica; *ii)* por transporte passivo associado ao transporte de iões e solutos e *iii)* por canais específicos para a água [2].

Actualmente sabe-se que a maioria das células de um organismo possui proteínas específicas – as aquaporinas – que conferem à membrana uma permeabilidade à água de cerca de 5 a 10 vezes superior às membranas que não possuem estas proteínas, onde o transporte de água apenas ocorre por difusão simples através da camada bilipídica e/ou por transporte associado a outros solutos (Figura I.1 B) [3]. As aquaporinas permitem um transporte bidireccional de água rápido, selectivo e regulado, em resposta a gradientes osmóticos [2].

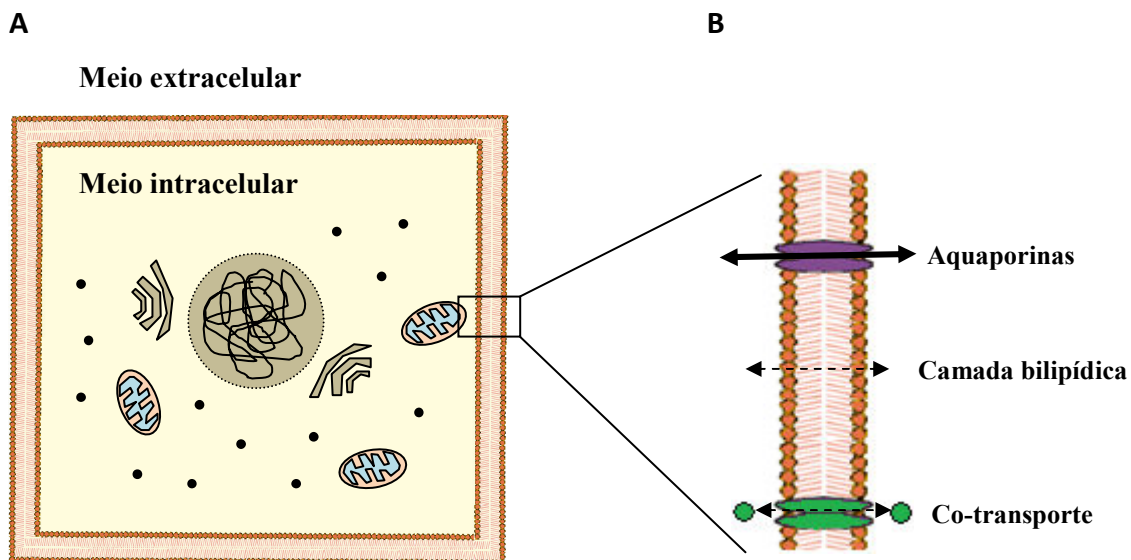


Figura I.1 – A. Representação esquemática de uma célula eucariótica animal. B. O transporte de água através da membrana plasmática e das membranas intracelulares pode ser feito por difusão simples, co-transporte passivo ou extremamente facilitado pela presença de canais específicos – aquaporinas.

2. Descoberta das aquaporinas – Perspectiva histórica

Os primeiros estudos sobre o transporte de água tiveram início na década de 50 quando Solomon verificou que a alta permeabilidade dos eritrócitos à água, quando sujeitos a um gradiente de pressão osmótica, não poderia ser só devida à permeabilidade difusional (através da via lipídica) [4]. Anos mais tarde, em 1970, Robert Macey observou que a energia de activação para o transporte de água através das membranas destas células era baixa e que este era fortemente inibido por reagentes mercúricos, mas que essa inibição era reversível pela acção de agentes redutores [5,6]. Estas observações confirmaram a presença de canais e sugeriram o envolvimento de grupos sulfidrilo (SH) no transporte de água, apesar de nesta altura ainda nenhum canal de água ter sido identificado.

2.1. Identificação de um canal de água - CHIP28

Em 1987, Peter Agre e colegas investigavam a presença do antígeno Rh em membranas de eritrócitos e obtiveram uma banda secundária num gel SDS-PAGE com um peso molecular aproximado de 28 kDa. Inicialmente consideraram ser um produto da degradação do antígeno [7], mas rapidamente chegaram à conclusão que esta proteína para além de ser abundante em eritrócitos também o é em túbulos renais, o que não deixava de ser intrigante [8]. Ainda assim, a sua função biológica continuava desconhecida.

Em 1991 foi confirmada a organização tetramérica da proteína membranar e que, de facto, não está relacionada de todo com o antígeno Rh [9]. Por outro lado, a análise da sua sequência revelou uma forte homologia com a proteína MIP26 da membrana celular do cristalino de bovino descrita em 1984 por Gorin [10], precursora da família de canais membranares MIP (*Major Intrinsic Protein*). Estes resultados sugeriram que esta proteína de 28 kDa pertence a uma família de canais proteicos transmembranares permeáveis a pequenas moléculas [11]. Na altura, esta proteína recebeu o nome de CHIP28 (*CHannel-forming Integral Protein of 28 kDa*).

O ponto de viragem na história da descoberta das aquaporinas teve lugar após a clonagem e expressão da proteína CHIP28 em óocitos de *Xenopus laevis*. Neste sistema, ao introduzir um choque osmótico hipotónico, a expressão da CHIP28 levou a um significativo aumento do volume celular seguido de ruptura dos óocitos, em comparação com óocitos controlo [12]. A proteína CHIP28 foi então identificada como um canal de água e a alta permeabilidade à água dos eritrócitos, até à data inexplicável, foi atribuída à presença destas proteínas na membrana celular. Actualmente a proteína CHIP28 é conhecida por aquaporina-1 (AQP1).

Introdução

Mais tarde, todo o trabalho desenvolvido por Peter Agre e seus colegas na descoberta da AQP1 foi reconhecido com o prémio Nobel da Química em 2003 [13].

3. Aquaporinas e aquagliceroporinas

Imediatamente a seguir à descoberta da AQP1 por Peter Agre, um outro investigador observou que outro membro da família das aquaporinas (AQP3) para além de apresentar permeabilidade à água, também transportava pequenos solutos não carregados como o glicerol e ureia [14]. Esta descoberta criou a classificação actual desta família de proteínas membranares, de acordo com a sua selectividade, em aquaporinas ortodoxas (quando apenas transportam água) e aquagliceroporinas (quando para além de água também transportam outros pequenos solutos). De facto, a lista de substâncias que são capazes de permear as diferentes aquaporinas tem aumentado ao longo do tempo. Recentemente, para além de água e glicerol, foi descrito o transporte também de arsenito [15], amoníaco [16, 17] e peróxido de hidrogénio [18].

As aquaporinas são encontradas em todos os organismos vivos dos vários reinos (*archaea*, *eubacteria*, *fungi*, *plantae* e *animalia*) devido à extrema necessidade da regulação da homeostase celular [19]. O número de aquaporinas expressas varia de organismo para organismo:

- i) Em *Escherichia coli* encontra-se apenas um gene codificante para um canal de água ortodoxo (AQPZ) e um gene codificante para um transportador de glicerol (GlpF) [20, 21];
- ii) Em *Saccharomyces cerevisiae* encontram-se dois genes codificantes para aquaporinas ortodoxas (AQY1 e AQY2) e dois genes geneticamente relacionados com aquagliceroporinas (*Yfl054c* e *Fps1*) [22, 23];
- iii) Em mamíferos são conhecidas, até à data, treze isoformas diferentes desta família (AQP0-AQP12), entre elas aquaporinas ortodoxas e aquagliceroporinas, sendo diferencialmente expressas em diferentes células e tecidos. A Tabela I.1 resume as principais localizações das aquaporinas de mamífero conhecidas.

Tabela I.1 – Distribuição nos principais tecidos onde as aquaporinas de mamífero são maioritariamente expressas e sua classificação de acordo com a selectividade. Adaptado de [24].

Aquaporina	Permeabilidade	Localização
AQP0	H ₂ O	Células fibrosas do cristalino
AQP1	H ₂ O	Túbulos renais, eritrócitos, endotélio, endotélio corneano, epitélio ciliar
AQP2	H ₂ O	Ducto colector renal
AQP3	H ₂ O, glicerol	Ducto colector renal, epiderme, epitélio das vias respiratórias, bexiga
AQP4	H ₂ O	Astroglia no cérebro e espinal medula, ducto colector renal, epitélio glandular, músculo esquelético, estômago, retina
AQP5	H ₂ O	Epitélio glandular, trato gastrointestinal, epitélio corneano
AQP6	H ₂ O, aniões	Células intercalares do tubo colector do rim
AQP7	H ₂ O, glicerol	Tecido adiposo, testículos, túbulo proximal do rim
AQP8	H ₂ O	Fígado, pâncreas, intestino, glândulas salivares, testículos, coração
AQP9	H ₂ O, pequenos solutos	Fígado, leucócitos, testículos, cérebro
AQP10	H ₂ O, glicerol	Intestino delgado
AQP11	?	Rim, fígado
AQP12	?	Células acinarespancreáticas

Devido à grande diversidade de tecidos onde são encontradas as aquaporinas, o papel de facilitar o transporte de água e/ou solutos através das membranas plasmáticas é então importante em vários processos fisiológicos, tais como: secreção de fluído glandular, mecanismo de concentração urinária, excitabilidade neuronal, metabolismo dos lípidos, hidratação epidérmica, balanço de água no cérebro entre outros [25].

3.1. Estrutura tridimensional

Com a descoberta da AQP1 em 1992 começaram a surgir as primeiras questões sobre a sua estrutura, como por exemplo, quais as propriedades do poro e que tipo de aminoácidos determinam a selectividade para a água e para outros solutos. Em 2001, foi determinada uma estrutura tridimensional da AQP1 (*Bos taurus*) refinada de alta resolução a 2.2 Å que permitiu obter respostas para estas questões [26].

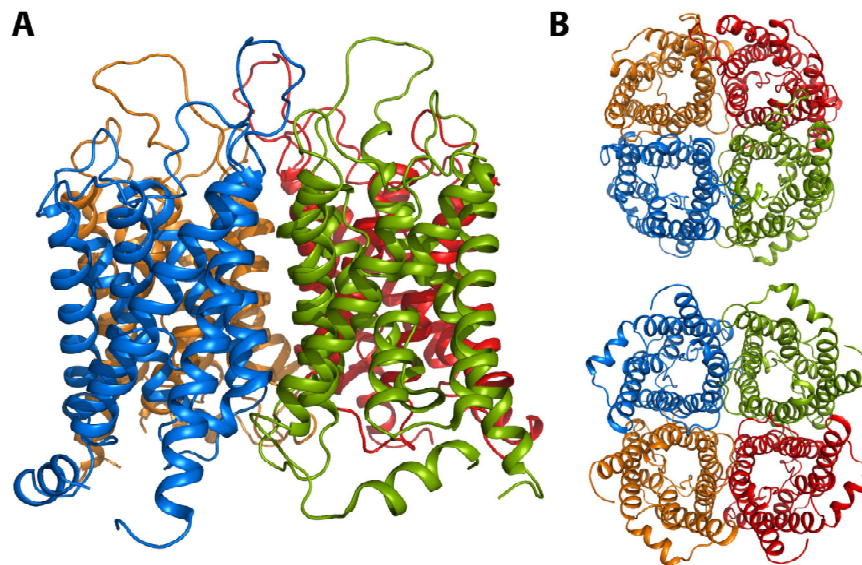


Figura I.2 – Estrutura tridimensional de alta resolução (2.2Å) da AQP1 de bovino (bAQP1). (A) Vista lateral e (B) Vista de cima e de baixo, respectivamente. Adaptado de [27].

Na Figura I.2 é possível observar a unidade funcional da bAQP1. É constituída por quatro monómeros em que cada um deles possui um poro responsável pelo transporte de água, ou seja, no total, uma aquaporina funcional possui quatro poros independentes. Curiosamente, o poro central do homotetrâmero, formado pela junção dos quatro monómeros, não transporta moléculas de água mas tem sido relacionado com o transporte de gases como o óxido nítrico e moléculas de oxigénio na AQP4 [28].

Cada um dos monómeros destas proteínas é constituído por seis hélices- α transmembranares conectadas por 5 ansas que se re-arranjam tridimensionalmente para formar o poro por onde as moléculas de água são transportadas (Figura I.3). As ansas B e E contêm uma zona altamente conservada de três aminoácidos, conhecida por motivo NPA (Asparagina-Prolina-Alanina) que se acredita ser a chave para a selectividade destas proteínas.

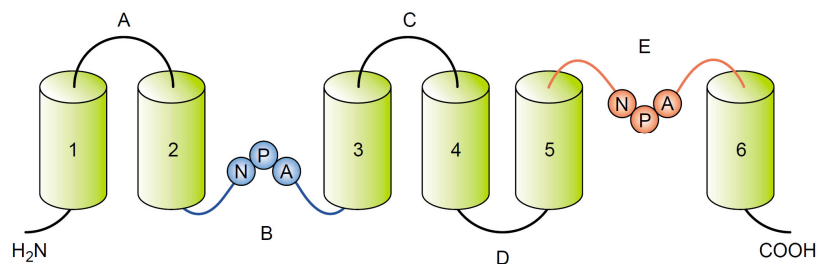


Figura I.3 – O monómero da AQP1 é constituído por seis hélices transmembranares (1-6) conectadas por cinco ansas (A-E). As ansas B e E formam o filtro de selectividade, onde se encontram os motivos NPA (Asn-Pro-Ala). Adaptado de [29].

Cada monómero, para além do motivo NPA (também conhecido como filtro de exclusão de cargas) possui ainda outro filtro de selectividade responsável pela exclusão através do tamanho (ar/R), na região central do poro (Figura I.4) [26, 27].

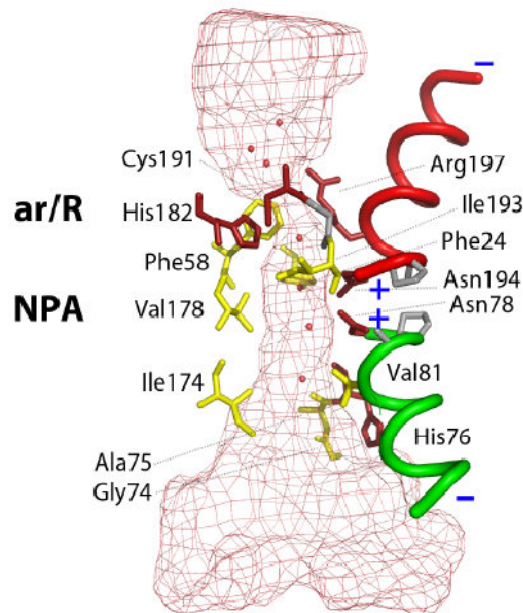


Figura I.4 – Vista detalhada da região do poro da baQP1 onde se podem encontrar os dois filtros de selectividade. A vermelho encontram-se representados os resíduos hidrofílicos (capazes de estabelecer ligações com as moléculas de água) e a amarelo encontram-se representados os resíduos hidrofóbicos. Adaptado de [27].

FILTRO DE EXCLUSÃO DE CARGAS – MOTIVO NPA

Na Figura I.4 podemos observar com mais detalhe a constituição interna do poro da baQP1, em particular a posição chave do motivo NPA. As duas meias hélices formadas pelas ansas B e E têm características especiais de dipolo, com os polos positivos direccionados para o interior do canal. O campo electrostático resultante obriga à reorientação dos dipolos das moléculas de água, de modo a que o átomo de oxigénio destas se aproxime dos grupos amido dos resíduos de asparagina das sequências NPA. A zona de potencial electrostático positivo favorece a formação de pontes de hidrogénio, em oposição às hélices que se encontram do lado oposto do poro que são constituídas por resíduos hidrofóbicos, que são pouco favoráveis para a interacção com as moléculas de água [27].

A zona de potencial electrostático positivo permite que as moléculas de água, à entrada no canal, quebrem as ligações de hidrogénio que estabelecem entre si e formem primeiro uma e depois duas ligações novas com as cadeias laterais das asparaginas. Esta zona é assim responsável pela correcta orientação das moléculas de água através das paredes do canal,

Introdução

garantindo uma corrente de moléculas de água através do poro (Figura I.5), o que elimina a possibilidade do transporte de prótons. Esta exclusão é determinante para a manutenção do potencial de membrana [27, 30].

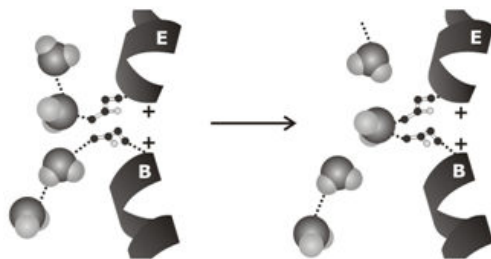


Figura I.5 – Representação esquemática do mecanismo de transporte de água através da bAQP1. As moléculas de água atravessam o canal por formação e quebra de pontes de hidrogênio com os resíduos de asparagina que pertencem ao motivo NPA. Adaptado de[30].

FILTRO DE EXCLUSÃO DE TAMANHO (AR/R)

Este filtro é constituído fundamentalmente por resíduos aromáticos e argininas e forma a região mais estreita do poro (Figura I.4). A existência de aquaporinas que conseguem transportar diferentes moléculas, como o glicerol (aquagliceroporinas) está directamente relacionada com as diferenças estruturais do filtro ar/R.

A comparação da estrutura tridimensional da AQP1 (selectiva para a água) com a estrutura homóloga do canal de glicerol GlpF de *E. coli*, determinada em 2000 [31] demonstra que a constituição dos seus filtros de selectividade é, de facto, diferente. Na Figura I.6 está representada a comparação do filtro ar/R numa aquaporina ortodoxa (hAQP1) e no canal de glicerol de *E. coli* (GlpF), onde as diferenças estereoquímicas das cadeias laterais dos aminoácidos determinam o tamanho daquela região. Em aquaporinas ortodoxas o diâmetro deste local (cerca de 2.8Å) é determinado pelos quatro resíduos que o constituem: Phe56, His180, Cis189 e Arg195 (na hAQP1) enquanto que no canal GlpF de *E. coli*, e naturalmente nas restantes aquagliceroporinas, o diâmetro é necessariamente maior e o seu ambiente menos polar para conseguir acomodar uma molécula de glicerol (3.4 Å) [32].

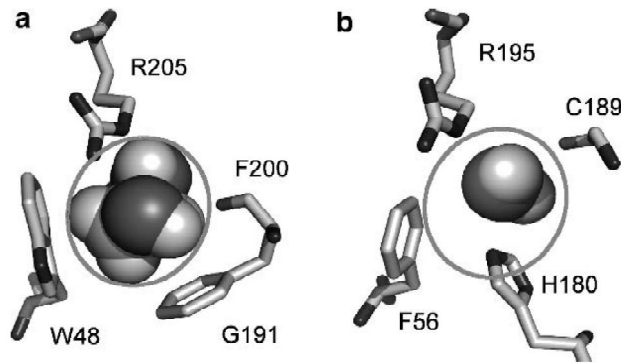


Figura I.6 – Comparação do arranjo tridimensional da região ar/R do canal GlpF de *E. coli* (a) e da hAQP1 (b). O círculo representa o diâmetro de uma molécula de glicerol. Adaptado de [32].

3.2. Aquaporinopatias

A observação do fenótipo de ratinhos geneticamente modificados com *knock-out* de determinadas aquaporinas revelou funções fisiológicas muito importantes no aparecimento e desenvolvimento de várias patologias, como epilepsia, edema cerebral, glaucoma, cancro e obesidade [33]. No contexto deste trabalho, apenas são relevantes as patologias que recentemente têm sido relacionadas com AQP3 e AQP7.

AQUAGLICEROPORINA-3

Tem sido reportado que a AQP3 é expressa em células epiteliais do rim, vias respiratórias e pele [24]. O papel da AQP3 na reabsorção de água e hidratação da pele tem sido amplamente discutido [34] após ter sido observado que a expressão da AQP3 em ratinhos favorece a hidratação e elasticidade da pele, bem como a cicatrização de feridas [35].

No entanto, estudos recentes observaram uma expressão aumentada da AQP3 em diferentes tumores malignos, sobretudo em tumores agressivos [36]. Posteriormente, verificou-se que ratinhos *knock-out* de AQP3 eram resistentes à formação e desenvolvimento de tumor epidermal (Figura I.7) e concluíram que o transporte de glicerol através da AQP3 é necessário para manter os níveis de glicerol intracelulares elevados para a produção de ATP. A elevada produção de ATP facilita o crescimento, proliferação e sobrevivência das células tumorais, e assim, em ratinhos *knock-out* cujo conteúdo celular de glicerol está diminuído, a biossíntese de ATP é inibida [37].

Introdução

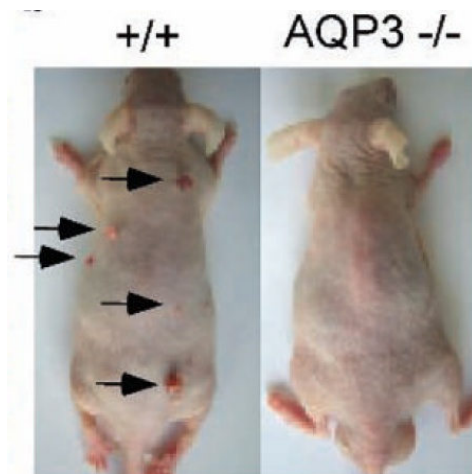


Figura I.7– Observação de múltiplos papilomas em ratinhos selvagem(+/-) mas ratinhos *knock-out*(-/-) de AQP3 são resistentes ao desenvolvimento de papilomas. Adaptado de [37].

AQUAGLICEROPORINA-7

Em relação à AQP7, a sua principal localização é no tecido adiposo (Tabela I.1) onde a sua expressão é regulada pela insulina e se pensa ser responsável pelo efluxo de glicerol em situações de hipoglicémia [38]. O glicerol resultante da lipólise intracelular do tecido adiposo, é permeado pela AQP7 existente na membrana adipocitária e levado pela corrente sanguínea até ao fígado, onde é captado pela AQP9 e utilizado na síntese hepática de glucose – mecanismo da gluconeogénese [39].

Este mecanismo de regulação do conteúdo de triglicéridos dos adipócitos foi revelado pela observação do fenótipo de ratinhos *knock-out* em AQP7. Hara-Chikuma e colaboradores verificaram uma progressiva hipertrofia dos adipócitos e acumulação de gordura corporal em ratinhos *knock-out* em AQP7 [40]. Nas primeiras semanas de crescimento todos os ratinhos apresentavam um peso corporal semelhante, embora fosse notório uma diferença de comprimento nos ratinhos *knock-out*. Às 16 semanas, a análise microscópica das gónadas revelou a hipertrofia dos adipócitos em comparação com ratinhos selvagem (Figura I.8 A), o que se traduz numa visível acumulação de gordura corporal (Figura I.8 B) em ratos deficientes nesta aquagliceroporina.

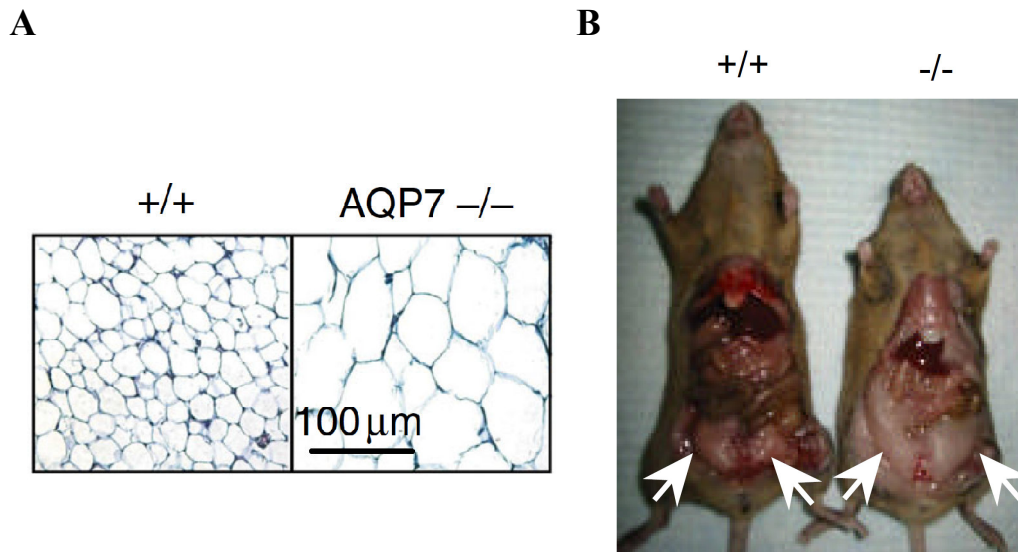


Figura I.8 – (A) Hipertrofia dos adipócitos em ratos deficientes (-/-) em AQP7; (B) Fotografias representativas de acumulação de gordura nas gónadas (indicada pelas setas brancas) em ratos deficientes (-/-) em AQP7, às 16 semanas. Adaptado de [40].

Foi então proposto que as elevadas concentrações intracelulares observadas de glicerol e triglicéridos, estão relacionadas com a drástica diminuição da permeabilidade da membrana plasmática dos adipócitos ao glicerol, em ratos deficientes em AQP7. Nos adipócitos, a hidrólise dos triglicéridos resulta em ácidos gordos livres e em glicerol. Devido à inexistência de efluxo de glicerol para fora das células, o glicerol acumula-se intracelularmente e promove a actividade da enzima glicerol cinase que por sua vez, provoca também a acumulação de triglicéridos [40]. Com a acumulação destas substâncias dentro da célula, os adipócitos aumentam de tamanho progressivamente como proposto no mecanismo da Figura I.9.

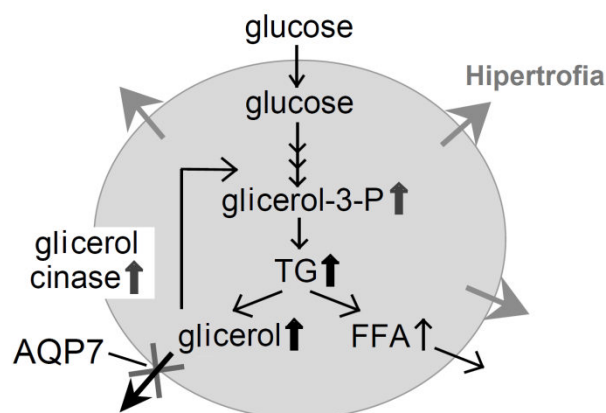


Figura I.9 – Mecanismo proposto para a hipertrofia dos adipócitos com deficiência em AQP7. Adaptado de [40].

Introdução

Mais tarde, estes resultados foram confirmados em humanos. Verificou-se que existem diferenças de expressão do gene da AQP7 no tecido adiposo de humanos obesos e humanos magros. Em humanos obesos, o gene encontra-se silenciado o que pode implicar a redução da libertação de glicerol dos adipócitos promovendo assim o ganho de peso corporal [41].

3.2.1. Desenho de moléculas farmacológicas - *Drug design*

A descoberta de moléculas inibidoras ou moduladoras da função/expressão das aquaporinas, pode ser usada para benefício clínico na prevenção ou tratamento das várias patologias associadas [42]. De facto, vários esforços têm vindo a ser feitos com o intuito de desenvolver possíveis fármacos para tratamento das aquaporinopatias [43], mas até agora nenhum composto se revelou qualificado para estudos *in vivo*, quer pela sua fraca solubilidade quer pela sua baixa capacidade de inibição.

Muito recentemente, o nosso grupo de investigação seleccionou vários compostos metálicos (Pt(II), Ru(III), Ag(I) e Au(III)), já conhecidos pelas suas aplicações terapêuticas e estudou o seu efeito inibitório no transporte de água e glicerol em eritrócitos humanos, células que expressam AQP1 (aquaporina ortodoxa) e AQP3 (aquagliceroporina). Dentro dos vários compostos, apenas o composto de ouro solúvel em água Auphen ($[\text{Au}(\text{phen})\text{Cl}_2]\text{Cl}$ onde phen=1,10-fenantrolina) demonstrou ter um efeito inibitório eficiente. Observou-se que o Auphen não afectou significativamente o transporte de água através das aquaporinas mas originou uma elevada inibição do transporte de glicerol, o que o torna um potente e selectivo inibidor da AQP3. Ao contrário de outros, o Auphen demonstrou não ser tóxico para as células [44].

Com este resultado promissor, para além do Auphen, foram seleccionados outros compostos de ouro (Figura I.10) para serem testados como possíveis inibidores. Os resultados obtidos confirmaram os anteriores, demonstrando que todos os compostos baseados em Au(III) são bastante efectivos em inibir o transporte de glicerol através da AQP3 [45].

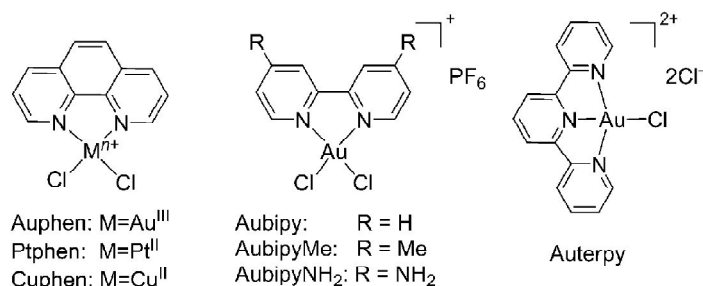


Figura I.10 – Estruturas dos compostos de ouro (III) testadas como inibidores da AQP3. Adaptado de [45].

4. A levedura *S. cerevisiae* como modelo celular para expressão de proteínas

Em 1981, a expressão de um gene humano em *S. cerevisiae*, demonstrou pela primeira vez o seu grande potencial como sistema de expressão [46]. Desde essa altura, muitas outras proteínas têm sido expressas em *S. cerevisiae* para caracterização funcional e estrutural [47].

A levedura *S. cerevisiae* é considerada um valioso sistema de expressão heteróloga para inúmeros estudos, devido à elevada homologia funcional entre esta e os eucariontes superiores (incluindo mamíferos). Pelo facto de existir uma grande biblioteca de estirpes disponíveis, ser de fácil manipulação genética e ser pouco dispendioso em comparação com as culturas de células animais, o sistema de expressão heteróloga em *S. cerevisiae* é considerado um modelo celular excelente para o estudo de proteínas em geral. No caso particular de proteínas membranares, vários transportadores foram já expressos com sucesso em *S. cerevisiae*, por exemplo, transportadores de glucose [48] e um canal de Ca^{2+} dependente da voltagem [49].

Para além dos transportadores já mencionados, o modelo celular de *S. cerevisiae* tem sido também referido como um sistema apropriado para expressão heteróloga de aquaporinas, devido à baixa permeabilidade à água da sua membrana plasmática [50]. A actividade de aquaporinas heterólogas inseridas na membrana de estirpes silenciadas nas suas aquaporinas endógenas, pode ser detectada e caracterizada por espectroscopia de *stopped-flow*. Ainda, as células de levedura podem ser mantidas numa variedade de condições externas e a sua composição intracelular pode ser controlada, criando condições óptimas para estudar a especificidade e regulação das aquaporinas. A utilização da metodologia de auto-extinção da fluorescência para aceder ao transporte de água em células intactas (sem a necessidade de remoção da parede celular), anteriormente desenvolvida pelo nosso grupo [51] representa um valor acrescentado para o estudo de aquaporinas de mamífero expressas em levedura. Esta metodologia abre novas perspectivas para determinar a permeabilidade à água em células não alteradas fisiologicamente, o que as torna estáveis durante tempos longos de experiência.

5. Determinação da permeabilidade membrana e actividade de aquaporinas

Uma importante função da membrana celular é ser uma barreira selectiva entre o meio intracelular e o meio extracelular. As aquaporinas aumentam a permeabilidade à água e, por seu lado, as aquagliceroporinas aumentam a permeabilidade da membrana à água e ao glicerol. Para se avaliar estas permeabilidades e verificar a presença destes canais pode estudar-se a resposta

Introdução

osmótica das células face à introdução de um gradiente de pressão osmótica ($\Delta\Pi$). Este gradiente pode ser aplicado instantaneamente variando a concentração do meio extracelular.

De uma forma geral, se tivermos dois compartimentos em equilíbrio osmótico separados por uma membrana e adicionarmos um soluto impermeante (não difusível, ND) a um dos compartimentos, estabelece-se um gradiente de pressão osmótica entre o lado *in* e *out*, que irá fazer com que a água se mova espontaneamente do lado com menor pressão osmótica para o lado com maior pressão até ser atingido o novo equilíbrio osmótico. É assim a diferença da concentração de soluto impermeante que origina a força motriz que cria o fluxo de água (Figura I.11).

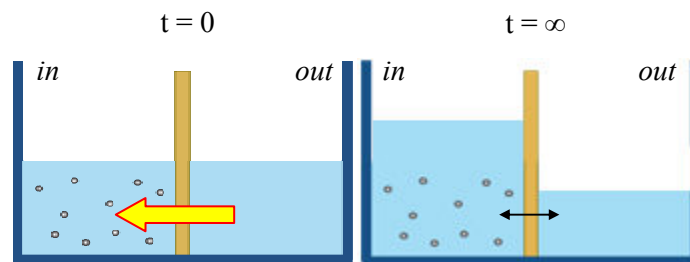


Figura I.11 – Gradiente de pressão osmótica criado por um soluto impermeante. A água desloca-se do compartimento *out* para o compartimento *in*, devido à existência de um gradiente osmótico provocado pela adição de um soluto impermeante a um dos lados da membrana, até que se atinja o equilíbrio osmótico.

Se por outro lado, o gradiente osmótico for criado devido à adição de um soluto permeante (S) então existirá um fluxo simultâneo de *i*) água devido ao gradiente osmótico (água, $\Delta\Pi_S$) e de *ii*) soluto devido ao respectivo gradiente de concentração de soluto (soluto, ΔC_S), até que se atinja um novo equilíbrio osmótico (Figura I.12).

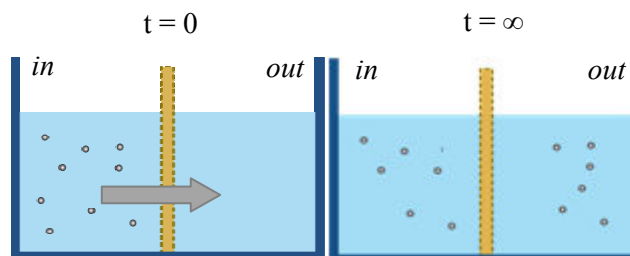


Figura I.12 - Gradiente de pressão osmótica criado por um soluto permeante (S). Existe um fluxo simultâneo de água e de soluto, até que se atinja o equilíbrio osmótico.

As variações de pressão osmótica relativas à adição de um soluto impermeante (ND) e de um soluto permeante (S) são respectivamente:

$$\Delta\Pi_{ND} = RT\Delta C_{ND} = RT(C_{ND_{in}} - C_{ND_{out}}) \text{ (J cm}^{-3}\text{)} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$\Delta\Pi_S = RT\Delta C_S = RT(C_{S_{in}} - C_{S_{out}}) \text{ (J cm}^{-3}\text{)} \quad \text{(Equação 2)}$$

Em cada um dos casos verifica-se que, quanto maior a diferença de concentrações, maior é o fluxo de água e de soluto que se observa. De uma forma genérica, assume-se então que um fluxo (J) através da membrana é directamente proporcional à força que sobre ele actua:

$$J = Px_{gradiente} \quad \text{(Equação 3)}$$

À constante de proporcionalidade P, entre o fluxo e o gradiente, chama-se coeficiente de permeabilidade. Quando consideramos o fluxo de água, este coeficiente é denominado por P_f e quando consideramos o fluxo de soluto, é denominado por P_s . Estes coeficientes são uma característica intrínseca de cada membrana.

5.1. Fluxos acoplados de água e soluto - Equações de Kedem Katchalsky

De forma análoga ao exemplo anterior, as células vivas encontram-se sempre em equilíbrio osmótico ($\Delta\Pi = 0$) imediatamente antes e após uma perturbação da osmolaridade¹ do meio ambiente. O transporte de água é muitas vezes assumido como sendo muito mais rápido que o transporte de solutos e, por isso, a maioria dos solutos são considerados impermeantes dentro da escala de tempo dos estudos de permeabilidade osmótica. Neste caso, uma variação da concentração de soluto no meio extracelular provocará um fluxo de água (J_v) através da membrana celular até ser atingido um novo equilíbrio osmótico. Se por outro lado, forem observados fluxos de solutos (J_s) na mesma escala de tempo em que ocorrem os fluxos de água, os solutos são considerados permeantes e observam-se fluxos de água e de soluto. Em qualquer um dos casos, os fluxos de água provocam uma variação de volume celular (dV/dt) ao longo do tempo. Considerando que o volume extracelular é muito superior ao volume intracelular, qualquer fluxo de água só irá alterar o volume da célula mantendo-se constante o volume e a osmolaridade externa (osm_{out}).

¹ Osmolaridade – número de partículas dissolvidas num solvente

Introdução

As equações simplificadas de Kedem Katchalsky foram desenvolvidas para relacionar os dois fluxos simultâneos (de água e de soluto) desde o instante em que é introduzida a perturbação no sistema, até que se atinja o novo equilíbrio osmótico:

$$\frac{in \rightarrow out}{J_v} = P_f \frac{V_w A}{RT} (-\Delta\Pi_s - \Delta\Pi_{ND}) \text{ (cm}^3\text{s}^{-1}) \quad \text{(Equação 4)}$$

$$\frac{in \rightarrow out}{J_s} = P_s A \Delta C_s = P_s A (\Delta C_s) \text{ (mol s}^{-1}) \quad \text{(Equação 5)}$$

Nestas equações J_v representa o volume total de solução (água mais soluto) que atravessa uma unidade de área por unidade de tempo, J_s representa o fluxo molar do soluto S, V_w corresponde ao volume parcial molar da água ($18 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$), $\Delta\Pi$ corresponde ao gradiente de pressão osmótica, R é a constante dos gases perfeitos ($8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T é a temperatura absoluta (Kelvin) e A corresponde à área total da membrana (cm^2). Nestas equações simplificadas não estão considerados os fluxos convectivos de arrastamento de soluto.

Como já foi dito anteriormente, o fluxo de água, quer seja de entrada ou de saída, vai provocar uma variação do volume celular (V) da célula ao longo do tempo até que a célula consiga atingir um novo equilíbrio osmótico:

$$\frac{in \rightarrow out}{J_v} = -\frac{dV}{dt} \text{ (cm}^3\text{s}^{-1}) \quad \text{(Equação 6)}$$

Se definirmos a variável adimensional v_{rel} ($v_{rel} = V/V_0$), que corresponde ao volume da célula relativo ao seu valor inicial, é possível determinar a variação de volume relativa:

$$\frac{dv_{rel}}{dt} = -\frac{J_v}{V_0} \text{ (s}^{-1}) \quad \text{(Equação 7)}$$

Substituindo a equação de J_v (Equação 4) nesta última equação, obtêm-se:

$$\frac{dv_{rel}}{dt} = -P_f \frac{V_w A}{RT V_0} (-\Delta\Pi_s - \Delta\Pi_{ND}) \quad \text{(Equação 8)}$$

5.1.1. Volume osmótico e não osmótico

No entanto, as células possuem limitações morfológicas e estruturais que condicionam o volume mínimo e máximo de água que pode ser trocado com o meio exterior. As células têm

um volume não osmótico (V_{Nosm}) devido a diferentes factores, tais como, à presença de diversos organitos não compressíveis e à solubilização das várias espécies não difusíveis intracelulares. Desta forma, o volume osmótico efectivo da célula (V_{osm}) é inferior ao volume total:

$$V = V_{osm} + V_{Nosm} \text{ (cm}^3\text{)} \quad \text{(Equação 9)}$$

Assim sendo, podemos definir as variáveis adimensionais v_{osm} e β , como o volume osmótico relativo e o volume não-osmótico relativo, respectivamente:

$$v_{osm} = \frac{V_{osm}}{V_0} \quad \text{(Equação 10)}$$

$$\beta = \frac{V_{Nosm}}{V_0} \quad \text{(Equação 11)}$$

A equação 9, pode ser então reescrita em termos de volumes relativos

$$v_{rel} = v_{osm} + \beta \Leftrightarrow v_{osm} = v_{rel} - \beta \quad \text{(Equação 12)}$$

5.1.2. Concentrações intracelulares

Como foi dito anteriormente, os fluxos de água e de soluto vão fazer variar o volume celular osmótico. Esta variação de volume vai, por consequência, afectar as concentrações intracelulares dos solutos.

No caso do soluto permeante, a sua quantidade intracelular (Q_{Sin}) vai variar ao longo de toda a perturbação devido ao seu fluxo de entrada:

$$\frac{dQ_{sin}}{dt} = -J_s \text{ (mol s}^{-1}\text{)} \quad \text{(Equação 13)}$$

E a variação da sua concentração (C_{Sin}) é então calculada a partir da sua quantidade intracelular a cada instante e do volume osmótico:

$$C_{sin} = \frac{Q_{sin}}{(V - V_{Nosm})} \text{ (mol cm}^{-3}\text{)} \quad \text{(Equação 14)}$$

Por outro lado, a quantidade total de solutos impermeantes intracelulares (Q_{NDin}) permanece constante porque estes estão impedidos de atravessar a membrana e Q_{NDin} pode ser calculada a partir da sua concentração no instante inicial (antes da perturbação, $(C_{NDin})_0$):

$$Q_{NDin} = (V_0 - V_{Nosm})(C_{NDin})_0 \text{ (mol)} \quad \text{(Equação 15)}$$

Introdução

Por sua vez, a variação da sua concentração intracelular é calculada a partir da sua quantidade inicial e do volume osmótico:

$$C_{NDin} = \frac{Q_{NDin}}{(V - V_{Nosm})} \text{ (mol cm}^{-3}\text{)} \quad \text{(Equação 16)}$$

II. Objetivos

Objectivos

No trabalho desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo foi detectado o forte potencial inibitório de um composto organometálico de Au(III) no transporte de glicerol da AQP3 (Martins, et al., 2012). No entanto, nesse trabalho os estudos foram realizados em eritrócitos, que se sabe serem células que co-expressam AQP1 e AQP3, e em células animais, que co-expressam sempre várias aquaporinas. Desta forma, é necessário desenvolver um modelo experimental que permita avaliar de forma individual a função das aquaporinas e validar o efeito inibitório observado anteriormente.

Tirando partido do facto de já existirem no nosso laboratório estirpes de *S. cerevisiae* silenciadas nos genes de aquaporinas endógenas, este modelo de expressão heteróloga é aliciente para expressar as várias isoformas de aquaporinas de mamífero, caracterizar a sua actividade e rastrear a actividade biológica de moléculas que possam modular a sua função.

Para isso, a capacidade da levedura *S. cerevisiae* como sistema de expressão heteróloga é explorada, utilizando-se uma estirpe silenciada nas suas aquaporinas endógenas, para expressar as aquaporinas de mamífero AQP3 e AQP7. Após a expressão e confirmação da sua localização na membrana plasmática da levedura, este sistema será utilizado para caracterizar individualmente a actividade da AQP3 e da AQP7 através da determinação da permeabilidade à água e ao glicerol e respectivas energias de activação para cada isoforma. Em seguida, a actividade será confirmada pela utilização do inibidor descrito anteriormente como específico para aquagliceroporinas (Auphen), validando assim o sistema celular de expressão heteróloga e tornando-o viável para rastreio de outros compostos moleculares com potencial acção farmacológica.

III. Materiais e Métodos

1 Estirpes e plasmídeos

Todas as estirpes e plasmídeos utilizados ao longo deste trabalho encontram-se listados e descritos na Tabela III.1.

As sequências codificantes dos genes *AQP7* (*Homo sapiens*) e *AQP3* (*Rattus norvegicus*) foram amplificadas, respectivamente, a partir dos plasmídeos pWPi-AQP7 (construído pelo nosso grupo de trabalho em parceria com o grupo do Professor Antonio Zorzano, do Instituto de Biomedicina de Barcelona – IRB Barcelona) e pcDNA3-AQP3 (fornecido pelo Instituto de Biomedicina de Sevilla - IBiS). Os produtos de amplificação foram clonados no vector pUG35, construindo dessa forma os plasmídeos recombinantes pUG35-AQP7 e pUG35-AQP3. Os plasmídeos construídos desta forma foram utilizados para transformar a estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* YSH 1770 onde foram realizados os estudos funcionais. No Anexo 1 encontra-se representado o mapa circular do plasmídeo pUG35, para informações adicionais.

Tabela III.1 - Descrição das estirpes e plasmídeos utilizados neste trabalho.

Estirpes/plasmídeos	Genótipo/características relevantes	Origem/referência
<u>Estirpes de <i>E. coli</i></u>		
DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK-mK+), λ -	Stratagene
<u>Estirpes de <i>S. cerevisiae</i></u>		
YSH 1770	Duplo mutante <i>aqy1 aqy2</i> (MAT α leu2::hisG trp1::hisG his3::hisG ura352 aqy1D::KanMX aqy2D::KanMX)	Stefan Hohmann
YSH 1770/pUG35	YSH 1770 transformada com pUG35	Este trabalho
YSH 1770/pUG35-AQP3	YSH 1770 transformada com pUG35-AQP3	Este trabalho
YSH 1770/pUG35-AQP7	YSH 1770 transformada com pUG35-AQP7	Este trabalho
<u>Plasmídeos</u>		
pcDNA3-AQP3	Sequência codificante <i>Rattus norvegicus AQP3</i>	IBiS - Espanha
pWPi-AQP7	Sequência codificante <i>Homo sapiens AQP7</i>	IRB - Espanha
pUG35	Vector <i>shuttle S. cerevisiae-E. coli</i> , Amp ^r , <i>URA3</i>	Niedenthal <i>et al.</i> , (1996)
pUG35-AQP3	Gene <i>Rattus norvegicus AQP3</i> clonado no pUG35	Este trabalho
pUG35-AQP7	Gene <i>Homo sapiens AQP7</i> clonado no pUG35	Este trabalho

1.1. Meios de cultura, condições de crescimento e manutenção

A composição dos meios de cultura utilizados no crescimento celular encontra-se descrita no Anexo 2. Uma vez preparados e antes da sua utilização, os meios são esterilizados num autoclave (Selecta) durante 20 min a 121°C e 1 atm.

Para o crescimento, transformação e manutenção de *E. coli* foi utilizado o meio LB, ao qual se adicionou ampicilina (100µg/mL concentração final) como marca de selecção sempre que necessário. Quando necessário, foi também preparado meio sólido adicionando 2% (p/v) de agar comercial ao meio líquido para preparação de placas. As culturas celulares de *E. coli* foram incubadas a 37 °C com agitação suave durante a noite. O crescimento celular foi avaliado através da determinação da densidade óptica a 600 nm recorrendo a um espectrofotómetro Ultrospec 2100 Pro.

No caso da estirpe de *S. cerevisiae* YSH 1770, esta foi mantida em tubos de meio inclinado de YNB com 2% (p/v) de glucose e 2% (p/v) de agar, suplementado com as concentrações necessárias de uracilo, histidina, leucina e triptofano, e cultivada a 28 °C. Para os transformantes de *S. cerevisiae* YSH 1770, as condições de manutenção foram idênticas à excepção da adição de uracilo, uma vez que este corresponde à marca de selecção do plasmídeo pUG35. Quando necessário foi preparado meio líquido YNB, idêntico ao meio de manutenção mas sem agar. As culturas celulares de *S. cerevisiae* foram cultivadas a 28 °C com agitação orbital suave. O crescimento da cultura foi acompanhado pela determinação da densidade óptica a 640 nm recorrendo ao espectrofotómetro Ultrospec 2100 Pro.

1.2. Armazenamento de material biológico

O armazenamento, por um longo período de tempo, das várias estirpes celulares foi efectuado por congelamento em *stock* de glicerol a -80 °C. Para tal, quando necessário, colónias celulares foram repicadas com o auxílio de um palito estéril e inoculadas durante a noite, em meio líquido e temperatura apropriada. No dia seguinte, adicionou-se 500 µL de glicerol a 30% a 500 µL de cultura celular em microtubos, que foram congelados rapidamente em azoto líquido e finalmente armazenados a -80 °C.

2 Amplificação das sequências codificantes dos genes da AQP3 e AQP7

2.1. Preparação de células competentes de *E. coli* DH5-*a*

Células de *E. coli* DH5-*a* foram descongeladas em gelo a partir do *stock* a -80 °C e plaqueadas numa placa de isolamento com meio LB, durante a noite a 37 °C. No dia seguinte, a partir de uma colónia isolada foi preparado um pré-inóculo de 3 mL de meio LB e após um período de incubação de 12 horas a 37 °C, a cultura foi transferida para um balão de *Erlenmeyer* de 500 mL com 250 mL de meio LB e incubada novamente a 37 °C até se atingir uma $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,3 e 0,4. Entretanto, diluíram-se 15 mL da solução 2x concentrada de TSS (Anexo 2) com 15 mL de meio LB (1:1) e colocou-se em gelo. Após se ter atingido a $DO_{600\text{ nm}}$ adequada, a cultura foi distribuída em tubos de Falcon de 50 mL, previamente colocados em gelo e centrifugada a 1811 $\times g$ durante 10 minutos a 4°C numa centrífuga 5810 R Eppendorf. O sobrenadante foi descartado rapidamente e ressuspendeu-se o *pellet* em 5 mL da solução gelada de TSS diluída previamente. Transferiram-se alíquotas de 100 μL para microtubos, congelaram-se rapidamente em azoto líquido e armazenaram-se a -80 °C. Antes de se descongelar qualquer alíquota para utilização esperou-se, no mínimo, 12 horas.

2.2. Transformação de células competentes de *E. coli* com os plasmídeos pcDNA3-AQP3, pWPi-AQP7 e pUG35

Descongelaram-se alíquotas de células competentes de *E. coli* DH5-*a* em gelo e transferiu-se 200 μL de células para vários tubos de ensaio frios. As células competentes foram transformadas com 1 μL e com 2 μL das soluções *stock* dos plasmídeos pcDNA3-AQP3 (147 ng/ μL) e pWPi-AQP7 (280 ng/ μL). Como controlo positivo da transformação, as células foram transformadas com o plasmídeo pUG35 (183 ng/ μL), que se sabe ter uma eficiência de transformação elevada, e como controlo negativo transformou-se com 2 μL de H₂O.

As amostras foram então mantidas em gelo durante 30 minutos, após os quais foram transferidas para um banho a 42 °C durante 45 segundos e colocadas novamente em gelo. Depois do choque térmico, adicionou-se a cada amostra 0,9 mL de SOC (Anexo 2) e incubaram-se as células durante 1 hora a 37 °C com agitação suave. Finalmente, centrifugou-se a suspensão celular a 1811 $\times g$ durante 5 minutos para depositar as células. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* nos restos do sobrenadante. Plaquearam-se as células em placas contendo meio LB com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, concentração final) e incubou-se durante a noite a 37 °C. As colónias resultantes foram repicadas com o auxílio de um palito

estéril para tubos contendo 5mL de meio líquido LB com ampicilina (100 µg/mL, concentração final) e incubou-se a 37 °C até se obter crescimento visível.

2.3. Extração e purificação de DNA plasmídico

Para a extração e purificação dos plasmídeos foi utilizado o kit comercial GenElute™ HP Plasmid Midiprep (Sigma-Aldrich). Para isso, células de *E. coli* transformadas com os plasmídeos foram cultivadas num balão em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL, concentração final) a 37 °C com agitação suave. O procedimento recomendado pelo fornecedor encontra-se descrito no Anexo 3.

2.4. Amplificação dos fragmentos por PCR

Para a reacção de amplificação foram desenhados dois oligonucleótidos iniciadores específicos (*primers*) para cada gene-alvo, tendo em conta as suas sequências codificantes. Nos *primers* foram também incorporados locais de restrição próprios para as enzimas *SpeI* e *ClaI* (sequências não complementares ao DNA molde), que posteriormente foram utilizados para clonagem do fragmento amplificado no vector de expressão. Os *primers* foram adquiridos à empresa STAB VIDA Lda (Caparica, Portugal) e a sua sequência encontra-se descrita na Tabela III.2.

Tabela III.2 - Sequências dos *primers* desenhados para amplificação da AQP3 e AQP7. A azul encontra-se assinalada a sequência de restrição da enzima *SpeI* e a verde a sequência de restrição para a enzima *ClaI*. O conjunto de nucleótidos que se encontra sublinhado corresponde à região do *primer* que é específico para a sequência codificante da respectiva aquaporina.

Gene-alvo	Designação	Sequência nucleotídica (5'→ 3')	T _M AQP (°C)	T _M total (°C)
AQP3	AQP3_Fw	GG <u>ACTAGT</u> CCTATGGGTCGACAGAAGGAGTTGAT	55.3	63.7
	AQP3_Bw	CC <u>ATCGAT</u> GGAGATCTGCTCCTTGCTTCATGT	55.3	65.0
AQP7	AQP7_Fw	GG <u>ACTAGT</u> CCTATGGTTCAAGCATCCGGGCACAG	60.1	66.3
	AQP7_Bw	CC <u>ATCGAT</u> GGAGAAGTGCTCTAGGGCCATGGATTTCAT	58.7	66.5





Para otimizar a reacção de amplificação foi realizado um gradiente de temperatura para se seleccionar a temperatura óptima de hibridação dos *primers* desenhados, com vista a obter-se uma maior especificidade e maior quantidade de produto amplificado.

Nos primeiros ciclos de amplificação, a hibridação ocorre apenas entre a sequência codificante e a sequência específica do *primer* para ela desenhada (Tabela III.2, nucleótidos

Materiais e Métodos

sublinhados) e foi necessário ter em conta as respectivas temperaturas de hibridação – T_M AQP (Gradiente 1). Só ao fim de alguns ciclos, existe um número suficiente de cópias contendo já os locais de reconhecimento das enzimas de restrição e nesta altura, considera-se a temperatura de hibridação de todo o primer – T_M total (Gradiente 2). Desta forma, é imperativo otimizar estas duas temperaturas de hibridação, para cada par de *primers*. O intervalo de temperaturas para cada gradiente a utilizar encontra-se esquematizado na Tabela III.3.

Tabela III.3 – Intervalo de temperaturas utilizado no Gradiente 1 e Gradiente 2 para a optimização das temperaturas de hibridação. A negrito encontra-se o valor de temperatura médio para cada par de *primers* e para cada gradiente e a vermelho encontram-se o intervalo de temperaturas adoptado para cada caso.

<i>Primer</i>	T_M AQP (°C)	T_M total (°C)
AQP3_Fw	55,3	63,7
AQP3_Bw	55,3	65,0
		
	46,0 ← 55,3 → 56,0	55,0 ← 64,4 → 65,0
	<u>Gradiente 1</u>	<u>Gradiente 2</u>
<i>Primer</i>	T_M AQP (°C)	T_M total (°C)
AQP7_Fw	60,1	66,3
AQP7_Bw	58,7	66,5
		
	51,0 ← 59,4 → 61,0	57,0 ← 66,4 → 67,0
	<u>Gradiente 1</u>	<u>Gradiente 2</u>

A reacção de amplificação foi realizada num termociclador de gradiente (C1000™ Thermal Cycler da BioRad) de acordo com o programa descrito na Tabela III.4, tendo em conta os gradientes definidos anteriormente e de acordo com a mistura reaccional da Tabela III.5. A reacção de amplificação foi realizada em vários tubos de PCR de 250 µL com um volume final de 10 µl cada um e foi realizado um controlo negativo da reacção de amplificação, no qual foi adicionada água milli-Q estéril ao invés de DNA molde.

Tabela III.4 - Programa de PCR para otimização das temperaturas de hibridação dos *primers* desenhados para amplificar a sequência codificante da AQP3 e da AQP7.

Fase	Duração (min)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	3	94	1
Desnaturação	0,5	94	
Hibridação dos <i>primers</i>	1	Gradiente 1	5
Elongação	1	72	
Desnaturação	0,5	94	
Hibridação dos <i>primers</i>	1	Gradiente 2	25
Elongação	1	72	
Elongação final	7	72	1

Tabela III.5 - Mistura reaccional preparada para amplificar a sequência codificante da AQP3 e da AQP7.

Constituinte	Volume (µl)
Taq <i>Change</i> polimerase (NZYTech) – (2.5U/µL)	0,2
Tampão Taq 10x (NZYTech)	1
<i>Primer</i> Fw (100 µM)	0,4
<i>Primer</i> Bw (100 µM)	0,4
dNTPs (NZYTech)– 10 mM	0,2
DNA molde	20-100 ng
H2O milli-Q estéril	(Perfazer)
Total	10

Após a otimização das temperaturas de hibridação para cada par de *primers*, foi realizado um outro PCR para amplificação em larga escala das sequências codificantes num termociclador Mastercycler® Personal da Eppendorf. O programa utilizado foi idêntico ao da Tabela III.4 mas desta vez com a inserção das temperaturas de hibridação já optimizadas: 55,4 e 64,5 °C para a AQP3; 60,3 e 66,3 °C para a AQP7. A mistura reaccional foi preparada de acordo com o descrito anteriormente na Tabela III.5.

O produto de PCR de cada amplificação foi purificado com o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), descrito no Anexo 3, e ressuspenso num volume final de 50 µL de H₂O milli-Q. Os produtos de PCR foram analisados por electroforese em gel de agarose 1% (p/v), por comparação com dois marcadores de peso molecular (marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I e DNA do fago lambda digerido com *Hind*III – Anexo 4).

3 Clonagem dos fragmentos amplificados em *E. coli*

3.1. Digestão dos produtos de amplificação e do plasmídeo pUG35

Após purificação dos produtos de amplificação e extracção e purificação do plasmídeo pUG35 procedeu-se à digestão dos mesmos com as enzimas de restrição *SpeI* e *ClaI*, de forma a criar extremidades coesivas para a ligação (Tabela III.6). De acordo com o fornecedor (Roche Diagnostics®) estas enzimas possuem actividade máxima no mesmo tampão (tampão H), cuja composição encontra-se descrita no Anexo 2.

Os tubos com a mistura reaccional foram incubados à temperatura óptima das duas enzimas (37 °C), recomendada no manual do fornecedor (Roche Diagnostics®). No manual, verifica-se que embora a enzima *ClaI* atinja 90% de eficiência de corte logo após 2 horas de digestão, a enzima *SpeI* só atinge 90% de eficiência de corte ao fim de 20 horas, por isso a mistura reaccional foi incubada durante a noite.

Tabela III.6 – Composição da reacção de digestão enzimática para preparação da clonagem.

Componentes	Concentração final
DNA	Cerca de 1 µg
10x tampão H	10 µl
<i>SpeI</i> (10 U/µL)	4 U
<i>ClaI</i> (10 U/µL)	4 U
Água estéril	Perfazer até 100 µl

Após digestão completa, as amostras digeridas foram purificadas através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) de acordo com as indicações do fabricante (Anexo 3) com vista à remoção de pequenos oligonucleótidos e foram analisadas num gel de agarose 1% (p/v) para observação dos diferentes fragmentos, por comparação com dois marcadores de peso molecular (marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I e DNA do fago lambda digerido com *HindIII* – Anexo 4).

3.2. Ligação dos produtos de digestão

Para a construção dos plasmídeos recombinantes pUG35-AQP3 e pUG35-AQP7, o plasmídeo e fragmentos digeridos foram incubados com a enzima T4 DNA ligase (Roche), de forma a ligar covalentemente as extremidades coesivas criadas no passo anterior.

Teoricamente, existe uma proporção para as quantidades óptimas de fragmento amplificado e plasmídeo a usar na reacção de ligação, calculada com base na razão molar entre ambos. Foram testadas as proporções 1/2, 1/3 e 1/5 (plasmídeo/fragmento). Para verificar a eficiência da digestão e probabilidade de re-ligação efectuou-se uma mistura de ligação apenas com o plasmídeo digerido (1/0). A composição da mistura reaccional encontra-se descrita na Tabela III.7. A reacção de ligação decorreu durante a noite a 16 °C, de acordo com as indicações do fabricante. A composição do tampão usado na reacção está descrita no Anexo 2.

Tabela III.7 – Composição da mistura reaccional de ligação entre os fragmentos amplificados por PCR da AQP3 e AQP7 e o pUG35.

Constituinte	Volume (µL)			
	AQP3/AQP7			
	C	1/2	1/3	1/5
Produto de PCR digerido (65-70 ng/µL)	0	4	6	10
pUG35 digerido (65 ng/µL)	2	2	2	2
T4 DNA ligase (Invitrogen) 5U/µL	2	2	2	2
Tampão de ligação 5x	2	2	2	2
H ₂ O estéril	14	10	8	4
Total	20			

3.3. Transformação de *E. coli* com produtos de ligação

A transformação de células de *E. coli* foi efectuada pela adição de 10 µL do produto de ligação a alíquotas de 200 µL de células competentes de *E. coli DH5a*. Foram feitos três controlos:

- Controlo negativo da transformação: adição de água estéril
- Controlo negativo da ligação: adição de pUG35 digerido e re-ligado
- Controlo positivo: adição de pUG35 não digerido

O protocolo de transformação foi idêntico ao utilizado no ponto 2.2.

4 Selecção de colónias de transformantes de *E. coli* contendo o produto amplificado

Foram feitas duas abordagens para garantir a presença dos insertos de interesse nos plasmídeos: uma primeira abordagem que consiste numa extracção rápida do plasmídeo (extracção por fenol-clorofórmio) e uma segunda abordagem que consiste numa análise mais fina para confirmação dos resultados obtidos na primeira abordagem. Para confirmação inequívoca, realizou-se um novo PCR e uma nova digestão enzimática.

4.1. Extracção de DNA com fenol-clorofórmio

Para a análise rápida, recolheu-se cada uma de várias colónias isoladas com o auxílio de um palito estéril para microtubos. Adicionaram-se 50 μ L de Triton X-100 2% (v/v) (pH 12,4) e 50 μ L de fenol-clorofórmio (1:1) a cada um dos microtubos. A mistura foi agitada para ressuspender as células, até se observar uma mistura homogénea. Em seguida, centrifugou-se durante 5 min à velocidade máxima (16 100 \times g) para separar as fases e recolheu-se o maior volume possível de fase aquosa (fase de cima) sem recolher nem fase orgânica (fase de baixo) nem a interfase. Observou-se por electroforese em gel de agarose a 0,80% (p/v) tendo como controlo do tamanho do plasmídeo sem fragmento ligado, uma amostra de pUG35 não digerido. Foram utilizados dois marcadores de peso molecular (marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I e DNA do fago lambda digerido com *Hind*III – Anexo 4).

4.2. Extracção de DNA por lise alcalina

Após a selecção dos resultados positivos da extracção orgânica, cada colónia correspondente foi inoculada em dois tubos de ensaio com 5 mL cada de meio LB com ampicilina (100 μ g/ml) e incubada durante a noite a 37 °C com agitação moderada.

Procedeu-se à extracção do DNA plasmídico por lise alcalina [52]. A cultura celular foi centrifugada a 16100 \times g durante 1 minuto e desprezou-se todo o sobrenadante. As células foram ressuspensas com 100 μ L da solução I (Anexo 2) e 8 μ L de lisozima (4 mg/mL) e incubadas 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 200 μ L da solução II (Anexo 2) preparada na altura. Os tubos foram invertidos suavemente para misturar o conteúdo e colocados em gelo durante 5 minutos. Após 5 minutos de incubação em gelo, foram adicionados 150 μ L da solução III (Anexo 2) fria e homogeneizou-se suavemente até que fosse visível um novelo branco e incubou-se em gelo durante 1 hora. Centrifugou-se durante 10 minutos a 16 100 \times g e transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos contendo 1 mL de etanol absoluto frio e colocaram-se 10 minutos a -80 °C e voltou-se a centrifugar com as condições anteriores. Descartou-se o sobrenadante e secou-se o sedimento ao ar. Depois de seco, adicionou-se 100 μ L da solução IV (Anexo 2) e 200 μ L de etanol absoluto frio e incubou-

se novamente durante 10 minutos a -80 °C. Após mais uma centrifugação de igual duração e velocidade, descartou-se o sobrenadante e secou-se novamente o sedimento. Por último, ressuspendeu-se o DNA em 30 µL de água milliQ estéril.

As amostras foram analisadas por electroforese em gel de agarose a 0,80% (p/v) para verificar a concentração e integridade do DNA por comparação com dois marcadores de peso molecular (marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I e DNA do fago lambda digerido com *Hind*III – Anexo 4).

4.2.1. Digestão com enzimas de restrição

Os plasmídeos extraídos foram analisados através da digestão com enzimas de restrição, com vista a verificar se o padrão de digestão corresponde ao esperado tendo em conta a inserção dos fragmentos de interesse. Foi usado o par de enzimas *Spe*I e *Cla*I. A composição da reacção de digestão foi idêntica à utilizada no ponto 3, à excepção do volume final que neste caso foi apenas 10 µl.

4.2.2. PCR de confirmação

Uma segunda abordagem que também permite confirmar a presença de inserto no plasmídeo é realizar uma reacção de amplificação, utilizando *primers* específicos para as regiões do plasmídeo pUG35 que flanqueiam o local de inserção do fragmento. Neste caso, a composição da mistura reaccional encontra-se descrita na Tabela III.8 e o programa utilizado descrito na Tabela III.9.

Tabela III.8 - Mistura reaccional preparada para confirmar a presença do fragmento, com *primers* específicos do pUG35.

Constituinte	Volume (µl)
	AQP
Taq <i>Change</i> polimerase (NZYTech) – (2,5 U/µl)	0,2
Tampão Taq 10x (NZYTech)	1
Primer pUG_fw (100 µM)	0,4
Primer pUG_Rev1 (100 µM)	0,4
dNTPs (NZYTech) – (10 mM)	0,2
H ₂ O mili-Q	(perfazer)
DNA molde	160-200 ng
Total	10

Materiais e Métodos

Tabela III.9 - Programa de PCR para confirmação da presença de fragmento, com os *primers* específicos do pUG35.

Fase	Duração (min)	Temperatura (°C)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	4	94	1
Desnaturação	1	94	
Hibridação dos <i>primers</i>	1	60	30
Elongação	1	72	
Elongação final	7	72	1

Os fragmentos amplificados por PCR foram visualizados em gel de agarose 1% (p/v), utilizando como marcador de peso molecular NZYDNA Ladder I.

Seleccionaram-se os transformantes que apresentaram tamanhos aproximadamente de 888 pb e 1042 pb para a AQP3 e AQP7, respectivamente.

4.3. Sequenciação automática

A sequenciação dos plasmídeos recombinantes que foram seleccionados para prosseguir o trabalho tem como objectivo assegurar a integridade da sua sequência nucleotídica. Para isso foram seleccionados dois transformantes de cada plasmídeo recombinante para sequenciação na empresa STAB VIDA, Investigação e Serviços em Ciências Biológicas, Lda. Os resultados provenientes das sequenciações foram visualizados e analisados recorrendo ao *software* BioEdit versão 7.2.0.

5. Expressão heteróloga da AQP3 e AQP7 em *Saccharomyces cerevisiae*

5.1. Transformação de células competentes de *S. cerevisiae* com os plasmídeos construídos

A estirpe de *S. cerevisiae* YSH 1770 foi transformada com os plasmídeos construídos (pUG35-AQP3 e pUG35-AQP7) bem como o plasmídeo controlo (pUG35 sem fragmento), através do método de acetato de lítio.

Preparou-se um pré-inóculo a partir de células de *S. cerevisiae* YSH 1770 em meio YPD (Anexo 2) e incubado a 30 °C durante a noite com agitação. No dia seguinte, mediu-se a DO_{640nm} e fez-se uma diluição de forma a obter-se 5×10^6 células/mL em 50 mL de meio YPD e

aguardou-se até duplicar duas vezes, o que corresponde a aproximadamente 4-5 horas, até se obter uma concentração final de 2×10^7 células/mL. Seguidamente, o meio de cultura foi centrifugado a $3000 \times g$ durante 5 minutos à temperatura ambiente e o *pellet* celular foi lavado com 25 mL de água estéril, seguido de uma nova centrifugação a $5000 \times g$ durante 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de acetato de lítio (LiAc) 100 mM e a suspensão transferida para um novo microtubo estéril. É feita uma centrifugação à velocidade máxima durante apenas 30 segundos, o sobrenadante é descartado e o *pellet* é ressuscitado vigorosamente com 400 μ L de LiAc 100 mM. Para cada transformação é transferido 50 μ L da suspensão anterior para novos microtubos estéreis, que em seguida são centrifugados à velocidade máxima durante 30 segundos para retirar toda a solução de LiAc. Paralelamente a estes procedimentos, ferveu-se 1 mL de DNA de esperma de salmão (*ss-carrier* DNA) e colocou-se imediatamente em gelo. Posteriormente e de acordo com a ordem que se segue na Tabela III.10, os componentes da mistura de transformação foram adicionados.

Para além da transformação com os plasmídeos construídos, a estirpe *S. cerevisiae* YSH 1770 foi também transformada com o pUG35 (controlo positivo) e com água estéril (controlo negativo).

Tabela III.10 – Componentes da mistura de transformação da estirpe *S. cerevisiae* YSH 1770.

PEG 3350 (50% p/v)	240 μ l
LiAc 1 M	36 μ l
<i>ss-carrier</i> DNA fervido (2mg/mL)	50 μ l
DNA plasmídico (2 μ g)	X μ l
Água estéril	34-X μ l
Volume total	360 μ l

Após adição de todos os componentes, os microtubos foram incubados a 30 °C durante 30 minutos e depois a 42 °C num banho termostatizado mais 30 minutos. Depois dos períodos de incubação, removeu-se o sobrenadante com a ajuda de uma micropipeta por centrifugação à velocidade máxima durante 30 segundos e o *pellet* ressuscitado cuidadosamente em 1 mL de água milli-Q estéril. Cada 100 μ L de transformantes foi plaqueado em placas YNB com glucose 2% suplementadas com leucina, histidina e triptofano. As placas foram incubadas a 28 °C até ao aparecimento de colónias visíveis.

5.2. Detecção da localização celular através de microscopia de fluorescência

As células de leveduras transformadas com os plasmídeos construídos foram submetidas a análise por microscopia de fluorescência, para detecção da localização da fusão AQP-GFP.

Materiais e Métodos

Para isso, as células de *S. cerevisiae* foram inoculadas durante a noite em meio YNB com 2% de glucose e adição de leucina, histidina e triptofano, a 28 °C. As células foram recolhidas a uma DO_{640nm} aproximadamente igual a 2 por centrifugação durante 10 minutos a 5 000 $\times g$ e a 4 °C. O *pellet* celular foi lavado três vezes com a solução de sorbitol 1.4 M (com osmolaridade $osm_{out}=1400$ mOsM) preparada em tampão ácido cítrico/fosfato dipotássico (K_2HPO_4) 50 mM a pH 7.4 (Anexo 2) e ressuspenso em 3 ml da mesma solução por cada grama de *pellet*.

Uma alíquota da suspensão de células foi colocada numa lamela e observada num microscópio de fluorescência Zeiss Axiovert 200, ao comprimento de onda de excitação 495 nm e de emissão 535 nm. As imagens de fluorescência foram capturadas numa câmara digital (CoolSNAP EZ, Photometrics, USA) e processadas recorrendo ao *software* ImageJ.

6 Ensaios funcionais através da técnica de interrupção brusca do fluxo

A técnica de interrupção brusca de fluxo (*stopped-flow*) baseia-se no facto da intensidade de luz dispersa ou fluorescência ser proporcional ao volume celular de uma suspensão de células (ou de vesículas). Neste caso, as células carregadas com uma sonda fluorescente sensível ao volume, equilibradas num determinado tampão isotónico, são rapidamente misturadas com soluções de osmolaridades diferentes, criando-se um gradiente osmótico entre o exterior e o interior da célula. Este gradiente osmótico provoca um movimento de saída ou entrada de água, originando uma variação do seu volume, até que o novo equilíbrio osmótico seja atingido. Esta variação de volume reflecte-se numa variação da fluorescência que é registada ao longo do tempo da reacção.

Na Figura III.1 encontra-se um esquema ilustrativo da composição e funcionamento do aparelho de *stopped-flow* utilizado neste trabalho experimental (HI-TECH Scientific PQ/SF-53), com um tempo morto de 2 ms, temperatura controlada e com interface computacional.

De uma forma geral, duas soluções são colocadas em duas seringas que injectam simultaneamente, devido à acção do compressor, volumes iguais de soluções para uma *cuvete*, passando por uma câmara onde as soluções se misturam. No contexto deste trabalho, uma das seringas irá conter a suspensão de células de levedura inicialmente equilibradas numa solução com osmolaridade $(osm_{out})_0 = 1400$ mOsM e a outra seringa irá conter a solução de choque osmótico com uma osmolaridade diferente. Define-se então como tonicidade do choque osmótico (Δ) a razão entre as osmolaridades externas final (após se ter atingido o equilíbrio) e a inicial:

$$\Lambda = \frac{(osm_{out})_{\infty}}{(osm_{out})_0} \quad \text{(Equação 17)}$$

Neste caso, a $(osm_{out})_{\infty}$ é calculada como a média das osmolaridades colocadas em cada seringa, uma vez que são injectados volumes iguais de solução para a *cuvete*. A tonicidade mede a amplitude do choque osmótico: quanto maior for a tonicidade de choque, maior o gradiente osmótico que se cria e por consequência, maior a variação do volume celular.

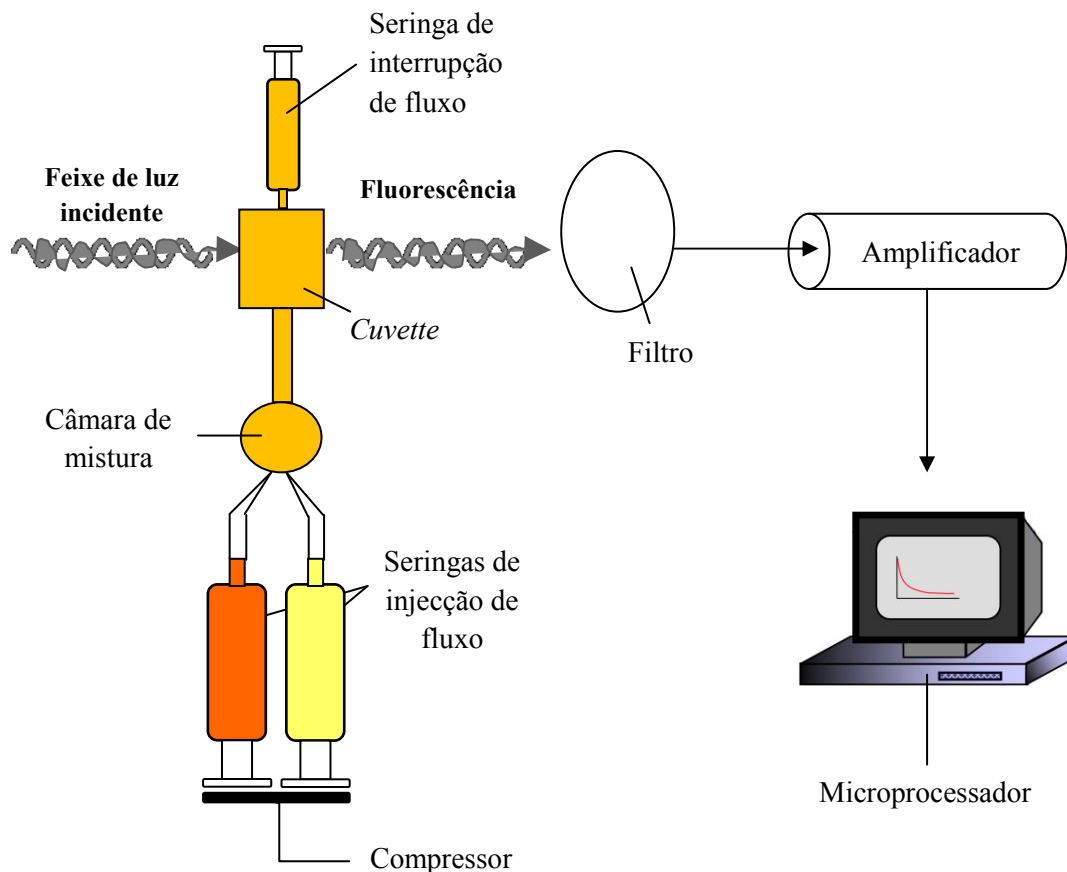


Figura III.1 - Esquema do aparelho de fluxo interrompido utilizado neste trabalho experimental.

Para se proceder ao estudo funcional através desta técnica, as células de *S. cerevisiae* tiveram a mesma preparação que no ponto 5.2. Para evitar interferências de pH na fluorescência medida, a suspensão de células e todas as soluções osmóticas foram preparadas em tampão ácido cítrico/fosfato dipotássico (K_2HPO_4) 50 mM a pH 7,4.

Para as experiências de fluorescência, as células intactas ressuspendidas são incubadas durante 20 min a 30 °C com 10 μ l de um precursor permeável não fluorescente, o cFDA (5-(e 6-) diacetato de carboxifluoresceína) 100 μ M (λ_{ex} 492 nm; λ_{em} 517 nm). Depois de entrar para o interior das células, o precursor do fluorocromo é hidrolisado por esterases intracelulares não

Materiais e Métodos

específicas, originando a forma fluorescente e impermeável da molécula que se mantém no citoplasma da célula [53]. Após o tempo de incubação é feita uma diluição de 1:10 com a solução de sorbitol 1,4 M.

Consoante a tonicidade de choque as células respondem aumentando ou diminuindo o seu volume, o que vai alterar a concentração do fluofóro dentro da célula. Devido à propriedade de auto-extinção de fluorescência (*self-quenching*) deste composto fluorescente, o sinal de fluorescência resultante da variação de volume celular é inversamente proporcional à variação de concentração de fluofóro, isto é, uma diminuição do volume induz um aumento da concentração deste e resulta numa diminuição do sinal de fluorescência [54]. Deste modo, após calibração (como descrito em seguida no ponto 6.2), os sinais de fluorescência da suspensão celular podem ser convertidos em sinais de variação de volume celular.

6.1. Aquisição de sinais de fluorescência

De forma a caracterizar o transporte de água e glicerol para cada uma das estirpes de *S. cerevisiae* transformadas com os plasmídeos construídos foram efectuadas 3 perturbações diferentes. As células encontravam-se inicialmente equilibradas numa solução de sorbitol a 1,4M a pH 7,4.

PERTURBAÇÃO 1

A primeira perturbação foi efectuada sem choque osmótico: as células equilibradas numa solução de sorbitol a 1,4 M ($(osm_{out})_0=1400$ mOsM) são confrontadas com a mesma solução ($(osm_{out})_\infty=1400$ mOsM). A tonicidade de choque é $\Lambda=(osm_{out})_\infty/(osm_{out})_0=1$ e desta forma não existirá gradiente de pressão osmótica. Nesta situação as células continuarão em equilíbrio osmótico e por isso, não serão observados fluxos de água.

PERTURBAÇÃO 2

Na segunda perturbação, as células são confrontadas com uma solução de soluto impermeante (sorbitol) a 2,1 M. O valor de $(osm_{out})_\infty$ é calculado como a média das duas osmolaridades e assim $(osm_{out})_\infty=(1400 \text{ mOsM} + 2100 \text{ mOsM})/2=1750$ mOsM. Desta forma a tonicidade de choque é $\Lambda=1750 \text{ mOsM}/1400 \text{ mOsM}=1,25$. O gradiente de solutos não difusíveis no início será negativo $(\Delta C_{ND})_0=(osm_{out})_0-(osm_{out})_\infty=1400 \text{ mOsM}-1750 \text{ mOsM}=-350$ mOsM e nesta situação a água move-se de dentro para fora das células até que se atinge o volume final V_∞ , onde o gradiente de soluto se dissipa.

PERTURBAÇÃO 3

Na terceira perturbação, as células são confrontadas com uma solução de soluto permeante (glicerol) a 2,1 M. Nesta situação, valor da osmolaridade final $(osm_{out})_{\infty}$ terá a contribuição de dois componentes, a concentração de sorbitol (C_{ND}) e concentração do glicerol (C_S). Assim, $(osm_{out})_{\infty} = (1400 \text{ mOsM (sorbitol)} + 2100 \text{ mOsM (glicerol)})/2 = 700 \text{ mOsM (sorbitol)} + 1050 \text{ mOsM (glicerol)} = 1750 \text{ mOsM}$, e a tonicidade de choque é $\Lambda=1,25$. O gradiente inicial de solutos não difusíveis é dado por $(\Delta C_{ND})_0 = 1400 \text{ mOsM} - 700 \text{ mOsM} = 700 \text{ mOsM}$ enquanto que o gradiente inicial de solutos difusíveis é $(\Delta C_S)_0 = 0 \text{ mOsM} - 1050 \text{ mOsM} = -1050 \text{ mOsM}$, pois no início não existe glicerol intracelular. O gradiente osmótico total será a soma de ambos, $\Delta\Pi_{total}=RT (\Delta C_{ND}+ \Delta C_S)$ e assim no início, teremos um gradiente negativo que causará a saída de água. Este gradiente torna-se positivo no evoluir do transitório.

Os vários sinais foram adquiridos numa gama de temperaturas entre cerca de 9,5 °C a 36 °C. Para o mesmo dia de experiências, tempo e frequência de aquisição de dados foi feita uma média de todos os ficheiros de temperaturas próximas, com variação de aproximadamente 1-2 °C.

6.2. Calibração do sinal de fluorescência para volume relativo

Para caracterizar o transporte de água e glicerol é necessário converter a variação da intensidade da fluorescência F/F_0 observada em variação do volume celular relativo (v_{rel}). Para a calibração dos sinais de fluorescência, correspondentes ao choques com sorbitol, onde só há transporte de água foi utilizada a estratégia desenvolvida anteriormente pelo nosso grupo [55], em particular, os valores medidos *i*) dos volumes iniciais e da variação final de volume em função e diferentes choque osmóticos, *ii*) o valor aproximado do volume não osmótico e *iii*) a relação linear entre as duas grandezas V/V_0 e F/F_0 :

$$\frac{V}{V_0} = v_{rel} = a \times \frac{F}{F_0} + b \tag{Equação 18}$$

Os valores de *a* de *b* serão determinados individualmente para cada ficheiro de dados correspondentes aos choques com sorbitol. Para a calibração dos sinais de fluorescência relativos aos choques osmóticos com glicerol, onde existem fluxos simultâneos de água e glicerol, foram utilizados os valores do declive (*a*) e da ordenada na origem (*b*) previamente determinados para as experiências de sorbitol (água) à mesma temperatura.

6.3. Determinação dos coeficientes de permeabilidade P_f e P_s e energias de activação E_a

Toda a análise dos dados de fluorescência, inclusivamente os cálculos de a e b para a calibração de cada sinal (Equação 18) e a estimativa dos coeficientes de permeabilidade P_f e P_s , foi feita utilizando o *software Berkeley Madonna* para a implementação do modelo matemático baseado nas equações simplificadas de Kedem Katchalsky (Equação 1-18).

O modelo matemático construído é capaz de simular o comportamento dinâmico das células quando expostas a perturbações osmóticas, bem como estimar os valores de permeabilidade, a partir de dados de volume relativo previamente calibrados por ajustamento da curva teórica da variação de volume relativo aos dados experimentais. Para isso, é necessário fornecer ao modelo alguns dados:

- Temperatura do ensaio
- V_w , volume parcial molar da água
- R , constante gases perfeitos
- Raio inicial da célula r_0
- Osmolaridade externa inicial (osm_{out})₀
- Tonicidade de choque Λ
- Informação relativa ao soluto adicionado, se sorbitol ou glicerol

A determinação da E_a associada ao transporte requer a medição dos coeficientes de permeabilidade a diferentes temperaturas e o seu valor (de E_a) pode ser calculado a partir do declive da representação gráfica de Arrhenius entre $\ln P_f$ ou $\ln P_s$ em função de $1/T$.

7. Inibição da permeabilidade à água e ao glicerol pelo composto Auphen

A preparação das experiências de inibição foi efectuada de igual forma que anteriormente: as suspensões de células intactas das três estirpes de *S. cerevisiae* equilibradas em solução isotónica (sorbitol 1.4 M) foram incubadas com sonda fluorescente (cFDA). Para além disso foram também incubadas com o composto Auphen 100 μ M, à temperatura ambiente por 30 minutos.

Da mesma forma que se procedeu anteriormente para a caracterização do transporte de água e de glicerol, as células equilibradas em solução isotónica e incubadas com Auphen são confrontadas com soluções hipertónicas pela adição de sorbitol ou pela adição de glicerol.

A aquisição e calibração dos sinais de fluorescência obtidos foram feitas de igual forma ao descrito no ponto 6.2, para a temperatura única de 23 °C. A estimativa dos coeficientes de

permeabilidade P_f e P_s foi feita através do assentamento das curvas teóricas seguindo o mesmo método descrito anteriormente e o efeito inibitório do composto Auphen foi avaliado através da comparação dos valores de P_f e P_s a 23 °C com e sem inibição.

Materiais e Métodos

IV. Resultados e Discussão

1 Construção dos plasmídeos recombinantes

As sequências codificantes de *AQP3* e *AQP7* foram fornecidas clonadas em plasmídeos pela Doutora Miriam do Instituto de Biomedicina de Sevilla – IbiS e pelo Professor Antonio Zorzano, do Instituto de Biomedicina de Barcelona. No entanto, sendo o principal objectivo comparar a actividade das duas aquaporinas por expressão heteróloga em uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae*, sem aquaporinas ortodoxas funcionais, foi necessário clonar estas sequências num mesmo vector com origem de replicação em *S. cerevisiae*. O plasmídeo escolhido para esse objectivo foi o pUG35 [56].

A escolha do pUG35 como vector de expressão final recaiu sobre o facto de ser um vector construído de forma a permitir a clonagem de qualquer gene em linha com o gene da yEGFP (*yeast-enhanced Green Fluorescence Protein*) num sítio de clonagem múltipla a montante, permitindo desta forma a detecção da localização celular da proteína expressa quando fundida com yEGFP. Esta região encontra-se sob a regulação do promotor *MET25* (Figura IV.1). Este promotor é reprimido na presença de metionina [57], permitindo assim, caso seja pretendido, reduzir significativamente os níveis de expressão das aquaporinas pela simples adição de metionina no meio de cultura.

Outra grande vantagem na escolha do pUG35 como vector de expressão é este ser um vector vai-vém (*shuttle*), isto é, tem capacidade de se replicar em dois hospedeiros diferentes. (*Escherichia coli* e *S. cerevisiae*) e possui marcas de selecção para os dois hospedeiros (resistência à ampicilina e *URA3*). Por possuir uma origem de replicação bacteriana e uma marca de resistência à ampicilina permitiu-nos efectuar toda a manipulação genética num organismo de fácil manutenção (*E. coli*) e por fim transformar uma estirpe de *S. cerevisiae* auxotrófica para o uracilo (YSH 1770, Tabela III.1), com os plasmídeos construídos.

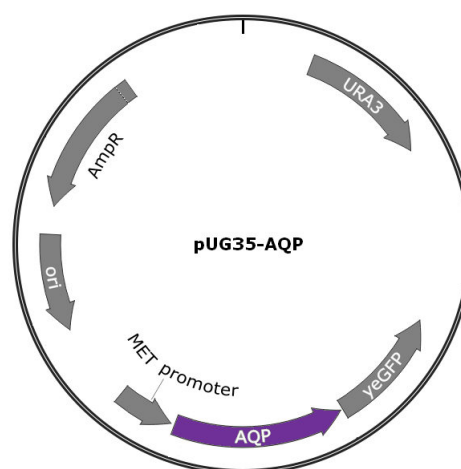


Figura IV.1– Mapa circular do plasmídeo recombinante, construído a partir do vector pUG35 por clonagem da sequência codificante da aquaporina em questão, em linha com o gene da GFP e sob a regulação do promotor MET25.

1.1. Desenho de *primers*

Com o objectivo de clonar as sequências codificantes das aquaporinas AQP3 e AQP7 no vector de expressão pUG35, as sequências correspondentes foram primeiramente amplificadas por PCR, a partir dos plasmídeos fornecidos.

O desenho dos *primers*, para além da qualidade e pureza do DNA molde, é um processo chave para o sucesso da amplificação da sequência desejada. Para isso foram tidos em conta vários critérios [58]:

- i. O *primer forward* deverá ser específico para o início da sequência a amplificar, incluindo o seu codão de iniciação (ATG);
- ii. O *primer backward* deverá ser específico para o final da sequência a amplificar, com a eliminação do codão *stop* (TAA) de forma a permitir a co-expressão da aquaporina e da yEGFP;
- iii. Os *primers* deverão ser desenhados de forma a obter máxima especificidade e eficiência de amplificação. *Primers* pouco específicos podem originar vários produtos de PCR não desejáveis, por hibridarem com outros locais do DNA molde;
- iv. O tamanho dos *primers* deverá ser entre 18-24 pb para assegurar a especificidade à sequência-alvo e uma temperatura de hibridação não excessivamente elevada;
- v. Ambos os *primers* de cada par deverão ter a temperatura de hibridação (T_M) e o conteúdo em GC (50-60%) idênticos, ou muito próximos;
- vi. Deverá evitar-se complementariedade entre os dois *primers* de cada par, particularmente nas extremidades 3'. A elevada complementariedade origina dímeros de *primers* indesejados, o que vai provocar a amplificação dos próprios *primers* e reduzir a fracção de *primers* disponível para hibridar com o DNA molde;
- vii. Deverá evitar-se a formação de estruturas secundárias intramoleculares (*hairpins* e *loops*) nos *primers*, que dificultam a correcta hibridação dos destes com o DNA molde.

Tendo em conta os critérios acima mencionados, os *primers* foram então desenhados manualmente e as temperaturas de hibridação (T_M) foram calculadas através do software *Tm calculator* – Finnzymes, baseadas no método termodinâmico descrito por SantaLucia [59]. Os conjuntos de *primers* que reuniram as melhores condições para amplificar as sequências em estudo encontram-se listados na Tabela IV.1.

Resultados e Discussão

Tabela IV.1 – Sequência nucleotídica dos *primers* específicos desenhados para amplificar as sequências-alvo de cada aquaporina

Nome	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Tamanho (pb)	CG (%)	T _M (°C)
AQP3_Fw	ATGGGTCGACAGAAGGAGTTGAT	23	47,8	55,3
AQP3_Bw	GATCTGCTCCTTGTGCTTCATGT	23	47,8	55,3
AQP7_Fw	ATGGTTCAAGCATCCGGGCACAG	23	56,5	60,1
AQP7_Bw	GAAGTGCTCTAGGGCCATGGATTCAT	26	50	58,7

No entanto, dado que o objectivo não foi apenas amplificar as sequências-alvo mas também tornar possível a sua clonagem no vector de expressão pUG35 foi necessário adicionar pares de bases extra contendo sequências específicas de corte para endonucleases de restrição. Estas sequências permitem futuras manipulações como a inserção das sequências na orientação correcta e em linha com a sequência da yEGFP. A escolha das enzimas de restrição a utilizar recaiu sobre os seguintes factores:

- i. Enzimas de restrição cujas sequências de corte estejam contidas no local de clonagem múltipla do vector de expressão;
- ii. Enzimas de restrição para as quais não existam também locais de corte dentro da sequência a clonar;
- iii. Enzimas de restrição que originem extremidades coesivas;
- iv. Enzimas que tenham actividade óptima com o mesmo tampão, por uma questão de poupança de tempo;

Tendo em conta os factores acima mencionados, as enzimas de restrição escolhidas foram a *SpeI* e *ClaI* (Figura IV.2). Foram escolhidas duas enzimas de restrição diferentes ao invés de uma porque caso se escolhesse apenas uma, durante a ligação, seria impossível controlar a orientação em que a sequência é inserida no vector. Como o principal objectivo é fusionar a sequência da aquaporina com o gene da yEGFP é crucial garantir a orientação desejada. Para isso, a região inicial da sequência amplificada deve ser flanqueada pela sequência de corte da enzima *SpeI* e o final flanqueado pela sequência de corte da enzima *ClaI*. Esta orientação fará com que o codão de iniciação da sequência da aquaporina fique próxima do promotor *MET25*, visto que, no vector, o local de restrição da *SpeI* se encontra mais próximo do promotor que a *ClaI*, e o gene seja expresso com sucesso e na correcta orientação.

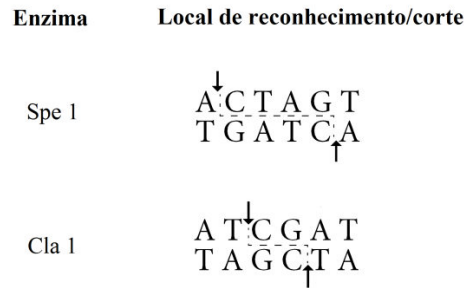


Figura IV.2 – Sequência de reconhecimento e padrão de corte das enzimas de restrição *SpeI* e *ClaI*. O corte destas enzimas resulta na formação de extremidades coesivas.

A maioria das enzimas de restrição necessita de suporte estrutural para que o corte seja eficiente, o que se traduz na adição de alguns pares de bases para além do seu local de reconhecimento, na extremidade 5' (a montante do seu local de reconhecimento). No caso das enzimas escolhidas (*SpeI* e *ClaI*) a adição de apenas duas bases extra na extremidade 5' e três bases entre o local de reconhecimento e o início da sequência complementar garantem eficiência máxima de corte (Manual NewEnglandBiolab). A Tabela IV.2 lista a sequência completa dos *primers* desenhados com o objectivo de amplificar e clonar as sequências de interesse.

Tabela IV.2 – Sequência nucleotídica completa dos *primers* utilizados para amplificação das sequências das aquaporinas. Os locais de corte das enzimas de restrição encontram-se sublinhados.

Nome	Sequência nucleotídica (5' → 3')	Enzima	Tamanho (pb)	CG (%)	T _M (°C)
AQP3_Fw	GG <u>ACTAGT</u> CCTATGGGTCGACAGAAGGAGTTGAT	<i>SpeI</i>	34	50,0	63,7
AQP3_Bw	CC <u>ATCGAT</u> GGAGATCTGCTCCTTGTGCTTCATGT	<i>ClaI</i>	34	50,0	65,0
AQP7_Fw	GG <u>ACTAGT</u> CCTATGGTTCAAGCATCCGGGCACAG	<i>SpeI</i>	34	55,9	66,3
AQP7_Bw	CC <u>ATCGAT</u> GGAGAAGTGCTCTAGGGCCATGGATTCAT	<i>ClaI</i>	37	51,4	66,5

A Figura IV.3 resume esquematicamente a estratégia que se adoptou para o desenho dos *primers* específicos que permitem a amplificação de cada sequência-alvo e também a clonagem dos fragmentos amplificados no vector de expressão, pela adição das sequências de corte das enzimas de restrição escolhidas.

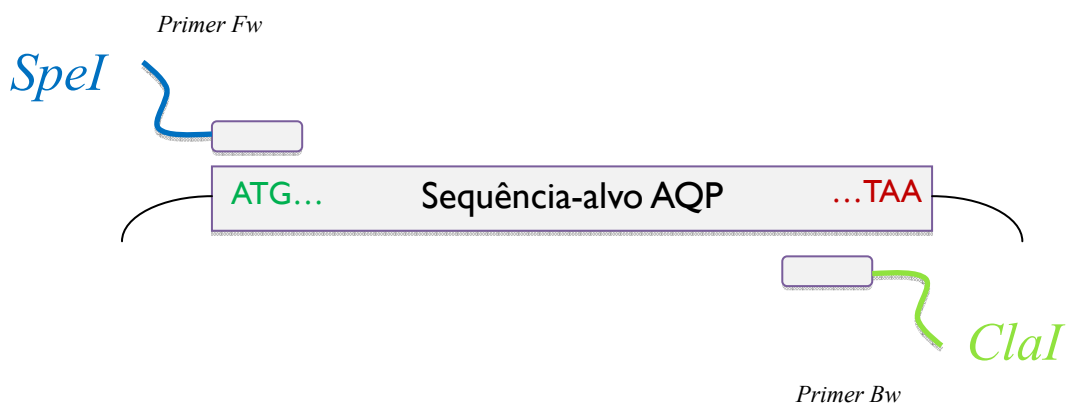


Figura IV.3 – Esquema ilustrativo do desenho dos *primers* específicos para o início e para o final (à exceção do codão stop) de cada sequência alvo para permitir a co-expressão da aquaporina e da yEGFP.

1.2. Otimização das condições e amplificação da sequência codificante da AQP3 e AQP7

Na reacção de PCR existem três etapas que são dependentes da temperatura: i) desnaturação do DNA molde; ii) hibridação entre o DNA molde e os *primers* e iii) polimerização pela DNA polimerase [60]. A especificidade e sucesso da reacção de PCR depende de várias variáveis, entre elas, a temperatura de hibridação.

Para otimizar a reacção de amplificação foi realizado um gradiente de temperaturas para se seleccionar as temperaturas óptima de hibridação dos *primers* desenhados, com vista a obter-se uma maior especificidade e maior quantidade de produto amplificado.

Como vimos, os *primers* desenhados contêm uma sequência que é específica para o início e fim de cada sequência codificante e também uma sequência de reconhecimento de enzimas de restrição, que não é complementar com o DNA molde. Nos primeiros ciclos de amplificação, a hibridação ocorre apenas entre a sequência codificante e a sequência específica do *primer* para ela desenhada, só ao fim de alguns ciclos, existe um número suficiente de cópias contendo já os locais de reconhecimento das enzimas de restrição. Desta forma foi necessário otimizar a temperatura dos primeiros ciclos (Gradiente 1) e dos restantes (Gradiente 2), para cada par de *primers*. Este procedimento está descrito no ponto 2.4 dos Materiais e Métodos, bem como o intervalo de temperaturas escolhidos para cada gradiente.

Como se pode observar na Figura IV.4 todos os oito conjuntos de temperaturas testados para cada sequência codificante, permitiram a amplificação com sucesso dos respectivos fragmentos em estudo (888 pb para a AQP3 e 1042 pb para a AQP7).

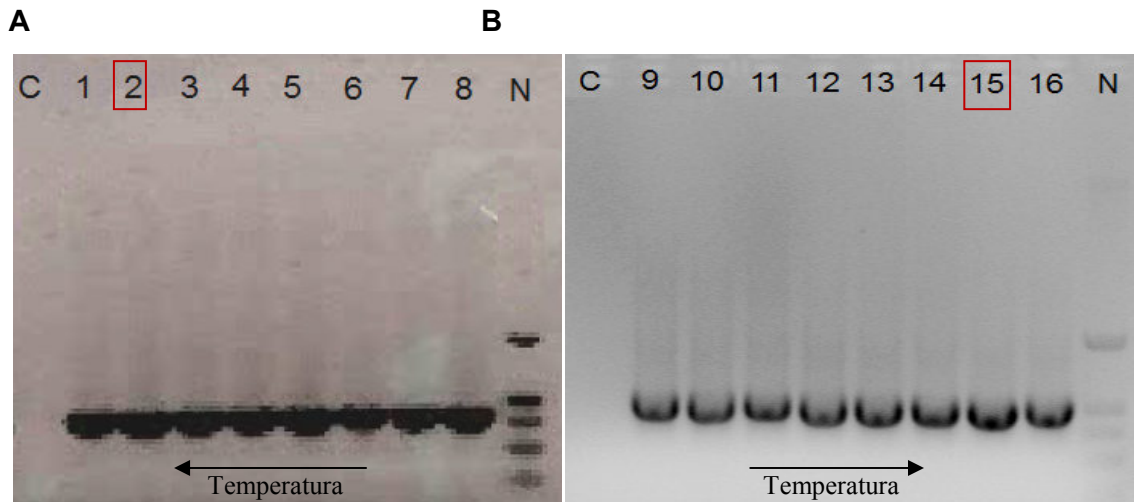


Figura IV.4 – Perfil de amplificação por PCR de gradiente de temperaturas da AQP3 (A) e da AQP7 (B). Foram feitos dois gradientes para as temperaturas dos dois ciclos de hibridação. As temperaturas testadas para o Gradiente 1 e Gradiente 2, foram respectivamente, para a AQP3: **1**-56 e 65 °C; **2**-55,4 e 64,5 °C; **3**-54,3 e 63,3 °C; **4**-52,3 e 61,4 °C; **5**-49,9 e 58,9 °C; **6**-48 e 57 °C; **7**-46,6 e 55,7 °C; **8**-46 e 55 °C; e para a AQP7: **9**- 51 e 57 °C; **10**- 51,9 e 58 °C; **11**- 53,3 e 59,3 °C; **12**- 55 e 61 °C; **13**- 57,3 e 63,3 °C; **14**- 59,1 e 65,1 °C; **15**- 60,3 e 66,3 °C; **16**- 61 e 67 °C; C- controlo negativo da reacção de PCR; N- marcador NZYDNAladder I da NZYTech.

No entanto, para obter as melhores condições para a amplificação da sequência da AQP3 foi escolhido o conjunto de temperaturas 2 (55,4 e 64,5 °C) e para a amplificação da sequência codificante da AQP7, o conjunto de temperaturas 15 (60,3 e 66,3 °C). Esta escolha recaiu sobre o facto de, a temperaturas mais baixas existir maior probabilidade de ocorrer amplificações não-específicas de outras regiões do DNA molde, e também ser aconselhável evitar-se a temperatura mais alta onde os *primers* podem não hibridar eficientemente [60].

Uma vez optimizadas as temperaturas de hibridação dos *primers* para o primeiro ciclo e segundo ciclo de amplificação, foi realizado um PCR em larga escala com as temperaturas escolhidas de forma a obter os fragmentos em quantidade suficiente para o passo de clonagem no vector pUG35.

1.3. Ligação do produto amplificado

Após a amplificação com sucesso das sequências desejadas, o produto de PCR foi purificado, quantificado e sujeito a digestão com as enzimas de restrição *SpeI* e *ClaI* de modo a originar extremidades coesivas. Em simultâneo com a digestão do produto de PCR, o vector pUG35 é também digerido com as mesmas enzimas.

Resultados e Discussão

O último passo da construção dos plasmídeos recombinantes é a ligação das sequências amplificadas com o vector pUG35, ambos digeridos com as enzimas *SpeI* e *ClaI*. Esta reacção é catalisada pela enzima DNA ligase que é responsável pela formação de uma ligação fosfodiéster entre a extremidade 3'-hidroxilo de um nucleótido de um fragmento de DNA com a extremidade 5'-fosfato de outro nucleótido do segundo fragmento de DNA.

Uma vez concluída a ligação do produto de PCR amplificado com o vector pUG35, transformaram-se células competentes de *E. coli* DH5 α com os produtos de ligação. Através de um choque térmico, as células competentes permitem a entrada através da membrana celular dos plasmídeos recombinantes. Como o plasmídeo pUG35 possui um gene de resistência à ampicilina (marca de selecção), quando as células transformadas são inoculadas num meio sólido e selectivo, devido à adição de ampicilina, o antibiótico vai impedir o crescimento de células que não incorporaram o plasmídeo. A ampicilina impede a síntese da camada de peptidoglicano que faz parte da constituição da membrana celular de *E. coli*. O gene de resistência à ampicilina contido no vector pUG35 codifica para a enzima β -lactamase que quebra ligações específicas na molécula de ampicilina, dessa forma, as células que incorporarem o plasmídeo são resistentes ao antibiótico. À medida que a célula hospedeira se multiplica, o vector também se replica autonomamente e é passado para as células-filhas. Desta forma cria-se uma população de células idênticas (clones) que resulta numa colónia visível a olho.

Após 24h de incubação a 37 °C, obteve-se um grande número de colónias em todas as proporções testadas, que foram repicadas para novas placas para diminuir o aparecimento de colónias satélite, que surgem em placas com incubações prolongadas. As colónias satélite caracterizam-se por crescerem à volta de colónias transformantes devido à difusão da enzima que degrada a ampicilina (β -lactamase) ao longo do tempo.

1.4. Selecção de colónias contendo o produto amplificado

Antes de se prosseguir para futuras experiências com os plasmídeos foi necessário confirmar a presença do fragmento de interesse. A reacção de ligação do inserto ao vector não é 100% eficiente porque as duas extremidades do vector podem voltar a ligar-se (*self-ligation*), diminuindo assim a quantidade de vector disponível para incorporar o fragmento e levando a que o produto da reacção de ligação possa conter, para além do plasmídeo com o fragmento clonado, plasmídeo vazio. As células de *E. coli* transformadas anteriormente podem ter incorporado algum plasmídeo re-ligado (sem fragmento) e também estas células irão crescer no meio selectivo. Para distinguir quais as colónias que incorporaram o plasmídeo com o fragmento, inoculou-se cada uma das colónias isoladas e repicadas para uma nova placa para posterior extracção do DNA plasmídico. O método de extracção utilizado permite um rastreio

rápido das colónias apenas pela comparação do tamanho de bandas num gel electroforético. Para isso, foram escolhidas de forma aleatória várias colónias de cada construção (pUG35-AQP7 e pUG35-AQP3) para análise.

RASTREIO DA PRESENÇA DE FRAGMENTO

Numa primeira abordagem, foi realizada uma extracção de DNA com fenol-clorofórmio (1:1) das colónias escolhidas. Este método de extracção separa as diferentes moléculas com base nas suas solubilidades em dois líquidos imiscíveis [61]. Por centrifugação é obtida a separação de fases: uma fase orgânica devido ao fenol (de maior densidade), uma interfase e uma fase aquosa (de menor densidade). Ao usar-se um pH alcalino (pH= 12,4), os grupos fosfatos do esqueleto dos ácidos nucleicos estão carregados negativamente e por isso, o DNA e RNA são solúveis na fase aquosa. Por outro lado, a presença do fenol causa a precipitação das proteínas que ficam retidas na interfase. A adição de clorofórmio assegura uma nítida divisão entre a fase orgânica e aquosa o que diminui a probabilidade de contaminação por proteínas, aquando da recolha da fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos [61]. A fase aquosa foi então recolhida e analisada por electroforese em gel de agarose (Figura IV.5).

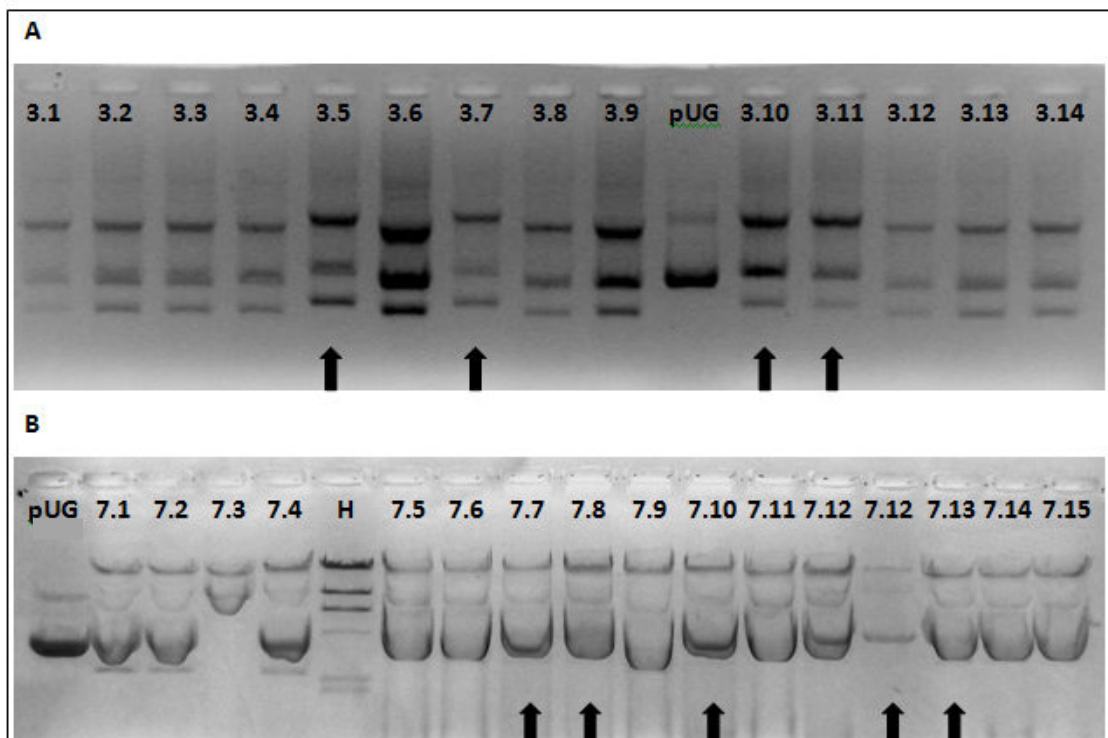


Figura IV.5 – Exemplos dos padrões obtidos na extracção por fenol-clorofórmio dos plasmídeos de algumas das colónias escolhidas da construção pUG35-AQP3 (A) e pUG35-AQP7 (B). **pUG**- pUG35 vazio. **H**- marcador λ DNA/*Hind*III. As setas (\uparrow) indicam as colónias seleccionadas para prosseguir. A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 60 min a 80V.

Resultados e Discussão

Este método de extracção de DNA é uma abordagem bastante rápida visto minimizar o número de etapas de extracção e não ser necessário um passo de precipitação [62]. Este método permitiu seleccionar de uma forma rápida, potenciais colónias contendo o fragmento apenas por comparação directa com o tamanho do plasmídeo vazio não digerido. Uma banda que esteja acima da banda correspondente à banda do pUG35 vazio, significa que o plasmídeo dessas colónias tem mais pares de bases e por isso é um forte candidato a conter o inserto de interesse. Com base neste princípio foram seleccionadas quatro colónias da construção pUG35-AQP3 (3.5, 3.6, 3.10 e 3.11) e cinco colónias da construção pUG35-AQP7 (7.7, 7.8, 7.10, 7.12 e 7.13), para prosseguir para a confirmação por PCR e digestão enzimática. Esta confirmação é necessária para garantir o sucesso da clonagem do fragmento de interesse no vector de expressão.

CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE FRAGMENTO

Para confirmação da presença de fragmento, os plasmídeos que se mostraram positivos nesta primeira abordagem são sujeitos a uma segunda abordagem. Esta abordagem passou por extrair novamente os plasmídeos das colónias seleccionadas anteriormente, desta vez pelo método de lise alcalina (extracção mais fina) e utilizá-los como molde para uma nova reacção de PCR e digestão com enzimas de restrição. Utilizando *primers* específicos para as regiões do plasmídeo pUG35 que flanqueiam o local de inserção do fragmento espera-se obter amplificação do tamanho do fragmento nas várias colónias e ao sujeitar os plasmídeos a uma digestão enzimática espera-se obter fragmentos do tamanho esperado.

O perfil de amplificação correspondente às cinco colónias da construção pUG35-AQP7 encontra-se na Figura IV.6.

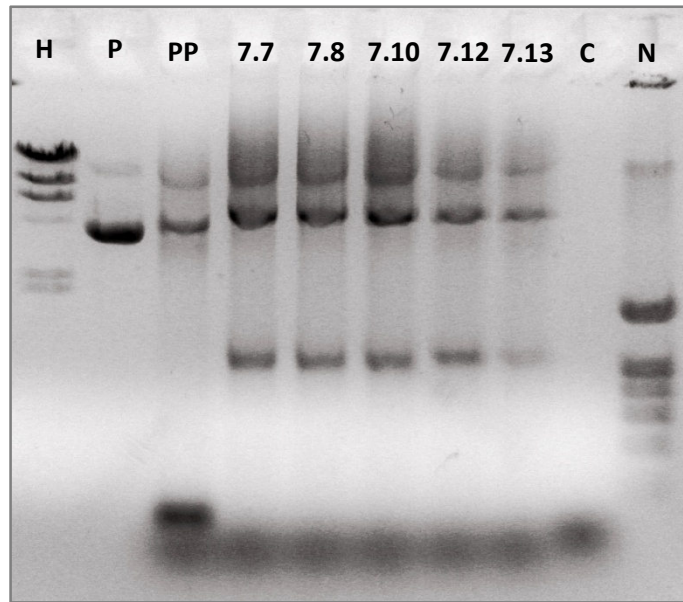


Figura IV.6 – Exemplo da amplificação da sequência da AQP7 obtida por PCR, utilizando como DNA molde os plasmídeos seleccionados entre os transformantes que possivelmente contêm o fragmento. **H**- marcador λ DNA/*Hind*III, **N**- marcador NZYDNA ladder I, **P**- pUG35 vazio, **PP**- pUG35 vazio sujeito também à reacção de amplificação, **C**- controlo negativo da reacção de PCR. A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 60 min a 80V.

Pela análise da Figura IV.6 verificou-se que houve amplificação da sequência da AQP7 (1042pb) em todos os plasmídeos que foram seleccionados anteriormente. No caso dos transformantes com pUG35-AQP3, obteve-se também bandas de tamanho similar (dados não apresentados).

Paralelamente à reacção de amplificação por PCR procedeu-se também a uma digestão enzimática com enzimas de restrição dos plasmídeos extraídos de forma a verificar a correspondência de tamanhos dos fragmentos digeridos. O tamanho dos fragmentos esperados encontra-se na Tabela IV.3.

Tabela IV.3 – Tamanho dos fragmentos esperados após digestão dos três plasmídeos com as enzimas *Spe*I e *Cla*I.

Construção	Enzimas de restrição	Tamanho aproximado dos fragmentos esperados após digestão (pb)
pUG35-AQP3	<i>Spe</i> I e <i>Cla</i> I	888 e 6188
pUG35-AQP7	<i>Spe</i> I e <i>Cla</i> I	1042 e 6188
pUG35	<i>Spe</i> I e <i>Cla</i> I	6188

Resultados e Discussão

Após a digestão, os resultados foram visualizados por electroforese em gel de agarose 1% (p/v) e observa-se a presença dos fragmentos de tamanho esperado em todos os plasmídeos que foram testados (Figura IV.7).

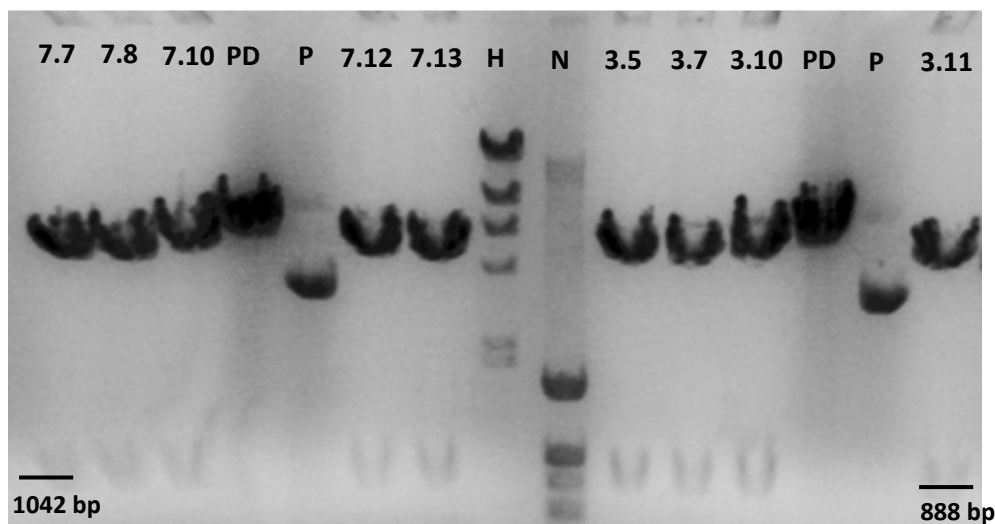


Figura IV.7 – Electroforese em gel de agarose do resultado da digestão com *SpeI* e *ClaI* dos plasmídeos extraídos. P- pUG35 vazio, PD- pUG35 vazio sujeito também à reacção de digestão, H- marcador λ DNA/*HindIII*, N- marcador NZYDNA ladder I. A corrida electroforética decorreu durante aproximadamente 60 min a 80V.

Após a confirmação da presença do inserto nos vários plasmídeos extraídos das colónias seleccionadas, foi necessário assegurar a integridade da sua sequência nucleotídica. Alguma mutação na sequência, aquando da amplificação, pode traduzir-se num *folding* incorrecto da proteína e/ou perda da sua função biológica.

Dessa forma, o DNA plasmídico de dois transformantes que apresentaram um resultado positivo na digestão enzimática com as enzimas *SpeI* e *ClaI* e que apresentaram amplificação do tamanho do inserto em questão foram enviados para sequenciação (colónias 3.5 e 3.7 da construção pUG35-AQP3 e colónias 7.7 e 7.8 para a construção pUG35-AQP7). Os resultados foram analisados recorrendo ao *software* BioEdit e alinhados com a sequência da aquaporina em questão disponível na base de dados NCBI. A existência de mutações nas sequências clonadas não foi observada, verificando-se assim a integridade das sequências. Os alinhamentos encontram-se em anexo (Figura VII.2 e Figura VII.3).

2 Expressão heteróloga da AQP3 e AQP7 em *S. cerevisiae* YSH 1770

Após confirmação da presença e integridade das sequências codificantes nos plasmídeos construídos, avançou-se para a transformação da estirpe de *S. cerevisiae* YSH 1770

com os plasmídeos provenientes das colónias 3.5 (construção pUG35-AQP3) e 7.7 (construção pUG35-AQP7).

2.1. Detecção da localização celular utilizando GFP como repórter

A proteína verde fluorescente mais conhecida por GFP (*Green Fluorescent Protein*), proveniente do cnidário *Aequorea victoria*, tem sido das proteínas mais utilizadas em biologia celular devido às suas variadas aplicações. Pela sua capacidade de emitir fluorescência na zona do visível sem necessitar de co-factores, é utilizada como marcador de níveis de expressão genética e como proteína de fusão de forma a monitorizar a localização subcelular de proteínas de interesse, *in vivo* [63, 64]. No entanto, a sua sequência genética foi alvo de modificações com o objectivo de melhorar o desempenho da proteína. Cormack e colegas construíram um gene sintético da GFP em que optimizaram os codões para a tradução em *Candida albicans* e incorporaram ainda duas mutações na região do cromóforo que aumentam a fluorescência emitida pela proteína [65]. Desta forma construíram uma GFP melhorada, conhecida como yEGFP (*yeast-enhanced GFP*) que pode ser usada como gene repórter em leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, de forma mais eficiente [65].

No contexto deste trabalho, a clonagem das sequências codificantes das aquaporinas de forma a criar uma fusão com o gene yEGFP, contido no vector de expressão, permite rapidamente observar a localização celular das aquaporinas por microscopia de fluorescência. Antes de se prosseguir para os estudos funcionais e para a caracterização do transporte das aquaporinas é necessário garantir a localização membranar das proteínas e avaliar o nível de expressão proteica.

Na Figura IV.8, em células de *S. cerevisiae* YSH 1770 transformadas com o plasmídeo pUG35 vazio, observa-se que a proteína GFP é de facto expressa mas que se encontra distribuída homogeneamente no citoplasma celular. Isto é devido ao facto de a GFP, nestas células, não estar fusionada com qualquer aquaporina, não possuindo por isso sinalização membranar.

Resultados e Discussão

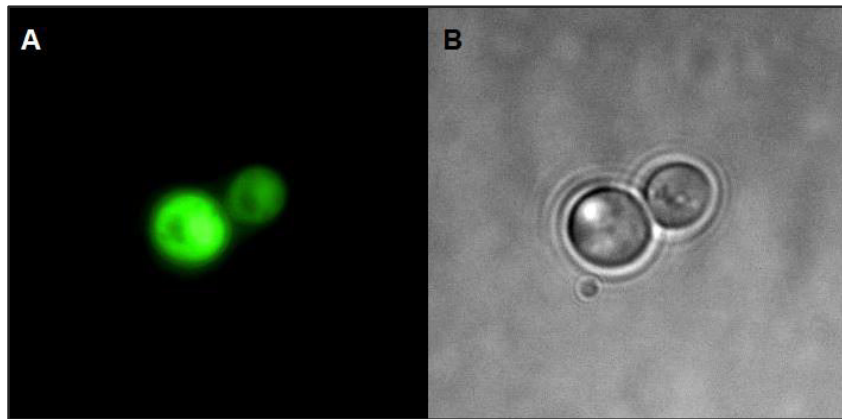


Figura IV.8 – Exemplo de fotografias obtidas por microscopia de fluorescência (A) e de luz visível (B) de células de *S. cerevisiae* YSH 1770 transformadas com o plasmídeo pUG35 sem inserto.

Por comparação com as células transformadas com o plasmídeo que contém a proteína GFP fusionada no lado C-terminal da sequência da aquaporina, verifica-se uma distribuição celular muito mais restrita e localizada na membrana plasmática, apesar de se também visualizar a expressão em membranas intracelulares, no retículo endoplasmático [66], possivelmente numa fase prévia ao seu transporte para a membrana plasmática(Figura IV.9).

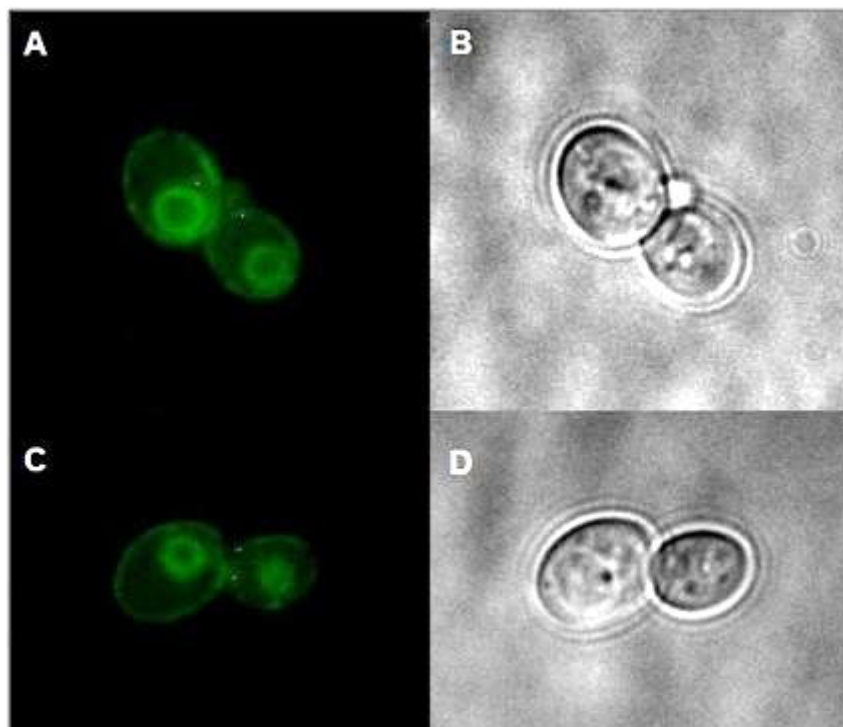


Figura IV.9 - Exemplo de fotografias obtidas por microscopia de fluorescência (A e C) e de luz visível (B e D) de células de *S. cerevisiae* YSH 1770 transformadas com o plasmídeo recombinante pUG35-AQP3 (A) e pUG35-AQP7 (C).

Como as diferenças de intensidade no sinal de fluorescência proveniente da GFP de célula para célula estão relacionadas directamente com os níveis de expressão da proteína em cada célula, é possível observar que existem níveis baixos de expressão de ambas as aquaporinas na membrana celular.

2.2. Resposta osmótica celular

Como vimos na introdução deste trabalho, as células são capazes de responder a perturbações do meio exterior, variando o seu volume celular devido a fluxos de água e soluto.

Antes da caracterização do transporte de água e glicerol mediado pelas aquaporinas, iremos primeiro observar as simulações do modelo matemático descrito e aceder ao comportamento das células quando expostas a determinadas perturbações. Nesta explicação, para fácil compreensão, serão utilizados os sinais obtidos apenas para uma das estirpes porque para as restantes duas a interpretação de gráficos e o raciocínio adoptado é idêntico, visto que foram efectuados o mesmo tipo de choques osmóticos. De uma forma geral, a única diferença entre os sinais das três estirpes vai residir no tempo em que levam a atingir um novo estado estacionário, devido à maior ou menor presença de aquaporinas.

2.2.1. Calibração de F/F_0 em v_{rel}

EFEITO DE BLEACHING

Os sinais de fluorescência adquiridos antes e após a introdução do choque osmótico não reflectem apenas a variação do volume celular mas também um outro fenómeno chamado de *bleaching* associado às sondas fluorescente que está relacionado com a perda de capacidade de emitir fluorescência, quando o fluóforo é exposto à luz [67].

Para visualizar este efeito (e/ou possível pequena deposição de células durante a aquisição) procedeu-se à aquisição de vários sinais a 23 °C, em que as células são expostas a uma solução isotónica ($\Lambda=1$). Como não existem diferenças de osmolaridade entre o meio extracelular e intracelular ($osm_{out} = osm_{in}$) não existirão alterações do volume e, desta forma, qualquer variação de fluorescência reflecte o efeito de *bleaching*. Experimentalmente, observa-se um decréscimo linear da intensidade de fluorescência ao longo do tempo. Foi feita uma média a um conjunto destes ficheiros com o mesmo tempo e frequência de aquisição e foi considerada como linha de base (Figura IV.10-A).

Para a anulação do efeito de *bleaching* foi sempre subtraída esta linha de base média aos diferentes sinais hiperosmóticos, garantindo assim que a variação da fluorescência apenas se deve à variação do volume celular devida à introdução do choque osmótico (Figura IV.10-B).

Resultados e Discussão

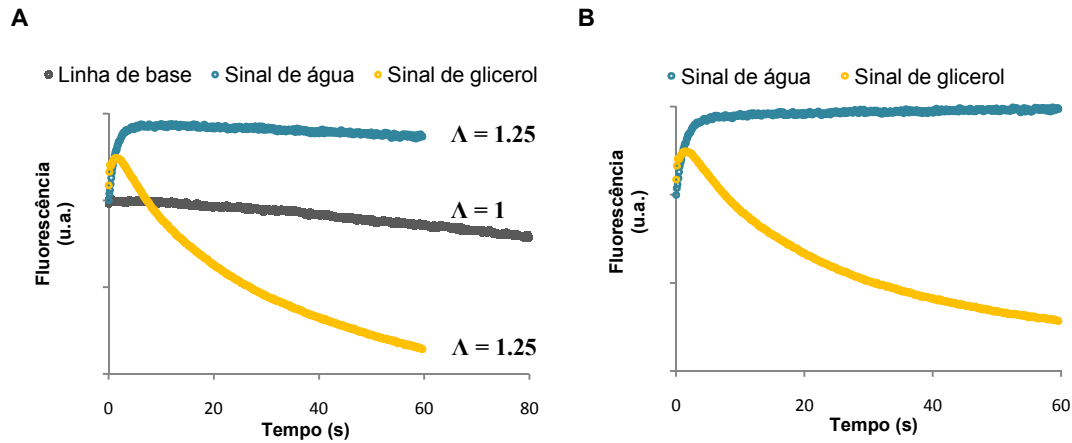


Figura IV.10 – A. Sinais de água (●) e glicerol (●) típicos obtidos a 23 °C, quando sujeitos a um choque hiperosmótico ($\Lambda=1.25$) não-tratados e linha de base média (●) obtida a 23 °C com um choque isosmótico $\Lambda=1$, onde é possível observar o efeito de *bleaching*. B. Sinais de água e sinais de glicerol anteriores, depois da subtração da linha de base.

CALIBRAÇÃO F/F_0 EM V_{REL}

Como já referido na secção de métodos, utilizou-se a relação linear entre v_{rel} e F/F_0 (após subtração do efeito de *bleaching*) e calculados os valores de a (declive) e b (ordenada na origem) para os sinais obtidos com o choque de sorbitol. Estes valores foram usados na calibração dos sinais de fluorescência dos choques osmóticos com glicerol, onde existem fluxos simultâneos de água e glicerol.

No painel A da Figura IV.11 mostram-se os valores experimentais de F/F_0 (azul, após subtração do *bleaching*) e os respectivos valores calibrados de v_{rel} (vermelho) para o choque com sorbitol, e no painel B as curvas obtidas para o choque com glicerol (F/F_0 (amarelo, após subtração do *bleaching*) e v_{rel} (verde). A estimativa das permeabilidades foi feita através da simulação numérica do modelo matemático (descrito nos métodos) por ajustamento das curvas teóricas de v_{rel} às respectivas curvas experimentais (linhas a preto).

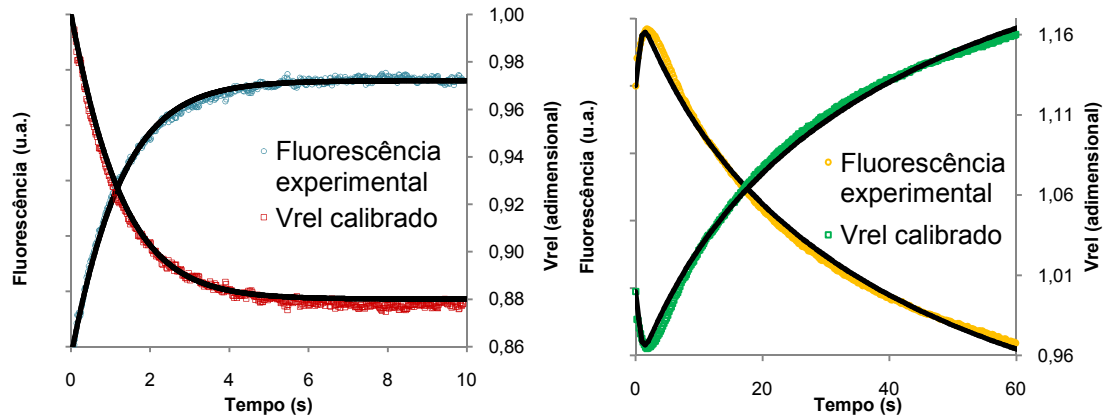


Figura IV.11 – Sinal de fluorescência obtido quando células da estirpe YSH 1770/pUG35-rAQP3 são expostas a um choque osmótico de $\Lambda=1.25$ com a adição de sorbitol, soluto impermeante (A) e com a adição de glicerol, soluto permeante (B) e respectivas calibrações para volume relativo.

2.2.2. Dependência de v_{rel} nos gradientes de solutos

SORBITOL, UM SOLUTO IMPERMEANTE

Através da técnica de fluxo interrompido, quando se introduz um choque osmótico de tonicidade $\Lambda=1.25$ com adição de um soluto impermeante, observa-se uma variação de v_{rel} típica como o da Figura IV.11.A.

Quando se introduz um choque osmótico deste tipo cria-se imediatamente um gradiente de pressão osmótica, devido às diferenças de concentração entre o meio extracelular e o intracelular. Este gradiente provoca a saída de água do interior das células, o que se reflecte na diminuição do volume celular relativo. Na Figura IV.12 A é possível observar a variação da amplitude do gradiente de pressão osmótica em relação ao volume relativo.

Resultados e Discussão

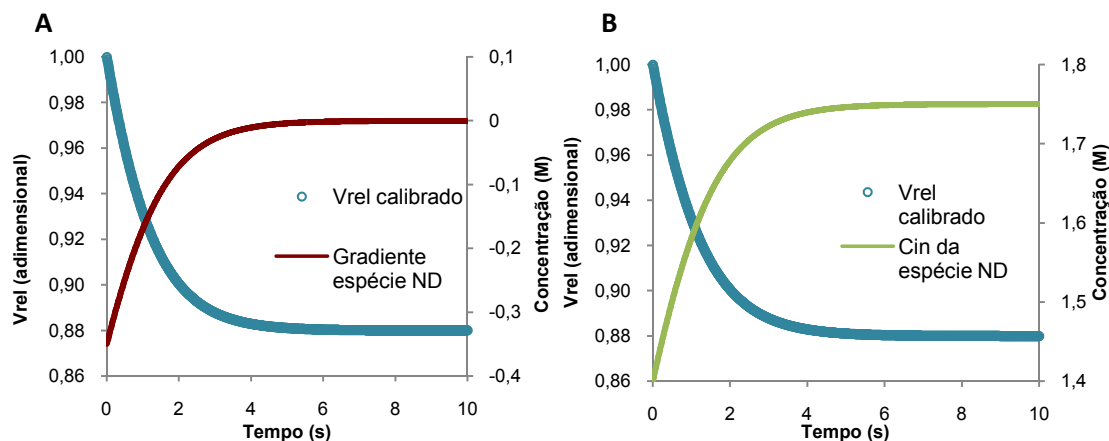


Figura IV.12 – Variação do volume relativo celular quando se introduz um choque osmótico de tonicidade $\Lambda=1.25$ com adição de soluto impermeante (sorbitol) e simulação da variação do gradiente de pressão osmótica criado por este (A) e simulação da variação da concentração interna de espécies não-difusíveis (B), ao longo do tempo.

No instante inicial, quando se introduz o choque osmótico, o gradiente apresenta o seu valor absoluto máximo (-0.35 M) que é dado por:

$$\Delta\Pi_{ND} = RT(C_{ND_{in}} - C_{ND_{out}})$$

$$\Delta\Pi_{ND} = RT(1.4 \text{ M} - 1.75 \text{ M}) = -RT 0.35 \text{ M}$$

Um valor de gradiente negativo, significa que o meio extracelular encontra-se momentaneamente mais concentrado que o meio intracelular, fazendo com que exista um fluxo de saída de água. À medida que a água sai da célula, o seu volume vai diminuindo ao longo do tempo até que $(osm_{in})_{\infty} = (osm_{out})_{\infty}$. Nesta altura o gradiente de pressão osmótica dissipa-se completamente ($\Delta\Pi_{ND} = 0$) por não haver mais diferenças de concentração e o volume celular estabiliza no seu valor final e a célula atinge assim um novo equilíbrio osmótico. O gradiente de pressão osmótica dissipa-se ao longo do tempo porque com a saída inicial de água há variação da concentração interna de espécies não-difusíveis (Figura IV.12 B). A quantidade das espécies intracelulares mantém-se constante durante toda a perturbação mas à medida que o volume celular diminui a concentração destas espécies intracelulares aumenta o que provoca a igualdade de concentrações de solutos do meio externo e interno.

GLICEROL, UM SOLUTO PERMEANTE

Por outro lado, no caso de termos um choque osmótico com a adição de um soluto permeante, como é o caso do glicerol, o seu movimento através da membrana será também

observado para além do fluxo de água. A variação de v_{rel} típica de uma experiência com estas condições encontra-se na Figura IV.11.A.

Numa primeira fase é observado um rápido decréscimo de volume devido a um rápido fluxo de água devido ao gradiente de pressão osmótica criado e, numa segunda fase observa-se uma variação de volume devida aos fluxos de entrada de glicerol simultâneos com a entrada de água. De facto, os dois fluxos (de água e glicerol) iniciam-se ao mesmo tempo mas o movimento de água é muito mais rápido na escala de tempo de observação, o que determina este tipo de variação de volume (diminuição seguida de aumento).

Para melhor entender estas variações de volume, a Figura IV.13 mostra, na mesma escala de tempo, as simulações da variação do gradiente osmótico associado à variação de volume e às variações das concentrações das espécies intracelulares e do glicerol, também associadas à variação de volume e à entrada de glicerol.

No instante em que se introduz a perturbação, o gradiente total é negativo sendo o fluxo de água de saída, causando uma diminuição de volume. A determinada altura o volume celular inverte a sua tendência de descida, pois o gradiente total, anteriormente negativo, passa a ser positivo. Nesse momento o gradiente das espécies ND torna-se superior, em valor absoluto, ao do glicerol, causando uma entrada de água.

Em relação às concentrações intracelulares, estas variam até igualarem as concentrações externas. A concentração intracelular das espécies não difusíveis ($C_{in\ ND}$) segue a variação de volume até igualar a concentração externa de sorbitol, enquanto que a concentração intracelular de glicerol ($C_{in\ S}$) aumenta até ao seu valor final igual à sua concentração externa.

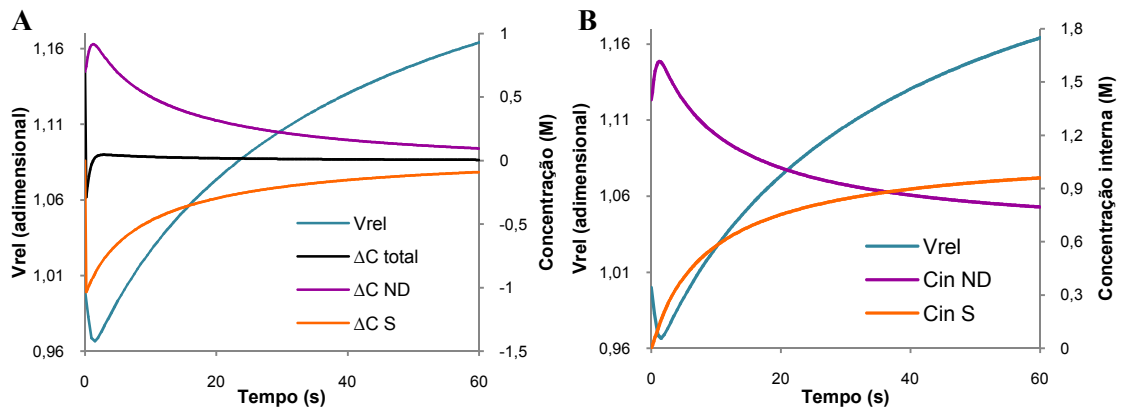


Figura IV.13–(A) Variação do volume relativo e simulação da variação do gradiente de pressão osmótica criado por este, ao longo do tempo e (B) simulação da variação das concentrações intracelulares das espécies não-difusíveis.

2.3. Estimativa dos coeficientes de permeabilidade e energias de activação

A água pode movimentar-se através da membrana celular através de duas vias: *i)* difusão através da bicamada lipídica (à qual está associada uma elevada energia de activação) e *ii)* através de canais específicos (à qual está associada uma baixa energia de activação).

O coeficiente de permeabilidade osmótica (P_f) e o coeficiente de permeabilidade do soluto (P_s) são parâmetros importantes na caracterização quer do transporte de água quer do transporte de soluto através das membranas. O valor absoluto de P_f e P_s permite-nos prever se o transporte membranar é facilitado por canais (como as aquaporinas ou aquagliceroporinas) ou através da camada bilipídica. A energia de activação (E_a) é um outro parâmetro bastante útil para prever a presença de canais transportadores nas membranas celulares. A E_a é uma medida da energia envolvida no processo de transporte de água ou soluto através da membrana. Valores de E_a muito elevados estão associados fundamentalmente ao transporte através da bicamada lipídica, significando uma grande barreira energética relacionada com a energia envolvida no processo de quebra de ligações de hidrogénio entre as moléculas de água e/ou de solutos e sua transferência para o meio lipídico. A presença de canais transportadores permite a formação de ligações entre moléculas transportadas e as paredes do canal, baixando a energia de activação do transporte.

O fluxo de total de água (ou soluto) que atravessa a membrana de uma célula é a soma dos fluxos através das duas vias e, por isso, o valor total de P_f (ou P_s) e da E_a associada ao transporte está dependente da contribuição relativa de cada uma das vias. No caso presente quanto maior for a expressão das aquaporinas maior será o valor das permeabilidades e menor o valor de E_a associado ao transporte.

Desta forma, para a estimativa dos coeficientes de permeabilidade (P_f e P_s) e cálculo da E_a associada foram adquiridos vários sinais a temperaturas diferentes (Anexo 6), como descrito no capítulo II. Estes sinais obtidos foram calibrados, como já previamente descrito, pelo que já não serão apresentados sinais de fluorescência, apenas de v_{rel} . A optimização dos valores das permeabilidades foi feita pelo assentamento das curvas teóricas aos dados experimentais, utilizando o modelo matemático implementado no *software* Berkeley Madonna. (<http://www.berkeleymadonna.com>).

CARACTERIZAÇÃO DO TRANSPORTE DE ÁGUA

A Figura IV.14 compara a variação de v_{rel} após um choque osmótico com sorbitol a 23°C para as três estirpes, em que os valores estimados de P_f foram para o pUG35 vazio (controlo), AQP3 e AQP7 de $4,00 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, $5,34 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, $5,93 \times 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente.

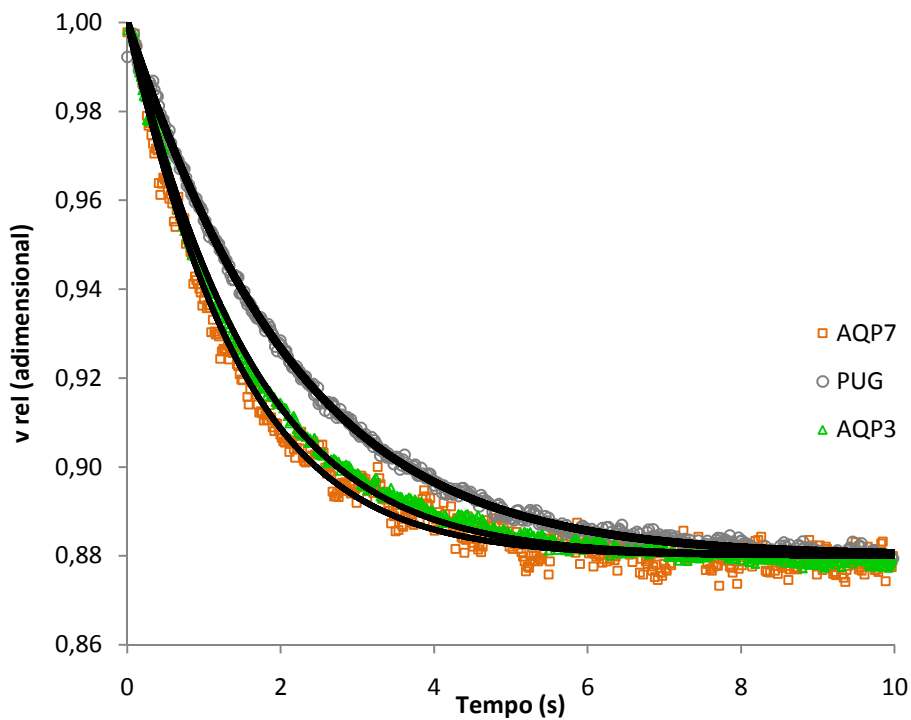


Figura IV.14 – Comparação da variação de v_{rel} das três estirpes, quando sujeitas a um choque osmótico com sorbitol ($\Lambda=1.25$) a 23 °C e a pH 7,4.

O cálculo da E_a relativo ao transporte de água é feito a partir da representação gráfica de Arrhenius dos valores de P_f estimados para as várias temperaturas testadas (Figura IV.15). O valor de E_a determinado para o transporte de água para a estirpe controlo foi de $14.45 \text{ kcal mol}^{-1}$ e para as estirpes que sobre-expressam a AQP3 e AQP7 foi de $12.67 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $13.24 \text{ kcal mol}^{-1}$ respectivamente. Como a estirpe controlo (YSH 1770/pUG35) não sobre-expressa nenhuma aquaporina endógena ou de mamífero, considera-se que esta estirpe representa apenas o transporte através da bicamada lipídica.

Resultados e Discussão

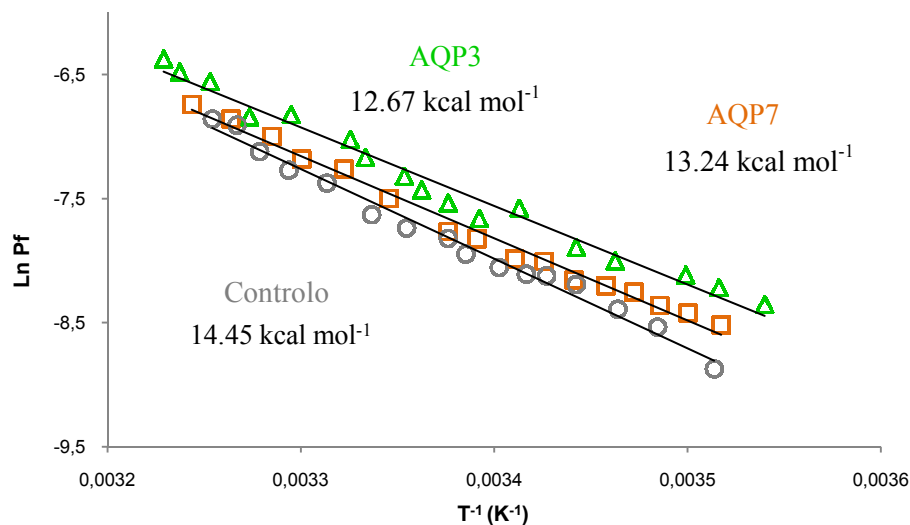


Figura IV.15 – Representação gráfica de Arrhenius dos ensaios de permeabilidade à água para cada estirpe, quando sujeitas a um choque osmótico com sorbitol de tonicidade $\Lambda=1.25$, a pH 7,4. A escala de temperaturas varia de 9 °C (282 K) a 37 °C (310K). As energias de activação (E_a) para cada estirpe foram calculadas a partir dos declives das linhas de tendência.

Quando se analisam as ordens de grandeza quer dos valores dos P_f quer de E_a para as estirpes que sobre-expressam a AQP3 e AQP7, os valores de P_f e a diminuição verificada da energia de activação são pequenos, indiciando que houve um baixo nível de expressão destes canais na membrana ou os canais expressos não estarem funcionais. Contudo, quer os valores de permeabilidades obtidos para as diferentes temperaturas, quer as energias de activação calculadas são significativamente diferentes, apontando para expressão, embora baixa, de aquaporinas activas na membrana.

Para melhor compreensão destes fenómenos, apresenta-se o perfil esperado da variação da E_a consoante o número de canais activos na membrana. Recorreu-se novamente ao *software* de simulação matemática Berkeley Madonna e foram simuladas três situações em que se variou o número de canais activos na membrana: *i*) número muito reduzido, canais quase inexistentes; *ii*) poucos canais; *iii*) número médio de canais e *iv*) presença elevada de canais.

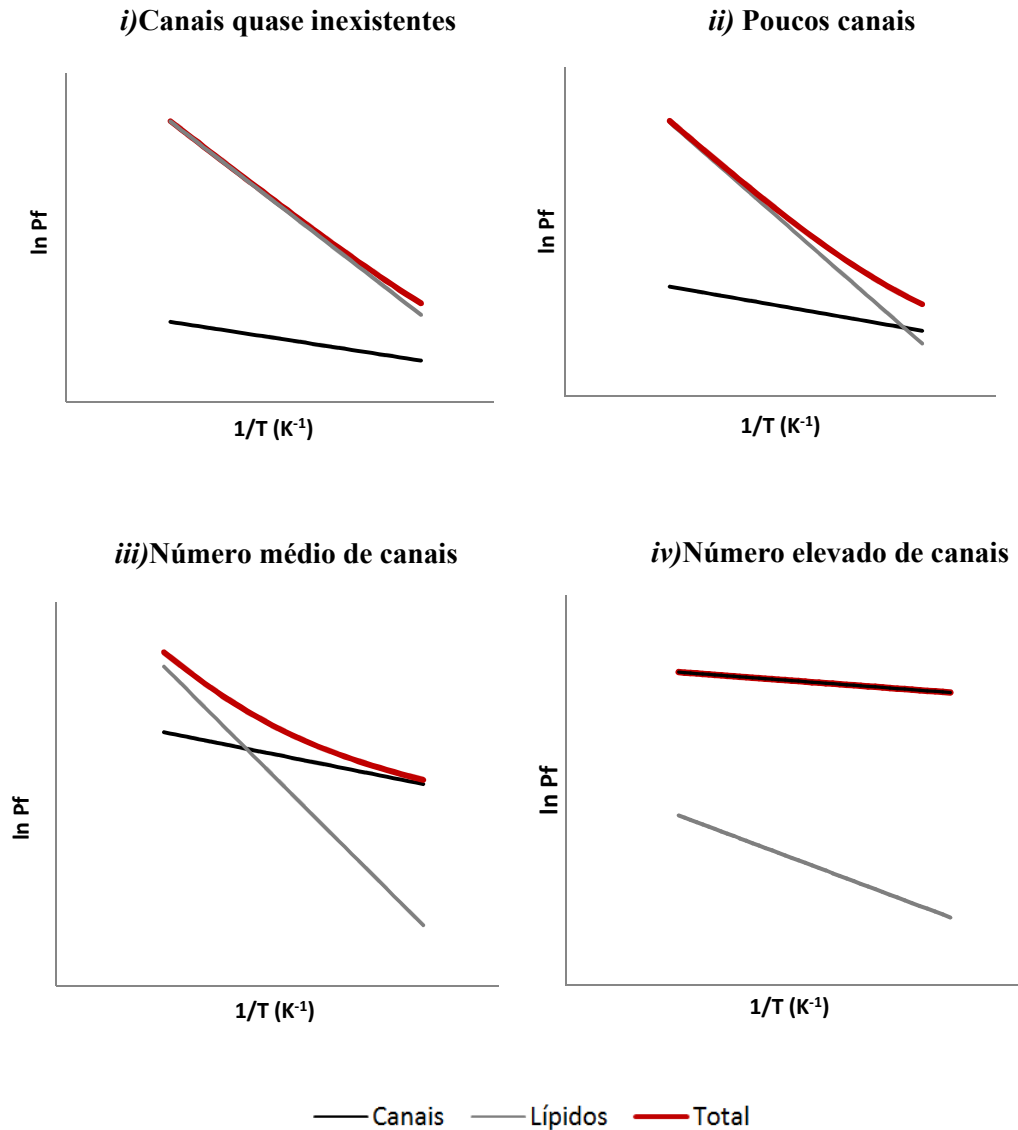


Figura IV.16 – Simulação numérica de um gráfico de Arrhenius em função do número de canais expressos na membrana. As duas linhas sólidas a cinzento e preto representam o comportamento típico da via lipídica e da via facilitada por canais, respectivamente. A linha sólida vermelha representa a soma da contribuição de ambas as vias.

Na Figura IV.16*i*), no primeiro caso em que quase não existem canais activos na membrana, observa-se que só a via lipídica contribui fundamentalmente para o valor total de E_a (as duas linhas estão quase sobrepostas). Se o número de canais activos na membrana aumentar, mas ainda assim o seu número não for suficiente elevado, a E_a total terá já uma pequena contribuição dos canais mas um declive, na maior parte da curva, semelhante ao declive da via lipídica (Figura IV.16*ii*)). É importante referir que, dependendo do intervalo de temperaturas que se considere, observa-se contribuições variáveis das duas vias de transporte. Neste caso, a diferença de contribuição só começa a ser notória a temperaturas mais baixas (lado direito dos gráficos), onde os fluxos de água ocorrem predominantemente através dos canais. A soma das

Resultados e Discussão

duas contribuições origina um gráfico de Arrhenius não-linear. À medida que o nº de canais activos na membrana aumenta, a E_a total reflectirá cada vez mais a contribuição da via proteica em detrimento da via lipídica (Figura IV.16iii)), até que a permeabilidade total seja idêntica à permeabilidade através dos canais, no caso de haver um número elevado destes na membrana (Figura IV.16iv)). Este argumento já foi detalhadamente discutido numa publicação anterior do nosso grupo [68].

Tendo em conta as simulações anteriormente descritas, é possível concluir que os resultados obtidos na caracterização do transporte de água indicam que, de facto, as aquaporinas expressas estão funcionais no entanto, o seu nível de expressão é baixo. Resultado que também é corroborado pelas imagens obtidas por microscopia de fluorescência.

CARACTERIZAÇÃO DO TRANSPORTE DE GLICEROL

Quando se caracteriza o transporte de glicerol é importante ter em conta que a estirpe de *S. cerevisiae* YSH 1770 não está silenciada nos canais de glicerol endógenos; contudo, ao caracterizar a estirpe controlo (YSH 1770/pUG35) a contribuição desse transporte já vem contabilizada e dessa forma considera-se que as diferenças obtidas para as estirpes que sobre-expressam aquaporinas são apenas devidas aos canais expressos.

A Figura IV.17 compara as variações de v_{rel} obtidas após um choque osmótico com glicerol a 23°C para as três estirpes. Pode observar-se que na estirpe controlo há uma pequena entrada de glicerol devido à existência dos canais de glicerol endógenos e observa-se também que a presença de AQP3 ou AQP7, no entanto, aumenta drasticamente essa entrada. Os valores estimados de permeabilidade ao glicerol (P_s) para o PUG vazio (controlo), AQP3 e AQP7 foram de $2,24 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$, $9,70 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$, $1,06 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$, respectivamente.

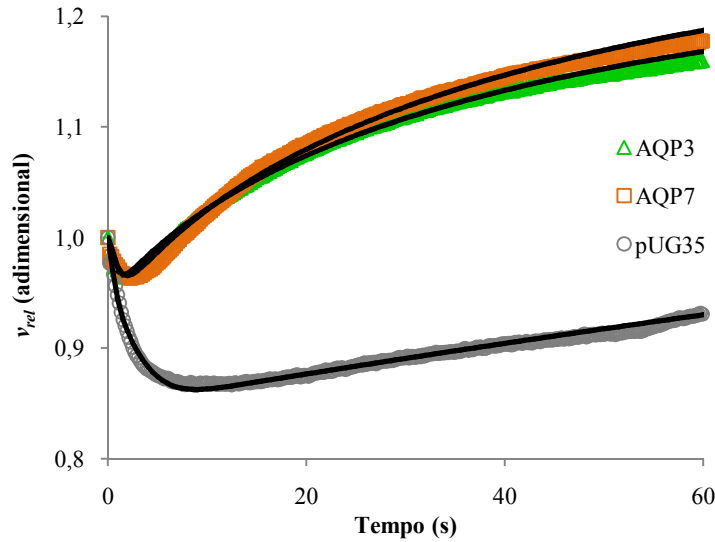


Figura IV.17 - Comparação da variação de v_{rel} das três estirpes, quando sujeitas a um choque osmótico com glicerol ($\Lambda=1.25$) a 23 °C e a pH 7,4.

De facto, quando se comparam os valores de E_a do transporte de glicerol das estirpes transformadas com a AQP3 e AQP7 (E_a , 15.75 kcal mol⁻¹ e 13.09 kcal mol⁻¹, respectivamente) com a estirpe controlo (E_a , 22.19 kcal mol⁻¹), observa-se uma diferença acentuada (Figura IV.18).

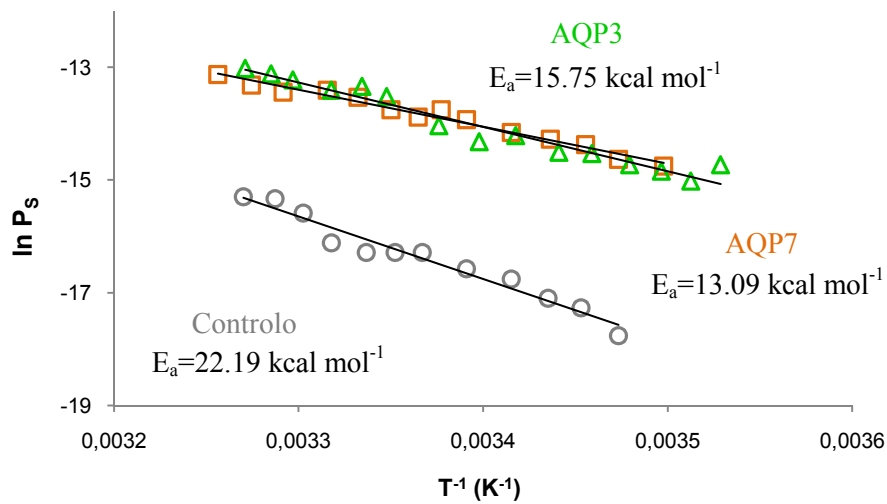


Figura IV.18 - Representação gráfica de Arrhenius dos ensaios de permeabilidade ao glicerol para cada estirpe, quando sujeitas a um choque osmótico com glicerol de tonicidade $\Lambda=1,25$ a pH 7,4. A escala de temperaturas varia de 12 °C (285 K) a 36 °C (309 K). As energias de activação (E_a) para cada estirpe foram calculadas a partir dos declives das linhas de tendência.

Resultados e Discussão

Estes resultados mostram que as aquagliceroporinas conferem uma grande permeabilidade membranar ao glicerol relativamente ao controlo o que demonstra que, embora em pequenos níveis de expressão, estão funcionais. Estas diferenças no transporte de glicerol são mais acentuadas que no transporte de água porque a membrana celular da estirpe controlo é muito menos permeável ao glicerol ($E_a = 22.19 \text{ kcal mol}^{-1}$) que à água, ainda que existam canais endógenos específicos para este soluto. Mesmo em baixo número, as poucas aquagliceroporinas funcionais conseguem aumentar acentuadamente a permeabilidade membranar ao glicerol enquanto que, como a membrana já é muito permeável à água, as diferenças tornam-se pouco notórias no transporte de água.

2.4. Estudos de inibição com o composto organometálico Auphen

São várias as patologias que têm sido associadas à disfunção de aquaporinas, sendo pois importante a descoberta de moléculas capazes de modular a sua actividade. Neste trabalho estudou-se em particular o efeito do Auphen, um composto organometálico de Au (III), que de acordo com resultados anteriores mostrou não afectar significativamente o transporte de água através da AQP3 mas demonstrou uma elevada inibição do transporte de glicerol, o que o torna um potente e selectivo inibidor desta [44]. A observação do efeito deste inibidor serve também para validar o modelo celular de expressão heteróloga de AQP3 e AQP7, tornando-o viável para o rastreio de outras moléculas com possível acção farmacológica.

De forma a avaliar o efeito inibitório do Auphen no transporte de água e glicerol das estirpes, as células inicialmente equilibradas em solução isotónica de sorbitol 1,4 M e incubadas com o inibidor durante 30 min à temperatura ambiente, foram sujeitas ao mesmo tipo de choques hiperosmóticos ($\Lambda=1,25$). Uma vez que toda a estratégia de tratamento e calibração de sinais de fluorescência já foi discutida anteriormente não se irá apresentar graficamente a variação de v_{rel} ao longo do tempo mas apenas, de forma comparativa, os valores de P_f e P_s determinados para as células incubadas com Auphen e as células controlo (sem incubação com Auphen).

Na Figura IV.19 (Painel A) observa-se o efeito do Auphen no transporte de água e no transporte de glicerol (Painel B).

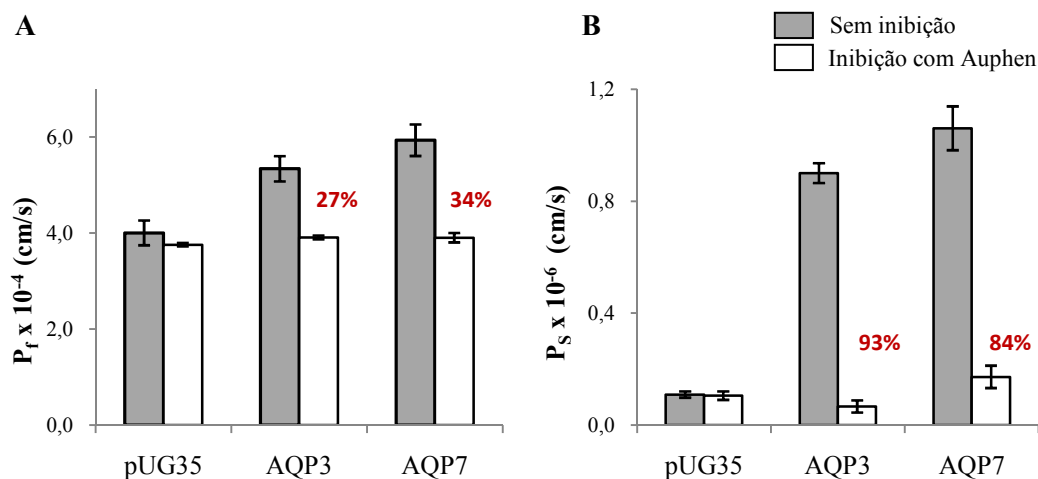


Figura IV.19 – Efeito do Auphen 100 μ M, a 23 $^{\circ}$ C e a pH 7,4, na permeabilidade à água (A) e na permeabilidade ao glicerol (B) das várias estirpes.

TRANSPORTE DE ÁGUA

Para determinar o efeito do Auphen no transporte de água, foram primeiramente determinados os valores de P_f para as células das três estirpes, sem incubação com Auphen. A ordem de grandeza destes valores já foi anteriormente discutida e relacionada com a presença de um número pequeno de canais membranares devido a baixos níveis de expressão genética.

Quando observamos o efeito da incubação com Auphen na estirpe controlo (YSH 1770/pUG35, sem sobre-expressão de aquagliceroporinas) verifica-se que o inibidor não possui um efeito inibidor na permeabilidade à água, visto os valores calculados de P_f não serem significativamente diferentes. Este resultado está de acordo com o facto da estirpe de *S. cerevisiae* utilizada (YSH 1770) estar silenciada em todas as aquaporinas ortodoxas endógenas e a permeabilidade à água ser apenas conferida pela camada bilipídica; desta forma, não existe nenhum canal de água para o qual o Auphen possa ter afinidade e os valores de P_f não variam.

No entanto, quando se analisa os valores de P_f das células que sobre-expressam as aquagliceroporinas em estudo (AQP3 e AQP7), quando incubadas com Auphen, observa-se uma inibição do transporte de água (27 e 34% de inibição). Os valores de P_f estimados para as células inibidas são semelhantes aos valores de P_f da estirpe controlo, o que sugere que o Auphen inibe totalmente o transporte de água através das aquagliceroporinas.

TRANSPORTE DE GLICEROL

O efeito inibitório do Auphen foi também avaliado no transporte de glicerol e comparado entre as três estirpes. Os valores de P_s para as células das três estirpes, sem incubação com Auphen, foram determinados e a sua diferença discutida anteriormente.

Resultados e Discussão

Quando observamos o efeito da incubação com Auphen na estirpe controlo (YSH 1770/pUG35, sem sobre-expressão de aquagliceroporinas) verifica-se que o inibidor não possui qualquer efeito na permeabilidade ao glicerol. Apesar da estirpe de *S. cerevisiae* utilizada (YSH 1770) estar silenciada em todas as aquaporinas ortodoxas endógenas, não o está nos canais de glicerol intrínsecos. Desta forma, verifica-se que o Auphen não possui afinidade para estes canais.

Por outro lado, verificou-se uma grande alteração nos valores de P_s obtidos devido à presença das aquagliceroporinas AQP3 e AQP7, incubadas com Auphen. Estes valores ficaram semelhantes aos valores obtidos para a estirpe controlo (YSH 1770/pUG35) na presença de Auphen, indicando que o inibidor é um inibidor específico destas duas aquaporinas, reduzindo praticamente o comportamento destas duas construções ao comportamento da estirpe sem sobre-expressão. Assim, nestas estirpes que sobre-expressam as aquagliceroporinas AQP3 e AQP7 o efeito inibitório do Auphen é bastante acentuado no transporte de glicerol com inibições de 93 e 84%, respectivamente. Em particular, na estirpe que sobre-expressa a AQP3 essa inibição (93%) demonstra ser total, uma vez que o correspondente valor de P_s assemelha-se aos valores obtidos para a estirpe controlo.

O facto de o Auphen não apresentar afinidade para qualquer transportador de glicerol intrínseco da estirpe de *S. cerevisiae* YSH 1770 mas inibir fortemente o transporte de glicerol das aquagliceroporinas sobre-expressas demonstra que este composto possui um alto poder inibidor e selectivo, como descrito anteriormente, não só para a AQP3 [44] mas também para a AQP7.

V. Conclusões

Conclusões

Este trabalho experimental dividiu-se em três partes importantes: *i*) a construção de um sistema de expressão heteróloga que permitisse a expressão de aquaporinas, de forma individual e, tirar vantagem desse sistema único para *ii*) caracterizar o transporte de água e glicerol das aquaporinas em estudo e *iii*) rastrear moléculas com potencial farmacológico.

Na primeira parte do trabalho foram aplicadas várias técnicas de biologia molecular que envolveram a amplificação e clonagem das sequências-alvo num vector de expressão adequado, o pUG35 e a transformação da estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* YSH 1770 com os plasmídeos construídos. Devido à fusão AQP-GFP foi possível observar a sua localização subcelular, por microscopia de fluorescência. Observou-se que ambas as aquagliceroporinas encontravam-se maioritariamente expressas na membrana de um organito celular – o retículo endoplasmático. No entanto, era também possível observar a sua presença na membrana plasmática.

A segunda parte do trabalho consistiu na caracterização funcional da AQP3 e da AQP7 e para isso foi utilizada a técnica de interrupção brusca do fluxo que permite seguir a variação de volume celular por fluorescência, quando se introduz uma perturbação no meio extracelular. Os fluxos de água através da membrana celular causados por gradientes de pressão osmótica (de solutos impermeantes ou permeantes) provocam alterações transitórias de volume, até se atingir um novo volume final de equilíbrio osmótico. A velocidade com que as alterações de volume ocorrem e o tempo que a célula leva a re-estabelecer o seu novo equilíbrio osmótico dependem directamente das características intrínsecas de transporte da membrana, em particular, da quantidade de canais específicos para a água e para o soluto em questão. De forma a caracterizar o transporte de água e glicerol da AQP3 e AQP7 foram realizadas experiências hiperosmóticas que provocaram alteração de volume celular, a diferentes temperaturas. A construção de um modelo matemático que permite simular o comportamento celular quando sujeitas a este tipo de experiências foi o ponto fulcral na análise dos resultados. Pelo assentamento de curvas teóricas aos dados experimentais, os coeficientes de permeabilidade à água (P_f) e ao soluto (P_s) foram estimados e foram calculadas energias de activação (E_a) associadas ao transporte. Os valores obtidos destes parâmetros indicam que existe um baixo nível de expressão destas aquagliceroporinas na membrana, resultado que corrobora as observações feitas no microscópio de fluorescência. Ainda assim, foi possível observar que as proteínas se encontram funcionais e que este sistema de expressão heteróloga é um sistema excelente para a caracterização funcional e ainda, para o rastreio de moléculas farmacológicas.

Em particular, na terceira parte do trabalho foi estudado o efeito do composto organometálico (Auphen) na actividade das aquagliceroporinas em estudo. Anteriormente, foi demonstrado a alta selectividade do Auphen para o transporte de glicerol da AQP3. De facto,

neste trabalho foi observada uma drástica inibição no transporte de glicerol e uma redução menos acentuada no transporte de água das duas estirpes contendo a AQP3 e AQP7, reduzindo no entanto, os valores das permeabilidades quer do glicerol quer da água aos valores obtidos para a estirpe sem aquaporinas. Este facto demonstrou que o Auphen inibiu totalmente estas aquaporinas, reduzindo a zero a sua contribuição para o transporte de água e glicerol. Mostrou-se também que o Auphen possui uma alta selectividade para as aquagliceroporinas, não tendo qualquer afinidade para os transportadores de glicerol endógenos da estirpe de *S. cerevisiae* utilizada. O efeito deste inibidor específico mostra que o modelo celular de expressão heteróloga construído neste trabalho é válido e poderá ser utilizado para o rastreio da actividade inibitória de outras moléculas.

Em suma, todos os objectivos deste trabalho foram concretizados com sucesso e existem perspectivas futuras para continuação:

- i)* Construir uma estirpe de *S. cerevisiae*, que para além de estar silenciada nos genes que codificam para as aquaporinas ortodoxas (aqy1 e aqy2), estar silenciada também nos genes que codificam para os canais de glicerol (fps1 e yfl054c). Desta forma não existirá qualquer transporte de *background* de água e glicerol e todos os resultados obtidos serão devido à expressão das aquaporinas;
- ii)* Isolar o organelo celular onde se verificou uma elevada expressão de aquaporina na membrana (retículo endoplasmático), ou tentar otimizar condições que resultem no aumento substancial dos níveis de expressão das sequências codificantes das aquaporinas;
- iii)* Investigar o efeito inibitório do Auphen nas restantes aquagliceroporinas, de forma a otimizar o desenho de moléculas altamente selectivas para o tratamento das diferentes patologias associadas a estas proteínas.

Conclusões

VI. Bibliografia

Bibliografia

- [1] Lehninger, Albert; Nelson, David L.; Cox, Michael M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th edition
- [2] Krane, C. M., & Kishore, B. K. (2003). Aquaporins: the membrane water channels of the biological world. *Biologist* (50) , 81-86.
- [3] Zeuthen, T. (2010). Water-transporting proteins. *J. Membrane Biol.*, 234 , 57-73.
- [4] Sidel, V. W. (1957). Entrance of water into human red cells under an osmotic pressure gradient. *The Journal of general physiology.* 41 , 243-257.
- [5] Farmer, R. E., & Macey, R. I. (1970). Perturbation of red cell volume: rectification of osmotic flow. *Biochim. Biophys. Acta*, 196 , 53-65.
- [6] Macey, R. I., Karan, D. M., & Farmer, R. E. (1972). Properties of water channels in human red cells. *Biomembranes*, 3 , 331-340.
- [7] Agre, P., Saboori, A. M., Asimos, A., Smith, B. L. (1987). Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 262, No. 36, 17497-17503.
- [8] Denker, B. M., Smith, B. L., Kuhajda, F. P., Agre, P. (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, No. 30, 15634-15642.
- [9] Preston, G. M., Agre, P. (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons - Member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 11110-11114.
- [10] Gorin, M. B., Yancey, S. B., Cline, J., Revel, J., Horwitz, J. (1984). The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell*, vol. 39, 49-59.
- [11] Smith, B. L., Agre, P. (1991) Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, No. 10, 6407-6415.
- [12] Preston, G. M., Carroll, T. P., Guggino, W. B., Agre, P. (1992) Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, vol. 256, 385-387.
- [13] "The Nobel Prize in Chemistry 2003". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2013. Web. 11 Aug 2013. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2003/
- [14] Ishibashi, K., Sasaki, S., Fushimi, K., Uchida, S., Kuwahara, M., Saito, H., Furukawa, T., Nakajima, K., Yamaguchi, Y., Gojobori, T., Marumo, F. (1994) Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 91, 6269-6273.
- [15] Liu, Z., Shen, J., Carbrey, J. M., Mukhopadhyay, R., Agre, P., Rosen, B. P. (2002) Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 6053-6058.
- [16] Holm, L. M.; Jahn, T. P.; Moller, A. L. B.; Schjoerring, J. K.; Ferri, D.; Klaerke, D. A.; Zeuthen, T. (2005). NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch*, 450, 415-428
- [17] Saparov, S. M.; Liu, K.; Agre, P.; Pohl, P. (2007). Fast and selective ammonia transport by aquaporin-8. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, No. 8, 5296-5301.
- [18] Bienert, G. P.; Moller, A. L. B.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Moller, I. M.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, No. 2, 1183-1192.
- [19] Kruse, E.; Uehlein, N.; Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins - Protein family review. *Genome Biology*, vol. 7, issue 2, article 206.

- [20] Maurel, C.; Reizer, J.; Schroeder, J. I.; Chrispeels, M. J.; Saier, M. H. (1994). Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus Oocytes*. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, No. 16, 11869-11872.
- [21] Calamita, G. (2000). The *Escherichia coli* aquaporin-Z water channel. *Molecular Microbiology*, vol. 37, 254-262.
- [22] Carbrey, J. M.; Bonhivers, M.; Boeke, J. D.; Agre, P. (2001). Aquaporins in *Saccharomyces*: characterization of a second functional water channel protein. *PNAS*, vol. 98, No 3, 1000-1005.
- [23] Soveral, G.; Prista, C.; Moura, T. F.; Loureiro-Dias, M. C. (2011). Yeast water channels: an overview of orthodox aquaporins. *Biology of the Cell*, vol. 103, 35-54.
- [24] Verkman, A. S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *Journal of Cell Science*, 118 (15), 3225-3232.
- [25] Verkman, A. S. (2012). Aquaporins in clinical medicine. *Annu. Rev. Med.* 63, 303-316.
- [26] Sui, H.; Han, B.; Lee, J. K.; Walian, P.; Jap, B. K. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, vol. 414, 872-878.
- [27] Soveral, G.; Trincão, J.; Moura, T. F. (2011). Aquaporin water channels. *Canal BQ - Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, n.º 8, 36-43.
- [28] Wang, Y.; Tajkhorshid, E. (2010). Nitric oxide conduction by the brain aquaporin AQP4. *Proteins*, 78(3), 661-670.
- [29] Zeuthen, T. (2001). How water molecules pass through aquaporins. *TRENDS in Biochemical Sciences*, vol. 26, No. 2, 77-79.
- [30] Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann, J. B.; Engel, A.; Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, vol. 407, 599-605.
- [31] Fu, D.; Libson, A.; Miercke, L. J. W.; Weitzman, C.; Nollert, P.; Krucinski, J.; Stroud, R. M. (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* vol. 290, 481-486.
- [32] Beitz, E.; Becker, D.; Bulow, J.; Conrad, C.; Fricke, N.; Geadkaew, A.; Krenc, D.; Song, J.; Wree, D.; Wu, B. (2009). In vitro analysis and modification of aquaporin pore selectivity. *Handbook of Experimental Pharmacology* 190, 77-92.
- [33] Verkman, A. S. (2009). Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb Exp Pharmacol*, 190, 359-381.
- [34] Boury-Jamot, M.; Daraspe, J.; Bonté, F.; Perrier, E.; Schnebert, S.; Dumas, M.; Verbavatz, J. (2009). Skin aquaporins: function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 190, 205-219.
- [35] Hara, M.; Ma, T.; Verkman, A. S. (2002). Selectively reduced glycerol in skin of aquaporin-3-deficient mice may account for impaired skin hydration, elasticity, and barrier recovery. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, No. 48, 46616-46621.
- [36] Nakakoshi, M.; Morishita, Y.; Usui, K.; Ohtsuki, M.; Ishibashi, K. (2006). Identification of a keratinocarcinoma cell line expressing AQP3. *Biol. Cell*, 98, 95-100.
- [37] Hara-Chikuma, M.; Verkman, A. S. (2008). Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 28, No. 1, 326-332.
- [38] Kishida, K.; Kuriyama, H.; Funahashi, T.; Shimomura, I.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Nishida, M.; Nishizawa, H.; Matsuda, M.; Takahashi, M.; Hotta, K.; Nakamura, T.; Yamashita, S.; Tochino, Y.; Matsuzawa, Y. (2000). Aquaporin adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, No 27, 20896-20902.
- [39] Rodriguez, A.; Catalán, V.; Gómez-Ambrosi, J.; Fruhbeck, G. (2011). Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance

Bibliografia

- control. *Cell cycle*, vol. 10, 1548-1556.
- [40] Hara-Chikuma, M.; Sohara, E.; Rai, T.; Ikawa, M.; Okabe, M.; Sasaki, S.; Uchida, S.; Verkman, A. S. (2005). Progressive adipocyte hypertrophy in aquaporin-7 deficient mice: adipocyte glycerol permeability as a novel regulator of fat accumulation. *J. Biol. Chem.* 280, 15493-15496.
- [41] Marrades, M. P.; Milagro, F. I.; Martínez, A.; Moreno-Aliaga, M. J. (2006). Differential expression of aquaporin 7 in adipose tissue of lean and obese high fat consumers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339, 785-789.
- [42] Wang, F.; Feng, X.; Li, Y.; Yang, H.; Ma, T. (2006). Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27 (4), 395-401.
- [43] Huber, V. J.; Tsujita, M.; Nakada, T. (2012). Aquaporins in drug discovery and pharmacotherapy. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 691-703.
- [44] Martins, A. P.; Marrone, A.; Ciancetta, A.; Cobo, A. G.; Echevarría, M.; Moura, T. F.; Re, N.; Casini, A.; Soveral, G. (2012). Targeting aquaporin function: potent inhibition of aquaglyceroporin-3 by a gold-based compound. *PLoS ONE*, Vol. 7, Issue 5, e37435.
- [45] Martins, A. P.; Ciancetta, A.; Almeida, A.; Marrone, A.; Re, N.; Soveral, G.; Casini, A. (2013). Aquaporin inhibition by gold (III) compounds: new insights. *ChemMedChem*, 8, 1086-1092.
- [46] Hitzeman, R. A.; Hagie, F. E.; Levine, H. L.; Goeddel, D. V.; Ammerer, G.; Hall, B. D. (1981). Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature*, 293, 717-722.
- [47] Bill, R. M. (2001). Yeast - a panacea for the structure-function analysis of membrane proteins?. *Curr. Genet.*, 40, 157-171
- [48] Wiczorke, R.; Dlugai, S.; Krampe, S.; Boles, E. (2003). Characterization of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell Physiol Biochem*, 13, 123-134.
- [49] Hashimoto, K.; Saito, M.; Matsuoka, H.; Iida, K. Iida, H. (2004). Functional analysis of a rice putative voltage dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene CCH1. *Plant and Cell Physiology*, vol. 45, 496-500.
- [50] Suga, S.; Maeshima, M. (2004). Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol.* 45 (7), 823-830.
- [51] Soveral, G.; Madeira, A.; Loureiro-Dias, M. C.; Moura, T. F. (2007). Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching. *Appl Environ Microbiol*, 73, 2341-2343.
- [52] Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, vol. 7, No 6, 1513-1523.
- [53] Breeuwer, P.; Drocourt, J. L.; Bunschoten, N.; Zwietering, M. H.; Rombouts, F. M.; Abee, T. (1995). Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 61, No 4, 1614-1619.
- [54] Chen, R. F.; Knutson, J. R. (1988). Mechanism of fluorescence concentration quenching of carboxyfluorescein in liposomes: energy transfer to nonfluorescent dimmers. *Analytical Biochemistry*, vol. 172, 61-77.
- [55] Soveral, G.; Madeira, A.; Loureiro-Dias, M. C.; Moura, T. F. (2008). Membrane tension regulates water transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 2573-2579.
- [56] Güldener, U.; Hegenmann, J. H. A second generation of GFP-vectors for subcellular localization studies in budding yeast.
<http://mips.helmholtz-muenchen.de/proj/yeast/info/tools/hegemann/gfp.html>.
Acedido a 12 de Agosto de 2013.

- [57] Sangsoda, S.; Cherest, H.; Surdin-Kerjan, Y. (1985). The expression of the MET25 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated transcriptionally. *Mol. Gen. Genet.* 200, 407-414.
- [58] Dieffenbach, C. W.; Lowe, T. M.; Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Res.* 3, S30-S37.
- [59] SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 95*, 1460-1465
- [60] Rychlik, W.; Spencer, W. J.; Rhoads, R. E. (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Research, vol. 18, No 21*, 6409-6412.
- [61] Wallace, D. M (1987). Large- and small-scale phenol extractions. *Methods in Enzymology, vol. 152*, 33-41.
- [62] Cheng, H.; Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 28, 55-59.
- [63] Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science, vol. 263, No 5148*, 802-805.
- [64] Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509-544.
- [65] Cormack, B. P.; Valdivia, R. H.; Falcow, S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.
- [66] Huh, W.; Falvo, J. V.; Gerke, L. C.; Carroll, A. S.; Howson, R. W.; Weissman, J. S.; O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature, vol. 425*, 686-691.
- [67] Song, L.; van Gijlswijk, R. P. M.; Young, T.; Tanke, H. J. (1997). Influence of fluorochrome labeling density on the photobleaching kinetics of fluorescein in microscopy. *Cytometry, vol. 27*, 213-223.
- [68] Soveral, G.; Veiga, A.; Loureiro-Dias, M. C.; Tanghe, A.; Dijck, P. V.; Moura, T. F. (2006). Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology, 152*, 1515-1521.

Bibliografia

VII. Anexos

Anexo 1 – Mapa circular do vector de expressão

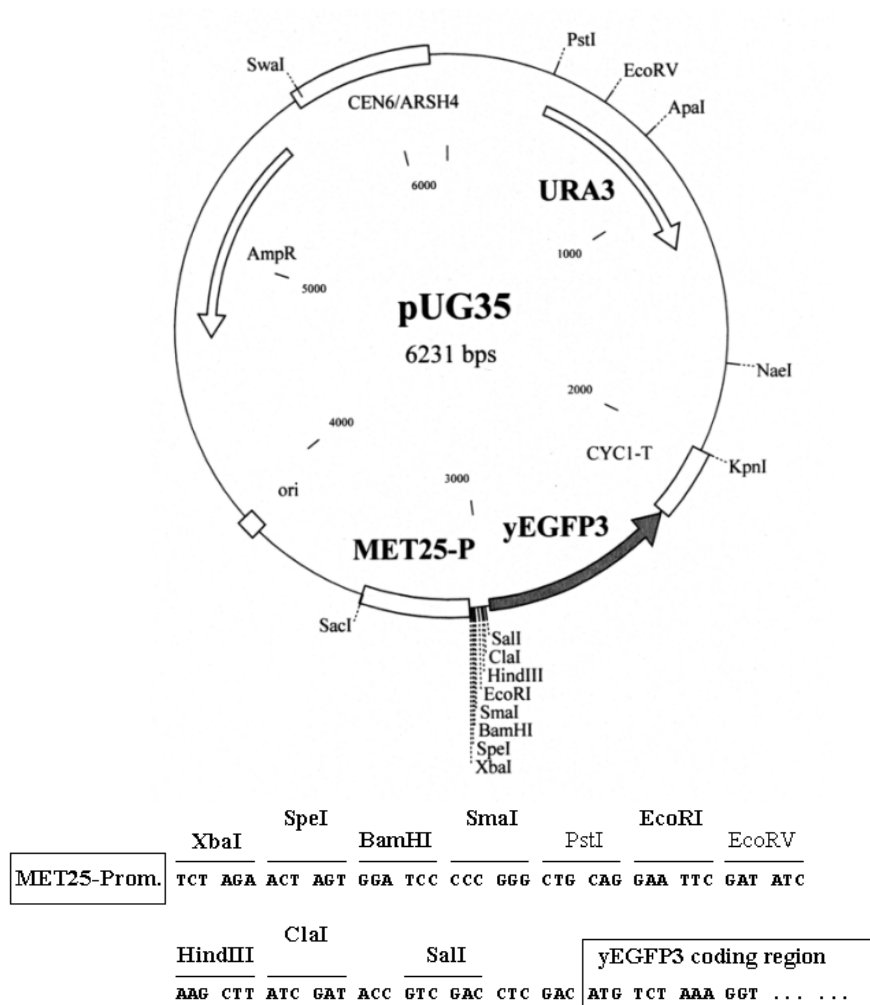


Figura VII.1 – Mapa circular do vector de expressão pUG35 e sequência nucleotídica do sítio de clonagem múltipla sob a regulação do promotor MET25. (Güldener & Hegenmann)

Anexo 2 – Composição dos meios de cultura utilizados no crescimento celular, soluções e tampões

Tabela VII.1 – Composição do meio de cultura LB.

Meio LB	
Composto	Concentração final
Triptona	1 % (p/v)
Extracto de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	1 % (p/v)
Agar	1,5 % (p/v)

Tabela VII.2 – Composição do meio de cultura YNB.

Meio YNB	
Composto	Concentração final
<i>Yeast Nitrogen Base</i>	0,67 % (p/v)
Glucose	2 % (p/v)
Histidina	20 mg/mL
Leucina	40 mg/mL
Triptofano	30 mg/ml
Uracilo	20 mg/mL
Agar	2 % (p/v)

Tabela VII.3 – Composição do meio de cultura YPD.

Meio YPD	
Composto	Concentração final
Extracto de levedura	0,5 % (p/v)
Peptona	1 % (p/v)
Glucose	2 % (p/v)
Agar	2 % (p/v)

Tabela VII.4 - Composição do meio de regeneração SOC.

Meio de regeneração SOC	
Composto	Concentração final
Triptona	2 % (p/v)
Glucose	2 % (p/v)
Extracto de levedura	0,5 % (p/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
pH 6,8-7 (com KOH)	

Tabela VII.5 - Composição da solução 2x TSS.

Solução 2x TSS	
Composto	Concentração final
PEG 3350	20 % (p/v)
DMSO	10 % (p/v)
MgCl ₂	50 mM
Meio LB	0,5x

Anexos

Tabela VII.6 – Composição das soluções usadas no protocolo de extracção de DNA por lise alcalina.

Solução I	
Composto	Concentração final
Glucose	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM
Solução II	
Composto	Concentração final
NaOH	200 mM
SDS	1% (p/v)
Solução III	
Composto	Concentração final
NaAc	3 M
HAc	Até pH 4,8
Solução IV	
Composto	Concentração final
NaAc	100 mM
Tris pH 8,0	50 mM

Tabela VII.7 – Composição do tampão H, utilizado na reacção de digestão com as enzimas *SpeI* e *ClaI*.

Tampão H 1x	
Composto	Concentração final
Tris-HCl	50 mM
NaCl	10 mM
MgCl ₂	100 mM
Ditioeritritol (DTE)	1 mM
pH 7,5 a 37 °C	

Tabela VII.8 – Composição do tampão utilizado na reacção de ligação entre plasmídeo e fragmento.

Tampão de ligação 5x	
Composto	Concentração final
Tris-HCl	250 mM
MgCl ₂	50 mM
ATP	5 mM
Ditiotreitol (DTT)	5 mM
PEG 8000	25 % (p/v)
pH 7,6	

Tabela VII.9 – Composição do tampão ácido cítrico/fosfato dipotássico utilizado na preparação das soluções para os choques osmóticos.

Tampão ácido cítrico/fosfato dipotássico	
Composto	Concentração final
Ácido cítrico monohidratado	50 mM
K ₂ HPO ₄	50 mM
Acertar o pH a 7,4 com KOH	

Anexo 3 – Kits comerciais

GenElute™ HP Plasmid Midiprep (Sigma-Aldrich)

As células bacterianas foram recolhidas do meio de cultura por centrifugação a 5000 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado completamente com 4 mL da solução de Ressuspensão/RNase A. De seguida, adicionou-se ao tubo 4 mL da solução de Lise e inverteu-se 6-8 vezes de modo a misturar as soluções. Deixou-se ocorrer a lise celular durante 3-5 minutos, até que a solução se tornasse transparente e viscosa. As células lisadas foram neutralizadas com a adição de 4 mL da solução de Neutralização fria e inversão do conteúdo 4-6 vezes de forma a observar o aparecimento de um agregado branco. Adicionou-se 3 mL da solução de Ligação, inverteu-se 1-2 vezes, transferiu-se toda a solução imediatamente para a seringa, sem o êmbolo e deixou-se a solução repousar assim durante 5 minutos. Durante o tempo de espera, uma das colunas fornecidas no kit foi colocada num tubo colector e adicionou-se a esta 4 mL da solução de Preparação da Coluna e centrifugou-se a 3000 x g por 2 minutos num rotor basculante. Após descartar a solução de preparação, a seringa foi colocada sobre a coluna e com a ajuda do êmbolo, o lisado celular foi expelido da seringa para a coluna. O filtro da seringa irá reter os restos celulares, bem como proteínas, lípidos e DNA cromossomal. O conteúdo da coluna foi novamente centrifugado a 3000 x g por 2 minutos e o eluído descartado. Este processo é repetido enquanto houver lisado na seringa. Posteriormente, foi adicionado 4 mL da solução de Lavagem 1 à coluna e esta centrifugada a 3000 x g por 2 minutos. Após descartar o eluído, adicionou-se 4 mL da solução de Lavagem 2 e repetiu-se o passo de centrifugação. A coluna foi transferida para um novo tubo, adicionou-se 1 mL de H₂O mili-Q estéril e centrifugou-se a 3000 x g por 5 minutos, de forma a eluir o DNA plasmídico.

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

O kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) é apropriado para extrair e purificar fragmentos de DNA (100bp a 10 kb) a partir de géis de agarose (1.A) ou purificar produtos da reacção de amplificação por PCR (1.B), removendo o excesso de nucleótidos e *primers*.

1. Preparação da amostra

(A) Banda excisada do gel

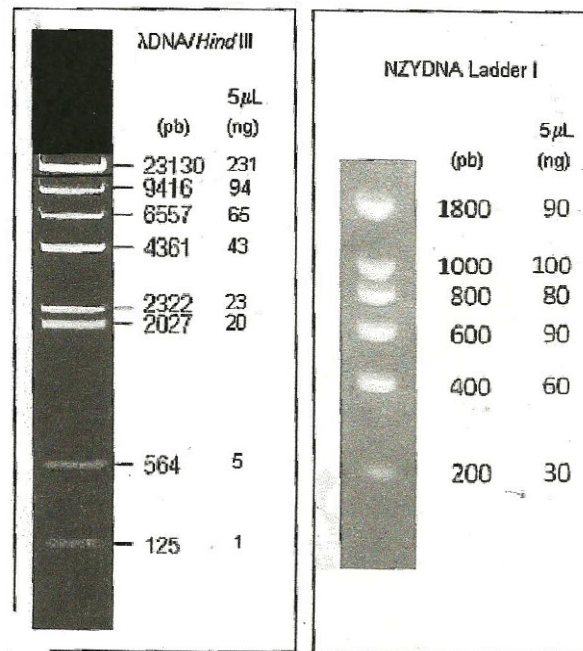
Após a electroforese em gel de agarose para separar os fragmentos de DNA, a banda de interesse foi excisada, colocada num microtubo de 1.5 mL e o seu peso foi apontado. Adicionou-se 10 µL de tiocianato de guanidina (*Membrane Binding Solution*) por cada 10 mg de banda excisada. A mistura foi agitada no vortex e incubada a 50-65 °C até que a banda se dissolvesse por completo.

(B) Reacção de PCR

Após amplificação, adicionou-se um volume igual de *Membrane Binding Solution* à reacção de PCR.

Foi utilizado o método por centrifugação para a purificação de DNA. Para isso, uma mini-coluna é colocada num tubo colector e a amostra preparada (banda dissolvida ou produto de PCR) é transferida para a mini-coluna. Aguardou-se 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 16 000 x g por 1 minuto. O eluído presente no tubo colector é descartado pela remoção momentânea da mini-coluna. À mini-coluna inserida novamente no tubo colector foi adicionado 700 µL de *Membrane Wash Solution* e procedeu-se a nova centrifugação nas mesmas condições e o eluído foi novamente descartado. Este passo de lavagem foi repetido com a adição de 500 µL de *Membrane Wash Solution* e centrifugação a 16 000 x g por 5 minutos. O eluído foi novamente descartado e voltou-se a centrifugar por 2 minutos para permitir a evaporação de etanol residual. A mini-coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 50 µL de *Nuclease-Free Water*. Aguardou-se 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 16 000 x g por 1 minuto. O microtubo com o DNA eluído foi guardado.

Anexo 4 – Marcadores de peso molecular



Anexo 5 – Alinhamento dos resultados de sequenciação

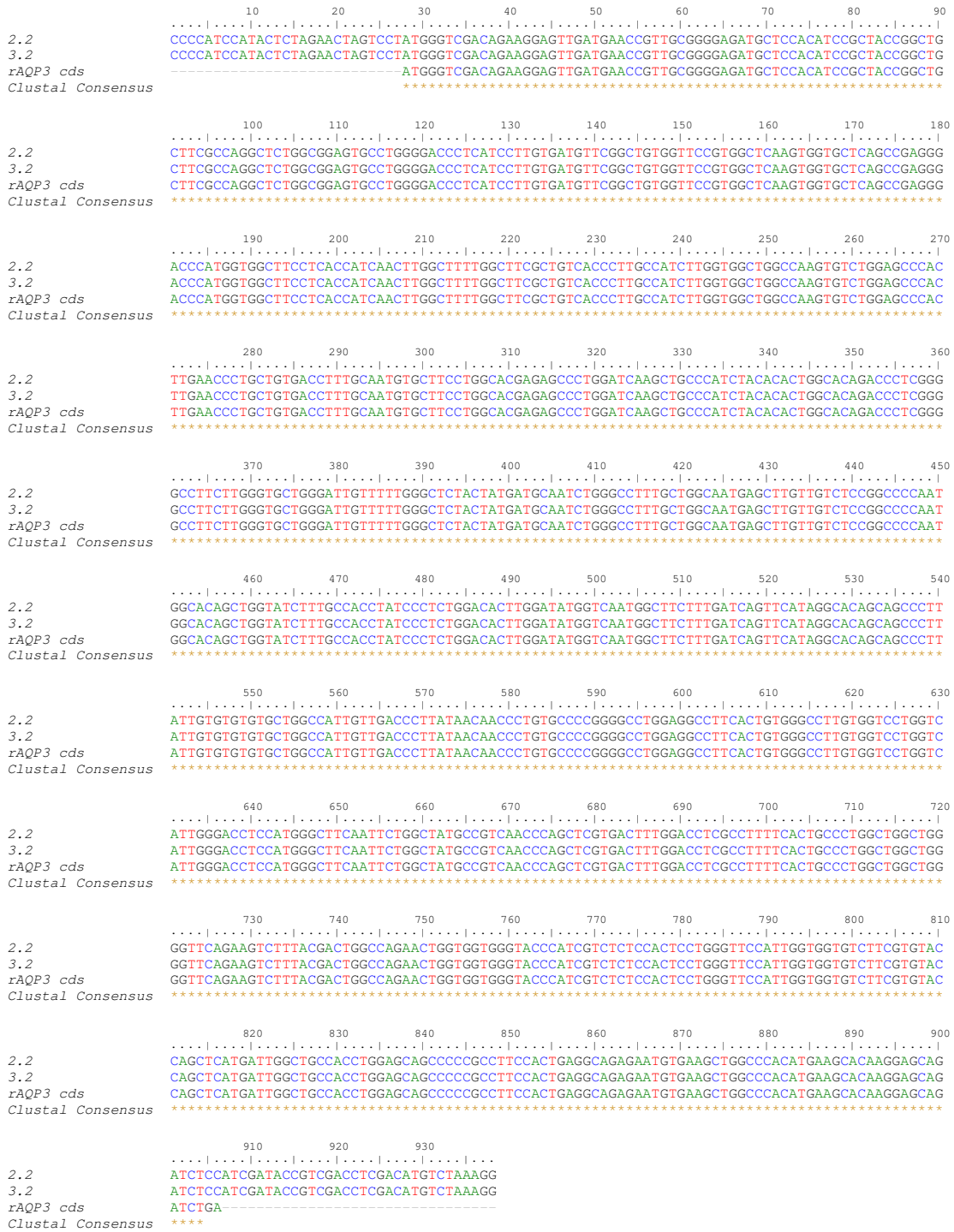


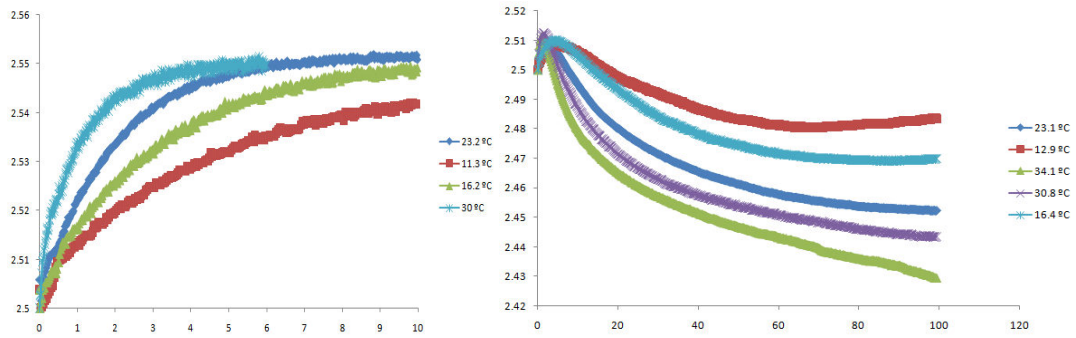
Figura VII.2 – Alinhamento da sequência codificante da AQP3 de *Rattus norvegicus* com os resultados da sequenciação do plasmídeo extraído das colônias 3.5 (equivalente 2.2) e e 3.7 (equivalente a 3.2). O múltiplo alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta ClustalW do software BioEdit versão 7.2.0.



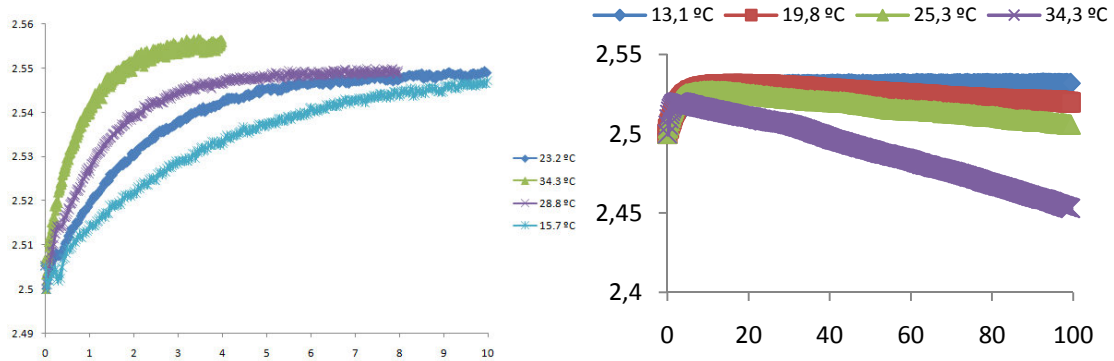
Figura VII.3 - Alinhamento da sequência codificante da AQP7 de *Homo sapiens* com os resultados da sequenciação do plasmídeo extraído das colônias 7.7 (equivalente a 4.3) e 7.8 (equivalente a 4.4). O múltiplo alinhamento das sequências foi realizado com a ferramenta ClustalW do software BioEdit versão 7.2.0.

Anexo 6 – Sinais típicos da variação de fluorescência (após subtração da linha de base) para as várias estirpes a diferentes temperaturas

AQP7



PUG



AQP3

