

Localização subcelular de proteínas baseada em co-localização com marcadores celulares⁽¹⁾

Maria Regina Fernandes Gonçalves⁽²⁾, Beatriz de Almeida Barros⁽³⁾, Vanessa de Almeida Barros⁽²⁾ e Jurandir Vieira de Magalhães⁽⁴⁾

⁽¹⁾Trabalho financiado pelo CNPq/Fapemig, ⁽²⁾Estudante do Curso de Biotecnologia da Faculdade Ciências da Vida, Bolsista PIBIC do Convênio CNPq/Embrapa, ⁽³⁾Analista, Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG,

⁽⁴⁾ Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

Resumo - Uma informação importante para a análise funcional de proteínas é a sua localização subcelular, e uma das técnicas mais utilizadas para esse fim é a expressão de uma proteína cuja localização deseja-se estabelecer, simultaneamente a uma ou mais proteínas de localização conhecida fusionadas a proteínas fluorescentes marcadoras. A expressão deste tipo de fusão traducional, em uma célula vegetal, pode ser observada por microscopia de fluorescência. O objetivo do presente trabalho é implementar a utilização de proteínas conhecidas como marcadoras de organelas para estudos de localização subcelular na Embrapa Milho e Sorgo. Para isso, células da epiderme de *Nicotiana benthamiana* foram infiltradas com culturas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 contendo um vetor binário que continha, individualmente, cada proteína marcadora fusionada a uma proteína fluorescente. A transformação transiente de *Nicotiana benthamiana* usando a estirpe da bactéria GV3101 mostrou-se eficiente para estudos de localização subcelular das proteínas. Pelos perfis de localização obtidos, considera-se que o conjunto de marcadores de organelas utilizado neste estudo é adequado para estudos de localização subcelular de proteínas de plantas.

Termos para Indexação: *Nicotiana benthamiana*, marcadores moleculares, transformação de plantas, genes repórteres, transformação transiente

Subcellular localization of proteins based on co-localization with cellular markers⁽¹⁾

Abstract - An important piece of information for the functional analysis of proteins is their subcellular localization. One of the most commonly used techniques for this purpose is the expression of a protein whose localization is to be established, simultaneously with one or more proteins of known localization fused to fluorescent marker proteins. The expression of this type of translational fusion in a plant cell can be observed by fluorescence microscopy. The objective of the present work is to implement the use of proteins known as organelle markers for subcellular localization studies at Embrapa Milho e Sorgo. For this purpose, epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* were infiltrated with cultures of *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 harboring a binary vector that contained, individually, each marker protein fused to a fluorescent protein. The transient transformation of *Nicotiana benthamiana* using the GV3101 bacterial strain proved to be efficient for subcellular localization studies of

proteins. Based on the localization profiles obtained, it is considered that the set of organelle markers used in this study is suitable for subcellular localization studies of plant proteins.

Index terms: *Nicotiana benthamiana*, molecular markers, plant transformation, reporter gene, transient transformation

Introdução

Nicotiana benthamiana é uma das espécies de plantas modelo mais comumente usadas para pesquisas de interações planta-microrganismo, bem como em outras áreas da ciência vegetal (Goodin et al., 2008). As folhas grandes do tabaco e sua suscetibilidade a patógenos foram exploradas como uma forma de expressar proteínas de forma transiente, usando vírus manipulados ou por meio de infiltração de culturas da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (Chapman et al., 1992; Tang et al., 1996; Van Der Hoorn et al., 2000; Wagner et al., 2004; Ma et al., 2012). As células vegetais são sistemas altamente complexos, que realizam numerosas funções bioquímicas. Para permitir a execução coordenada e eficiente dessas funções, as células dos organismos eucarióticos são organizadas em subcompartimentos ou organelas, que são delimitadas por membranas biológicas. São eles: o núcleo celular, as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, o lisossomo, o peroxissomo, os plastídios (como os cloroplastos) e o vacúolo. Nestas organelas, ocorrem diferentes processos bioquímicos. Por exemplo, a fotossíntese, que ocorre nos cloroplastos; a síntese de lipídios e proteínas no retículo endoplasmático; a modificação, armazenamento e transporte de proteínas e lipídios no complexo de Golgi e a respiração mitocondrial. A capacidade bioquímica ou função de uma organela é definida pelas proteínas e ou enzimas que estão presentes nos diferentes compartimentos celulares (Lunn, 2007). Portanto, uma informação muito importante para inferências sobre função das proteínas é exatamente a sua localização subcelular. Uma das técnicas mais usadas para este fim é a expressão de uma dada proteína de interesse fusionada com uma proteína fluorescente, utilizando um sistema de transformação genética transiente.

A infiltração de culturas de *A. tumefaciens* em folhas de tabaco (Xu et al., 2011) permite uma síntese proteica considerável em poucos dias, sendo essa uma estratégia eficiente para estudos de localização subcelular de proteínas em plantas. Esta técnica, também denominada de *Agrobacterium tumefaciens transient expression* (ATTE), baseia-se na capacidade natural destas bactérias de transferirem uma parte do seu material genético para a planta hospedeira (Circelli et al., 2010; Wang et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi catalogar o perfil de localização de marcadores de organelas já conhecidos, bem como da proteína SbMATE, que confere tolerância ao alumínio em sorgo (Magalhães et al., 2004).

Material e métodos

A linhagem *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 foi transformada com o vetor pSoup (Hellens et al., 2005) por eletroporação (Ward et al., 1988), plaqueada em ágar com meio YEP (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 0,5%) suplementado com tetraciclina (12,5 mg. mL⁻¹) e rifampicina (50 mg. mL⁻¹), seguindo-

se cultivo a 28°C por 48 horas.

Foi realizado um pré-inóculo a partir de colônias isoladas de bactérias, que foram transferidas individualmente para erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml do meio YEP suplementado com antibióticos como descrito acima. Esses erlenmeyers foram mantidos sob agitação a 150 *rpm/overnight* a 28 °C, até que a cultura atingisse uma densidade ótica (*optical density*) OD600 de 0,5-1,0. Posteriormente, as culturas foram transferidas para tubos de 50 mL e centrifugadas a 5000 *rpm* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas por quatro vezes em 40 mL de água estéril gelada. Logo após essa lavagem foi feita a ressuspensão das células em 2 mL de meio GYT (glicerol 10%, triptona 0,25%, extrato de levedura 0,125%), seguindo-se distribuição em alíquotas de 50 µL, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

A partir do estoque de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 contendo o plasmídeo *helper* (pSOUP) foram feitas as transformações por eletroporação da seguinte construção:

Marcador de retículo endoplasmático (RE), criado combinando o peptídeo sinal de AtWAK2 à sequência de retenção no RE, HDEL, fusionados à proteína ciano fluorescente (Cyan Fluorescent Protein, CFP) (Nelson et al., 2007);

Apartir do estoque de células competentes de *A. tumefaciens* GV3101 foram feitas as transformações por eletroporação das seguintes construções:

Proteína WWP1 (WW domain-containing protein) de *Arabidopsis thaliana*, AtWWP1, fusionada com mCherry, usada como marcador de núcleo.

Proteína FLS2 (FLAGELIN-SENSITIVE2), fusionada à mCherry, usada como marcador de membrana.

Proteína SbMATE fusionada com GFP (*green fluorescent protein*).

A partir das colônias de GV3101 transformadas com os plasmídeos de interesse, foram feitos inóculos das mesmas em 10 mL de meio YEP acrescido dos antibióticos rifampicina (50 mg.mL⁻¹) e canamicina (50 mg.mL⁻¹), seguindo-se o cultivo *overnight* a 28-30°C com agitação a 180 rpm. As colônias de GV3101 que continham o plasmídeo *helper* pSOUP foram crescidas como descrito anteriormente acrescentando-se tetraciclina (12,5 mg.mL⁻¹) ao meio. Após o crescimento, as culturas foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 *rpm* e cada pellet foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de infiltração (acetosseringona 100 µM, MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM) e centrifugado a 5.000 *rpm* por 3 min. Esse passo foi repetido por duas vezes. Após a última centrifugação, os pellets foram novamente ressuspensionados em 1 mL do tampão de infiltração e a OD600 foi ajustada para 0,5-0,6. Logo em seguida foi feita a infiltração no lado abaxial das folhas de *N. benthamiana* com tempo de crescimento entre 4 a 5 semanas, utilizando uma seringa descartável de 1 ml (sem agulha).

Após três dias a 22 °C sob fotoperíodo 16 horas/8 horas (claro/escuro), amostras de tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram cortadas com auxílio de um bisturi e visualizadas utilizando um microscópio Zeiss AxioObserver ZI Apoptome 2.0. Os comprimentos de onda utilizados para capturar as imagens fluorescentes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Comprimentos de onda utilizados para obtenção de imagens

Proteína fluorescente	Excitação (nm)	Emissão (nm)
GFP	498	500-550
mCherry	543	608-680
CFP	433-445	475-503

Resultados e discussão

Localização subcelular

A Figura 1 mostra o perfil de fluorescência do marcador de membrana plasmática, FLS2::mCherry, destacando-se a cor vermelha no contorno da células, onde encontram-se, em proximidade, a parede celular e a membrana plasmática. Nesse caso, a plasmólise celular poderia ser utilizada para retração da membrana plasmática da parede celular, individualizando o sinal proveniente de membrana plasmática e/ou da parede celular.

Uma das moléculas excretoras derivadas de bactérias mais ativas em células vegetais é a flagelina (Felix et al., 1999), que induz respostas de defesa rápidas (Gómez-Gómez; Boller, 2000) e desencadeia a ativação de uma cascata de fosforilação em plantas. A proteína FLS2 possui três domínios: um extracelular, um transmembrana e um intracelular, sendo que o domínio transmembrana é responsável pela associação da proteína com a membrana plasmática. Portanto, estudos prévios indicam a localização primária da proteína FLS2 na membrana plasmática, consistente com os nossos resultados.

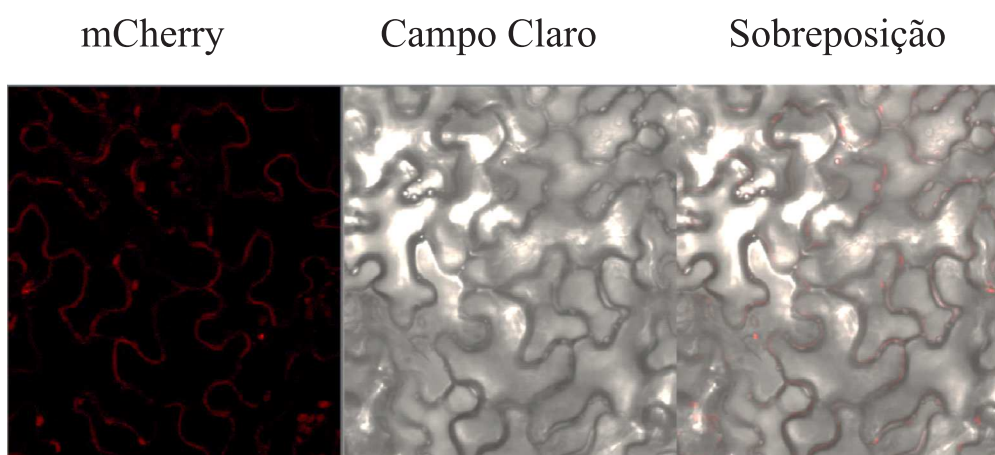


Figura 1: Localização da proteína FLS2 fusionada a mCherry em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens no espectro de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente.

Na Figura 2, a proteína transportadora SbMATE fusionada à proteína fluorescente GFP, produziu perfil de fluorescência no contorno celular, de forma semelhante ao perfil obtido com a proteína marcadora, FLS2. Esses resultados estão de acordo com a localização conhecida da proteína SbMATE na membrana plasmática das células radiculares, onde ela medeia a exsudação de citrato ativada pelo alumínio, conferindo tolerância ao metal

(Magalhães et al., 2007). Do ponto de vista formal, haveria necessidade de transformação simultânea (i.e. cotransformação) de FLS2:mCherry e SbMATE::GFP, onde a sobreposição das fluorescências vermelha e verde confirmaria a localização na membrana plasmática. Entretanto, essa etapa não foi aqui apresentada, uma vez que já foi feita em outros estudos. Mediante a fusão tradicional da proteína SbMATE com GFP e transformação em células epidérmicas de cebola plasmolizadas, Magalhães et al. (2007), descartaram uma possível localização da proteína SbMATE na parede celular, confirmando a localização na membrana plasmática.

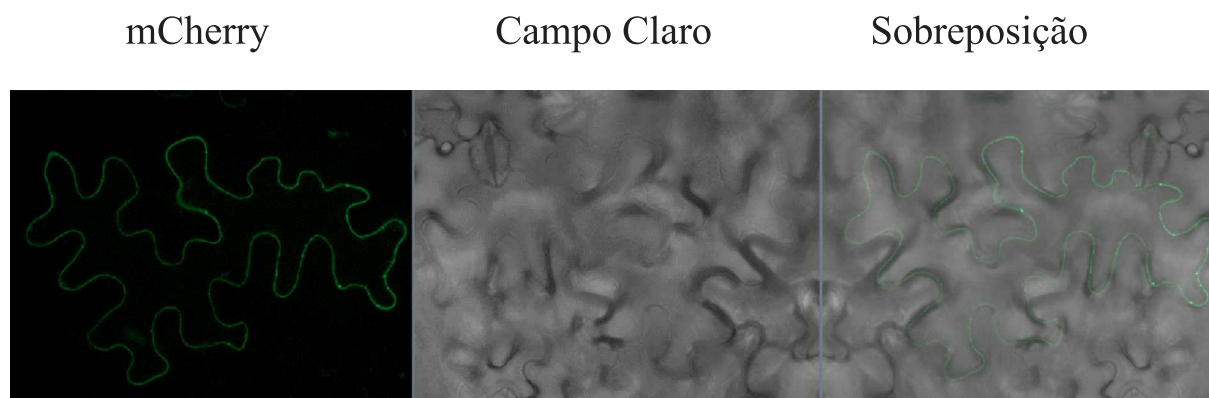


Figura 2. Localização subcelular da proteína SbMATE fusionada com GFP em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens no espectro de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente.

No caso da proteína AtWWP1, a fluorescência vermelha proveniente da fusão com mCherry foi observada em uma organela delimitada, de forma circular, no interior da célula (Figura 3). Esse perfil é claramente proveniente do núcleo celular, de forma consistente com a localização conhecida de AtWWP1. AtWWP1 é uma proteína de 463 aminoácidos que contém domínios WW, que formam corpos nucleares imunes (NBs). Esses corpos são estruturas celulares importantes que atuam como mediadores chave da resistência intrínseca contra muitos vírus em espécies que vão desde humanos até plantas (Calil et al., 2018).

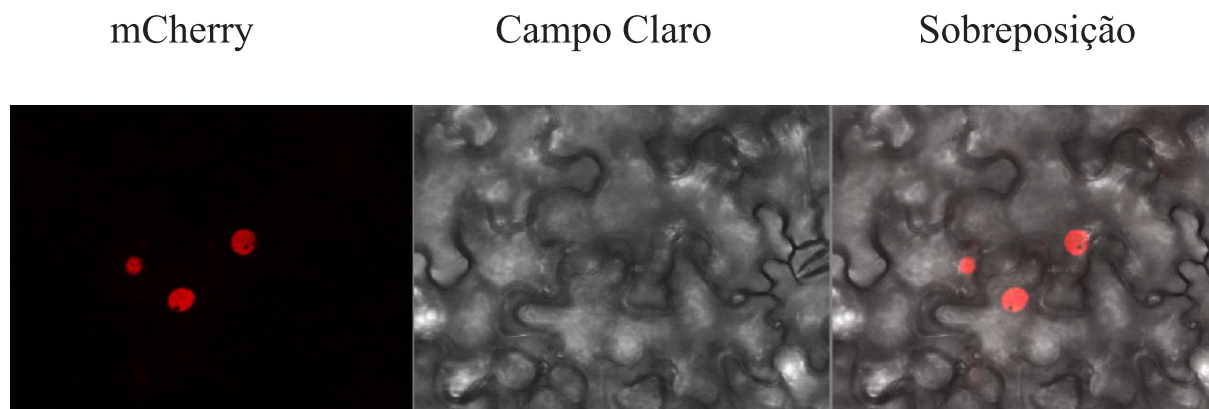


Figura 3. Localização da proteína AtWWP1 fusionada a mCherry em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente, confirmando a localização do núcleo.

A fluorescência azul proveniente da proteína fluorescente CFP fusionada ao marcador

de Retículo Endoplasmático (RE) foi observada no citoplasma, definindo uma estrutura reticular, inclusive circundando uma estrutura intracelular circular, que é provavelmente o núcleo celular (Figura 4). Uma confirmação formal disso pode ser feita mediante a cotransformação dos marcadores de núcleo e de RE, ou mesmo pela coloração com o marcador DAPI.

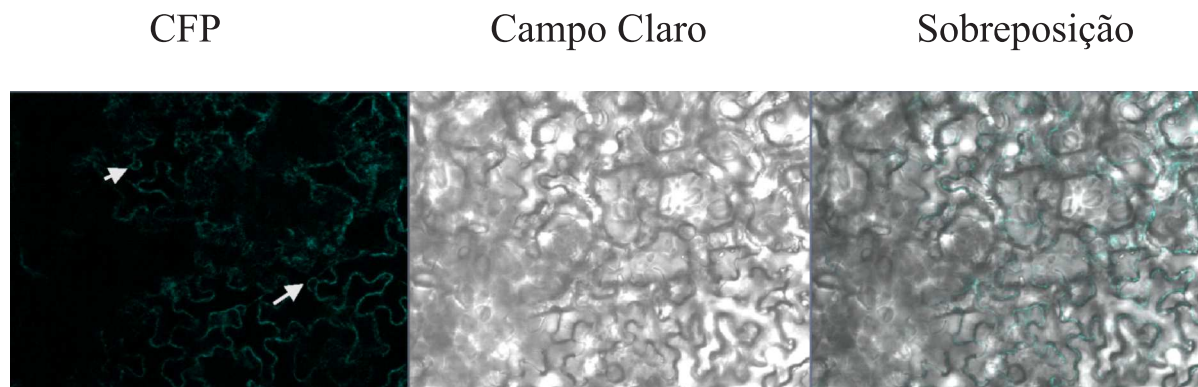


Figura 4. Localização do marcador de Retículo Endoplasmático (RE) fusionado com a proteína CFP em folhas de *Nicotiana benthamiana*. As imagens no espectro de fluorescência do tecido vegetal próximas aos sítios de infiltração foram visualizadas com 3 dias de transformação transiente, confirmando a localização do emaranhado de células no retículo endoplasmático. Setas brancas indicam a delimitação do núcleo.

Quando células totalmente expandidas são visualizadas em um plano medial, o RE é visto apenas na fina camada de citoplasma abaixo da membrana plasmática e ao redor do núcleo. O RE cortical geralmente assume uma aparência pontilhada resultante de seu caráter de rede, como observado acima na Figura 4. A marcação perinuclear, no entanto, é mais uniforme porque o RE é contínuo com o envelope nuclear. O marcador RE pode também, portanto, revelar a morfologia dinâmica do núcleo (Collings et al., 2000).

Conclusão

Foi possível estabelecer a localização dos marcadores de organelas, de forma consistente com a literatura, na Embrapa Milho e Sorgo. Ainda é preciso estabelecer a metodologia para marcadores de mitocôndrias, plastídios e complexo de Golgi, de forma a expandir esse catálogo para outras proteínas em investigação nos projetos de pesquisa da unidade. Esse catálogo será fundamental para a caracterização funcional de outras proteínas de interesse agrônomo.

Referências

CALIL, I.; QUADROS, I. P. S.; ARAÚJO, T. C.; DUARTE, C. E. M.; GOUVEIA-MAGESTE, B. C.; SILVA, J. C. F.; BRUSTOLINI, O. J. B.; TEIXEIRA, R. M.; OLIVEIRA, C. N.; MILAGRES, R. W. M. M.; MARTINS, G. S.; CHORY, J.; REIS, P. A. B.; MACHADO, J. P. B.; FONTES, E. P. B. A WW

domain-containing protein forms immune nuclear bodies against begomoviruses. **Molecular Plant**, v. 11, n. 2, p. 1449-1465, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.09.009>.

CHAPMAN, S.; KAVANAGH, T.; BAULCOMBE, D. Potato virus X as a vector for gene expression in plants. **Plant Journal**, v. 2, n. 4, p. 549-557, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1992.t01-24-00999.x>.

CIRCELLI, P.; DONINI, M.; VILLANI, M. E.; BENVENUTO, E. Efficient agrobacterium-based transient expression system for the production of biopharmaceuticals in plants. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 3, p. 221-224, 2010. DOI: <https://doi.org/10.4161%2Fbbug.1.3.11722>.

COLLINGS, D. A.; CARTER, C. N.; RINK, J. C.; SCOTT, A. C.; WYATT, S. E.; ALLEN, N. S. Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. **The Plant Cell**, v. 12, n. 12, p. 2425-2439, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1105%2Ftpc.12.12.2425>.

FELIX, G.; DURAN, J. D.; VOLKO, S.; BOLLER, T. Plants recognize bacteria through the most conserved domain of flagellin. **Plant Journal**, v. 18, p. 265-276, 1999.

GÓMEZ-GÓMEZ, L.; BOLLER, T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. **Molecular Cell**, v. 5, n. 6, p. 1003-1011, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8).

GOODIN, M. M.; ZAITLIN, D.; NAIDU, R. A.; LOMMEL, A. A. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 8, p. 1015-1026, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-8-1015>.

HELLENS, R. P.; ALLAN, A. C.; FRIEL, E. N.; BOLITHO, K.; GRAFTON, K.; TEMPLETON, M. D.; KARUNAIRETNAM, S.; GLEAVE, A. P.; LAING, W. A. Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. **Plant Methods**, v. 1, article 13, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-13>.

LUNN, J. E. Compartmentation in plant metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 1, p. 35-47, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl134>.

MA, L.; LUKASIK, E.; GAWEHNS, F.; TAKKEN, F. L. W. The use of agroinfiltration for transient expression of plant resistance and fungal effector proteins in *Nicotiana benthamiana* leaves. **Methods Molecular Biology**, v. 835, p. 61-74, 2012. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-501-5_4.

MAGALHÃES, J. V. de; LIU, J.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. de P.; ALVES, V. M. C.; WANG, Y.-H.; SCHAFFERT, R. E.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A.; SHAFF, J. E.; KLEIN, P. E.; CARNEIRO, N. P.; COELHO, C. M.; TRICK, H. N.; KOCHIAN, L. V. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. **Nature Genetics**, v. 39, n. 9, p. 1156-1161, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng2074>.

MAGALHÃES, J. V.; GARVIN, D. F.; WANG, Y. H.; SORRELLS, M. E.; KLEIN, P. E.; SCHAFFERT, R. E.; LI, L.; KOCHIAN, L. V. Comparative mapping of a major aluminum tolerance gene in sorghum and other species in the poaceae. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1905-1914, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1534/genetics.103.023580>.

NELSON, B. K.; CAI, X.; NEBENFÜHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. **The Plant Journal**, v. 51, n. 6, p. 1126-1136, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2007.03212.x>.

TANG, X.; FREDERICK, R. D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D. A.; JIA, Y.; MARTIN, G. B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2060-2063, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.274.5295.2060>.

VAN DER HOOR, R.; LAURENT, F.; ROTH, R.; DE WIT, P. J. Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 4, p. 439-446, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1094/mpmi.2000.13.4.439>.

WAGNER, B.; FUCHS, H.; ADHAMI, F.; MA, Y.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Plant virus expression systems for transient production of recombinant allergens in *Nicotiana benthamiana*. **Methods**, v. 32, n. 3, p. 227-234, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.08.005>.

WANG, G.; HUANG, M.; NIELSEN, J. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 48, p. 77-84, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.03.017>.

WARD, M.; WILSON, L. J.; CARMONA, L. C.; TURNER, G. The oliC3 gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. **Current Genetics**, v. 14, n. 1, p. 37-42, 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf00405851>.

XU, J.; CHEN, H.; KÁDÁR, Z.; THOMSEN, A. B.; SCHMIDT, J. E.; PENG, H. Optimization of microwave pretreatment on wheat straw for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 9, p. 3859-3864, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.054>.