ELISABETE RODRIGUES DO MONTE SILVA

CARACTERIZAÇÃO DO REPERTÓRIO PEPTÍDICO INTRACELULAR DE CÉLULAS EXPRESSANDO O PROTEASSOMO IMUNE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

ELISABETE RODRIGUES DO MONTE SILVA

CARACTERIZAÇÃO DO REPERTÓRIO PEPTÍDICO INTRACELULAR DE CÉLULAS EXPRESSANDO O PROTEASSOMO IMUNE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Elisabete Rodrigues de Monte.
Caracterização do repertório peptídico intracelular de células expressando o proteassomo imune / Elisabete Rodrigues de Monte Silva. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia Celular.

Versão do título para o inglês: Characterization of intracellular peptide repertoire of cells expressing the immune proteasome.

1. Peptídeos 2. Proteassomo 3. Proteassomo imune
4. Espectrometria de massas 5. Degradação de proteínas
6. Sistema ubiquitina-proteassomo I. Ferro, Prof. Dr. Emer Suavinho
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB01/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elisabete Rodrigues de Monte Silva.

Título da Dissertação: Caracterização do repertório peptídico intracelular de células expressando o proteassomo imune .

Orientador(a): Prof. Dr. Emer Suavinho Ferro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **513/12** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização do repertório peptídico intracelular em células expressando o proteassoma imune*" sob a responsabilidade de **Elisabete Rodrigues do Monte Silva,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 28 de março de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Dedicatória

A Deus, porque d'Ele e por Ele são todas as coisas, aos meus pais, Leobino Cirilo do Monte e Eliete Rodrigues do Monte, e a meu esposo, Danilo de Paula Silva pelo apoio, força, incentivo e companherismo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Emer Suavinho Ferro pela oportunidade e orientação durante o período de desenvolvimento do trabalho de mestrado que foram importantes para a minha formação profissional.

À Pesquisadora Vanessa Rioli, pela oportunidade de estágio durante seis meses em seu laboratório, sendo um dos primeiros lugares em que pude ter contado com pesquisa científica, que foram importantes para os passos que viriam a seguir, e ainda, pelos momentos em que se colocou a disposição para discussões sobre o desenvolver do projeto de mestrado.

Aos meus pais, que foram os meus primeiros orientadores da vida, por sempre me apoiarem e incentivarem em tudo quando me dispus a realizar, pelo amor e carinho em todos os momentos.

Aos meus irmãos, que sempre serão meus modelos de determinação e realização, por terem sido sempre cuidadosos comigo nos momentos em que precisei de compreensão e carinho.

Ao meu esposo, por acreditar em mim e por não me deixar vacilar nos momentos em que pensei em desistir, por sonhar os meus sonhos e acreditar que eles poderiam se tornar realidade.

Aos amigos que conquistei e que quero levá-los por toda a vida, Cecília Café Mendes, Christiane Bezerra Araujo, Diogo Manuel Lopes de Paiva Cavalcanti, Leandro Mantovani de Castro, Lilian Cristina Russo, Lilian Cruz e Natália Mazini Ribeiro, com vocês os dias difíceis se tornaram mais leves e os dias alegres ainda mais felizes.

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

A todos que de alguma forma participaram para que essa conquista acontecesse.

Às agências CAPES, CNPq e a Pró-reitoria de pesquisa da USP (projeto NAPNA e NAPPS) pelo suporte financeiro, indispensável para a realização deste trabalho.

RESUMO

MONTE, E. R. **Caracterização do repertório peptídico intracelular de células expressando o proteassomo imune.** 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O sistema ubiquitina-proteassomo (UPS) representa o principal meio para o *turnover* protéico em mamíferos, e contribui para diversas funções celulares como proliferação, diferenciação, expressão gênica e transdução de sinal. Proteínas direcionadas à degradação pelo UPS são, geralmente, covalentemente ligadas à ubiquitina e, então, encaminhadas ao complexo do proteassomo. Os proteassomos são complexos proteolíticos dependentes de ATP e são constituídos pela partícula regulatória 19S, que é responsável por reconhecer, desdobrar e encaminhar a proteína para o interior do complexo 20S no qual a partícula regulatória (19S) está ligada, em ambas as extremidades. O complexo 20S é formado por 4 anéis heptaméricos, 2 anéis externos (α) e dois anéis internos (β). As subunidades catalíticas do proteassomo são β1, β2 e β5 e apresentam especificidade de clivagem diferentes no substrato. A subunidade β1 cliva após resíduos ácidos (caspase-símile), a subunidade β2 cliva após resíduos básicos (tripsina-símile) e a subunidade β5 cliva após resíduos hidrofóbicos (quimotripsina-símile). Após a clivagem proteolítica, o proteassomo libera no meio intracelular (núcleo e citoplasma) peptídeos que contém entre 2-20 resíduos de aminoácidos, que podem ser degradados em aminoácidos, desempenhar funções na sinalização celular e/ou serem apresentados como antígenos via complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Particularmente, em condições de estresse ou resposta imune aguda, uma forma alternativa do proteassomo pode ser induzida e as subunidades β1, β2 e β5 são substituídas por $\beta1_i$, $\beta2_i$ e $\beta5_i$, alterando a especificidade catalítica e propiciando melhor apresentação de antígenos via MHC de classe I pelo proteassomo imune. Essa alteração de especificidade catalítica que ocorre entre o proteassomo constitutivo e o imune altera, pelo menos parcialmente, o conteúdo de diversos peptídeos antigênicos. Assim, através da indução do proteassomo imune em células HeLa tratadas ou não com INF-γ, foi caracterizado o repertório peptídico intracelular, entre as células controle e experimental, utilizando a técnica de espectrometria de massas para analisar e encontrar as sequências dos peptídeos gerados. Foram encontrados 42 peptídeos com as sequências confirmadas, entretanto, apenas um peptídeo teve um aumento de 3 vezes em relação ao controle. Esse peptídeo (EL28) é proveniente da degradação da proteína *26S protease regulatory subunit 4* (Rpt2) pelo proteassomo. Rpt2 é uma ATPase que pertence às seis diferentes ATPases presentes na partícula regulatória 19S e possui sua função relacionada com a estabilidade da ligação entre a partícula regulatória 19S e o complexo 20S, além de estar relacionada com a função de facilitar a entrada do substrato dentro do complexo 20S através da mudança conformacional do anel α, aumentando a atividade proteolítica do proteassomo. Ao analisar o efeito do peptídeo EL28 sobre a atividade do proteassomo, houve um aumento da atividade caspase-, tripsina-, quimotripsina-símile do proteassomo. Estudos adicionais poderão ser realizados, com o intuito de caracterizar o mecanismo de ação do peptídeo na atividade do proteassomo, bem como seu efeito sistêmico.

Palavras-chave: Peptídeos. Proteassomo. Proteassomo imune. Sistema ubiquitina-proteassomo. Epectrometria de massas. Degradação de proteínas. Rpt2.

ABSTRACT

MONTE, E. R. **Characterization of intracellular peptide repertoire of cells expressing the immune proteasome.** 2014. 58 p. Masters thesis (Cell and Tissue Biology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the primary means of protein turnover in mammals, and contributes to various cellular functions such as proliferation, differentiation, gene expression and signal transduction. Proteins targeted for degradation by the UPS are usually covalently linked to ubiquitin and then forwarded to the proteasome complex. The proteasome are ATP-dependent proteolytic complex and are comprised of the 19S regulatory particle, which is responsible to recognize, unfold the protein and forward into the complex in which the 20S regulatory particle (19S) is attached at both ends. The 20S complex consists of 4 heptamerics rings, two outer rings (α) and two inner rings (β). The catalytic subunits of the proteasome are β1, β2 and β5 and exhibit different cleavage specificity of the substrate. The β1 subunit cleaves after acidic residues (caspase-like), the β2 subunit cleaves after basic residues (trypsin-like) and β5 subunit cleaves after hydrophobic residues (chymotrypsin-like). After proteolytic cleavage, releases the proteasome in the intracellular environment (nucleus and cytoplasm) peptides containing from 2-20 amino acid residues, which may be degraded into amino acids play roles in cellular signaling and / or are presented as antigens via the major histocompatibility complex (MHC) class I. Particularly under conditions of stress or acute immune response , an alternative form of the proteasome can be induced and the subunits β1 , β2 and β5 are replaced by β1i , β2i and β5i by changing the catalytic specificity and offering better antigen presentation via MHC class I by the immune proteasome . This change in catalytic specificity that occurs between the constitutive proteasome and immune changes, at least partially, the contents of several antigenic peptides. Thus, through the induction of immune proteasome in HeLa cells treated or not with IFN- γ has characterized the intracellular peptide repertoire between the control and experimental cells using the technique of mass spectrometry to find and analyze the sequences of peptides generated. 42 peptides were found with the sequences confirmed, however, only one peptide had a 3-fold increase compared to control. This peptide (EL28) comes from the degradation of protein 26S protease regulatory subunit 4 (Rpt2) by the proteasome. Rpt2 is an ATPase that belongs to the six ATPases present in different 19S regulatory particle, and has its connection with the stability of the connection between the 19S regulatory particle, and the 20S complex function, besides being related to the function of facilitating entry of the substrate into the complex 20S through conformational change of the α ring, increasing the proteolytic activity of the proteasome. When analyzing the effect of the peptide on EL28 proteasome activity, there was an increase in caspase-, tripsina-, chymotrypsin-like activity of the proteasome. Adictional studies can be performed in order to characterize the action of the peptide in proteasome activation, as well as, systemically mechanism.

Keywords: Peptides. Proteasome. Immune proteasome. Ubiquitin-proteasome system. Mass spectrometry. Protein degradation, Rpt2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do proteassomo 26S 20

Figura 2. A via ubiquitina-proteassomo para degradação de proteínas..... 22

Figura 3. Composição das subunidades catalíticas do proteassomo constitutivo e imune..... 24

Figura 4. Esquema representativo da marcação dos peptídeos obtidos de amostras controle e experimental 34

Figura 5. Interface da ferramenta online PCPS (*Proteasome Cleavage Prediction Server*).. 35

Figura 6. Expressão do proteassomo imune em células HeLa e HEK293H 36

Figura 7. Ensaio de atividade do proteassomo (quimotripsina-símile) 38

Figura 8. Ensaio de atividade do proteassomo após diferentes tempos de tratamento com IFN-γ..... 38

Figura 9. Ensaio de viabilidade celular por MTT 39

Figura 10. Confirmação da expressão do proteassomo imune em três diferentes experimentos de indução do proteassomo imune pelo IFN-γ 40

Figura 11. MS representativo do peptídeo marcado com TMAB 42

Figura 12. Análise computacional dos prováveis sítios de clivagem da proteína Rpt2 pelo proteassomo constitutivo e imune na região próxima ao peptídeo EL28..... 43

Figura 13. Efeito do peptídeo EL28 na atividade do proteassomo (quimotripsina-*símile*) in-vitro e in-vivo 44

Figura 14. Efeito do peptídeo EL28 nas três atividades do proteassomo (caspase-, tripsina- e quimotripsina-*símile*)..... 45

Figura 15. Modelo do complexo base-core(19S-20S) do proteassomo 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de peptídeos sequenciados encontrados por espectrometria de massas em células HeLa 42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – adenosina Trifosfato

ATPases – classe de enzimas que catalisam a decomposição de Adenosina Trifosfato

BSA – albumina do soro bovino

CT-L – linfócitos T citotóxicos

DDA – dados dependentes de aquisição

DMEM – *Dulbecco's modification Eagle's Medium*

ESI – ionização em elétron spray

GPCRs – receptores aclopados a proteínas G

IL – interleucina

IL-1β – interleucina 1 beta

IL-6 – interleucina 6

IL-23 – interleucina 23

INF-y – interferon gama

LC-MS/MS – cromatrografia líquida acoplada à espectrometria de massas

MHC-I – complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe I

MS – espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

MTT – *3-(4,5- Dimethylthiazol-2-yl)2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)*

PA28 – partícula regulatória independente de ATP

PA700 – partícula regulatória dependente de ATP

PBS – tampão fosfato-salina

PCPS – ferramenta online para predição dos sítios de clivagem do proteassomo (*Proteasome Cleavage Prediction Server*)

PR-957 – inibidor específico do proteassomo imune

PRS4-HUMAN – subunidade regulatória 4 da protease 26S (*26S protease regulatory subunit 4*)

RLU – unidade relativa de luz

Rpns – Subunidades não-ATPases da partícula regulatória PA700

Rpt – subunidades ATPases da partícula regulatória PA700

Rpt2 – subunidade ATPase 2 da partícula regulatória PA700

SDS-PAGE – dodecil sulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamina

TAP – proteína associada ao transporte de peptídeos para o retículo endoplasmático rugoso

TBS – tampão tris-salina

TFA – ácido trifluoracético

T-L – linfócitos T

TMAB – 4-trimetil-amônio-butiril

TNF-α – fator de necrose tumoral α

UAF – unidades arbitrárias de fluorescência

VFD-7 – peptídeo VFDVELL

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Objetivo 18
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 O proteassomo 19
2.2 Reconhecimento e degradação de proteínas pelo proteassomo 26S 21
2.3 Proteassomo imune 22
2.4 Funções do proteassomo imune 24
2.5 Peptídeos intracelulares 26
3 MATERIAIS E MÉTODOS 28
3.2 Cultura de células 28
3.3 Indução da expressão do proteassomo imune 28
3.4 Dosagem de proteínas 28
3.5 Preparação das amostras 28
3.6 Experimentos de confirmação da expressão do proteassomo imune 29
3.6.1 Eletroforese e Western blotting 29
3.6.2 Ensaios de atividade das subunidades do proteassomo 29
3.7 Análises de viabilidade e proliferação celular 30
3.8 Forma de análise dos resultados 30
3.9 Experimentos de peptidoma 30
3.9.1 Extração de peptídeos 31
3.9.2 Dosagem de peptídeos através do reagente fluorescamine 31
3.9.3 Marcação isotópica dos peptídeos 32
3.9.4 Cromatografia líquida e espectrometria de massas 32
3.10 Interpretação de resultados 33
3.10.1 Fragmentação de peptídeos marcados com isótopos D_0 e D_3-TMAB no espectrômetro de massas 33
3.10.2 Identificação dos peptídeos 33
3.11 Análise computacional dos sítios de clivagem dos peptídeos encontrados 35
4 RESULTADOS 36
4.1 Confirmação da expressão do proteassomo imune 36
4.1.2 Expressão protéica das subunidades do proteassomo 36
4.1.3 Ensaio da atividade proteolítica das subunidades do proteassomo 37
4.2 Análise de viabilidade celular e proliferação 39
4.3 Experimentos de peptidoma 39
4.3.2 Tratamento com IFN-γ e expressão do proteassomo imune 39
4.3.3 Caracterização do conteúdo peptídico intracelular de células HeLa 40
4.3.4 Análise computacional dos sítios de clivagem da proteína Rpt2 próximo à região do peptídeo EL28 42

4.4 Efeito do peptídeo EL28 nas atividades do proteassomo 43
5 DISCUSSÃO 46
6 CONCLUSÃO 51
REFERÊNCIAS 52

1 INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham papéis fundamentais em praticamente todos os processos biológicos, logo o controle do processo de síntese e degradação protéica é altamente específico e importante para a manutenção da homeostase celular. Apesar da natureza exergônica da clivagem de ligações peptídicas, muitos dos processos de degradação intracelular dependem de energia para o reconhecimento e preparação dos substratos encaminhados para a proteólise (DAHLMANN, 2007; RAVID; HOCHSTRASSER, 2008). Em células eucarióticas, esse processo de degradação é regulado, principalmente, pelo sistema extralisossomal da ubiquitina-proteassomo (UPS)(RAVID; HOCHSTRASSER, 2008). Cerca de 90% das proteínas intracelulares de mamíferos é degradada pelo UPS, o qual também é importante para diversas funções celulares como proliferação, diferenciação, apoptose, expressão gênica, transdução de sinal e regulação metabólica (DAHLMANN, 2007; DEMO et al., 2007; DREWS et al., 2007).

O recrutamento de proteínas destinadas à degradação pelo proteassomo ocorre por modificação covalente das mesmas e marca o início do processo. Os substratos protéicos que serão encaminhados à proteólise devem se ligar a, no mínimo, quatro moléculas de ubiquitina, uma pequena proteína altamente conservada contendo 76 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 8,6 kDa. A enzima ativadora da ubiquitina (E1), a enzima conjugada a ubiquitina (E2) e a ubiquitina-proteína ligase (E3) são responsáveis pelo processo de ubiquitinação. A enzima E1 depende de ATP para que possa ativar a molécula de ubiquitina e a E3 é importante para o reconhecimento do substrato a ser degradado (RAVID; HOCHSTRASSER, 2008). Após a reação de ubiquitinação, a molécula é encaminhada ao complexo multicatalítico do proteasomo, o qual irá reconhecer o sinal de poliubiquitina, desdobrar e degradar proteínas alvo em pequenos peptídeos (DAHLMANN, 2007; DREWS et al., 2007; RAVID; HOCHSTRASSER, 2008).

O core 20S é um dos componentes da estrutura molecular do complexo enzimático do proteassomo 26S, sendo caracterizado como uma câmara cilíndrica na qual se encontram os sítios com atividade proteolítica. Em cada uma das extremidades desse core protéico existem dois complexos regulatórios 19S, responsáveis pelo reconhecimento do sinal de poliubiquitina, que contribuem para evitar a degradação indiscriminada de proteínas intracelulares (Figura 1). O regulador 19S possui, em sua estrutura, ATPases importantes para o desdobramento de proteínas e seu direcionamento para o interior do proteassomo. Já o core 20S é unidade proteolítica central formada por quatro anéis, sendo que os dois externos são

compostos por sete subunidades α e os dois internos, por sete subunidades β, que tem peso molecular variando entre 21 e 31 kDa (HEINK et al., 2005; KLOETZEL, 2001).

Os sítios ativos do proteassomo estão presentes nas subunidades catalíticas β_1, β_2 e β_5, e utilizam o grupo hidroxila da cadeia lateral da treonina amino terminal como agente nucleofílico, caracterizando esse complexo enzimático como uma hidrolase aminoterminal nucleofílica e o distinguindo de outras proteases celulares (DEMO et al., 2007; HEINK et al., 2005; KLOETZEL, 2001). Proteínas senescentes, com erros no dobramento ou que sofreram algum problema na tradução são encaminhadas para a degradação (DEMO et al., 2007; NUSSBAUM et al., 2005; YEWDELL; REITS; NEEFJES, 2003). Esses substratos podem se encontrar com o proteassomo por colisão e os produtos da sua proteólise são peptídeos com tamanho variando entre 2 a 20 aminoácidos, os quais podem, ainda, sofrer a ação de peptidases do citoplasma, núcleo ou do retículo endoplasmático. Os peptídeos que escapam da degradação podem ser apresentados como antígenos pelo complexo de histocompatibilidade maior de classe I (MHC-I) (FOSS et al., 1998; YEWDELL; REITS; NEEFJES, 2003). Cada uma dessas subunidades apresenta preferência por diferentes sítios de clivagem no substrato: a subunidade β_1 cliva após resíduos ácidos (atividade caspase-*símile*), a subunidade β_2 cliva após resíduos básicos (atividade tripsina-*símile*) e a subunidade β_5 cliva após resíduos hidrofóbicos (atividade quimiotripsina-*símile*) (CUNHA et al., 2008; GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009; KLOETZEL, 2001; MUCHAMUEL et al., 2009). Em condições de estresse ou resposta imune aguda, essas três subunidades podem ser substituídas por síntese *de novo*, originando as subunidades β_{1i} (*Low Molecular Weight Protein 2* - LMP2), β_{2i} (*Multicatalytic Endopeptidase Complex-símile 1* - MECL-1) e β_{5i} (*Low Molecular Weight Protein 7* - LMP7), que são incorporadas cooperativamente ao complexo do proteassomo imune em formação (DAHLMANN, 2007; FOSS et al., 1998; HEINK et al., 2005; KLOETZEL, 2001).

Essas novas subunidades do proteassomo são fortemente induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias interferon gama (INF-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). Estudos em camundongos mostraram que, cerca de oito dias após a infecção com vírus, bactéria ou fungo, o padrão de produção do proteassomo é alterado e a forma imune passa a ser a predominante em diversas células e tecidos (FOSS et al., 1998; GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009; GROETTRUP et al., 1995; MUCHAMUEL et al., 2009; NUSSBAUM et al., 2005). O INF-γ torna-se particularmente importante para a apresentação de antígenos, pois, além de induzir a formação das diferentes subunidades do proteassomo, é capaz de estimular a síntese da cadeia pesada do MHC de classe I, diversas proteínas do transportador associado ao processamento de antígenos (TAP) e o ativador PA28 (GROETTRUP et al., 1995; KLOETZEL, 2001).

Dessa forma, o proteassomo padrão pode ser substituído pelo proteassomo imune, o qual apresenta diferentes especificidades de clivagem proteolítica e se liga a outra partícula regulatória, o PA28 (DAHLMANN, 2007; GROETTRUP et al., 1995; KLOETZEL, 2001). Estudos anteriores demonstraram que o PA28 e PA700(19S) se ligam, simultaneamente, ao complexo proteolítico (20S) do proteassomo constitutivo formando o proteassomo híbrido (PA700-20S-PA28) (TANAHASHI et al., 2000). Entretanto, recentemente, verificou-se que a partícula regulatória PA28 aumenta a produção de um mesmo peptídeo, mas não confere ao proteassomo constitutivo a capacidade de produzir o mesmo peptídeo gerado pelo proteassomo imune (DE GRAAF et al., 2011).

Outras formas de diferenciação entre os dois tipos de proteossomo são a localização celular e o tempo de meia vida. O proteassomo constitutivo apresenta tempo de meia vida de, aproximadamente, 5 dias, enquanto o do proteassomo imune é por volta de 27 horas. Em células de mamíferos, o proteassomo 26S se distribui por todo o núcleo e citoplasma, contudo se apresenta em maiores concentrações próximo dos centrossomos. Já o proteassomo imune se concentra especificamente no retículo endoplasmático (DAHLMANN, 2007; HEINK et al., 2005). Apesar de poder ser induzido em diversos tipos celulares, algumas células de origem hematopoética e envolvidas na vigilância imune, como as células dendríticas, linfócitos e monócitos, apresentam constitutivamente a forma imune do proteassomo (DAHLMANN, 2007; MUCHAMUEL et al., 2009).

O proteassomo imune propicia uma melhor apresentação de antígenos via MHC-I. Isso ocorre por que essa forma do proteassomo produz maior quantidade de peptídeos com oito a dez aminoácidos e apresenta atividade quimotripsina-*símile* aumentada, em parte, devido à substituição da subunidade β_1 pela subunidade β_{1i}, que passa a ter essa característica de catálise. Assim, a apresentação de antígenos será favorecida já que as moléculas MHC-I têm preferência por se ligarem a peptídeos com cerca de nove aminoácidos e que apresentem características hidrofóbicas ou básicas em suas regiões carboxi terminais (GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009; YEWDELL; REITS; NEEFJES, 2003).

Essa característica do proteassomo imune, de produzir maior número de peptídeos capazes de se ligarem corretamente ao MHC de classe I, faz com que esse complexo tenha grande importância para a modulação da eficiência da resposta imune através da ativação de linfócitos T citotóxicos (HEINK et al., 2005).

Destaca-se, ainda, o fato de que epítopos virais são processados de maneira mais eficiente em relação aos epítopos tumorais e próprios pelo proteassomo imune (NUSSBAUM et al., 2005). Além disso, em alguns casos específicos, outras proteases podem participar do

processo de produção do *pool* de ligantes para o MHC de classe I, como a tripeptidil peptidase II e a thimet oligopeptidase (BERTI et al., 2009; FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004; KLOETZEL, 2001; RIOLI et al., 2003). Dessa forma, a formação e a viabilidade do UPS representam etapas importantes para a maquinaria celular da produção de antígenos e para a defesa do organismo (HEINK et al., 2005).

Os processos dependentes do proteassomo para a apresentação de antígenos podem ser considerados específicos de células de mamíferos, contudo a proteólise e produção de peptídeos por esse complexo enzimático são eventos necessários para todos os tipos celulares. Em eucariotos, de 30 a 90% das proteínas sintetizadas são degradadas minutos após sua produção e os peptídeos produzidos são liberados em diferentes compartimentos celulares. Além de poderem ser apresentados como antígenos, esses peptídeos intracelulares podem ter outras funções, como modular a função de proteínas (BERTI et al., 2009; CUNHA et al., 2008; FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004).

Peptídeos livres podem influenciar a localização e atividade de quinases e fosfatases nas células, pois são capazes de modular a atividade enzimática atuando como inibidores competitivos ou como ativadores de enzimas proteolíticas (BERTI et al., 2009; FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004; FRICKER et al., 2012). Esses peptídeos também podem ter ações farmacológicas ao agirem como agonistas ou antagonistas de receptores da membrana nuclear, bem como funcionarem como reguladores da transcrição gênica (HAYNES et al., 2010). Outra possível função é a de serem agonistas naturais de muitos receptores intracelulares órfãos, bem como interferir na cascata de transdução de sinal de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (CUNHA et al., 2008). Portanto, os peptídeos presentes no interior das células podem ser considerados moduladores naturais de funções celulares, como regulação da expressão gênica, metabolismo, sinalização celular e direcionamento de proteínas (CUNHA et al., 2008; FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004; FRICKER et al., 2012).

Por conseguinte, esses peptídeos podem apresentar grande importância *in vivo*, afinal a regulação das funções celulares pode ter consequência em diversos processos fisiológicos ou patológicos (BERTI et al., 2009). Estudos tem mostrado que a introdução de peptídeos sintéticos em células pode influenciar as interações proteína-proteína, indicando que essas novas moléculas bioativas poderão apresentar potencial terapêutico para manipulações farmacológicas (CUNHA et al., 2008; FRICKER et al., 2012). Sabendo dessa relevância biológica dos peptídeos intracelulares e da existência de diferentes tipos de proteassomo para a degradação de proteínas e apresentação de antígenos, um melhor entendimento do repertório

de peptídeos produzidos pelas células e do papel funcional desempenhado pelos mesmos torna-se um objetivo de investigação importante.

1.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi padronizar um modelo celular de indução do proteassomo imune e caracterizar as diferenças peptídicas entre células expressando o proteassomo imune e células expressando o proteassomo constitutivo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O proteassomo

O proteassomo, um complexo multicatalítico de 2 MDa, é um componente essencial da via proteolítica em células eucarióticas sendo responsável pela degradação da maior parte de proteínas intracelulares, podendo ser uma degradação dependente ou não-dependente de ubiquitina.

Existem diferentes tipos de proteassomo e o proteassomo 26S, que é expresso constitutivamente na maioria das células eucarióticas, está envolvido em vários processos biológicos, incluindo progressão do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose, resposta imune, transdução de sinal, transcrição, metabolismo e controle de qualidade de proteína (DAHLMANN, 2007; DEMO et al., 2007; DREWS et al., 2007).

O proteassomo é composto por dois subcomplexos: o PA700 (partícula regulatória 19S) e o complexo 20S. O PA700 é composto por 20 diferentes subunidades que servem para reconhecer, desdobrar e translocar a proteína para dentro do core proteolítico. O PA700 é formado por outros dois subcomplexos chamados de base e tampa (GLICKMAN et al., 1998a). A base consiste de seis subunidades AAA-ATPases, Rpt1-6, e por 2 subunidades não ATPases, Rpn1 e Rpn2, que atuam como suportes e interagem com uma infinidade de subunidades (DA FONSECA; HE; MORRIS, 2012). As ATPases, por sua vez, utilizam ATP para desdobrar as proteínas e transportá-las para dentro do complexo 20S.

As Rpts, além de possuírem o domínio conservado Walker A e B, que são necessários para a hidrólise de ATP, possuem outro domínio conservado no N-terminal que promove a interação das Rpts com outras subunidades do proteassomo (FOSS et al., 1998; GLICKMAN et al., 1998b; RICHMOND; GORBEA; RECHSTEINER, 1997). A tampa é constituída por outras subunidades, Rpn3, Rpn5-12 e Rpn15 que forma uma subestrutura posicionada distalmente ao complexo 20S.

O complexo 20S é caracterizado como uma câmara cilíndrica na qual se encontram os sítios das atividades catalíticas. Essa câmara cilíndrica é formada por 4 anéis, sendo que, o anel externo é formado por 7 subunidades α, e o anel interno formado por 7 subunidades β. As subunidades catalíticas, β1, β2 e β5, do proteassomo 26S, possuem especificidade de clivagem diferente no substrato. A subunidade β1 cliva após resíduos ácidos (caspase-*símile*), β2 após resíduos básicos (tripsina-*símile*) e a subunidade β5 após resíduos hidrofóbicos (quimotripsina-*símile*) (BAUMEISTER et al., 1998; COUX; TANAKA; GOLDBERG, 1996).

Os anéis α servem como uma porta que limita a entrada do substrato para dentro do complexo 20S. A interação de um domínio no N-terminal das proteínas Rpt com subunidades do anel α, gera uma mudança conformacional permitindo a passagem e saída do substrato de dentro da câmara catalítica. Em células eucarióticas, a degradação dependente de ubiquitina começa uma função primária na degradação de proteínas de vida média curta, que são importantes em vários processos celulares, como por exemplo, ciclo celular (BECH-OTSCHIR et al., 2001; KAISER et al., 1999; VERMA et al., 1997), regulação transcricional (BOUNPHENG et al., 1999), apoptose (BUSCHMANN et al., 2000), além de degradar proteínas danificadas (HILLER et al., 1996). O produto de degradação pelo proteassomo 26S gera peptídeos entre 2-20 aminoácidos que são liberados no citoplasma que podem sofrer uma nova degradação liberando os aminoácidos que servirão para formação de novas proteínas. Os peptídeos que escapam de uma nova degradação no citoplasma podem ser utilizados como peptídeos antigênicos e serem apresentados pelas moléculas de MHC-I às células T do sistema imune, ou ainda serem utilizados na sinalização celular modulando interações proteína-proteína (BERTI et al., 2009; CUNHA et al., 2008; FRICKER et al., 2012; GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009).

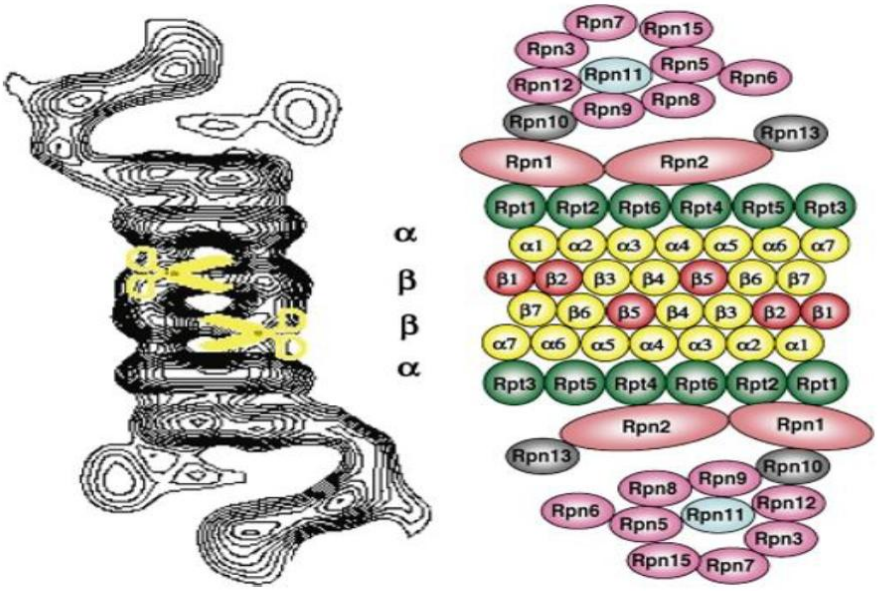


Figura 1. Representação esquemática do proteassomo 26S. Painel esquerdo: Estrutura Bruta (imagem média) do proteassomo 20S com base em micrografia eletrônica. Fotografia cedida por W. Baumeister. Os anéis α e β do proteassomo 20S estão indicados. As tesouras em amarelo na imagem indicam a localização dos sítios ativos nos dois anéis β. **Painel direito:** Desenho esquemático do proteassomo 26S. O complexo 20S é constituído por dois anéis externos α e dois anéis internos β, que são compostos de sete subunidades cada. As subunidades β1, β2 e β5 estão associadas com as atividades caspase, tripsina, quimotripsina, respectivamente. O complexo 19S

compreende várias subunidades diferentes, no qual nove estão agrupadas em uma região denominada tampa e as demais subunidades formam a região denominada de base. Adaptado de Tanaka, 2009.

2.2 Reconhecimento e degradação de proteínas pelo proteassomo 26S

Como já citado anteriormente, o complexo 19S (PA700) é a partícula regulatória do proteassomo e está ligado em ambas a extremidades do complexo 20S (19S-20S-19S), ele regula a entrada e a saída de substratos do complexo 20S. As proteínas marcadas para a degradação podem ou não estar ligadas covalentemente a uma cadeia de poliubiquitina. Uma cascata de enzimas, conhecidas como E1, E2 e E3, conjuga ubiquitina através dos resíduos de lisina em proteínas marcadas (FINLEY, 2009). Essas proteínas poliubiquitinadas são reconhecidas pela partícula regulatória (19S) a qual é desdobrada e encaminhada para dentro do complexo 20S, onde é rapidamente degradada. O desdobramento de proteínas pela partícula regulatória é mediada por seis subunidades ATPases, que são membros da família de proteínas AAA (LEE et al., 2001; WEBER-BAN et al., 1999). As subunidades α do complexo 20S possui sítios de ligação para a partícula regulatória que promove a abertura do canal (FORSTER et al., 2005; SMITH et al., 2007). Então, a formação do proteassomo 19S-20S-19S é geralmente acompanhada pela abertura do canal 20S. Então, para entrar no canal 20S, o substrato primeiro precisa se deslocar através do canal da partícula regulatória. Os componentes da partícula regulatória que promovem o desdobramento de proteínas são Rpn1 e Rpn2, e pelo reconhecimento de ubiquitina são Rpn10 e Rpn11.

A entrada do substrato dentro do complexo 20S, depende da abertura do anel α, que é proporcionado pela ligação do domínio HbYX (um resíduo hidrofóbico seguido por uma tirosina e por um resíduo não específico) no C-terminal das Rpts. Portanto, peptídeos sintéticos terminados neste motif podem abrir o canal catalítico do complexo 20S. Mutações realizadas no domínio HbYX bloquearam a abertura do canal 20S, ou preveniram a formação do complexo 19S-20S ou permitindo sua formação, mas interferindo com os mecanismo de abertura (SMITH et al., 2007). Estudos realizados com microscopia de força atômica (AFM), indicaram que o complexo 20S, em sua forma livre, possui uma abertura do canal α que alterna entre aberto e fechado, provavelmente representando para uma atividade peptidase pequena (OSMULSKI; GACZYNSKA, 2000).

A degradação de proteínas pelo proteassomo é estritamente dependente de ATP, o que indica um papel central que começa com as Rpts no mecanismo de reação.

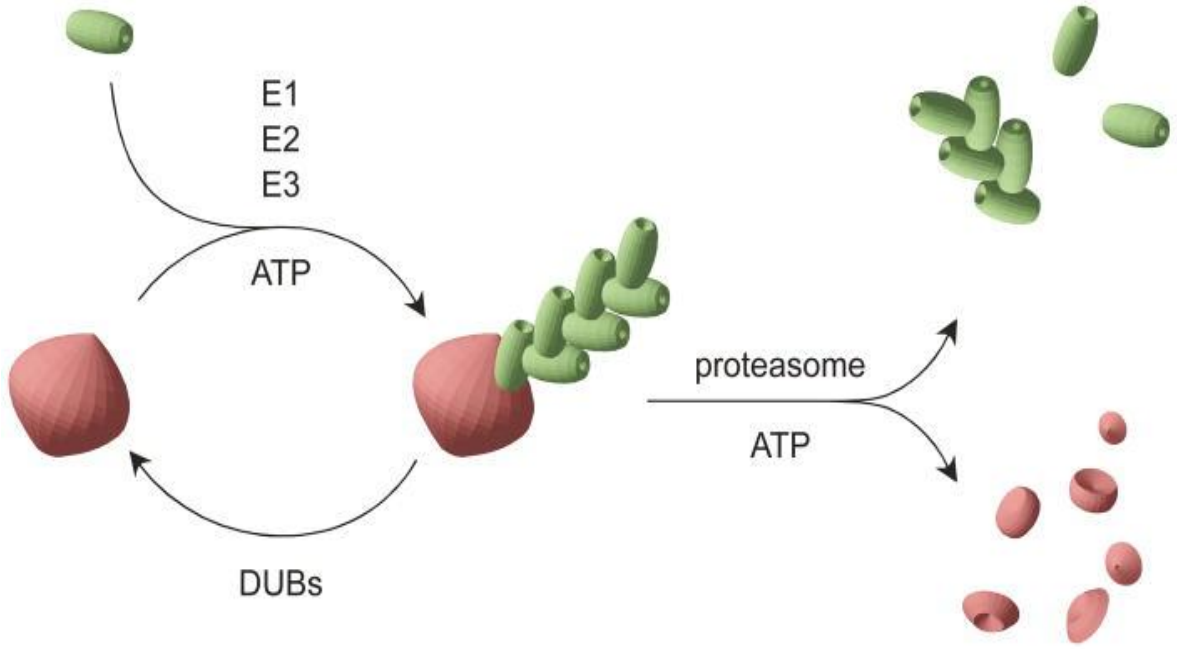


Figura 2. A via ubiquitina-proteassomo para degradação de proteínas. Ubiquitina em verde, substrato em rosa. Uma cadeia linear de ubiquitina, sintetizada via uma cascata de enzimas E1, E2 e E3, parece ser predominante para o reconhecimento de substratos pelo proteassomo. Para alguns substratos, entretanto, a adição da cadeia de poliubiquitina não é obrigatória.

2.3 Proteassomo imune

Além do proteassomo 26S, que é expresso constitutivamente em células eucarióticas, existe a forma induzível do proteassomo. Em condições de stress ou resposta imune, três subunidades catalíticas, β1i (LMP2), β2i (MECL-1) e β5i (LMP7), são expressas e substituem, respectivamente, as subunidades β1, β2 e β5 em um proteassomo em formação (Figura. 3). A expressão do proteassomo imune é induzível na maioria das células de mamíferos, entretanto, a sua expressão é constitutiva em células dendríticas (MOREL et al., 2000). Essas novas subunidades catalíticas conferem ao proteassomo imune uma atividade quimotripsina-símile aumentada, em parte devido à substituição de β1 por β1i, que ao invés de possuir a atividade caspase-símile, que cliva após resíduos ácidos, apresenta atividade quimotripsina-símile, que cliva após resíduos hidrofóbicos (TOES et al., 2001). Portanto, teoricamente, o proteassomo imune produz uma quantidade menor de peptídeos com resíduos ácidos do que hidrofóbicos no C-terminal (KESMIR et al., 2003). Desta forma, a expressão das imuno subunidades confere uma melhor apresentação de antígeno via MHC de classe I, visto que as moléculas de MHC de classe I possuem uma preferência a se ligarem a peptídeos com o C-terminal hidrofóbico. Além disso, o proteassomo imune produz peptídeos entre 8-9 aminoácidos, sendo esta também uma característica preferencial das moléculas de MHC-I

(CHAPIRO et al., 2006). O aumento da capacidade proteolítica e a alta afinidade dos peptídeos ligantes das moléculas de MHC-I, gerados pelo proteassomo imune, são o que definem sua melhor eficiência sobre o proteassomo constitutivo.

Os fatores que induzem a expressão de β1i, β2i e β5i são citocinas pro-inflamatórias como o IFN-γ e o fator de necrose tumoral (TNF-α) (AKI et al., 1994; BOES et al., 1994; HALLERMALM et al., 2001). Essas citocinas além de induzirem fortemente as imuno subunidades, também induzem a expressão da partícula regulatória PA28 (KLOETZEL, 2001). PA28 é um complexo heptamérico composto de 28 subunidades α e β que se ligam aos anéis α, de ambas as extremidades, do complexo 20S. Este complexo se liga às extremidades do complexo 20S permitindo a abertura do barril. Ao contrário do 19S, a PA28 não possui subunidades ATPases e não possui habilidade de se ligar a conjugados de ubiquitina. Além disso, numa formação do proteassomo híbrido (19S-20S-PA28), o PA28 pode facilitar a saída dos peptídeos de dentro do proteassomo (RABL et al., 2008; SMITH et al., 2007). A saída rápida do peptídeo de dentro do proteassomo deve previnir sua rápida digestão dentro da cavidade do complexo 20S. A análise da geração de produtos pelo proteassomo 20S, com ou sem PA28, demonstraram que a presença de PA28 contribui para aumentar a geração de peptídeos por dupla clivagem (DICK et al., 1996). Entretanto, estudos *in vitro* onde foram utilizados o PA28, o proteassomo constitutivo (20S) e o proteassomo imune (20Si) purificados, demonstraram que o PA28, em conjunto com as subunidades, começa um papel importante na produção de peptídeos de alta afinidade que mantém os níveis de MHC-I na superfície das células. Além disso, proporciona peptídeos ligantes que estabilizam as moléculas de MHC-I após a exposição às citocinas. Os estudos em que foram utilizados o proteassomo imune e o PA28, purificados, demonstraram que o PA28 e as imunosubunidades (β1i, β2i e β5i) possuem efeitos aditivos. O PA28 se liga em ambas as extremidades do proteassomo imune, levando a uma clivagem dupla coordenada e aparentemente aumentando a geração de ligantes de MHC-I. As imunosubunidades mudam, portanto, as preferências dos sítios de clivagem do proteassomo (DE GRAAF et al., 2011).

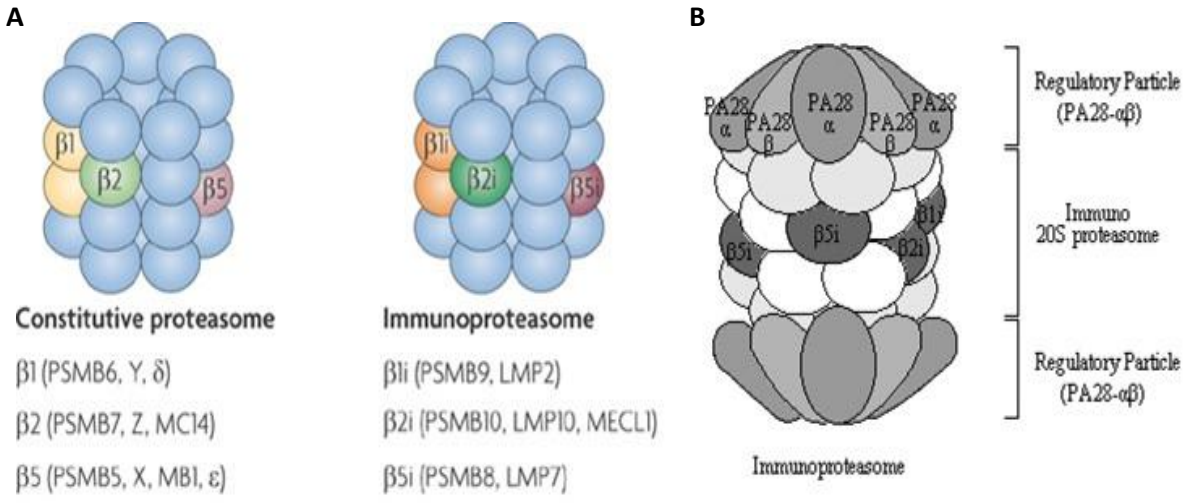


Figura 3. Composição das subunidades catalíticas do proteassomo constitutivo e do proteassomo imune: A. As subunidades proteolíticas do proteassomo constitutivo são β1 (também conhecida como PSMB6, Y e δ), β2 (também conhecida como PSMB7, Z e MC14) e β5 (também conhecida como PSMB5, X, MB1 e ε). As subunidades catalíticas do proteassomo imune, que são induzidas por IFN-γ e TNF-α, são β1i (também conhecida como PSMB9 e LMP2), β2i (também conhecida como PSMB10, LMP10 e MECL1) e β5i (também conhecida como PSMB8 e LMP7). Nature Reviews Immunology; (GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009). **B.** A partícula PA28 composta por subunidades α e β ligadas às extremidades do complexo 20S contendo as imuno subunidades.

2.4 Funções do proteassomo imune

Além da função de degradação de proteínas intracelulares, o proteassomo também está envolvido na produção de peptídeos antigênicos apresentados ao sistema imune via MHC- I (ROCK; GOLDBERG, 1999). Proteínas virais e intracelulares são degradadas gerando peptídeos entre 8 a 11 aminoácidos, que é um tamanho apropriado para que esses fragmentos se liguem e sejam transportados até o retículo endoplasmático pelo transportador associado ao processamento de antígeno (TAP) onde eles se associam as moléculas de MHC-I e são apresentados na superfície das células (GACZYNSKA; ROCK; GOLDBERG, 1993). Ambos os proteassomos, o constitutivo e o imune, são capazes de gerar epítopos para moléculas de MHC-I. Entretanto, existem algumas diferenças na geração eficiente de determinados epítopos. Em um estudo, onde células HeLa foram infectadas com o vírus da Hepatite B (HBV), revelou-se uma eficiência na geração do epítopo $HBVcAg_{141-151}$. Entretanto, para a apresentação deste epítopo, foi necessária a estimulação da expressão do proteassomo imune com IFN-γ (SIJTS et al., 2000). Ao contrário, a geração do epítopo derivado de um tumor de Melan-A parece ser significantemente prejudicado na presença do proteassomo imune (MOREL et al., 2000). Além disso, em certos estudos *in vitro*, o *turnover* de proteínas mostra ser acelerado na presença do proteassomo imune quando comparado com o proteassomo constitutivo (SIJTS et al., 2000). Portanto, o proteassomo imune apresenta padrões de

clivagens diferentes daqueles apresentados pelo proteassomo constitutivo, visto que o proteassomo imune não apresenta a atividade que cliva após resíduos ácidos (GACZYNSKA et al., 1994; TOES et al., 2001). Utilizando análises de bioinformática para comparar a especificidade dos dois tipos de proteassomo, foi possível quantificar que o proteassomo imune é mais específico que o proteassomo constitutivo, ou seja, a clivagem do proteassomo imune é restrita a um menor número de aminoácidos, enquanto que a clivagem pelo proteassomo constitutivo é muito mais ampla (KESMIR et al., 2003).

A formação do proteassomo imune ocorre rapidamente em resposta a citocinas pró-inflamatórias, produzidas pela resposta imune inata após uma infecção. Entretanto, a expressão do proteassomo imune também ocorre em células não infectadas, sugerindo que o proteassomo imune não deve ter apenas um papel importante no processamento de antígenos (GROETTRUP; KIRK; BASLER, 2009). O proteassomo imune tem tido suas funções relacionadas com a de regular a produção de citocinas. Células dendríticas derivadas de camundongos deficientes em LMP2/β1i infectados com o vírus da influenza tiveram níveis reduzidos de INF-α, interleucina (IL)-1β, IL6 e TNF-α quando comparados com camundongos controle (HENSLEY et al., 2010), sugerindo um papel importante do proteassomo imune na resposta imune inata. A inibição seletiva de β5i, utilizando o inibidor PR-957, bloqueou a produção de IL-23 em monócitos e de TNF-α e IL-6 em células T (MUCHAMUEL et al., 2009). O mesmo foi observado em outro estudo em que animais modelos de doenças autoimunes, tais como, coliti experimental e artrite reumatóide. A inibição de β5i por PR-957 (BASLER et al., 2010; MUCHAMUEL et al., 2009) ou a deleção de LMP7/β5i em camundongos (SCHMIDT et al., 2010), diminuiu a secreção de citocinas inflamatórias reduzindo eficientemente a inflamação e a manifestação da doença. Utilizando um inibidor específico (PR-957) da subunidade β5i (LMP7) em células derivadas de indivíduos com artrite reumatoide, observou-se o bloqueio da produção de IL-23 em torno de 80%, e da secreção de IL-6 e TNF em torno de 50%, sugerindo que LMP7 pode regular a produção de citocinas inflamatórias em células de doadores saudáveis ou daqueles com artrite reumatoide (MUCHAMUEL et al., 2009).

Também tem sido estudado o envolvimento do proteassomo imune com a diferenciação, a sobrevivência e a proliferação de células T. A administração de PR-957 previne a indução da diferenciação por IL-6 e TGF-β, de células T CD4 em células T_H17, o que implica que o proteassomo imune deve ser necessário para o processamento de certos fatores de diferenciação (MUCHAMUEL et al., 2009). A inibição seletiva ou a ablação genética de β5i resulta em uma diminuição da diferenciação de Th1 e Th17, aumentando o

desenvolvimento de células T regulatórias, mas não apresenta nenhum efeito na diferenciação de células Th2. A proliferação também mostrou uma alteração em células T com deficiência das imuno subunidades. Células T de camundongos sem MECL-1/β2i e LMP7/β5i mostraram-se altamente proliferativas em resposta a mitógenos de células T, entretanto, a mesma resposta não foi observada na ausência de apenas uma das imunosubunidades (CAUDILL et al., 2006).

Alguns estudos começaram a relacionar o proteassomo imune com funções não imunes, como por exemplo, controle na homeostase celular sobre stress oxidativo induzido por citocina. Estudos *in vitro* demonstraram que o proteassomo constitutivo (26S) não é muito eficiente em reconhecer e degradar proteínas oxidadas (DAVIES, 2001). Tanto o proteassomo 20S, sem as imuno subunidades (β1i, β2i e β5i), quanto o proteassomo imune (com a presença das imunosubunidades, com ou sem a partícula regulatória PA28), demonstraram uma maior capacidade em degradar agregados de proteínas causados por stress oxidativo, devido ao aumento da capacidade proteolítica do proteassomo (AIKEN et al., 2011). Juntos estes dados demonstraram não só a importância do proteassomo imune na geração de diferentes peptídeos antigênicos, mas também na regulação de outros eventos celulares importantes.

2.5 Peptídeos intracelulares

Recentes estudos tem demonstrado a importância dos peptídeos intracelulares em importantes processos celulares. A função dos peptídeos intracelulares em modular a interação proteína-proteína, proteína-RNA e proteína-DNA os tem envolvido em processos como a regulação gênica, metabolismo, sinalização celular e endereçamento de proteínas. Como já foi dito anteriormente, alguns peptídeos gerados pelo proteassomo escapam de uma nova degradação no citoplasma e são utilizados como epítopos na apresentação de antígeno via MHC-I. Entretanto, estudos de peptidômica realizados em células tem demonstrado um grande número de peptídeos derivados de proteínas celulares que podem ter um papel regulatório na sinalização celular (FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004; GELMAN et al., 2011).

Peptídeos intracelulares específicos foram isolados de cérebro de camundongo e de célula HEK293H, sequenciados e quimicamente sintetizados. Estes peptídeos foram reintroduzidos dentro de células HEK293H e CHO-S em concentrações entre 20-80 µM e mostraram modular a transdução de sinal na via GPCR (CUNHA et al., 2008). Em outro estudo foi demonstrado que peptídeos intracelulares específicos, que foram isolados do tecido

adiposo de ratos, se ligam em proteínas específicas e quando reintroduzidos em adipócitos diferenciados (3T3-L1) facilitam a capacitação de glicose induzida por insulina (HAYNES et al., 2010). Além disso, um peptídeo intracelular específico, produzido pelo proteassomo, foi capaz de aumentar a concentração citosólica de cálcio em células HEK293H, sugerindo uma possível função biológica do peptídeo VFD-7(RUSSO et al., 2012).

Análises peptidômicas, após inibição do proteassomo com inibidores como o bortezomib e o epoxomicin, demonstraram um aumento nos níveis de peptídeos intracelulares, sugerindo que a inibição do proteassomo altera o balanço de peptídeos intracelulares, os quais devem contribuir para o efeito biológico destas drogas (FRICKER et al., 2012; GELMAN et al., 2013). Por outro lado, células tratadas com INF-y demonstraram uma grande importância na geração de peptídeos e conferindo uma melhor apresentação de antígenos via MHC-I, não só dos peptídeos que também são gerados pelo proteassomo constitutivo mais de outros peptídeos que só são encontrados na presença do proteassomo imune. Estudos anteriores demonstraram que os peptídeos gerados pelo proteassomo imune são mais eficientes na ativação de células T do que os peptídeos gerados pelo proteassomo constitutivo (KLOETZEL, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2 Cultura de células

A linhagem celular imortalizada que foi isolada de um tumor de cérvix humano (HeLa) e células humanas embrionárias de rim (HEK293H) foram cultivadas em placas de 100 mm com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Life Technologies*, EUA), bicarbonato de sódio 24 mM e antibióticos (100.000 u/L de penicilina e 0,1 g/L de estreptomicina) (*Life Technologies*, EUA). As células foram mantidas em um ambiente atmosférico constante de 5% de CO_2 e a temperatura de 37 °C.

3.3 Indução da expressão do proteassomo imune

Após atingirem 50 a 60% de confluência, as células HeLa foram incubadas em diversas concentrações de INF-γ (0, 100, 200, 400 unidades/mL) por 48 horas. Depois do período de incubação com INF-γ, as células foram acondicionadas por 1 hora em meio DMEM sem SFB, a fim de minimizar os estímulos externos recebidos pelas células. A seguir as células foram coletadas com PBS gelado e centrifugadas três vezes em centrífuga refrigerada a 4 °C a 850 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso em tampão de lise (Tris/HCl 50 mM; pH 7,5; NaCl 150 mM e 1% NP40) e incubado em gelo por 30 minutos. O proteassomo foi analisado no sobrenadante após centrifugação dos homogenatos a 13.000 x g por 10 minutos a 4 °C (FOSS et al., 1998).

3.4 Dosagem de proteínas

As determinações da concentração protéica das amostras dos homogenatos celulares foram realizadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) (*Bio-Rad Protein Assay*, EUA), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

3.5 Preparação das amostras

Após a dosagem de proteínas, 50 µg de proteínas de cada amostra foi ressuspensa em tampão de amostra (Tris/HCl 100 mM; pH 6,8; dodecil sulfato de sódio - SDS - 4%; azul de

bromofenol 0,2%; glicerol 20% e β-mercaptoetanol 200 mM) e aquecida a 95 °C durante 5 minutos para posterior análises por *Western blotting*, conforme descrito a seguir.

3.6 Experimentos de confirmação da expressão do proteassomo imune

3.6.1 Eletroforese e Western blotting

As proteínas foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida (acrilamida 12%) em presença de SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Em seguida, as proteínas passaram por transferência eletroforética para uma membrana de nitrocelulose (*Bio-Rad*, EUA). Após a verificação da transferência com o corante *Pounceau red*, a membrana foi incubada com os anticorpos primários *Anti-20S proteasome subunit* β5 (1:1000, Millipore, Temecula, CA) para confirmar a expressão da subunidade especifica do proteassomo contitutivo e *Anti-Proteasome 20S LMP7 antibody [1A5]* (1:1000, Abcam, EUA) para confirmar a expressão da subunidade específica ($\beta5_i$) do proteassomo imune por 2 horas. A seguir, a membrana foi marcada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:2000, *GE Heathcare*, EUA) por 1 hora. A revelação foi realizada com substrato quimioluminescente, seguindo as instruções do fabricante (*Thermo Scientific*, EUA) e sensibilizadas em filme de raio-X.

3.6.2 Ensaios de atividade das subunidades do proteassomo

As atividades caspase-*símile*, tripsina-*símile* e quimotripsina-símile do proteassomo, foram medidas pela taxa de clivagem dos substratos luminescentes Suc-LLVY-Glo™, Z-LRR-Glo™ e Z-nLPnLD-Glo™ (*Promega*,USA). As células foram lisadas em tampão de lise (Tris–HCl, pH 7.6 a 0 °C, 150 mM NaCl, 1% NP40) em gelo por 30 minutos, sem adição de inibidor de protease. Os lisados foram centrifugados a 13.000 x g por 10 min (FOSS et al., 1998). Após a extração, cada sobrenadante foi transferido para um tubo seco e diluído, a fim de corrigir a concentração protéica das amostras (20 µg de proteína de cada sobrenadante). Em seguida, as amostras foram incubadas na ausência ou na presença de 10 µM de inibidor do proteassomo lactacistina (*Sigma-Aldrich*, EUA) por 30 minutos, em temperatura ambiente. As amostras foram pipetadas em triplicatas em placas brancas de poliestireno de 96 poços (*Corning*, USA). Os peptídeos luminescentes foram preparados, separadamente, conforme orientações do fabricante e 50µL foram aplicadas em cada poço para um volume total de 100

µL. Após a incubação em temperatura ambiente por 35 minutos, o sinal luminescente produzido pela reação da luciferase foi lido em um leitor de placas *SpectraMax L* (*Molecular Devices*, EUA). O sinal foi linearmente proporcional à quantidade de atividade do proteassomo.

3.7 Análises de viabilidade e proliferação celular

O teste MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2-,5-diphenyltetrazolium bromide) baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazólio por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectofotométrico.

O teste de MTT foi realizado de acordo com os seguintes passos (VAN DE LOOSDRECHT et al., 1991):

1. Células HeLa foram cultivadas em placas de 35mm em uma concentração de $60x10^4$ células. No dia seguinte, as células foram tratadas com 200U de IFN-γ.
2. Após, 48 horas de incubação em estufa a 37 °C, o sobrenadante das culturas de células tratadas ou não com 200U/48H de IFN-γ, foi removido e substituído por DMEM sem soro e sem antibióticos, acrescido de 10% do volume de MTT (*Sigma-Aldrich*, EUA). Em seguida, foram incubadas em estufa a 37 °C de 1 a 3 horas ou até atingir a coloração arroxeada. O meio foi então substituído por solução de álcool isopropílico/ HCl no mesmo volume, para dissolução dos cristais. As placas foram agitadas vigorosamente em shaker por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e aplicado em triplicata em placas transparentes de 96 poços. A leitura da absorbância a 570 nm foi realizada em espectofotômetro *SpectraMax M2*^{e} (*Molecular Devices, EUA*)

3.8 Forma de análise dos resultados

Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ o erro padrão da média (EPM). Foram aplicados testes estatísticos One way-ANOVA e Two way-ANOVA para análise dos resultados. Foram considerados significantes valores com $p \leq 0,05$ ou $p \leq 0,001$.

3.9 Experimentos de peptidoma

3.9.1 Extração de peptídeos

Os extratos de peptídeos de células HeLa foram preparados como previamente descrito (CASTRO et al., 2010). Após tratamento de células HeLa com ou sem 200U de IFN-γ por 48 horas, as células foram coletadas e o pellet celular lavado com PBS 1X por centrifugação a 1.100 x g por 5 minutos e então ressuspeso em 10 mL de H_2O milliQ a 80 °C e incubadas em banho-maria a 80 ºC por 20 minutos (a incubação em alta temperatura tem como finalidade a inativação de proteases). Após esta incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C no gelo por quarenta minutos e posteriormente acidificadas com HCl para uma concentração final de 10 mM, para precipitação de proteínas (o resfriamento antes da acidificação evita a formação de fragmentos peptídicos gerados por hidrólise ácida a quente). As amostras resfriadas foram sonicadas três vezes com 20 pulsos de um segundo a 4 Hz e os homogenatos centrifugados a 1.500 x g por 40 minutos a 4 ºC. Os sobrenadantes coletados foram novamente centrifugados a 100.000 x g por 1 hora a 4 °C. Depois deste ponto, os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore que permite a passagem de moléculas com peso molecular inferior a 5 KDa ou 10 KDa (Amicom Ultra, Millipore, EUA). Os eluatos não retidos pela membrana foram aplicados em pré-colunas C18 (OASIS – Waters, UK), lavado com água deionizada e eluído com metanol 100% contendo 0,15% de ácido trifluoracético (TFA). Os volumes das amostras foram reduzidos para 5 µL em uma centrífuga a vácuo e estocados a -20 ºC.

3.9.2 Dosagem de peptídeos através do reagente fluorescamine

Os extratos de peptídeos foram ressuspensos em água deionizada e quantificados através de um método fluorimétrico, utilizando-se o marcador fluorescamine ($C_{17}H_{10}O_4$) (UDENFRIEND et al., 1972). Este método consiste na ligação de uma molécula de fluorescamine à aminas primárias presentes nos resíduos de lisina (K) e no N-terminal dos peptídeos. Ao reagir com estes resíduos a molécula de fluorescamine emite fluorescência medida nos comprimentos de onda de 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão). As concentrações de peptídeos nas amostras desconhecidas foram determinadas através de uma curva padrão utilizando o peptídeo 5ª (LTLRTKL) como padrão.

Para a realização desses experimentos foram utilizadas placa branca opaca de 96 poços ((Corning Incorporated, NY, USA). Em cada poço foram misturados 2,5 µL de amostra, 25 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6.8) e 12,5 µL de solução de fluorescamine 0,3 mg/mL

diluída em acetona. Após a aplicação de todas as amostras, a placa foi agitada por 1 minuto e acrescentados 110 µL de água para estabilizar a reação. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão).

3.9.3 Marcação isotópica dos peptídeos

Os extratos de peptídeos foram submetidos à marcação isotópica com as diversas formas modificadas do reagente trimetilamôniobutiril (TMAB) como previamente descrito (CHE; FRICKER, 2002; MORANO; ZHANG; FRICKER, 2008). A quantidade de extrato utilizado em cada experimento foi de 10 µg. Após a normalização entre as amostras controle e experimental, foi adicionado 200 µL de tampão fosfato de sódio a 0,4 M, pH 9,5. O pH das amostras foi ajustado para 9,5 com NaOH a 1 M. Em seguida 6,4 µL de marcador (D_0 e D_3-TMAB) foram adicionados e após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, um volume apropriado de NaOH a 1 M foi adicionado a reação e incubados por mais 10 minutos. A adição do marcador e da solução alcalina foi repetida por mais seis vezes durante 2 horas e as amostras incubadas por mais trinta minutos a temperatura ambiente. Após o término da marcação, 30 µL de uma solução de glicina a 2,5 M foram adicionados e incubados por 40 minutos, interrompendo a reação.

Em seguida, as amostras, controle e experimental, contendo os diferentes marcadores, foram combinadas e centrifugadas a 800 x g por 5 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e o pH ajustado para 9,0 com uma solução de NaOH 1 M. Nesse momento foram adicionados hidroxilamina 2 M (na proporção de 3 µL para 1 mL de amostra), para remover possíveis marcações em resíduos de tirosina. A adição de hidroxilamina e o ajuste do pH para 9,0 foram repetidos por 3 vezes, respeitando um intervalo de 10 minutos entre estas repetições. Essas amostras foram submetidas à dessalinização em colunas C18 (OASIS-Waters, UK) e os peptídeos marcados foram eluídos com 1 mL de metanol contendo 0,15% de TFA. Para remoção do metanol, as amostras foram submetidas à centrifugação a vácuo (14.000 x g) e armazenadas a -20 °C.

3.9.4 Cromatografia líquida e espectrometria de massas

As amostras de peptídeos marcados com diferentes isótopos foram ressuspendidas em um volume de 10 a 15 µL de H_2O e submetidas às análises por cromatografia líquida, acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS). Um aparelho Q-Tof-Ultima (Micromass,

UK) ou Synapt HDMS (Waters, UK) acoplado a um sistema de cromatografia líquida capilar Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) (Micromass, UK) ou NanoAcquity, (Waters, UK) foram utilizados. As misturas peptídicas marcadas foram separadas em gradiente de eluição de 0-85% de uma mistura água/acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, em coluna capilar de 75 µm empacotada com sílica C18. Os dados foram adquiridos automaticamente em modo dependente (DDA) após geração de múltiplos peptídeos protonados por ionização em elétron spray (ESI), seguido de dissociação em MS/MS por colisão com argônio em intensidade de 10 a 30 eV. Condições típicas de LC e ESI foram: fluxo de 600 nL/min, voltagem no capilar do nanofluxo de 3.5 kV, temperatura do bloco de 80 °C, e voltagem do cone de 100 V (CASTRO et al., 2010).

3.10 Interpretação de resultados

3.10.1 Fragmentação de peptídeos marcados com isótopos D_0 e D_3-TMAB no espectrômetro de massas

A incorporação dos isótopos D_0- e D_3-TMAB ao N-terminal ou a resíduos de lisina de um determinado peptídeo, adiciona as massas 128,11 e 131,13 Da, respectivamente, as quais são visualizadas durante a detecção do primeiro MS (relação massa carga (m/z) do peptídeo não fragmentado). Após a determinação da massa do peptídeo, o mesmo é fragmentado (MS/MS) em uma câmara de colisão com argônio, para identificação da sua estrutura primária (sequência de aminoácidos). Esta fragmentação leva à perda parcial da molécula de TMAB, alterando novamente o peso molecular do peptídeo.

3.10.2 Identificação dos peptídeos

As análises de sequenciamento dos peptídeos foram realizadas através do programa MASCOT versão 2.2 (Matrix Science Ltd, UK). Os arquivos brutos (extensão raw), gerados pelo espectômetro foram convertidos para arquivos no formato de texto (“extensão mg”) pelo programa Mascot Distiller versão 2.1.1 (Matrix Science Ltd, UK). As modificações variáveis selecionadas foram: GIST- Quat (K) e GIST- Quat (N-term); GIST-Quat: 2H(3) (K) e GIST-Quat: 2H(3) N-term para sequenciamento dos peptídeos contendo D_0- e D_3- TMAB, respectivamente. Os dados foram submetidos ao programa MASCOT, utilizando como parâmetros: banco de dados NCBI ou SWISPROT, taxonomia *Homo Sapiens*, e sem digestão

enzimática. A tolerância do erro utilizada para os íons precursores de MS e MS/MS foi de 0.2 Da. Após a obtenção dos resultados, as sequências peptídicas foram validadas por interpretação manual para a eliminação dos resultados falsos positivos. Nestas análises, foram levados em consideração os fragmentos de íons que não são reconhecidos pelo Mascot, como perda parcial de trimetilamina, a presença dos íons a2 e os fragmentos marcados com o isótopo TMAB intacto, que em alguns casos especiais não é fragmentado durante a aquisição dos espectros de MS/MS.

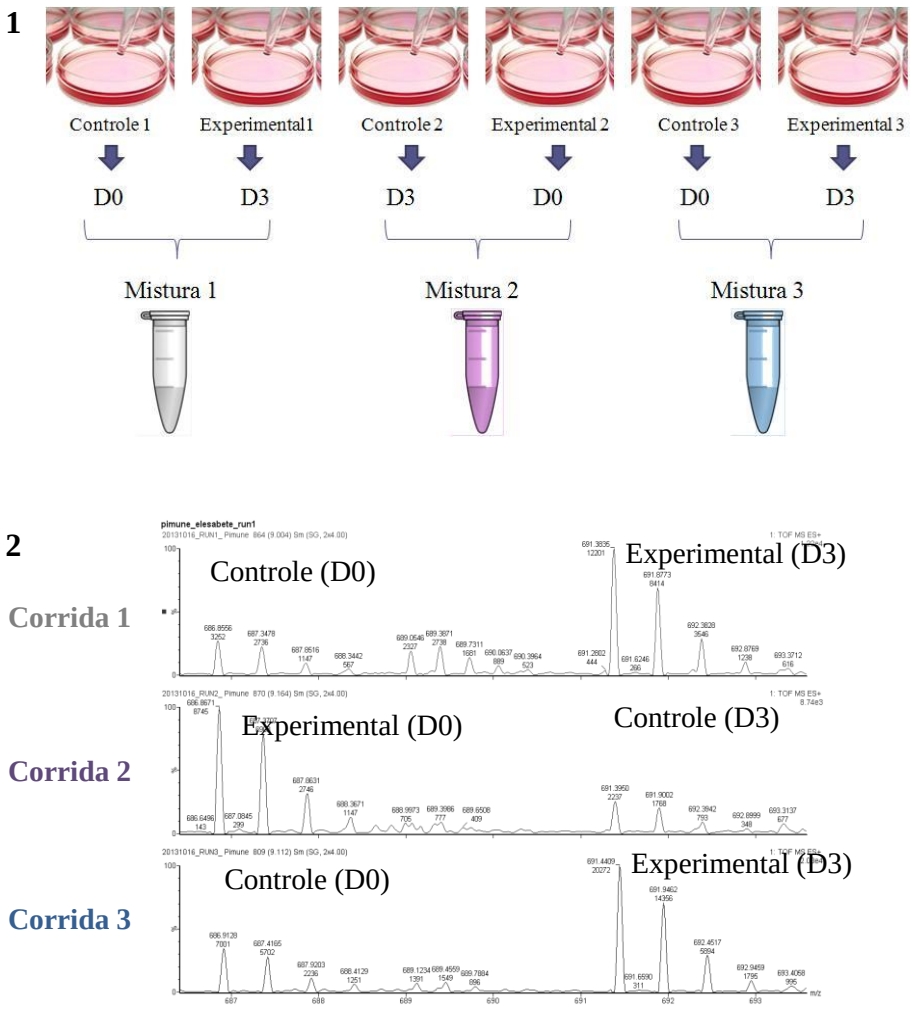
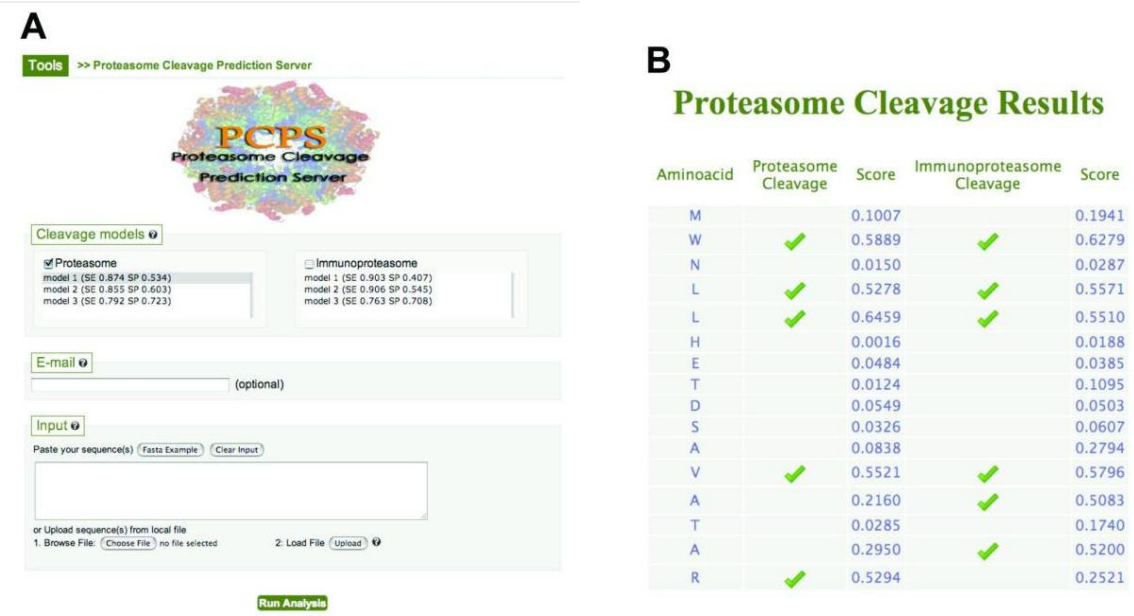


Figura 4. Esquema representativo da marcação dos peptídeos obtidos de amostras controle e experimental: Painel 1. Três experimentos de indução do proteassomo imune foram realizados em dias diferentes. Células HeLa foram tratadas ou não com IFN-γ por 48 horas. Os peptídeos foram extraídos do grupo controle (não tratado) e do experimental (tratado com 200U de IFN-γ) e marcados com os isótopos conforme apresentado na figura acima. Os peptídeos das amostras controle (1 e 3) e experimental (2) foram marcados com D_0-TMAB e as amostras dos grupos experimentais (1 e 3) e controle (2) foram marcados com D_3-TMAB. Essas amostras foram combinadas entre si, de forma que, as 3 misturas geradas continham peptídeos das amostras controle e experimental em um mesmo tubo, marcados com isótopos diferentes. **Painel 2.** Após análise de espectrometria de massas (LC/MS/MS), estes peptídeos aparecem separados por uma diferença de 3 Da, e o peptídeo nas amostras experimentais se apresentam em maior concentração em relação ao mesmo peptídeo das amostras

controles. Para validar estes resultados, um experimento paralelo é realizado com uma marcação reversa representado na figura pela Corrida 2.

3.11 Análise computacional dos sítios de clivagem dos peptídeos encontrados

Para analisar os sítios de clivagem na proteína pelo proteassomo constitutivo e imune foi utilizada a ferramenta online *Proteasome Cleavage Prediction Server* – PCPS (http://imed.med.ucm.es/Tools/PCPS/). Esta ferramenta permite predizer os possíveis sítios de clivagem do proteassomo constitutivo e imune na proteína pesquisada. Os modelos de clivagem utilizados por PCPS possuem fragmento de peptídeos com 12 resíduos (modelo 1), 8 (modelo 2) e de 6 resíduos (modelo 3). Ao colar a sequência da proteína pesquisada na ferramenta PCPS, o site retorna uma tabela indicando a taxa de clivagem de cada resíduo na proteína. As taxas de clivagem refletem a probabilidade que o proteassomo constitutivo ou imune possui em clivar a proteína após cada resíduo (P1 resíduo do sítio de clivagem). Se a taxa de clivagem for maior que 0.5, o resíduo correspondente é assinalado.



Aminoacid	Proteasome Cleavage	Score	Immunoproteasome Cleavage	Score
M		0.1007		0.1941
W	✔	0.5889	✔	0.6279
N		0.0150		0.0287
L	✔	0.5278	✔	0.5571
L	✔	0.6459	✔	0.5510
H		0.0016		0.0188
E		0.0484		0.0385
T		0.0124		0.1095
D		0.0549		0.0503
S		0.0326		0.0607
A		0.0838		0.2794
V	✔	0.5521	✔	0.5796
A		0.2160	✔	0.5083
T		0.0285		0.1740
A		0.2950	✔	0.5200
R	✔	0.5294		0.2521

Figura 5. Interface da ferramenta online PCPS *(Proteasome Cleavage Prediction Server)* – A) PCPS interface. **B)** PCPS "Results Page". A página retorna a probabilidade da taxa de clivagem depois de cada resíduo da proteína pesquisada. Os resíduos com taxa de clivagem de 0.5 ou mais são assinalados. Estes resíduos correspondem ao resíduo P1 de cada sítio de clivagem e corresponde ao C-terminal do peptídeo.

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação da expressão do proteassomo imune

4.1.2 Expressão protéica das subunidades do proteassomo

Para padronização da expressão do proteassomo imune, primeiramente, células HeLa e HEK293H (células de rim embrionário humano) foram utilizadas. Estudos realizados com células HeLa demonstraram que em condições normais, ou seja, não tratadas com IFN-γ, são livres de proteassomo imune (KLARE et al., 2007; YANG et al., 1992). As células foram tratadas com diferentes concentrações de IFN-γ (0-400U/0-20 ηg). Após 48 horas de tratamento, as células foram coletadas, homogeneizadas e centrifugadas 2 vezes em PBS a 850 x g a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em tampão de lise e incubadas por 30 minutos em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 15000 X g a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos novos para posterior dosagem de proteína.

A indução do proteassomo imune foi realizada tratando células HeLa com diferentes concentrações de IFN-γ e a expressão foi avaliada por Western Blotting. Anticorpos contra as subunidades β5 (proteassomo constitutivo) e β5i (proteassomo imune) foram utilizados na concentração de 1:1000. O aumento da expressão do proteassomo imune foi diretamente proporcional às concentrações de IFN-γ utilizadas (0-400U/0-20 ng/mL, 48H) (Figura 6). Entretanto, células HEK293H não mostraram expressão do proteassomo imune após tratamento com IFN-γ (Figura 6, Painel 2).

Devido não termos observado a expressão do proteassomo imune em células HEK293H tratadas com IFN-γ, para a realização do peptidoma de células expressando ou não o proteasomo imune, utilizamos apenas células HeLa. Além da confirmação da expressão do proteassomo imune em células HeLa após o tratamento com IFN-γ, sabe-se que, em condições normais, células HeLa são livres de proteassomo imune (KLARE et al., 2007; YANG et al., 1992), portanto, um bom modelo para nossos estudos.

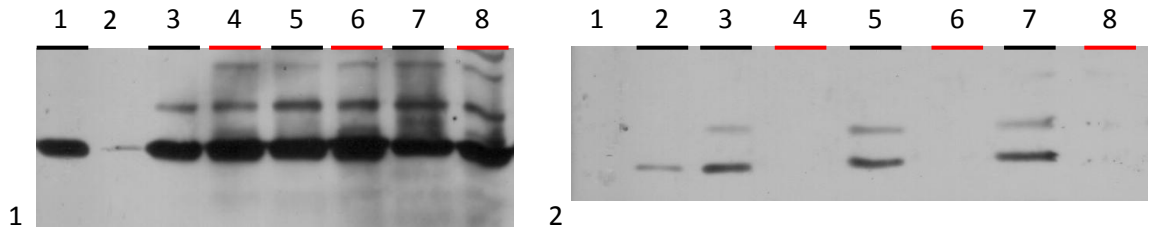


Figura 6. Expressão do proteassomo imune em células HeLa e células HEK293H: O lisado proteico foi extraídos de células HeLa e células HEK293H, tratadas ou não, com diferentes concentrações de IFN-γ. **Painel 1**. Membrana incubada com anticorpo contra a subunidade β5 (22kDa) do proteassomo constitutivo: **1.** Células HeLa não tratadas com IFN-γ; **2.** Peso Molecular; **3.** Células HeLa tratadas com 100U de IFN-γ; **4.** Células HEK293H tratadas com 100U de IFN-γ; **5.** Células HeLa tratadas com 200U de IFN-γ; **6.** Células HEK293H tratadas com 200U de IFN-γ; **7.** Células HeLa tratadas com 400U de IFN-γ; **8.** Células HEK293H tratadas com 400U de IFN-γ. **Painel 2.** Membrana incubada com anticorpo contra a subunidade $\beta5_i$ (25kDa) do proteassomo imune: **1.** Peso Molecular **2.** Células HeLa não tratadas com IFN-γ; **3.** Células HeLa tratadas com 100U de IFN-γ; **4.** Células HEK293H tratadas com 100U de IFN-γ; **5.** Células HeLa tratadas com 200U de IFN-γ; **6.** Células HEK293H tratadas com 200U de IFN-γ; **7.** Células HeLa tratadas com 400U de IFN-γ; **8.** Células HEK293H tratadas com 400U de IFN-γ.

4.1.3 Ensaio da atividade proteolítica das subunidades do proteassomo

Além de confirmar a expressão do proteassomo imune por Western Blotting, foi realizado o ensaio de atividade proteolítica das subunidades do proteassomo, visto que estudos anteriores demonstraram que, após tratamento com IFN-γ é observado um aumento na atividade que cliva após resíduos hidrofóbicos (quimotripsina-símile) (GACZYNSKA et al., 1994). Após as células serem tratadas ou não com 200U de IFN-γ, as mesmas foram coletadas com PBS, homogeneizadas e centrifugadas a 850 g a 4 °C por 10 minutos. O extrato celular foi então ressuspendido em tampão de lise e incubado por 30 minutos em gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado. Misturas contendo 20 µg de proteína, das amostras controle e experimental, dosado por bradford, foram preparadas, separadamente, e pipetadas em triplicata em placas opacas de 96 poços. Os substratos luminescentes Suc-LLVY-Glo™ (quimotripsina-símile), Z-LRR-Glo™ (tripsina-símile) e Z-nLPnLD-Glo™ (caspase-símile) (*Promega,*USA), foram adicionados ao poços e misturado gentilmente em um agitador de placas. A adição dos substratos resulta na sua clivagem induzido pelo proteassomo que gera um sinal luminescente produzido pela reação da luciferase. O sinal produzido é proporcional a atividade do proteassomo. Os resultados obtidos demonstraram que, após o tratamento com IFN-γ, o proteassomo apresenta um aumento na atividade quimotripsina-símile, sugerindo a indução das subunidades proteolíticas do proteassomo imune ($\beta1_i$, $\beta2_i$ e $\beta5_i$). Portanto, além de confirmarmos a expressão do proteassomo imune em nossos experimentos, confirmamos que o proteassomo imune em células HeLa está biologicamente ativo.

Outro ensaio de atividade do proteassomo foi realizado após tratar células HeLa em diferentes tempos (6, 12, 24 e 48 horas) de incubação com IFN-γ. O intuito foi verificar se a atividade quimotripsina-símile apresenta-se maior em tempos menores de tratamento com

IFN-γ e em consequência podendo gerar um pool maior de peptídeos intracelulares, devido ter a atividade proteolítica aumentada. Conforme mostra a figura 8 o tempo de 48 horas parece ser o melhor tempo de tratamento para realizar o peptidoma. Prosseguimos, portanto, com o tratamento de células HeLa com 200U de IFN-γ por 48 horas.

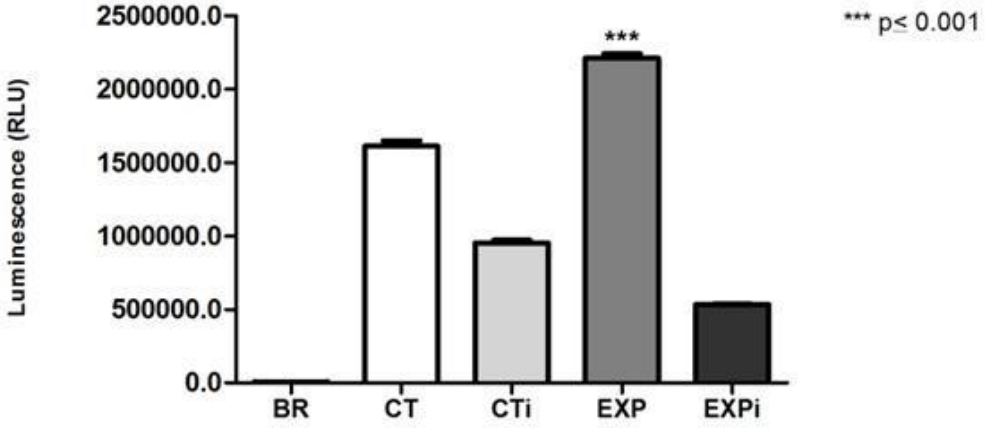


Figura 7. Ensaio de atividade do proteassomo (quimotripsina-símile): Células HeLa tratadas com 200U de IFN-γ por 48 horas. A atividade foi realizada em alíquotas contendo lisado celular conforme descrito em materiais e métodos. **BR**, Suc-LLVY-Glo^{TM} Substrato+ H2O MilliQ estéril; **CT**, Suc-LLVY-Glo^{TM} Substrato + extrato proteico de células HeLa (20µg); **CTi,** Suc-LLVY-Glo^{TM} Substrato + extrato proteico de células HeLa (20µg) + 10mM inibidor Lactacistina; **EXP,** Suc-LLVY-Glo^{TM} Substrato + extrato proteico de células HeLa (20µg) + IFN-γ (200U); **EXPi,** Suc-LLVY-Glo^{TM} Substrato + extrato proteico de células HeLa (20µg) + IFN-γ (200U) + 10mM inibidor Lactacistina.

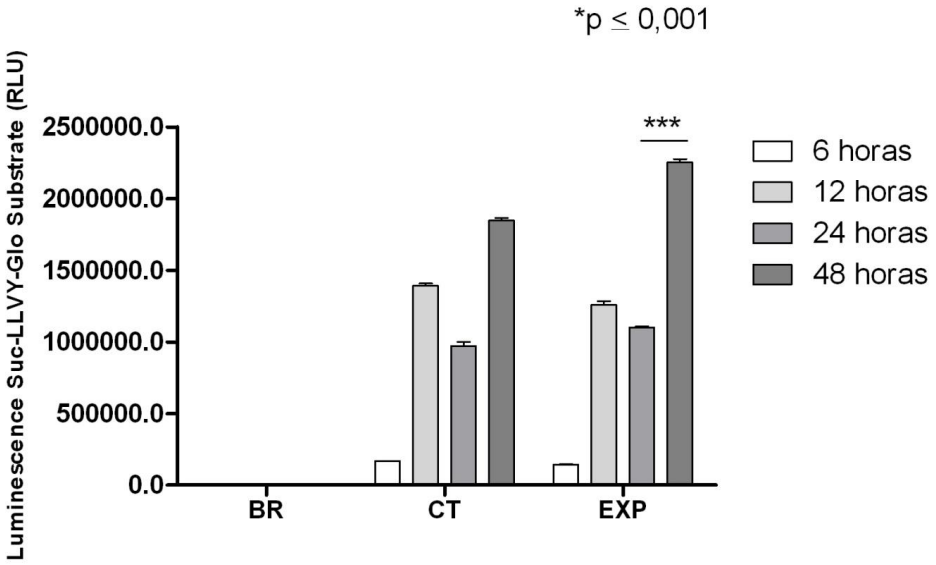


Figura 8. Ensaio de atividade do proteassomo realizado em diferentes tempos de tratamento com IFN-γ: Células HeLa tratadas com 200U de IFN-γ por 6, 12, 24 e 48 horas. A atividade *quimotripsina-símile* foi medida utilizando o substrato luminescente Suc-LLVY-Glo^{TM}. **BR**: sem lisado celular; **CT**: células não tratadas com IFN-γ; **EXP**: células tratadas com IFN-γ

4.2 Análise de viabilidade celular e proliferação

A figura 9 representa o resultado obtido pelo teste do MTT para avaliação dos efeitos citotóxicos do tratamento de células HeLa com IFN-γ. A morte celular, em torno de 20%, foi observada em células tratadas com 400U/48H de IFN-γ, enquanto que menos de 10% de morte celular foi observada em concentrações de 100 e 200U/48H. A dose de 200U de IFN-γ foi escolhida para tratar células HeLa nos experimentos seguintes.

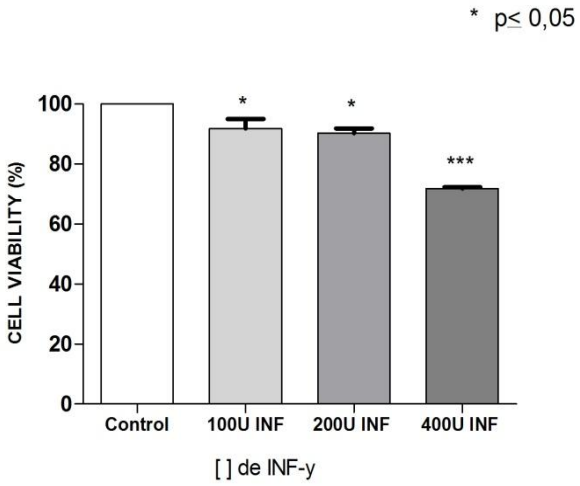


Figura 9. Ensaio de viabilidade celular por MTT: Células HeLa foram tratadas com 100U, 200U e 400U de IFN-γ por 48 horas. A viabilidade celular foi analisada através da redução de MTT pelas células ativas. A absorbância foi lida em comprimento de onda de 570nm. **Controle:** células HeLa não tratadas; **100U, 200U e 400U:** células HeLa tratadas com diferentes concentrações de IFN-γ (5 ng/mL, 10 ng/mL e 20 ng/mL, respectivamente).

4.3 Experimentos de peptidoma

4.3.2 Tratamento com IFN-γ e expressão do proteassomo imune

Para a realização do experimento de peptidoma, três experimentos de indução do proteassomo imune foram realizados em dias diferentes a fim de gerar replicatas experimentais. Células HeLa foram tratadas ou não com IFN-γ (200U), conforme especificado em materiais e métodos, e após 48 horas as células foram coletadas. Após serem lavadas três vezes com PBS, duas alíquotas de cada grupo (controle e experimental) foram separadas, dosadas e preparadas para o Western blotting. A membrana, contendo as proteínas das amostras controle e experimental, foram incubadas com anticorpo anti-subunidade $\beta5_i$ para confirmação da expressão do proteassomo imune. Conforme consta na figura 10,

obtivemos sucesso na expressão do proteassomo imune nos três experimentos realizados. É possível observar uma significante expressão da subunidade $\beta5_i$ do proteassomo imune nas bandas 3 e 4 das três figuras. Sendo possível, portanto, a extração dos peptídeos intracelulares para posterior caracterização.

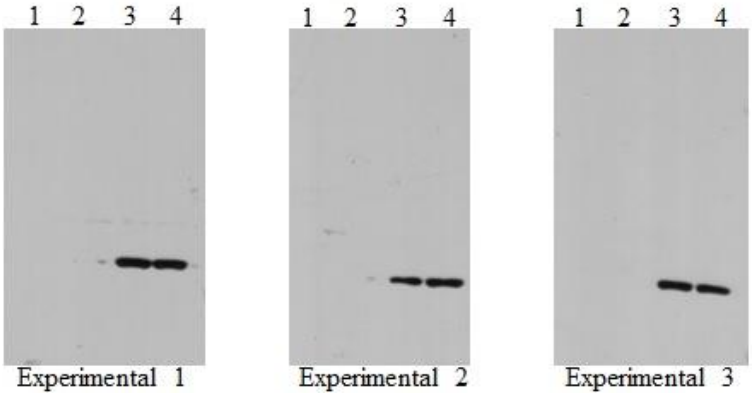


Figura 10. Confirmação da expressão do proteassomo imune por Western Blotting após tratamento de células HeLa pelo IFN-γ: 3 experimentos foram realizados em dias diferentes, sendo que cada painel representa um experimento. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpo $\beta5_i$. 50 µg de proteínas foram aplicadas em gel de acrilamida 12% para posterior transferência over-night. **1** e **2**: Controle (lisado de células HeLa não tratadas com IFN-γ); **3** e **4**: Experimental (lisado de células HeLa tratadas com 200U de IFN-γ).

4.3.3 Caracterização do conteúdo peptídico intracelular de células HeLa

Após a confirmação da expressão do proteassomo imune nos três experimentos de indução, realizamos a extração para a caracterização dos peptídeos intracelulares de células HeLa expressando o proteassomo imune, bem como controle de células HeLa não tratadas com IFN-γ, portanto não expressando o proteassomo imune. No total, 42 peptídeos foram identificados através de análise MS/MS usando o programa MASCOT. Esses peptídeos foram identificados de 31 proteínas conhecidas, cujos tamanhos variaram entre 6 a 22 aminoácidos. Os peptídeos encontrados e suas respectivas proteínas estão relacionados na tabela 1. Dentre esses 42 peptídeos, apenas um peptídeo teve um aumento de 3 vezes no grupo experimental quando comparado com o controle. Este peptídeo,chamado de EL28, foi gerado pela clivagem de uma proteína do proteassomo 26S, PRS4_HUMAN (*26S protease regulatory subunit 4*). A proteína PRS4_HUMAN, também conhecida como Rpt2, é uma das ATPases que constituem a base do complexo 19S. Conforme alguns estudos indicaram, as Rpts são responsáveis por se ligarem ao anel α do complexo 20S levando uma mudança conformacional do anel e permitir a passagem da proteína para dentro do barril catalítico, onde entrará em contato com as subunidades catalíticas.

Tabela 1- Níveis relativos de peptídeos sequenciados encontrados na análise MS/MS

Proteína	Peptídeo	Nível tratado/controle
IF5A1_HUMAN	EL1	0,94±0,42(3)
IF5A1_HUMAN	EL2	1,05±0,43(3)
IF5A1_HUMAN	EL3	0,85±0,43(3)
PPIA_HUMAN	EL4	0,92±0,14(3)
PPIA_HUMAN	EL5	0,94±0,18(3)
PPIA_HUMAN	EL6	1,55±0,88(3)
PPIA_HUMAN	EL8	1,18±0,50(3)
PPIA_HUMAN	EL9	0,92±0,36(3)
PPIA_HUMAN	EL10	1,07±0,20(3)
PPIA_HUMAN	EL11	0,98±0,19(3)
PRDX5_HUMAN	EL12	0,81±0,19(3)
PRDX5_HUMAN	EL13	0,88±0,12(3)
IF4H_HUMAN	EL14	0,78±0,11(3)
CH10_HUMAN	EL15	1,33±0,58(3)
EF1B_HUMAN	EL16	0,62±0,11(3)
NLTP_HUMAN	EL17	0,47±0,18(3)
COF1_HUMAN	EL18	1,22±0,26(3)
VDAC1_HUMAN	EL19	1,31±0,05(3)
CATC_HUMAN	EL20	0,78±0,49(3)
RS21_HUMAN	EL21	1,61±1,27(3)
RS21_HUMAN	EL22	0,62±0,16(3)
RS21_HUMAN	EL23	1,14±0,30(3)
FMNL2_HUMAN	EL24	0,57±0,12(3)
GTR10_HUMAN	EL25	1,13±0,33(3)
TCP4_HUMAN	EL26	0,92±0,38(3)
AKD2_HUMAN	EL27	0,65±0,13(3)
PRS4_HUMAN	EL28	3±0(2)
XKR2_HUMAN	EL29	0,68±0,15(3)
NED4L_HUMAN	EL30	0,90±0,23(3)
RNC_HUMAN	EL31	0,57±0,12(3)
UBQL2_HUMAN	EL32	1,36±0,66(3)
BRWD2_HUMAN	EL33	1,20±0,41(3)
ELK1_HUMAN	EL34	0,87±0,83(3)

PLCB4_HUMAN	EL35	0,65±0,13(3)
ABCD4_HUMAN	EL36	1,36±0,66(3)
CB067_HUMAN	EL37	0,94±0,18(3)
ALPK2_HUMAN	EL38	0,98±0,26(3)
ACSF4_HUMAN	EL39	0,98±0,50(3)
GOG8A_HUMAN	EL40	0,90±0,23(3)
GPR1_HUMAN	EL41	1,30±0,61(3)
SFRS1_HUMAN	EL42	1,27±0,85(3)
FKB15_HUMAN	EL43	1,09±0,22(3)

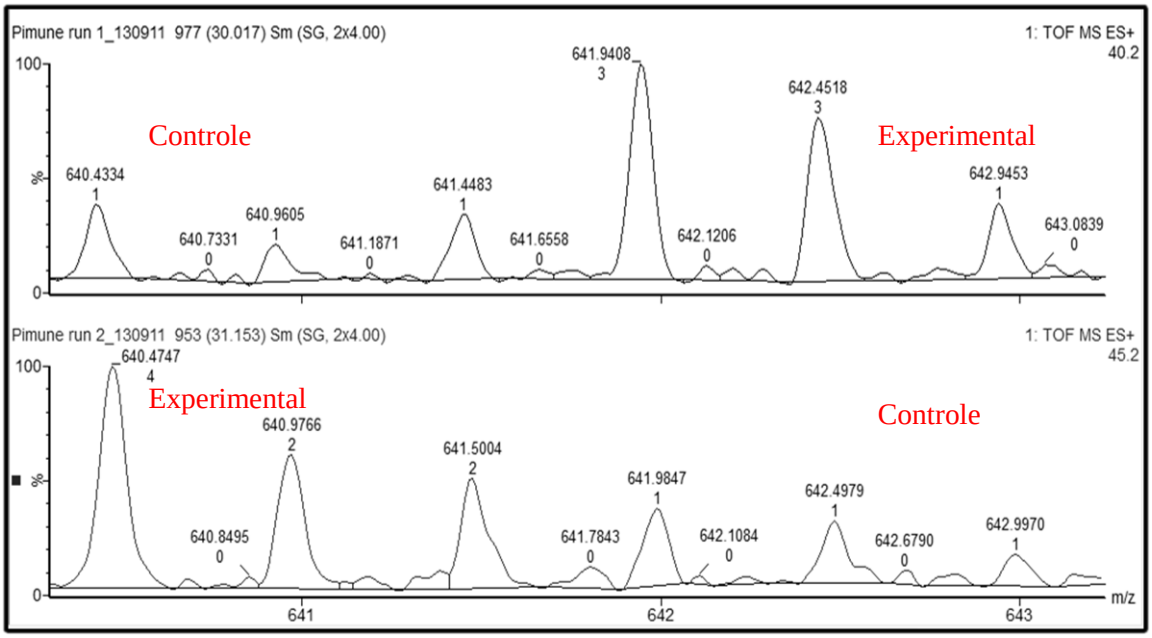


Figura 11. MS representativo do peptídeo marcado com TMAB de células HeLa expressando o proteassomo constitutivo (controle) e o proteassomo imune (experimental). A figura mostra o MS do peptídeo EL28 que aumenta em resposta ao tratamento celular com 200U de IFN-y (indução do proteassomo imune) O peptídeo foi identificado no MS-MS contendo 3 marcações por TMAB e carga 2.

4.3.4 Análise computacional dos sítios de clivagem da proteína Rpt2 próximo à região do peptídeo EL28

Através de análise computacional utilizando a ferramenta online PCPS (descrito em materiais e métodos), foi possível analisar os possíveis sítios de clivagem do proteassomo constitutivo e imune nas proteínas relacionadas acima. Dos peptídeos gerados pela espectrometria de massas, 23 peptídeos demonstraram não possuir, ou no N-terminal ou no C-terminal, possíveis resíduos que configuram sítios de clivagem para o proteassomo

constitutivo ou imune, entretanto, 12 peptídeos, provavelmente foram gerados tanto pelo proteassomo constitutivo quanto pelo proteassomo imune, e apenas 7 peptídeos podem ter sido gerados apenas pelo proteassomo imune. O peptídeo EL28, que apresentou um aumento 3 vezes maior no grupo experimental em relação ao controle é, provavelmente, um produto do proteassomo imune, mas não do proteassomo constitutivo, conforme a análise realizada em PCPS (figura 12).

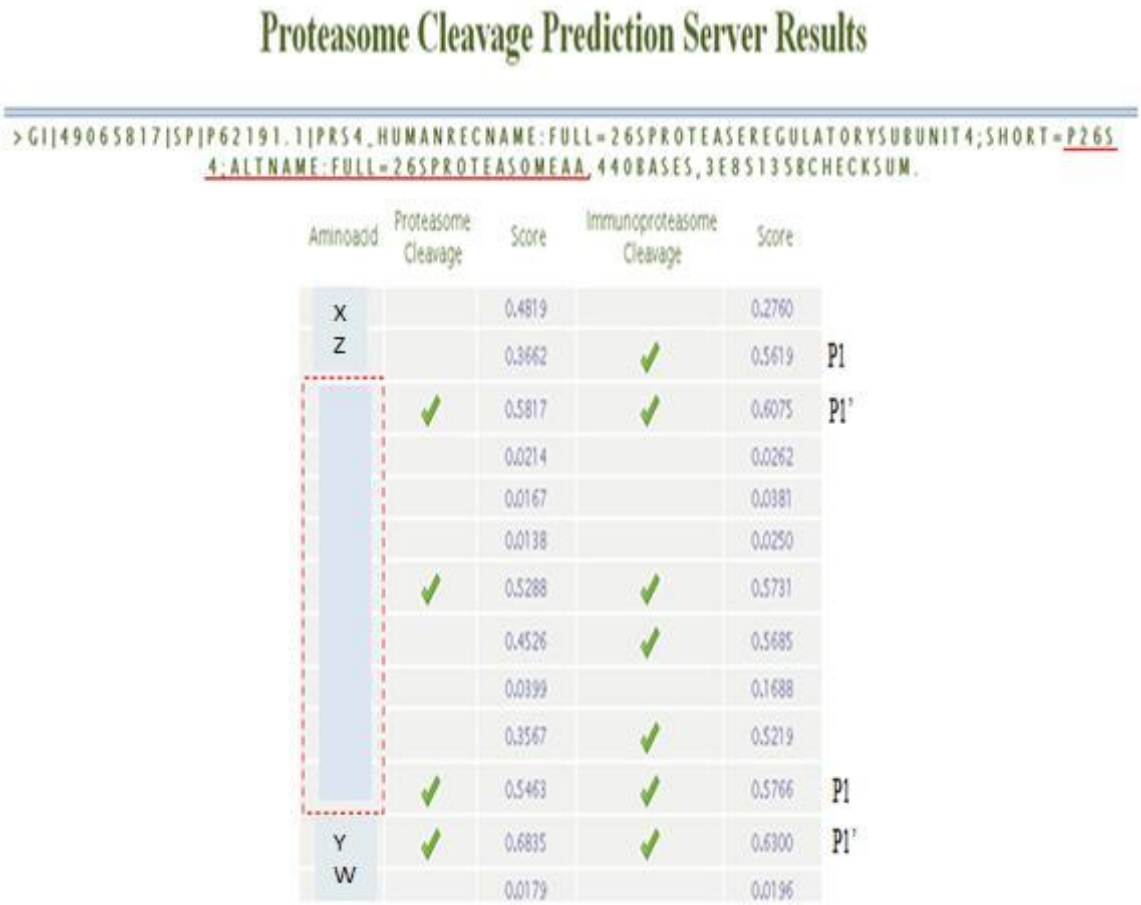


Figura 12. Análise computacional dos prováveis sítios de clivagem da proteína Rpt2 pelo proteassomo constitutivo e imune na região próxima ao peptídeo EL28. A página retorna uma taxa de clivagem depois de cada resíduo da *protein 26S protease regulatory subunit* 4. Os resíduos com a taxa de clivagem acima de 0.5 são assinalados. Estes resíduos correspondem ao resíduo P1 do sítio de clivagem que determina o C-terminal do peptídeo.

4.4 Efeito do peptídeo EL28 nas atividades do proteassomo

Como já citado anteriormente, o peptídeo EL28 é derivado da proteína Rpt2, uma ATPase presente na tampa da partícula regulatória 19S. As ATPases tem sido relacionadas com a capacidade de permitir a passagem do substrato para dentro do complexo 20S através da ligação do C-terminal das ATPases com o anel α levando este a uma mudança conformacional e a abertura do barril catalítico. Estudos demonstraram que as ATPases

promovem um aumento da atividade proteolítica do proteassomo. Devido a isso, decidimos verificar o efeito do peptídeo EL28 sobre a atividade quimotripsina do proteassomo, visto que o peptídeo encontra-se em maior quantidade em células que apresentam a expressão do proteassomo imune.

Para este ensaio foi utilizado o extrato proteico de células HeLa. A figura 11A mostra um aumento significativo da atividade quimotripsina-símile após a incubação do extrato protéico com o peptídeo EL28 nas concentrações de 50 µM ou 100 µM, sugerindo que o peptídeo pode ter um efeito biológico na regulação da atividade do proteassomo.

Posteriormente, o peptídeo EL28 foi sintetizado fusionado com uma sequência TAT como anteriormente descrito (SOUGHAYER et al., 2004) no C-terminal ou N-terminal, como uma forma de introduzir o peptídeo dentro de células vivas e verificar seu efeito na atividade do proteassomo *in vivo*.

As células foram tratadas com os peptídeos sintéticos na concentração de 100µM. Após 2 horas incubando a 37ºC, as células foram coletadas e preparadas para atividade como anteriormente descrito em materiais e métodos. Após as amostras terem sido pipetadas em triplicatas em placas opacas de 96 poços, contendo 20µg de proteínas, o substrato Suc-LLVY-Glo™ foi adicionado e após 35 minutos a luminescência foi medida (Fig.11B).

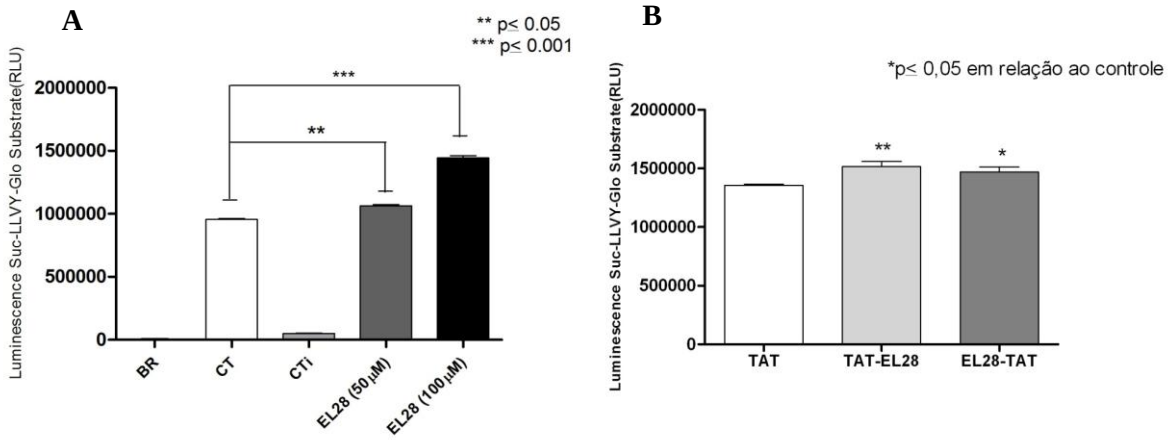


Figura 13. Efeito do peptídeo EL28 sobre a atividade quimotripsina-símile do proteassomo *in vitro* e *in vivo*. Painel 1. Ensaio *in vitro*: Extrato proteico incubado com 50µM ou 100µM de peptídeo por 30 minutos. BR: sem extrato proteico; CT: extrato protéico sem peptídeo; CTi: extrato proteico incubado com 10µM de inibidor Lactacistina; EL28(50µm) ou EL28(100µM): extrato proteico incubado com peptídeo (50µM ou 100µM). **Painel 2. Ensaio *in vivo*:** Células HeLa tratadas com peptídeo EL28 que foram anteriormente fusionados com uma sequência TAT no C-terminal e no N-terminal. **TAT:** células tratadas com a sequência TAT (100µM); **TAT-EL28:** células tratadas com o peptídeo EL28 fusionado com TAT no N-terminal (100µM); **EL28-TAT:** células tratadas com o peptídeo EL28 fusionado com TAT no C-terminal (100µM).

Os ensaios de atividade, utilizando os substratos luminescentes para as atividades caspase- e tripsina-*símile*, também foram realizados. O peptídeo EL28 demonstrou ativar não só a atividade quimotripsina-símile do proteassomo mais também as outras duas atividades conforme mostrado na figura 12. No tempo de 15 minutos de incubação do extrato celular com o peptídeo já foi possível observar um aumento significativo na atividade do proteassomo.

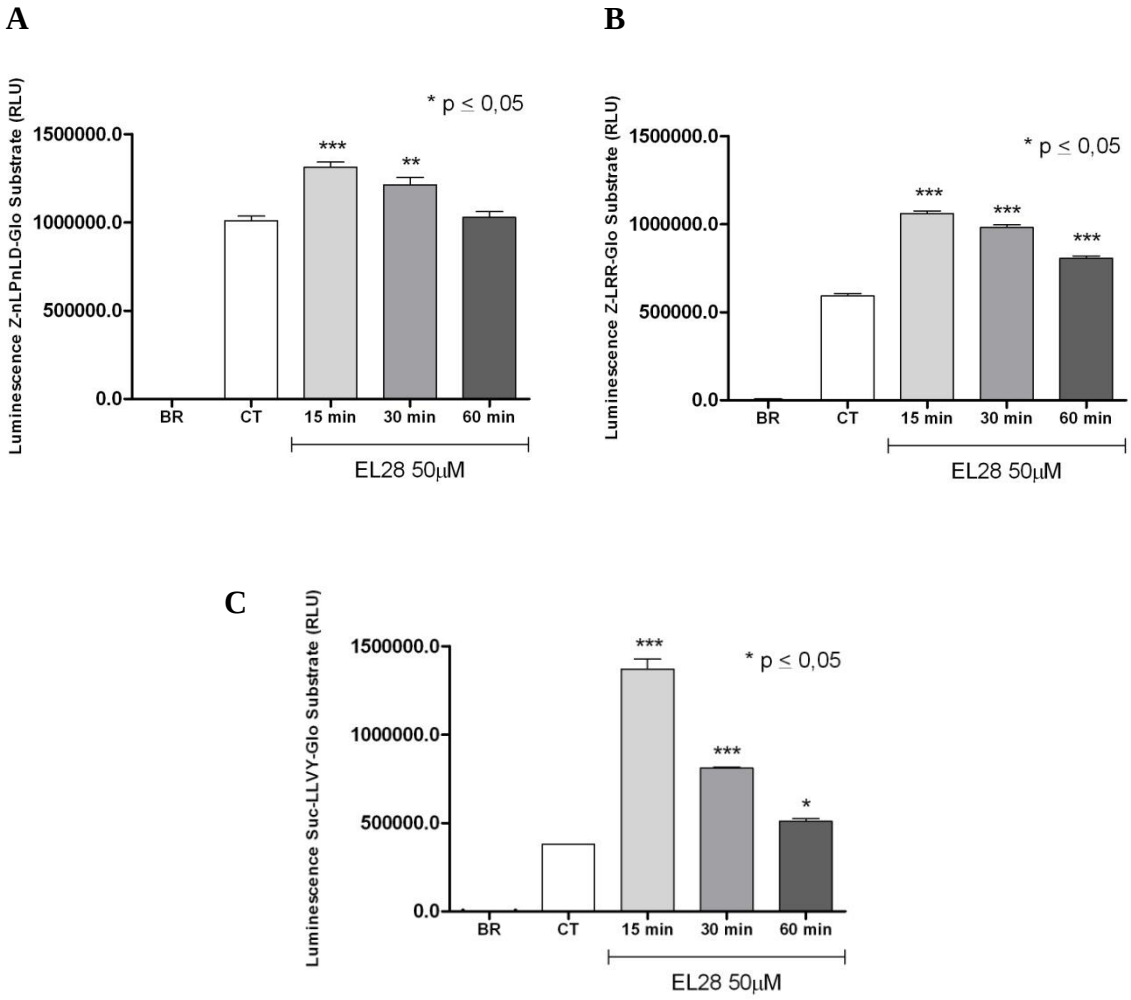


Figura 14. **Efeito do peptídeo EL28 na atividade do proteassomo (caspase-, tripsina- e quimotripsina-*símile*, respectivamente)** BR: H_2O milliQ; CT: extrato proteico; os outros grupos referem-se ao extrato de proteína incubado com 50µM de peptídeo por 15, 30 e 60 minutos. A- Caspase-símile (substrato Suc-LLVY-Glo); B- Tripsina-símile (substrato Z-LRR-Glo) e C- quimotripsina-símile (substrato Z-nLPnLD-Glo).

5 DISCUSSÃO

A degradação de proteína dependente do proteassomo participa de vários processos celulares importantes, especialmente se considerarmos que cerca de 90% de proteínas intracelulares são degradadas pelo sistema ubiquitina-proteassomo (ROCK et al., 1994). As proteínas que são reconhecidas pelo proteassomo, são desdobradas e encaminhadas para dentro do complexo 20S que contém as subunidades catalíticas β1, β2 e β5 do proteassomo responsáveis pela clivagem dos substratos. As atividades proteolíticas das subunidades β1, β2 e β5 do proteassomo são descritas como caspase-, tripsina- e quimotripsina-*simile*, respectivamente. A degradação de proteínas pelo proteassomo gera peptídeos que possuem entre 2 a 20 aminoácidos. Estes peptídeos, por sua vez, podem ser utilizados como epítopos na apresentação de antígeno via MHC-I, ou passarem por uma degradação completa liberando os aminoácidos para serem utilizados na formação de novas proteínas. Entrentanto, estudos recentes têm demonstrado que diversos peptídeos, que escapam da degradação completa, podem ter funções biológicas importantes nas células (CUNHA et al., 2008; FERRO; HYSLOP; CAMARGO, 2004; RUSSO et al., 2012). Como por exemplo, peptídeos intracelulares específicos que foram isolados de cérebros de camundongo e de células de rim de embrião humano (HEK293H), sequenciados e quimicamente sintetizados, e quando reintroduzidos dentro de células CHO-S e HEK293H, em concentrações entre 20-80µM, mostraram modular a transdução de sinal via receptores aclopados a proteínas G (GPCRs) (CUNHA et al., 2008; RUSSO et al., 2012). Além disso, peptídeos intracelulares específicos isolados do tecido adiposo de ratos mostraram se ligar a proteínas específicas quando reintroduzidos em células adiposas diferenciadas 3T3-L1, facilitando a captação de glicose induzido por insulina (BERTI et al., 2012). Um dos peptídeos intracelulares produzidos pelo proteassomo, conhecido como VFD-7, é capaz de aumentar a concentração citosólica de cálcio em células HEK293H, sugerindo uma possível função biológica (RUSSO et al., 2012).

Sabe-se ainda que, uma forma induzível de proteassomo é formada, na presença de IFN-γ, sendo este conhecido como proteassomo imune. O proteassomo imune possui subunidades catalíticas conhecidas como β1i, β2i e β5i. Vários estudos tem demonstrado que a presença do proteassomo imune na célula, produz antígenos diferentes dos que são gerados pelo proteassomo constitutivo, melhorando a qualidade e a quantidade de ligantes para as moléculas de MHC-I. Análises proteômicas de peptídeos associados a MHC-I, derivados de células dendríticas de camundongos duplo deficientes para $\beta2i^{-/-}$ e $\beta5i^{-/-}$, demonstraram que o

proteassomo imune dramaticamente aumenta a abundância e a diversidade de peptídeos ligantes de MHC-I (DE VERTEUIL et al., 2010).

Através de análise peptidômica, neste trabalho tivemos como objetivo analisar as diferenças do conteúdo peptídico intracelular entre células controle ou tratadas com IFN-γ. A expressão do proteassomo imune foi padronizada em células HeLa, que em condições normais de crescimento são livres de proteassomo imune (KLARE et al., 2007). As células HeLa foram crescidas em condições padrão de crescimento, e após atingirem a confluência necessária, foram tratadas ou não com diferentes concentrações de IFN-γ. A indução da expressão do proteassomo imune foi confirmada nas três concentrações utilizadas de IFN-γ (100U, 200U ou 400U) em células HeLa. Em um momento inicial, células HEK293H também foram utilizadas para verificar a expressão do proteassomo imune, entretanto, não se observou a presença da subunidade β5i nas células tratadas com IFN-γ (Figura 6). Portanto, o modelo celular utilizado para os demais experimento foram as células HeLa.

Para confirmar a presença do proteassomo imune em células tratadas com IFN-γ, o ensaio de atividade quimotripsina-*simile* do proteassomo foi realizado, confirmando o esperado aumento dessa atividade enzimática do proteassomo quando comparado com controle, conforme trabalhos anteriores (TOES et al., 2001). Enquanto o aumento da atividade quimotripsina-simile do proteassomo foi em torno de 13% em células tratadas por 24 horas com IFN-γ, o aumento no tempo de 48 horas foi em torno de 21%, comparado com os controles. Devido a isso, para os experimentos de análise do peptidoma induzido pelo IFN-γ, o tempo utilizado de tratamento foi de 48 horas.

Após confirmar por ensaio com MTT que há perda pequena da viabilidade celular das células tratadas com IFN-γ nessas condições, três experimentos de indução do proteassomo imune foram realizados em dias diferentes a fim de gerar triplicatas experimentais para o peptidoma. As amostras, que foram anteriormente marcadas com isótopos pesados e leves, foram injetadas de forma independente no espectrômetro de massas. Como resultado da análise do peptidoma, foi possível encontrar 42 peptídeos com as sequências identificadas através do programa MASCOT. Destes, apenas um peptídeo demonstrou aumento superior a 3 vezes no grupo experimental em relação ao controle (Tabela 1).

O peptídeo chamado de EL28, cuja sequência de aminoácidos está sendo reservada por motivos de proteção de propriedade intelectual, foi derivado da clivagem da proteína PRS4-HUMAN (*26S protease regulatory subunit 4*), também conhecida como Rpt2.

Analisando os possíveis sítios de clivagem nessa proteína pelo proteassomo constitutivo e imune através da ferramenta online PCPS, o peptídeo encontrado em maior

quantidade nas amostras extraídas de células tratadas com IFN-y, é provavelmente um produto gerado pelo proteassomo imune.

A proteína Rpt2 faz parte de uma família de ATPases que reside dentro da partícula regulatória 19S. Tem sido proposto que essas proteínas (Rpt1 a Rpt6) mediam o desdobramento do substrato que é necessário para a sua entrada no interior do barril catalítico do proteassomo 20S (DEMARTINO et al., 1994; HERSHKO et al., 1984; HOFFMAN; RECHSTEINER, 1994) (Figura15). Os anéis de ATPase associam-se com os anéis α do 20S, e na presença de ATP desdobram as proteínas substrato e promovem sua translocação através do canal da partícula 20S (KOHLER et al., 2001; SMITH et al., 2005). As Rpts pertencem a família *Walker* de ATPases as quais possuem os domínios *Walker* A (GPPGTGKT) e *Walker* B (IIFFDEID) que se ligam e hidrolisam o ATP, respectivamente (WALKER et al., 1982). Vários estudos investigando as funções das Rpts os quais as têm relacionado com a função de promover a ligação da partícula 19S com o complexo 20S, que leva à abertura do anel α, promovendo a entrada do substrato dentro do barril catalítico permitindo sua degradação posterior. Substituições realizadas no resíduo invariável de lisina do domínio Walker A resultou em uma inibição parcial ou completa da ligação e hidrólise de ATP (SUNG et al., 1988). As ATPases possuem um domínio HbYX conservado no C-terminal (um resíduo hidrofóbico, um resíduo de tirosina e um resíduo de aminoácido qualquer, respectivamente). Estudos demonstraram que mutações no domínio HbYX das ATPases prejudicam a formação do complexo 19S-20S e, consequentemente, falham em estimular a abertura do complexo 20S (SMITH et al., 2007).

Levando estes estudos em consideração, decidimos testar o efeito do peptídeo EL28 na atividade do proteassomo. Extratos protéicos de células HeLa contendo 20µg de proteína foram incubados com 50µM ou 100µM do peptídeo EL28 por 30 minutos e em seguida foi adicionado o substrato luminescente Suc-LLVY-Glo™. Devido ao fato de as amostras biológicas conterem compostos fluorescentes naturais que contribuem para o *background* e, além do mais, substratos fluorescentes serem limitantes para ensaios realizados em sistemas com o proteassomo purificado (KISSELEV; GOLDBERG, 2005), optamos por utilizar o substrato luminescente, visto que para o ensaio de atividade utilizamos o extrato protéico total. O peptídeo EL28 demonstrou um efeito potenciador da atividade quimotripsina-*símile* do proteassomo, tanto *in vitro* como *in vivo*, em ambas as concentrações utilizadas do peptídeo (50 e 100 µM).

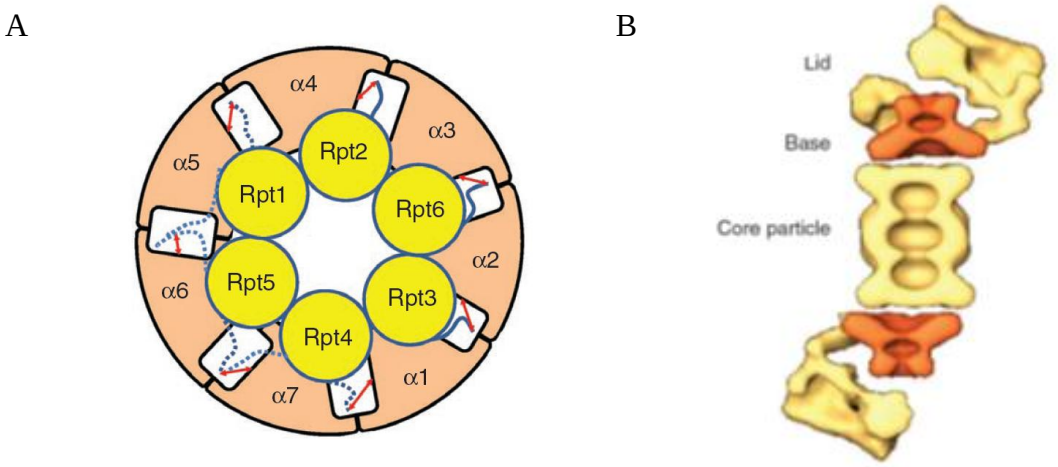


Figura 15. Modelo do complexo *base-core* (19S-20S) do proteassomo. A. Mapeamento das seis caldas de Rpts se ligando aos sete subunidades α da partícula core. As subunidades α estão em bege com "bolsos" em branco. As subunidades Rpts estão em amarelo com a cauda C-terminal em azul. As setas em vermelho representam uma única ligação cruzada do C-terminal de um Rpt com um bolso α específico. As linhas tracejadas indicam a ligação cruzada da cauda C-terminal de um Rpts com vários bolsos α. (TIAN et al., 2011). **B.** Desalinhamento da partícula core (20S)- partícula regulatória (19S) da holoenzima do proteassomo como revelado por microscopia crioeletrônica. Imagem média de marcação negativa do proteassomo de *Drosophila melanogaster*. A densidade atribuída aos anéis Rpts é dada em laranja, o restante do proteassomo em amarelo. Adaptado com permissão de (NICKELL et al., 2009)

Para verificar o efeito do peptídeo EL28 nas outras duas atividades do proteassomo, tripsina-*simile* e caspase-*símile*, foram analisados utilizando os substratos Z-LRR-Glo^{TM} e Z-nLPnLD-Glo^{TM}, respectivamente. O peptídeo EL28 (50 µM) também demonstrou também potenciar essas duas atividades do proteassomo em ensaios realizados *in-vitro*.

Tem sido descritos diversos inibidores naturais ou sintéticos para o proteassomo sendo o primeiro peptídeo inibidor do proteassomo descrito na década de 1990 (FENTEANY; SCHREIBER, 1998). Devido à inibição proteassomal promover a apoptose, o proteassomo é um importante alvo para o desenvolvimento de novas drogas (HUANG; CHEN, 2009). Entretanto, há pouco descrito sobre ativadores do proteassomo. A ativação do proteassomo é benéfica para o aumento do tempo de vida celular (CHONDROGIANNI; GONOS, 2008; KWAK et al., 2007). Estudos com a partícula regulatória 19S têm identificado várias subunidades que diminuem durante a senescência (HUANG; CHEN, 2009; KISSELEV; KAGANOVICH; GOLDBERG, 2002). A transfecção de β5i em linfoblastos e células HeLa demonstrou um aumento da atividade do proteassomo em T-L e CT-L (GACZYNSKA et al., 1994). Além disso, a superexpressão de β1 e β1i em células HeLa mostrou uma estimulação similar de T-L (CHONDROGIANNI et al., 2005). Alterações estruturais das subunidades do proteassomo têm mostrado alteração na atividade do proteassomo através da mudança conformacional do barril 20S. Inicialmente, SDS estimula a atividade proteassomal

(DAHLMANN et al., 1985) enquanto que cloreto de potássio inibe a atividade do proteassomo (KOHLER et al., 2001) por favorecerem a abertura ou o fechamento da conformação do proteassomo, respectivamente. Tem sido demonstrado que peptídeos hidrofóbicos se ligam em locais não catalíticos imitando assim o complexo 19S abrindo ou fechando o poro α do complexo 20S (KISSELEV; KAGANOVICH; GOLDBERG, 2002). Essa mudança conformacional leva a um efeito estimulatório na atividade do proteassomo promovendo a resistência celular, como por exemplo, stress oxidativo (KATSIKI et al., 2007).

Diante dos resultados apresentados nessa dissertação, o peptídeo EL28 pode ser um novo ativador do proteassomo. Tendo em vista que esse peptídeo é derivado da degradação da proteína Rpt2, que na literatura tem sido relacionada com a função de promover a abertura do anel α do barril catalítico do proteassomo, acreditamos que o peptídeo EL28 possa estar mimetizando a função da proteína da qual teve origem. Cerca de 20 a 30% do proteassomo em células de mamíferos é livre de partícula regulatória 19S (BABBITT et al., 2005; TANAHASHI et al., 2000), então mais estudos são necessários para saber se o peptídeo EL28 pode estar agindo diretamente no proteassomo 20S, ou nas subunidades Rpts.

Como a inibição da subunidade β5i (LMP7) leva a uma diminuição na produção de interleucinas e também leva a uma mudança na diferenciação de células T helper (BASLER et al., 2010; HENSLEY et al., 2010; MUCHAMUEL et al., 2009; SCHMIDT et al., 2010), nossos dados nos levam a sugerir investigações posteriores sejam importantes, para determinar a possível significância biológica e/ou terapêutica do peptídeo EL28.

6 CONCLUSÃO

Como demonstrado neste trabalho, um dos possíveis efeitos biológicos do peptídeo EL28 (EL28) é potenciar a atividade catalítica do proteassomo. Os efeitos biológicos observados, seguido da inibição de proteassomo imune por inibidores específicos, tais como o PR-957 pode ser, pelo menos em parte, relacionado com a falta de aumento do peptídeo EL28 dentro das células, com a consequente redução na atividade de LMP7 (β5i). Assim, o peptídeo EL28 pode ser um dos peptídeos de ativação na produção de antígenos e a sua importância pode ter relevância clínica no tratamento de distúrbios relacionados com a apresentação de antígenos por MHC-I.

REFERÊNCIAS*

AIKEN, C. T. et al. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 10, n. 5, p. R110 006924, 2011.

AKI, M. et al. Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. **J. Biochem.**, v. 115, n. 2, p. 257-269, 1994.

BABBITT, S. E. et al. Atp hydrolysis-dependent disassembly of the 26s proteasome is part of the catalytic cycle. **Cell.**, v. 121, n. 4, p. 553-565, 2005.

BASLER, M. et al. Prevention of experimental colitis by a selective inhibitor of the immunoproteasome. **J. Immunol.**, v. 185, n. 1, p. 634-641, 2010.

BAUMEISTER, W. et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. **Cell.**, v. 92, n. 3, p. 367-380, 1998.

BECH-OTSCHIR, D. et al. Cop9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. **EMBO. J.**, v. 20, n. 7, p. 1630-1639, 2001.

BERTI, D. A. et al. Analysis of intracellular substrates and products of thimet oligopeptidase in human embryonic kidney 293 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 21, p. 14105-14116, 2009.

BERTI, D. A. et al. Identification of intracellular peptides in rat adipose tissue: Insights into insulin resistance. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2668-2681, 2012.

BOES, B. et al. Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20s mouse proteasomes. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 3, p. 901-909, 1994.

BOUNPHENG, M. A. et al. Degradation of id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. **FASEB J.**, v. 13, n. 15, p. 2257-2264, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n., p. 248-254, 1976.

BUSCHMANN, T. et al. Sumo-1 modification of mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases mdm2 ability to ubiquitinate p53. **Cell.**, v. 101, n. 7, p. 753-762, 2000.

CASTRO, L. M. et al. Similar intracellular peptide profile of tap1/beta2 microglobulin double-knockout mice and c57bl/6 wild-type mice as revealed by peptidomic analysis. **AAPS J.**, v. 12, n. 4, p. 608-616, 2010.

CAUDILL, C. M. et al. T cells lacking immunoproteasome subunits mecl-1 and lmp7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. **J. Immunol.**, v. 176, n. 7, p. 4075-4082, 2006.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHAPIRO, J. et al. Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. **J. Immunol.**, v. 176, n. 2, p. 1053-1061, 2006.

CHE, F. Y.; FRICKER, L. D. Quantitation of neuropeptides in cpe(fat)/cpe(fat) mice using differential isotopic tags and mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 74, n. 13, p. 3190-3198, 2002.

CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E. S. Proteasome activation as a novel antiaging strategy. **IUBMB Life**, v. 60, n. 10, p. 651-655, 2008.

CHONDROGIANNI, N. et al. Overexpression of proteasome beta5 assembled subunit increases the amount of proteasome and confers ameliorated response to oxidative stress and higher survival rates. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 12, p. 11840-11850, 2005.

COUX, O.; TANAKA, K.; GOLDBERG, A. L. Structure and functions of the 20s and 26s proteasomes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 65, p. 801-847, 1996.

CUNHA, F. M. et al. Intracellular peptides as natural regulators of cell signaling. **J. Biol. Chem.**, v. 283, n. 36, p. 24448-24459, 2008.

DA FONSECA, P. C.; HE, J.; MORRIS, E. P. Molecular model of the human 26s proteasome. **Mol. Cell.**, v. 46, n. 1, p. 54-66, 2012.

DAHLMANN, B. Role of proteasomes in disease. **BMC Biochem.**, v. 8 Suppl 1, p. S3, 2007.

DAHLMANN, B. et al. Activation of the multicatalytic proteinase from rat skeletal muscle by fatty acids or sodium dodecyl sulphate. **Biochem J**, v. 228, n. 1, p. 171-177, 1985.

DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins by the 20s proteasome. **Biochimie.**, v. 83, n. 3-4, p. 301-310, 2001.

DE GRAAF, N. et al. Pa28 and the proteasome immunosubunits play a central and independent role in the production of mhc class i-binding peptides in vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 4, p. 926-935, 2011.

DE VERTEUIL, D. et al. Deletion of immunoproteasome subunits imprints on the transcriptome and has a broad impact on peptides presented by major histocompatibility complex i molecules. **Mol. Cell Proteomics**, v. 9, n. 9, p. 2034-2047, 2010.

DEMARTINO, G. N. et al. Pa700, an atp-dependent activator of the 20 s proteasome, is an atpase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 33, p. 20878-20884, 1994.

DEMO, S. D. et al. Antitumor activity of pr-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. **Cancer Res.**, v. 67, n. 13, p. 6383-6391, 2007.

DICK, T. P. et al. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator pa28 lead to dominant mhc ligands. **Cell.**, v. 86, n. 2, p. 253-262, 1996.

DREWS, O. et al. Mammalian proteasome subpopulations with distinct molecular compositions and proteolytic activities. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 6, n. 11, p. 2021-2031, 2007.

FENTEANY, G.; SCHREIBER, S. L. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 15, p. 8545-8548, 1998.

FERRO, E. S.; HYSLOP, S.; CAMARGO, A. C. Intracellullar peptides as putative natural regulators of protein interactions. **J. Neurochem.**, v. 91, n. 4, p. 769-777, 2004.

FINLEY, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 78, p. 477-513, 2009.

FORSTER, A. et al. The 1.9 a structure of a proteasome-11s activator complex and implications for proteasome-pan/pa700 interactions. **Mol. Cell.**, v. 18, n. 5, p. 589-599, 2005.

FOSS, G. S. et al. Constitutive and interferon-gamma-induced expression of the human proteasome subunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1402, n. 1, p. 17-28, 1998.

FRICKER, L. D. et al. Peptidomic analysis of hek293t cells: effect of the proteasome inhibitor epoxomicin on intracellular peptides. **J. Proteome Res.**, v. 11, n. 3, p. 1981-1990, 2012.

GACZYNSKA, M.; ROCK, K. L.; GOLDBERG, A. L. Role of proteasomes in antigen presentation. **Enzyme Protein**, v. 47, n. 4-6, p. 354-369, 1993.

GACZYNSKA, M. et al. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for lmp2 and lmp7. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, n. 20, p. 9213-9217, 1994.

GELMAN, J. S. et al. Alterations of the intracellular peptidome in response to the proteasome inhibitor bortezomib. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53263, 2013.

GELMAN, J. S. et al. Peptidomic analysis of human cell lines. **J. Proteome. Res.**, v. 10, n. 4, p. 1583-1592, 2011.

GLICKMAN, M. H. et al. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the cop9-signalosome and eif3. **Cell.**, v. 94, n. 5, p. 615-623, 1998a.

GLICKMAN, M. H. et al. The regulatory particle of the saccharomyces cerevisiae proteasome. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, n. 6, p. 3149-3162, 1998b.

GROETTRUP, M.; KIRK, C. J.; BASLER, M. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 73-78, 2009.

GROETTRUP, M. et al. The interferon-gamma-inducible 11 s regulator (pa28) and the lmp2/lmp7 subunits govern the peptide production by the 20 s proteasome in vitro. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 40, p. 23808-2380815, 1995.

HALLERMALM, K. et al. Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class i presentation pathway, resulting in increased stability of class i complexes at the cell surface. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1108-1115, 2001.

HAYNES, C. M. et al. The matrix peptide exporter haf-1 signals a mitochondrial upr by activating the transcription factor zc376.7 in c. Elegans. **Mol. Cell.**, v. 37, n. 4, p. 529-540, 2010.

HEINK, S. et al. Ifn-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 102, n. 26, p. 9241-9246, 2005.

HENSLEY, S. E. et al. Unexpected role for the immunoproteasome subunit lmp2 in antiviral humoral and innate immune responses. **J. Immunol.**, v. 184, n. 8, p. 4115-4122, 2010.

HERSHKO, A. et al. Atp-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 81, n. 6, p. 1619-1623, 1984.

HILLER, M. M. et al. Er degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. **Science**, v. 273, n. 5282, p. 1725-1728, 1996.

HOFFMAN, L.; RECHSTEINER, M. Activation of the multicatalytic protease. The 11 s regulator and 20 s atpase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 24, p. 16890-16895, 1994.

HUANG, L.; CHEN, C. H. Proteasome regulators: activators and inhibitors. **Curr. Med. Chem.**, v. 16, n. 8, p. 931-939, 2009.

KAISER, P. et al. Cyclin-dependent kinase and cks/suc1 interact with the proteasome in yeast to control proteolysis of m-phase targets. **Genes Dev.**, v. 13, n. 9, p. 1190-1202, 1999.

KATSIKI, M. et al. The olive constituent oleuropein exhibits proteasome stimulatory properties in vitro and confers life span extension of human embryonic fibroblasts. **Rejuvenation Res.**, v. 10, n. 2, p. 157-172, 2007.

KESMIR, C. et al. Bioinformatic analysis of functional differences between the immunoproteasome and the constitutive proteasome. **Immunogenetics**, v. 55, n. 7, p. 437-449, 2003.

KISSELEV, A. F.; GOLDBERG, A. L. Monitoring activity and inhibition of 26s proteasomes with fluorogenic peptide substrates. **Methods Enzymol.**, v. 398, p. 364-378, 2005.

KISSELEV, A. F.; KAGANOVICH, D.; GOLDBERG, A. L. Binding of hydrophobic peptides to several non-catalytic sites promotes peptide hydrolysis by all active sites of 20 s proteasomes. Evidence for peptide-induced channel opening in the alpha-rings. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 25, p. 22260-22270, 2002.

KLARE, N. et al. Intermediate-type 20 s proteasomes in hela cells: "Asymmetric" Subunit composition, diversity and adaptation. **J. Mol. Biol.**, v. 373, n. 1, p. 1-10, 2007.

KLOETZEL, P. M. Antigen processing by the proteasome. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 2, n. 3, p. 179-187, 2001.

KOHLER, A. et al. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the rpt2 atpase and controls both substrate entry and product release. **Mol. Cell.**, v. 7, n. 6, p. 1143-1152, 2001.

KWAK, M. K. et al. Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 43, n. 5, p. 809-817, 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEE, C. et al. Atp-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal. **Mol. Cell.**, v. 7, n. 3, p. 627-637, 2001.

MORANO, C.; ZHANG, X.; FRICKER, L. D. Multiple isotopic labels for quantitative mass spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 23, p. 9298-9309, 2008.

MOREL, S. et al. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. **Immunity**, v. 12, n. 1, p. 107-117, 2000.

MUCHAMUEL, T. et al. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit lmp7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. **Nat. Med.**, v. 15, n. 7, p. 781-787, 2009.

NICKELL, S. et al. Insights into the molecular architecture of the 26s proteasome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 106, n. 29, p. 11943-11947, 2009.

NUSSBAUM, A. K. et al. Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal cd8+ t cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. **J. Immunol.**, v. 175, n. 2, p. 1153-1160, 2005.

OSMULSKI, P. A.; GACZYNSKA, M. Atomic force microscopy reveals two conformations of the 20 s proteasome from fission yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 18, p. 13171-13174, 2000.

RABL, J. et al. Mechanism of gate opening in the 20s proteasome by the proteasomal atpases. **Mol. Cell.**, v. 30, n. 3, p. 360-368, 2008.

RAVID, T.; HOCHSTRASSER, M. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 9, n. 9, p. 679-690, 2008.

RICHMOND, C.; GORBEA, C.; RECHSTEINER, M. Specific interactions between atpase subunits of the 26 s protease. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 20, p. 13403-13411, 1997.

RIOLI, V. et al. Novel natural peptide substrates for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 10, p. 8547-8555, 2003.

ROCK, K. L.; GOLDBERG, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of mhc class i-presented peptides. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 739-779, 1999.

ROCK, K. L. et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on mhc class i molecules. **Cell**, v. 78, n. 5, p. 761-771, 1994.

RUSSO, L. C. et al. Natural intracellular peptides can modulate the interactions of mouse brain proteins and thimet oligopeptidase with 14-3-3epsilon and calmodulin. **Proteomics**, v. 12, n. 17, p. 2641-2655, 2012.

SCHMIDT, N. et al. Targeting the proteasome: partial inhibition of the proteasome by bortezomib or deletion of the immunosubunit lmp7 attenuates experimental colitis. **Gut.**, v. 59, n. 7, p. 896-906, 2010.

SIJTS, A. J. et al. Efficient generation of a hepatitis b virus cytotoxic t lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. **J. Exp. Med.**, v. 191, n. 3, p. 503-514, 2000.

SMITH, D. M. et al. Docking of the proteasomal atpases' carboxyl termini in the 20s proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. **Mol. Cell.**, v. 27, n. 5, p. 731-744, 2007.

SMITH, D. M. et al. Atp binding to pan or the 26s atpases causes association with the 20s proteasome, gate opening, and translocation of unfolded proteins. **Mol. Cell.**, v. 20, n. 5, p. 687-698, 2005.

SOUGHAYER, J. S. et al. Characterization of tat-mediated transport of detachable kinase substrates. **Biochemistry**, v. 43, n. 26, p. 8528-8540, 2004.

SUNG, P. et al. Mutation of lysine-48 to arginine in the yeast rad3 protein abolishes its atpase and DNA helicase activities but not the ability to bind atp. **EMBO. J.**, v. 7, n. 10, p. 3263-3269, 1988.

TANAHASHI, N. et al. Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to atp-dependent proteolysis. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 19, p. 14336-14345, 2000.

TIAN, G. et al. An asymmetric interface between the regulatory and core particles of the proteasome. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 18, n. 11, p. 1259-1267, 2011.

TOES, R. E. et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. **J. Exp. Med.**, v. 194, n. 1, p. 1-12, 2001.

UDENFRIEND, S. et al. Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range. **Science**, v. 178, n. 4063, p. 871-872, 1972.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A. et al. Cell mediated cytotoxicity against u 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric mtt assay. A methodological study. **J. Immunol. Methods.**, v. 141, n. 1, p. 15-22, 1991.

VERMA, R. et al. Phosphorylation of sic1p by g1 cdk required for its degradation and entry into s phase. **Science**, v. 278, n. 5337, p. 455-460, 1997.

WALKER, J. E. et al. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of atp synthase, myosin, kinases and other atp-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. **EMBO. J.**, v. 1, n. 8, p. 945-951, 1982.

WEBER-BAN, E. U. et al. Global unfolding of a substrate protein by the hsp100 chaperone clpa. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 90-93, 1999.

YANG, Y. et al. Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 89, n. 11, p. 4928-4932, 1992.

YEWDELL, J. W.; REITS, E.; NEEFJES, J. Making sense of mass destruction: quantitating mhc class i antigen presentation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 12, p. 952-961, 2003.